PolyPublie
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Stimulation d'une microflore des eaux souterraines : évaluation de l'innocuité environnementale dans une perspective de biocolmatage d'un milieu géologique fracturé
Auteur: Author:	Nathalie Ross
Date:	1999
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Ross, N. (1999). Stimulation d'une microflore des eaux souterraines : évaluation de l'innocuité environnementale dans une perspective de biocolmatage d'un milieu géologique fracturé [Ph.D. thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/8801/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/8801/
Directeurs de recherche: Advisors:	Yves Comeau, & Réjean Samson
Programme: Program:	Unspecified

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

STIMULATION D'UNE MICROFLORE DES EAUX SOUTERRAINES: ÉVALUATION DE L'INNOCUITÉ ENVIRONNEMENTALE DANS UNE PERSPECTIVE DE BIOCOLMATAGE D'UN MILIEU GÉOLOGIQUE FRACTURÉ

NATHALIE ROSS
DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE CIVIL)
DÉCEMBRE 1999

© Nathalie Ross, 1999.

National Library of Canada
Acquisitions and Bibliographic Services
395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale du Canada
Acquisitions et services bibliographiques
395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-53544-4

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

STIMULATION D'UNE MICROFLORE DES EAUX SOUTERRAINES: ÉVALUATION DE L'INNOCUITÉ ENVIRONNEMENTALE DANS UNE PERSPECTIVE DE BIOCOLMATAGE D'UN MILIEU GÉOLOGIQUE FRACTURÉ

présentée par: ROSS Nathalie

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de:

M. AUBERTIN Michel, Ph.D., président du jury

M. COMEAU Yves, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. SAMSON Réjean, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

Mme LESAGE Suzanne, Ph.D., membre externe

M. RHO Denis, Ph.D., membre externe

''Quand on est petit,
pour être quelqu'un
il faut être plusieurs''
Les bactéries de la biobarrière
citant Romain Gary dans:
La vie devant soi

REMERCIEMENTS

La réussite de ce projet englobe plusieurs facteurs dont la disponibilité de scientifiques à générer des échanges constructifs. Des rencontres, officielles quelquefois ou improvisées à d'autres occasions, avec les professeurs Yves Comeau, Réjean Samson et Louise Deschênes ont stimulé le processus intellectuel tout au long du projet. Mais encore, une contribution à la formation d'une future chercheure a été omniprésente notamment par une confiance soutenue, incluant la représentation du groupe de recherche à des symposiums internationaux et la responsabilité de charge de cours.

La participation de personnes-ressources à différentes étapes du projet a également concouru à son avancement. M. Martin Héroux et M. Michel Demers, du Complexe environnemental de Saint-Michel, ont permis un approvisionnement en eau souterraine et ont généreusement répondu à des interrogations techniques concernant le pompage et les analyses de l'eau souterraine. M. Jacques Bureau et le professeur Bernard Clément ont apporté leur savoir-faire scientifique dans les domaines de l'écotoxicologie et de la statistique, respectivement. Une collaboration avec le professeur Richard Villemur et M. Éric Déziel de l'Institut Armand-Frappier a permis d'approfondir les connaissances sur la diversité microbienne des eaux souterraines et des biofilms. La conceptualisation d'un montage de laboratoire représentatif d'une nappe aquifère de roc fracturé a été réalisée avec le concours du professeur Robert Chapuis et M. Antonio Gatien. Finalement, l'atmosphère de travail de la Chaire, stimulante et propice aux échanges scientifiques et techniques, a contribué à cimenter les aspects inhérents à la démarche scientifique.

Cette recherche a été soutenue financièrement par les Partenaires de la Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites: Alcan, Bodycote/Analex, Bell Canada, BFI, Cambior, Chemin de fer Canadien Pacifique, CQVB, CRSNG, Elf Aquitaine, Hydro-Québec, Petro-Canada, SNC-Lavalin, Solvay et la Ville de Montréal. La *Fondation québécoise de la recherche en environnement* de Réseau Environnement a participé financièrement via l'attribution d'une bourse de recherche. À vous tous, merci.

RÉSUMÉ

La complexité de l'écoulement des contaminants dans les rocs fracturés ainsi que les coûts associés à l'excavation diminuent considérablement les alternatives de restauration. Parmi ces alternatives, le confinement de la contamination par des barrières physiques s'avère problématique en raison de la difficulté d'atteindre les fractures et la toxicité de certains matériaux. En matière de technologie de décontamination, et particulièrement dans le cas des biotechnologies, les notions d'écotoxicité et de préservation de la biodiversité doivent être prises en considération pour satisfaire aux exigences des lois et des politiques environnementales canadiennes.

Une biobarrière *in situ* est envisagée pour le confinement des contaminants dans un aquifère de roc ayant des ouvertures de fractures entre 10^{-1} et 10^{3} µm. Le développement de la biobarrière consiste en une stimulation de la microflore indigène de l'eau souterraine. La stimulation s'effectue par l'injection de nutriments et d'accepteurs d'électrons, nécessaires au métabolisme des micro-organismes pour leur multiplication et la sécrétion d'exopolysaccharides (EPS). Les EPS adhèrent au roc et forment une matrice appelée biofilm, dans laquelle les micro-organismes se développent.

Quoique les microflores des eaux souterraines contiennent généralement des bactéries productrices d'EPS, les biobarrières sont souvent formées dans les aquifères via l'injection de bactéries. Cette approche a montré des résultats significatifs de diminution de conductivité hydraulique. Cependant, la faible persistance des bactéries injectées peut amener des problèmes de longévité de la biobarrière. De plus, les effets de l'injection de bactéries sur la diversité microbienne indigène et l'écosystème demeurent inconnus.

Les recherches ont été orientées par les interrogations suivantes: 1- Est-ce que le concept des biobarrières, récemment utilisé dans un aquifère sablonneux, peut s'appliquer aux milieux fracturés? 2- La biostimulation s'avère-t-elle aussi efficace pour développer une biobarrière que l'injection de bactéries? 3- Quels sont les impacts sur la biodiversité et les

risques écotoxicologiques d'une telle biostimulation? Les travaux ont été concentrés sur l'application de la biostimulation dans uneperspectivede colmatage d'un aquifère de roc fracturé, observant les changements de diversité de la microflore indigène et les réponses écotoxicologiques.

L'hypothèse qui sous-tend le projet est la suivante: «La stimulation d'une microflore indigène de l'eau souterraine, via l'injection de nutriments et d'accepteurs d'électrons, permettra la croissance des cellules microbiennes et la production d'EPS, menant au colmatage d'un milieu rocheux fracturé, lequel développement préservera l'innocuité du système.» Les objectifs visés étaient: 1- mesurer les effets des facteurs physico-chimiques pertinents pour le développement d'un biofilm sur une surface reproduisant un roc, 2- évaluer l'écotoxicité de la biostimulation par l'utilisation de deux biotests, comparant les réponses écotoxiques de différents échantillons témoins, d'eau et de biofilms, 3- déterminer les changements de la biodiversité génétique et fonctionnelle occasionnés par la biostimulation en réalisant une étude comparative de la communauté microbienne initiale de l'eau souterraine et celle dans le biofilm, en mettant l'emphase sur les ultramicrobactéries (UMB), 4- développer un montage expérimental rocheux fracturé permettant de réaliser un essai de biocolmatage en condition dynamique et 5- montrer le potentiel de colmatage d'une fracture dans un roc calcaire.

Pour ce faire, deux approches expérimentales ont été utilisées (en cuvée et en continu). Le premier montage consistait en une série de réservoirs de 1 L, contenant 500 mL d'eau souterraine synthétique, dans lesquels une microflore, isolée d'une nappe aquifère de l'Île de Montréal, était resuspendue. Le biofilm se développait sur une plaque de céramique immergée, simulant une surface de roc. Les nutriments y étaient injectés manuellement sur une base journalière. Ce montage a permis d'utiliser un plan statistique de Plackett Burman afin de mesurer les effets de plusieurs facteurs sur la biomasse en suspension, les EPS en suspension et l'épaisseur du biofilm (Objectifs 1 à 3, Chapitres IV et V). Le deuxième montage a servi à mesurer le biocolmatage d'une fracture d'un roc calcaire (0,05 cm × 0,5 cm × 50 cm) en mesurant des variations de conductivité hydraulique de

l'ordre de 2 cm min^{-1}. Dans un premier temps, le bloc de calcaire a été inoculé avec la microflore, utilisant un circuit en boucle. Dans un deuxième temps, le bloc a été alimenté en eau souterraine synthétique et en nutriments pour favoriser le développement du biofilm. L'étendue du colmatage a été mesurée par la diminution du débit de l'effluent et l'augmentation de la perte de charge hydraulique (Objectifs 4 et 5, Chapitre VI).

Les résultats de l'étude portant sur les facteurs physico-chimiques (Objectif 1) ont montré que l'épaisseur du biofilm était significativement influencée par trois facteurs: le type de source de carbone, la concentration de la source de carbone et le type d'aération ($p = 0.0001$). En utilisant les conditions les plus favorables, c'est-à-dire en présence de mélasse comme source de carbone, injectée à un taux de 20 mg m^{-2} min^{-1}, et en alimentation d'air par bullage (4.2 cm^3 s^{-1}), le biofilm a atteint une épaisseur de 250 µm, mesurée après six jours. L'ajout de pentachlorophénate de sodium (NaPCP) (10 mg L^{-1}, initialement) n'a pas affecté significativement l'épaisseur du biofilm ($p > 0,05$). Par contre, la biomasse dans l'eau souterraine était en moyenne de 22 % inférieure ($p = 0,0131$).

L'évaluation écotoxicologique (Objectif 2) a montré une inhibition de croissance de 80 % en moyenne de l'algue verte (*Selenastrum capricornutum*) lorsque exposée aux échantillons d'eau souterraine synthétique, fraîchement inoculée avec la microflore indigène, ainsi qu'aux échantillons de biofilms dispersés dans une solution saline (0.85 % NaCl). L'utilisation du test d'inhibition de la bioluminescence de *Vibrio fischeri* a permis de différencier les effets de la présence de NaPCP (diminution par un facteur de 10 de la concentration requise pour inhiber 20% de la bioluminescence) et la production de produits microbiens solubles (PMS) (diminution de moitié de la concentration requise pour inhiber 20% de la bioluminescence). La quantité de PMS dans l'eau est passée de 92 mg DCO L^{-1} initialement à 4 150 mg DCO L^{-1} après huit jours de biostimulation.

La diversité génétique a diminué tandis que la diversité fonctionnelle a augmenté lorsque la communauté initiale d'UMB de l'eau souterraine a été comparée à la communauté

microbienne du biofilm (Objectif 3). En effet, la comparaison de gels montrant la répartition de fragments d'ADN indiquait qualitativement une diminution de la diversité génétique entre l'eau et le biofilm. Le séquençage de gènes ARNr 16S a permis d'identifier des genres bactériens différents pour ces deux microflores. L'analyse de la diversité fonctionnelle (microplaques Biolog GN) a montré que la microflore du biofilm pouvait oxyder deux fois plus de types de source de carbone que les UMB initialement présentes dans l'eau.

Un montage représentatif fut développé pour l'étude du biocolmatage en condition dynamique (Objectif 4). Un essai de biocolmatage a permis de mesurer une diminution de la conductivité hydraulique de la fracture de 99.2 % après 22 jours de biostimulation (Objectif 5). Un séquençage des gènes ARNr 16S, isolés de l'eau souterraine, a montré une affiliation significative avec des genres bactériens producteurs d'EPS : *Cytophaga, Arcobacter et Rhizobium.* Un suivi des paramètres microbiologiques et physico-chimiques de l'effluent a indiqué une colonisation du roc et des conditions oxydoréductrices élevées (≡ 125 mV Ag/AgCl).

L'ensemble des résultats du projet supporte l'hypothèse selon laquelle une microflore indigène peut être stimulée à sécréter des EPS et développer un biofilm en conditions d'eau souterraine. La biostimulation peut être réalisée en injectant des nutriments simples et économiques, telle la mélasse. Le potentiel écotoxique, dû à l'accumulation de PMS, demeure faible dans une perspective d'application en condition dynamique. La biostimulation contribue à réduire le nombre d'espèces bactériennes de la microflore et parallèlement, semble modifier la structure de la communauté de façon à ce que les bactéries physiologiquement versatiles soient activées. À l'intérieur d'un délai d'un mois, la biostimulation de cette même microflore a entraîné une diminution de deux ordres de grandeur de la conductivité hydraulique d'une fracture ayant une ouverture 2.5 mm^2. D'autres recherches devront démontrer les aspects de persistance et de résistance de la biobarrière en conditions dynamiques.

ABSTRACT

The complexity of contaminant movement in fractured rocks as well as the costs associated to extraction diminish considerably the restoration options. One of those alternatives, the confinement of contaminants with physical barriers, becomes problematic by reason of the difficulty to reach the fractures and the toxicity of certain plugging materials.

In the matter of decontamination technologies, particularly in the case of biotechnologies, the definition of ecotoxicity and the preservation of a biodiverse environment have to be considered to satisfy the existing canadian laws and environmental policies.

An *in situ* biobarrier is considered for the confinement of contaminants in a rock aquifer having fracture openings between 10^{-1} et 10^{3} µm. The biobarrier is developed by stimulating the indigenous microflora of the groundwater. Stimulation, by the injection of nutrients and electron acceptors, is necessary to the metabolism of micro-organisms for their multiplication and secretion of exopolysaccharides (EPS). EPS adhere to the rock and form a biofilm, in which the micro-organisms develop.

Although groundwaters usually contain bacteria which produce EPS, biobarriers are generally formed in aquifers by injection of bacteria. This approach showed significant results in the decrease of the hydraulic conductivity. However, the low survival rate of the injected bacteria could lead to a problem of sustainability of the biobarrier. Furthermore, the effects of the injection of bacteria on the indigenous microflora and the ecosystem remain unknown.

The base of research stimulated questions to be addressed: 1- Could the concept of biobarriers, recently applied in a sand aquifer, be extended to fractured media? 2- Could

the biostimulation be as effective to develop a biobarrier as the injection of bacteria? 3- What are the impacts on the biodiversity and the ecotoxicological risks of such a biostimulation? The focus of the present project was on the use of biostimulation in the prospect of clogging a fractured rock aquifer, assessing changes in the microbial diversity and ecotoxicological responses.

The hypothesis underlying the project was the following: "The stimulation of an indigenous groundwater microflora, by the injection of nutrients and electron acceptors, allows the multiplication of microbial cells and secretion of EPS, leading to the clogging of a fractured geological media, development of which will preserve the innocuousness." The objectives were: 1- to measure the effects of the physico-chemical factors pertinent to the development of a biofilm on a surface reproducing a rock, 2- to evaluate the ecotoxicity of such biostimulation by using two biotests to compare the ecotoxicological responses of controls, groundwater and biofilm samples, 3- to determine the changes of both the genetic and functional biodiversity following the biostimulation by comparing the initial microbial community in the groundwater to the resulting biofilm, focusing on ultramicrobacteria (UMB), 4- to develop a continuous flow system simulating the bioclogging of a fractured rock and 5- to show the potential of clogging a fracture in a limestone.

To reach those objectives, two experimental approaches were used: batch and continuous. The first apparatus consisted of 1 L reservoirs (500 mL of synthetic groundwater) in which a microflora, isolated from groundwater of the Montreal area, was resuspended. Biofilm developed on a ceramic coupon, which simulated a rock surface. Nutrients were added manually every day. This apparatus allowed several physico-chemical factors to be tested in duplicates (Objectives 1 to 3, Chapters IV and V). The second apparatus was used to monitor the bioclogging of a fracture in limestone (0.05 × 0.5 × 50 cm) observing variations in hydraulic conductivity as low as 2 cm min^{-1}. Initially, the limestone was inoculated with the microflora, using a closed-loop system.

Secondly, the limestone was fed with synthetic groundwater and nutrients for the development of the biofilm. The extent of bioclogging was measured by a reduction of the outflow rate and the increase in head loss between the beginning and the end of the fracture (Objectives 4 and 5, Chapter VI).

Results of the study of the physico-chemical factors (Objective 1) showed that the thickness of the biofilm was significantly affected by three factors: the type of carbon source, the concentration of the carbon source and the type of aeration ($p = 0.0001$). Under the best conditions tested, which were in the presence of molasses as carbon source (injection rate = 20 mg m^{-2} min^{-1}) and sparged air injection (4.2 cm^3 s^{-1}) the biofilm reached a thickness of 250 µm in six days. The addition of a spike of sodium pentachlorophenate (NaPCP, 10 mg L^{-1}) did not affect significantly the thickness of the biofilm ($p > 0.05$). Contrarily, the biomass in the groundwater was on average 22 % less ($p = 0.0131$).

The ecotoxicogical assessment (Objective 2) showed an inhibition of 80 % of the growth of green algae *Selenastrum capricornutum* when it was exposed to samples of synthetic groundwater, freshly inoculated with indigenous microflora, as well as the samples of biofilm dispersed in a saline solution (NaCl 0.85%). The use of the bioluminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) allowed to differentiate the effects of the presence of NaPCP (diminution by a factor of 10 of the concentration required to inhibit 20 % of the bioluminescence) and the production of soluble microbial products (SMP) (diminution by half of the concentration required to inhibit 20 % of the bioluminescence). The concentration of SMP increased from 92 to 4150 mg COD/L in eight days of biostimulation.

The genetic diversity decreased while the functional diversity increased when comparing UMB from the initial groundwater with the bacterial community of the biofilm (Objective 3). Indeed, the comparison of gels showing the distribution of DNA

fragments, indicated qualitatively a decrease of the genetic diversity between the groundwater and the biofilm. The sequencing of 16S rRNA genes revealed different bacterial groups for these two microflora. The analysis of the functional diversity (Biolog GN microplates system) showed that the biofilm microflora was able to oxidize two times more carbon source types than the UMB initially present in the groundwater.

A relevant apparatus was developed to study bioclogging under continuous flow conditions (Objective 4). A decrease in hydraulic conductivity of 99.2 % after 22 days was measured (Objective 5). A sequencing of 16S rRNA genes, isolated from groundwater, showed a significant affiliation with bacterial groups, known to produce EPS: *Cytophaga, Arcobacter and Rhizobium.* A monitoring of microbiological and physico-chemical parameters in the effluent indicated a colonization of the rock and a high oxydoreduction potential (≅ 125 mV Ag/AgCl).

The results of the project support the hypothesis being that an indigenous microflora can be stimulated to secrete EPS and develop a biofilm in groundwater conditions. The biostimulation can be achieved by injecting simple and economically viable nutrients, such as molasses. The ecotoxicological potential, due to the accumulation of SMP, remains low in the perspective of an application in continuous flow conditions. The biostimulation contributed to reduce the number of bacterial species in the microflora and seemed to modify the structure of the community by enhancing the activity of the most versatile bacteria, in relation to carbon sources oxydation. In a one-month period, the biostimulation of the same microflora led to a two orders of magnitude decrease in the hydraulic conductivity of a fracture having an opening of 2.5 mm^2. Further research should demonstrate the aspects of persistence and resistance of the biobarrier in continuous flow conditions.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE iv

REMERCIEMENTS v

RÉSUMÉ vi

ABSTRACT x

LISTE DES TABLEAUX xix

LISTE DES FIGURES xxi

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS xxiii

LISTE DES ANNEXES xxv

AVANT-PROPOS xxvi

CHAPITRE 1: INTRODUCTION 1

1.1 Problématique 1

1.2 Concept proposé 3

1.3 Approche de l'étude d'innocuité 6

1.4 Hypothèse et objectifs du projet 7

CHAPITRE 2: REVUE DE LITTÉRATURE 8

2.1 Eaux souterraines et nappes aquifères de roc fracturé 8

2.1.1 Biogéochimie des eaux souterraines 9

2.1.1.1 Composition chimique et dissolution du roc calcaire 9

2.1.1.2 Microflore générale et métabolisme significatif pour la biostimulation... 11

2.1.1.3 Écologie microbienne 15

2.1.1.4 Les cycles biogéochimiques 17
2.1.2 Écoulement dans les milieux rocheux fracturés 22
2.1.2.1 Conductivité hydraulique dans une fracture simple 24
2.1.2.2 Croissance et transport des micro-organismes 24
2.2 Les barrières verticales de confinement des eaux souterraines 25
2.2.1 Avantages et inconvénients des barrières physiques traditionnelles 26
2.2.1.1 Les rideaux d'injection 27
2.2.1.2 Les parois moulées 28
2.2.1.3 Les palplanches 29
2.2.2 La barrière biologique 30
2.2.2.1 Le système de biofilm et ses constituants 31
2.2.2.2 Étapes de formation et propriétés physico-chimiques des biofilms 38
2.2.2.3 Biocolmatage de milieux géologiques saturés 40
2.3 L'innocuité des biotechnologies environnementales 46
2.3.1 Effets sur la diversité de la microflore indigène 46
2.3.1.1 Changements de diversité génétique 48
2.3.1.2 Changements de diversité fonctionnelle mesurés par l'oxydation de sources de carbone 51
2.3.2 Évaluation écotoxicologique 56

CHAPITRE 3: SYNTHÈSE DU PROJET 61

3.1 Vue d'ensemble du projet 61
3.2 Approvisionnement en eau souterraine et conservation de la microflore 62
3.3 Détermination des effets des facteurs physico-chimiques sur le développement d'un biofilm sur une surface reproduisant un roc 63
3.4 Évaluation écotoxicologique des composantes eau et biofilm 66
3.5 Observation des changements de diversité microbienne suite à la biostimulation 68
3.6 Mesure du biocolmatage d'une fracture simple dans un bloc de calcaire 70

CHAPITRE 4: ÉVALUATION ÉCOTOXICOLOGIQUE ET EFFETS DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN BIOFILM EN CONDITIONS D'EAU SOUTERRAINE 73

4.1 Titre du manuscrit 73
4.2 Auteure et co-auteurs 73
4.3 « Abstract » 73
4.4 « Introduction » 74
4.5 « Methodology » 76
4.5.1 « Natural and synthetic groundwater » 76
4.5.2 « Microbial Enrichment » 76
4.5.3 « Biofilm Development Apparatus » 77
4.5.4 « Carbon sources, ions enrichment and model contaminant » 78
4.5.5 « Determination of the physico-chemical conditions effects » 78
4.5.6 « Evaluation of SMP production » 80
4.5.7 « Ecotoxicological assessment » 80
4.6 « Results and Discussion » 81
4.6.1 « Effects of physico-chemical conditions on microbial growth and biofilm development » 81
4.6.2 « SMPs accumulation and ecotoxicological assessment » 86
4.7 « Acknowledgments » 91
4.8 « Literature Cited » 91

CHAPITRE 5: STIMULATION D'UNE COMMUNAUTÉ D'ULTRAMICROBACTÉRIES DES EAUX SOUTERRAINES POUR LA FORMATION D'UN BIOFILM: COMPARAISON DES CHANGEMENTS DE DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET FONCTIONNELLE 97

5.1 Titre du manuscrit 97
5.2 Auteure et co-auteurs 97
5.3 « Abstract » 97

5.4 « Introduction » 98
5.5 « Material and Methods » 102
5.5.1 « Groundwater sampling and UMB isolation » 102
5.5.2 « UMB enumeration, EPS production, and biofilm development » 103
5.5.3 « Genetic Diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm » 103
5.5.3.1 "DNA extraction" 103
5.5.3.2 "PCR amplification and cloning of the 16S rRNA gene" 104
5.5.3.3 "Single Strand Conformational Polymorphism" 105
5.5.3.4 "DNA sequence and phylogenetic study" 105
5.5.4 « Functional diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm » 106
5.5.4.1 "Microplate inoculation and incubation" 106
5.5.4.2 "Data processing" 107
5.5.4.3 "Statistical analysis" 107
5.6 « Results » 108
5.6.1 « Groundwater UMB growth, EPS production, and biofilm development » 108
5.6.2 « Genetic diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm » 109
5.6.2.1 "Monitoring microbial diversity by SSCP" 109
5.6.2.2 "16S rRNA gene cloning" 111
5.6.3 « Functional diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm » 116
5.7 « Discussion » 119
5.8 « Acknowledgements » 123
5.9 « References » 124

CHAPITRE 6: BIOCOLMATAGE D'UN CALCAIRE FRACTURÉ AVEC UNE MICROFLORE INDIGÈNE DES EAUX SOUTERRAINES 131

6.1 Titre du manuscrit 131
6.2 Auteure et co-auteurs 131
6.3 « Abstract » 131
6.4 « Introduction » 132
6.5 « Material and methods » 135
6.5.1 « Groundwater sampling and preparation of the microbial population » 135
6.5.2 « Characterization of the microbial population » 136
6.5.3 « Single fracture apparatus and inoculation with the groundwater microbial population » 137
6.5.4 « Bioclogging measurement and analyses of the effluent » 139
6.6 « Results and discussion » 141
6.6.1 « Characterization of the microbial population » 141
6.6.2 « Bioclogging of the single fractured limestone rock » 144
6.7 « Conclusions » 149
6.8 « Acknowledgements » 150
6.9 « References » 150

CHAPITRE 7: CONCLUSIONS ET AVENUES DE RECHERCHE 159

7.1 Aspects physico-chimiques 159
7.2 Aspects d'écotoxicité 160
7.3 Aspects de diversité microbienne 161
7.4 Aspects d'hydrogéologie 163
7.5 Aspects socio-politiques 164
7.6 Projets de recherche découlant des travaux 164

RÉFÉRENCES 166

ANNEXES 199

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Synthèse des présentations orales et écrites du projet doctoral* xxvi
Tableau 2.1 Composés chimiques principaux des eaux souterraines 9
Tableau 2.2 Ions du roc calcaire 11
Tableau 2.3 Genres bactériens typiques des eaux souterraines 12
Tableau 2.4 Effets des interactions entre populations microbiennes 15
Tableau 2.5 Classification des fractures d'après leur longueur et leur largeur 23
Tableau 2.6 Porosité primaire et conductivité hydraulique de rocs intacts et fracturés ... 23
Tableau 2.7 Conductivité hydraulique des matériaux utilisés pour la construction d'une barrière verticale 26
Tableau 2.8 Avantages et inconvénients des rideaux d'injection 28
Tableau 2.9 Avantages et inconvénients des parois moulées 29
Tableau 2.10 Composition en glucides des EPS sécrétés par *Pseudomonas atlantis* 36
Tableau 2.11 Comparaison de la composition d'un biofilm avec celle de la biomasse en suspension 37
Tableau 2.12 Épaisseur et densité de biofilms formés par différentes populations bactériennes 39
Tableau 2.13 Diffusivité relative dans les biofilms 40
Tableau 2.14 Biocolmatage de milieux géologiques saturés 41
Tableau 2.15 Changements de diversité génétique de communautés microbiennes exposées à des contaminants 50
Tableau 2.16 Changements de diversité fonctionnelle de communautés microbiennes exposées à des contaminants 53
Tableau 2.17 Utilisation des bactéries pour l'évaluation écotoxicologique 59
Tableau 3.1 Références relative à l'échantillonnage de l'eau souterraine et la conservation de la microflore indigène 63

Tableau 3.2 Références relatives à la détermination des effets des facteurs physico-chimiques 64
Tableau 3.3 Références relatives à l'évaluation écotoxicologique 68
Tableau 3.4 Références relatives à l'étude de changements de diversité microbienne 69
Tableau 3.5 Références relatives à l'étude de biocolmatage 71
Tableau 4.1 Physico-Chemical Conditions for the Optimization of Biofilm Development on a Porous Media in Synthetic Groundwater 78
Tableau 4.2 The 8-run Basic[1] Experimental Design to Determine the Effects of Physico-Chemical Conditions on Biomass Growth and Biofilm Development 79
Tableau 4.3 Significant Effects of Physico-Chemical Factors on Microbial Production Variables over 192 hours 83
Tableau 4.4 Bioluminescence Inhibition of *Vibrio fischeri* Exposed to Water and Biofilm Samples for Different Inhibition Concentrations and Time Exposures 88
Tableau 5.1 Possible affiliation of the seventeen 16S rRNA cloned sequences obtained from groundwater UMB and the resulting biofilm community 111
Tableau 5.2 Substrate-guild analysis of UMB isolated from groundwater and the resulting biofilm community following 7 days of incubation of the Biolog GN microplates at 10 °C in darkness 118
Tableau 6.1 Characteristics of the single fractured apparatus and initial conditions 138
Tableau 6.2 Possible affiliations of the eight 16S rRNA cloned sequences obtained from groundwater 142

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma de la biobarrière 4
Figure 1.2 Biofilm développé dans une microfracture 4
Figure 2.1 Divisions des eaux du sol 8
Figure 2.2 Cycle du carbone 19
Figure 2.3 Cycle de l'azote 20
Figure 2.4 Cycle du fer 21
Figure 2.5 Cycle du soufre 22
Figure 2.6 Le système de biofilm et les interactions caractéristiques 32
Figure 2.7 Zones de différents potentiels d'oxydoréduction dans le biofilm 34
Figure 2.8 Concept de biodiversité totale reliant la diversité génétique, taxonomique et fonctionnelle 48
Figure 2.9 Hiérarchisation des effets des substances toxiques sur un écosystème 57
Figure 3.1 Démarche scientifique du projet 62
Figure 3.2 Réservoirs de 1 L utilisés pour l'étude des facteurs physico-chimiques, l'évaluation écotoxicologique et l'observation des changements de diversité microbienne 66
Figure 4.1 Microbial growth and biofilm development under groundwater conditions in semi-continuously fed reactors 82
Figure 4.2 Growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* submitted to different synthetic groundwater and biofilm samples 87
Figure 4.3 COD values of culture constituents for the evaluation of SMP production 90
Figure 5.1 Changes in suspended viable bacteria concentration (O), suspended EPS concentration (Δ), and biofilm thickness on a ceramic coupon (□), from groundwater indigenous UMB inoculated in reactors maintained at 10 °C in darkness 109

Figure 5.2 Determination of the diversity of the 16S rRNA gene sequences generated from the groundwater and biofilm bacterial samples by SSCP 110

Figure 5.3 Unrooted phylogenetic trees showing the relationship among our sequence types and some representative members of different bacterial families..... 114

Figure 5.4 Community-level physiological profiles of UMB isolated from groundwater (O), and the resulting biofilm (Δ): substrate richness (*S*), substrate diversity (*H*), and substrate evenness (*E*) 118

Figure 6.1 Schematic diagram of the single fractured apparatus 137

Figure 6.2 Unrooted phylogenetic trees showing the relationship among sequences types obtained in the present study and some representative members of different bacterial families 143

Figure 6.3 Eluted volume, time and hydraulic retention time (HRT) changes of hydraulic conductivity in the single fractured limestone (O) and effluent analyses: carbohydrate 146

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

β	ouverture de la fracture (*fracture width*)
Δh	différence entre les niveaux des piézomètres (*head loss*)
μ	viscosité (*viscosity*)
ρ	densité (*density*)
v_{fi}	vitesse initiale de l'eau dans la fracture (*initial water volocity*)
a	largeur de la fracture (*fracture aperture*)
A2CB	acide 2-chlorobenzoïque
b	taux de mortalité des micro-organismes
BTEX	benzène, toluène, éthylbenzène et xylène
CESM	Complexe environnemental de Saint-Michel
COD	demande chimique en oxygène (*chemical oxygen demand*)
DNA	acide désoxyribonucléique (*desoxyribonucleic acid*)
e	rugosité
E	(*substrate evenness*)
EPS	exopolysaccharides
GN	Gram négatif (*Gram negative*)
H	(*substrate diversity*)
HPLC	(*high performance liquid chromatography*)
I	gradient hydraulique
IC_{20} et IC_{50}	concentration nécessaire pour une inhibition de 20% et 50% d'un bioessai
I.D.	(*interior diameter*)
K, K_f, K_{fi}	conductivité hydraulique (*hydraulic conductivity*); f: fracture, i: initiale
k_s	taux d'utilisation
K_s	constante de saturation
L	distance entre les piézomètres

LCPE	Loi canadienne sur la protection de l'environnement
MPN	(*most probable number*)
NaPCP	pentachlorophénate de sodium (*sodium pentachlorophenate*)
OD	(*optical density*)
ORP	(*oxydoreduction potential*)
PCP	pentachlorophénol (*pentachlorophenol*)
PCR	(*polymerase chain reaction*)
PÉRÉ	Procédure d'évaluation du rique écotoxicologique
PMS	produits microbiens solubles
Q	débit
Re_f	nombre de Reynolds pour une fracture
rRNA	(*ribosomal ribonucleic acid*)
RRSN	Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles
S	concentration en substrat
S	(*substrate richness*)
SDS	(*sodium dodecyl sulfate*)
SMP	(*soluble microbial products*)
sp.	espèce (*species*)
SRB	(*sulfate-reducing bacteria*)
SSCP	(*single strand conformational polymorphism*)
TEN buffer	(*Tris-HCL, EDTA and NaCl buffer*)
UMB	ultramicrobactéries (ultramicrobacteria)
V	vitesse de l'eau souterraine
Y	rendement

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 Protocoles expérimentaux 199

Annexe 2 Caractérisation physico-chimique et microbiologique des échantillons d'eau souterraine de Montréal 225

Annexe 3 Caractérisation des sources de carbone pour la stimulation de micro-organismes indigènes des eaux souterraines 230

Annexe 4 Caractérisation de la céramique et du calcaire 231

Annexe 5 Analyses supplémentaires du biofilm et de l'évaluation écotoxicologique ... 234

Annexe 6 Comparaison des fractions microbiennes du filtrat et du rétentat, issues d'une filtration sur une membrane de diamètre de pores 0,4 µm, effectuée lors de l'expérimentation sur les UMB (Chapitre V) 253

Annexe 7 Biostimulation de microflores isolées de différentes eaux souterraines: suivi du pH et de l'épaisseur du biofilm développé sur la céramique 259

Annexe 8 Essais préliminaires de colmatage utilisant une colonne de sable 262

Annexe 9 Extrait du Règlement modifiant le *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (LCPE) 265

AVANT-PROPOS

Ce projet doctoral se positionne dans une démarche de développement d'une biobarrière pour le colmatage d'une nappe aquifère de roc fracturé. Ce colmatage biologique, aussi appelé biocolmatage, vise le confinement de la contamination d'une eau souterraine circulant dans un milieu géologique rocheux.

Les récentes orientations des normes, des politiques, et même des perceptions du public envers les biotechnologies environnementales, ont tissé la toile de fond incitant à intégrer les aspects d'altérations écosystémiques dans la démarche.

Le projet a donc été abordé sous un angle d'étude du potentiel d'une microflore indigène d'une eau souterraine à développer la biobarrière, parallèlement à une évaluation des changements de diversité microbienne et de ses effets écotoxicologiques. Le Tableau 1.1 résume la diffusion scientifique relative au projet.

Tableau 1.1 Synthèse des présentations orales et écrites du projet doctoral*

date de l'événement/ de la parution	**titre de la diffusion**	**nom et lieu de l'événement/ titre de la parution**	**auteurs par ordre d'apparition[§]**
29 sept. au 4 oct. 1996	Development of a Microbial Biobarrier for the Control of Groundwater in a Fractured Rock Aquifer [a]	*ASM Conference on Microbial Biofilms*, Snowbird, Utah	N.R., L.D. & R.S.
19 au 21 nov. 1996	Optimisation des conditions physico-chimiques pour le développement d'une biobarrière dans une nappe aquifère en milieu fracturé[b,c]	*19e Symposium international sur le traitement des eaux usées, 8e Atelier sur l'eau potable et 36e Réunion de la SCBE*, Montréal, Québec	N. R., L.D., B.C. & R.S.
28 avr. au 1er mai 1997	Physico-chemical Optimization of Biofilm Development in Fractured Rock Aquifer Conditions [a,c]	*The Fourth International Symposium on Bioremediation*, New Orleans, Louisiana	N. R., L.D., B.C. & R.S.

Tableau 1.1 Synthèse des présentations orales et écrites du projet doctoral* (suite)

18 au 21 mars 1997	Physico-chemical Optimization of Biofilm Development Under Groundwater Conditions	*Sixième symposium et exposition sur la restauration des eaux souterraines et des sols contaminés*, Montréal Québec	N. R., L.D., B.C. & R.S.
avril 1998	Ecotoxicological Assessment and Effects of Physico-Chemical Factors on Biofilm Development in Groundwater Conditions [L]	*Environmental Science and Technology*, Vol. 32, No. 8, pp. 1105-1111	N. R., L.D., J.B., B.C., Y.C. & R.S.
24 au 26 mars 1999	Development of a Biobarrier for the Containment of Groundwater in a Fractured Rock Aquifer [p,c]	*Americana 1999 – Salon des technologies environnementales des Amériques*, Montréal, Québec	N. R., R.V., J.B., Y.C., L.D. & R. S.
19 au 22 avril 1999	Ecotoxicological Assessment and Biodiversity Determination of Biofilms Developed in Groundwater[a,c]	*The Fifth International Symposium on Bioremediation*, San Diego, California	N. R., R.V., J.B., L.D. & R.S.
Réception du manuscrit pour revision: août 1999	Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater and Stimulated to Form a Biofilm : Assessment of Changes in the Biodiversity by Combining Genetic and Functional Methods [L]	Soumis à *Applied and Environmental Microbiology*	N. R., R.V., É.M. & L.D.
Expédition du manuscrit: octobre 1999	Clogging of a Calcareous Single Fracture by a Groundwater Microbial Population [L]	Soumis à *Water Research*	N. R., L.D., R.V. & R.S.

*: références complètes au Chapitre VIII, [a]: affiche, [p]: présentation orale, [c]:comptes-rendus, [L]: article soumis à une revue avec comité de lecture, [§] : N. R.: Nathalie Ross, L.D.: Louise Deschênes, R.S.: Réjean Samson, B.C.: Bernard Clément, J.B.: Jacques Bureau, Y.C.: Yves Comeau, R.V.: Richard Villemur, E.M.: Élise Marcandella.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1.1 Problématique

Le projet se rattache à la problématique d'une contamination dans une nappe aquifère de roc fracturé. La décontamination d'un milieu rocheux fracturé comporte des contraintes technologiques et économiques majeures. En effet, la délimitation du réseau de fractures et la connaissance de l'hydrodynamique dans la matrice représentent des défis de taille (Zimmie et Riggs, 1979). Mais encore, les technologies existantes de décontamination s'avèrent pour la plupart inapplicables soit en raison d'une limite dans l'atteinte des contaminants ou une augmentation considérable des coûts d'opération, incluant des coûts d'excavation et de forage du roc (Franklin et Dusseault, 1990).

La compréhension des réseaux de fractures a connu un intérêt accru depuis une quinzaine d'années en particulier dans la perspective d'enfouir les déchets nucléaires dans les rocs (Hakami et Larsson, 1996). Plus récemment, le transport des contaminants dans un aquifère rocheux a fait l'objet de plusieurs études (Abdel-Salam et Chrysikopoulos, 1995; Dronsfield et Silliman, 1993). Dans ce type d'aquifère, les contaminants peuvent être transportés par dispersion dans les fractures et par diffusion dans la matrice rocheuse (Neretnieks *et al.*, 1982). Les fractures servent de conduits alors que la matrice permet l'accumulation des contaminants, pouvant être relargués dans l'eau souterraine sur une grande échelle temporelle (Esposito et Thomson, 1999).

La préservation de l'intégrité des sites et des écosystèmes a pris de l'ampleur depuis une dizaine d'années amenant des considérations additionnelles à l'application des biotechnologies *in situ*, entre autres, les effets écotoxicologiques et les impacts sur la biodiversité. Le Ministère de l'environnement et de la faune du Québec, dans sa *Politique de protection des sols et de réhabilitation des sites contaminés*, exige une analyse des

risques écotoxicologiques, estimant les «possibilités et les probabilités d'occurrence de réponses néfastes chez un récepteur écologique en fonction de son exposition à un ou plusieurs contaminants» (Ministère de l'environnement et de la faune, 1996). Dans un contexte plus large que la toxicité due aux contaminants, l'évaluation écotoxicologique des biotechnologies vérifie que l'introduction de micro-organismes ou la stimulation de la microflore indigène n'amènent pas d'effets toxiques additionnels (Renoux, 1996). En effet, la présence de produits microbiens solubles (PMS) constitués, entre autres, de matériel nucléique et d'endotoxines peut amener une écotoxicité dans le milieu (Pitter et Chudoba, 1990).

Le maintien de la diversité microbiologique a une importance vitale dans la régulation de la composition de l'atmosphère via les cycles des nutriments (ex. cycle du carbone) mais également, dans le maintien de la diversité des macro-organismes (ex. relation directe entre la déforestation, donc une diminution de la diversité microbiologique, et l'augmentation des épidémies) (Reaka-Kudla *et al.*, 1997). Depuis septembre 1997, la toxicité de tout produit biotechnologique « nouveau », incluant les micro-organismes, doit être évaluée avant son importation, sa fabrication ou son introduction en territoire canadien, en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (Environnement Canada, 1997). Les renseignements exigés à l'égard de l'introduction de micro-organismes *in situ* demandent des études de la littérature, par exemple pour leurs rôles dans les cycles biogéochimiques, ainsi que des recherches au laboratoire ou de terrain concernant les effets écologiques. Certaines applications biotechnologiques sont exclues de la nécessité de déclaration de renseignements: 1- le traitement d'eau usée municipale ou industrielle, 2- le compostage et les fosses septiques et 3- la stimulation *in situ* de la croissance d'organismes par aération (ex. le labourage) ou l'addition de substances nutritives (ex. les biobarrières).

1.2 Concept proposé

Le concept des biobarrières *in situ* représente une alternative aux techniques existantes de restauration des nappes aquifères en milieu rocheux fracturé (Figure 1.1 et Figure 1.2). La biobarrière est constituée d'un biofilm, formé par les bactéries indigènes, colmatant les fractures. Le potentiel de ce colmatage réside dans la possibilité de confinement et de traitement d'une contamination (Bellamy *et al.*, 1993). En effet, la densité du biofilm, lequel peut contenir des colloïdes minéraux, en plus des bactéries et des exopolysaccharides (EPS), peut amener une diminution significative de la conductivité hydraulique (Vandevivere et Baveye, 1992). La biobarrière servirait alors de mur de confinement. Également, l'activité de biodégradation à l'intérieur du biofilm permettrait, dans certains cas, d'utiliser la biobarrière comme mur réactif (Characklis et Marshall, 1990).

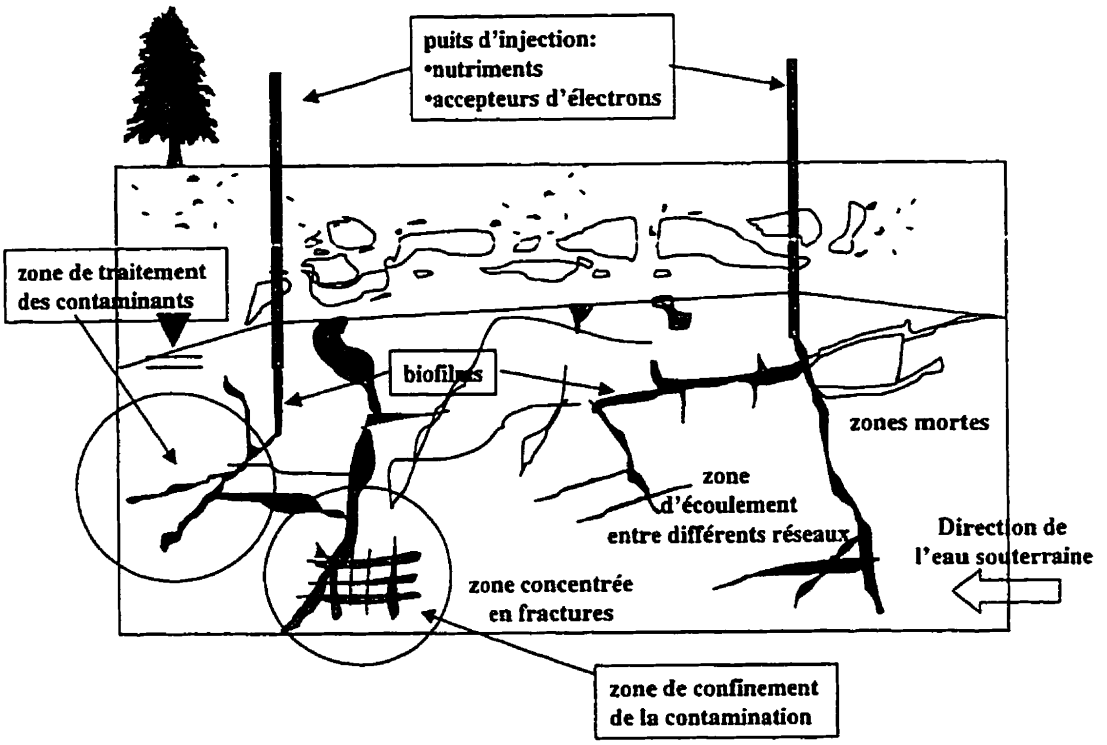


Figure 1.1 Schéma de la biobarrière

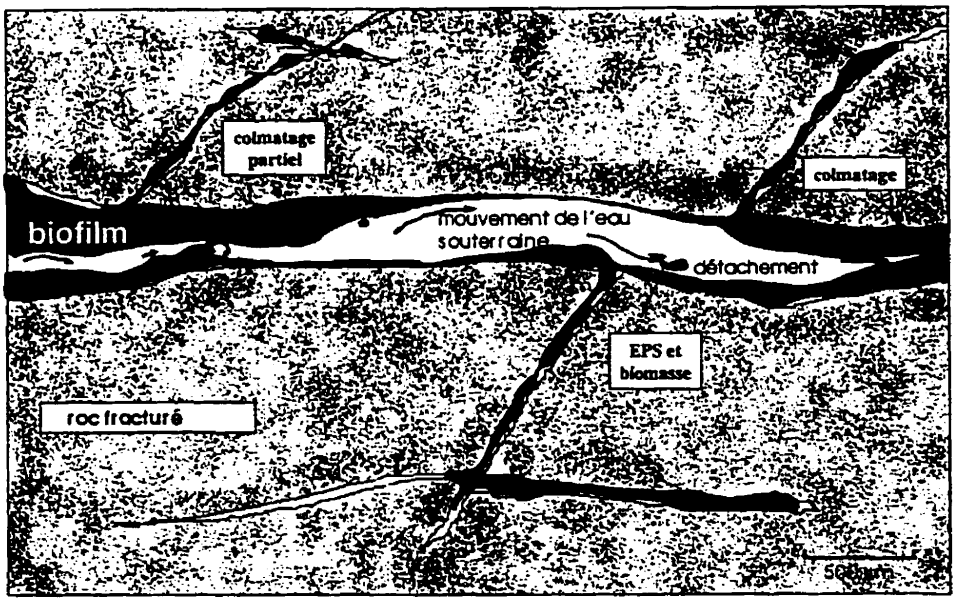


Figure 1.2 Biofilm développé dans une microfracture

Le biofilm se développe dans la nappe aquifère suite à une biostimulation de la flore indigène via l'injection de nutriments et d'accepteurs d'électrons (Johnston *et al.* , 1999). Cette injection fournit aux bactéries indigènes l'énergie nécessaire pour leur multiplication et la sécrétion d'EPS, des molécules responsables de la structure du biofilm (Characklis, 1981). Les eaux souterraines contiennent généralement des bactéries productrices d'EPS. En milieu aqueux, les biofilms se développent suivant sept étapes: 1- le conditionnement de la surface par une adsorption des molécules organiques (ex. une source de carbone), 2- le transport des cellules, 3- une dynamique d'adsorption et de désorption des cellules à la surface due aux forces de cisaillement, 4- une adsorption irréversible des cellules, 5- une croissance des cellules et une sécrétion d'EPS, 6- l'augmentation du biofilm dû à l'attachement de cellules en suspension et des matières colloïdales et 7- une dynamique de détachement et de re-formation du biofilm (Characklis et Marshall, 1990).

Plusieurs matériaux poreux ont été utilisés pour l'étude de la formation de biofilm: un sol contenant du silt, un sable, des billes de verre et du gravier (Bellamy *et al.*, 1993; Characklis et Marshall, 1990; Cunningham *et al.*, 1991; Davey *et al.*, 1998; Dennis et Turner, 1998; Sanchez de Lozada *et al.*, 1994). À l'échelle laboratoire, des études de biocolmatage, via l'injection de bactéries, ont montré une réduction de la conductivité hydraulique causée par: 1- les cellules regroupées en amas et 2- l'accumulation d'EPS et ce, dans différentes conditions d'oxydoréduction (Frankenberger *et al.*, 1979; Paksy *et al.*, 1998; Vandevivere et Baveye, 1992; Vandevivere et Baveye, 1992). Récemment, l'approche du colmatage d'un aquifère sablonneux via la biostimulation de la microflore indigène a été appliquée (Johnston *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1999). Une revue de littérature n'a pas permis de trouver d'application de cette approche dans un milieu géologique fracturé. De plus, aucune étude sur les effets de cette biostimulation sur l'écologie du milieu (écotoxicologie et biodiversité) n'a été répertoriée.

1.3 Approche de l'étude d'innocuité

Les exigences des politiques relatives à l'innocuité des biotechnologies environnementales visent à cerner le devenir des micro-organismes injectés, leurs impacts sur la biodiversité ainsi que le risque écotoxicologique (Environnement Canada, 1997). Quoique le concept des biobarrières, développées suite à une biostimulation de la microflore indigène, ne soit pas soumis à l'obligation de produire une *Déclaration de substances nouvelles* auprès d'Environnement Canada, il importait de vérifier son innocuité avant d'entrevoir une application *in situ*.

Depuis une quinzaine d'années, la recherche sur l'élaboration d'outils de mesure et d'analyse de l'innocuité environnementale s'est intensifiée. Autant dans le domaine de l'écotoxicologie que dans celui des impacts sur la biodiversité, l'approche d'évaluation des effets comprend généralement une batterie de tests (Keddy *et al.*, 1995; Paksy *et al.*, 1998). La majorité des études ont été effectuée dans une perspective de relier les résultats de ces tests à une disparition de contaminants. Cependant, peu de travaux ont circonscrit les effets de l'application d'une biotechnologie comme potentiel de toxicité (Renoux, 1996; Santini, 1998).

Dans le présent projet, l'évaluation écotoxicologique a été effectuée en utilisant des bioessais appartenant à deux groupes: un organisme procaryote (*Vibrio fischeri*) et un organisme eucaryote (*Selenastrum capricornutum*). Parallèlement, la quantité de PMS, des composés soupçonnés de générer une écotoxicité dans le milieu, a été évaluée (Barker et Stuckey, 1999). L'observation des changements de biodiversité a porté sur les aspects génétiques et fonctionnels de la communauté microbienne. De cette façon, il a été possible d'apprécier les effets de la biostimulation sur la structure ainsi que sur une fonction métabolique importante de la communauté microbienne indigène.

1.4 Hypothèse et objectifs du projet

L'hypothèse soutenue dans ce projet est la suivante: « La stimulation d'une microflore indigène de l'eau souterraine, via l'injection de nutriments et d'accepteurs d'électrons, permettra la croissance des cellules et la production d'EPS, menant au colmatage d'un milieu rocheux fracturé, lequel développement préservera l'innocuité du système. » Afin de vérifier cette hypothèse, cinq objectifs furent fixés:

1- Mesurer les effets des facteurs physico-chimiques pertinents pour le développement d'un biofilm sur une surface reproduisant un roc (source de carbone, concentration de la source de carbone, type d'aération, ratio C :N :P, présence d'ions calcium, présence d'un contaminant);

2- Évaluer l'écotoxicité de la biostimulation par l'utilisation de deux biotests (inhibition de la croissance de *Selenastrum capricornutum* et inhibition de la bioluminescence de *Vibrio fischeri*) en comparant les réponses écotoxiques de différents échantillons témoins, d'eau et de biofilms;

3- Déterminer les changements de biodiversité génétique (gènes ARNr 16S) et métabolique (système Biolog) occasionnés par la biostimulation en réalisant une étude comparative de la communauté microbienne initiale de l'eau souterraine et celle dans le biofilm, en mettant l'emphase sur les ultramicrobactéries (UMB);

4- Développer un montage expérimental rocheux fracturé permettant de simuler le biocolmatage en condition dynamique (calcaire naturel, charge hydraulique constante, piézomètres);

5- Montrer le potentiel de colmatage (diminution de la conductivité hydraulique) d'une fracture (0.05 cm × 0.5 cm × 50 cm), dans un roc calcaire, inoculée avec une microflore indigène, alimentée en nutriments et en eau souterraine synthétique sous une charge hydraulique constante.

CHAPITRE 2
REVUE DE LITTÉRATURE

Les notions nécessaires à la compréhension de la démarche du projet se regroupent en quatre sujets : 1- l'eau souterraine et son écoulement dans un milieu rocheux fracturé, 2- les barrières verticales de confinement des eaux souterraines, 3- la compréhension des mécanismes de formation des biofilms et 4- l'évaluation des effets d'une biotechnologie environnementale sur l'écosystème.

2.1 Eaux souterraines et nappes aquifères de roc fracturé

L'eau sous la surface du sol se retrouve dans deux zones: la zone non saturée, appelée zone vadose, et la zone saturée, dite aquifère. Dans la zone vadose, les pores du matériel géologique sont remplis par l'air et/ou l'eau tandis que dans l'aquifère, tous les vides sont occupés par l'eau. Les deux zones sont délimitées par le niveau de la nappe d'eau (Figure 2.1). Le volume d'eau souterraine emmagasinée dans les aquifères peut être substantiel. Par exemple au Québec, on estime à plus de 200 milliards de m^3, les réserves d'eau souterraine disponibles dans les régions habitées (Ministère de l'environnement et de la faune, 1996).

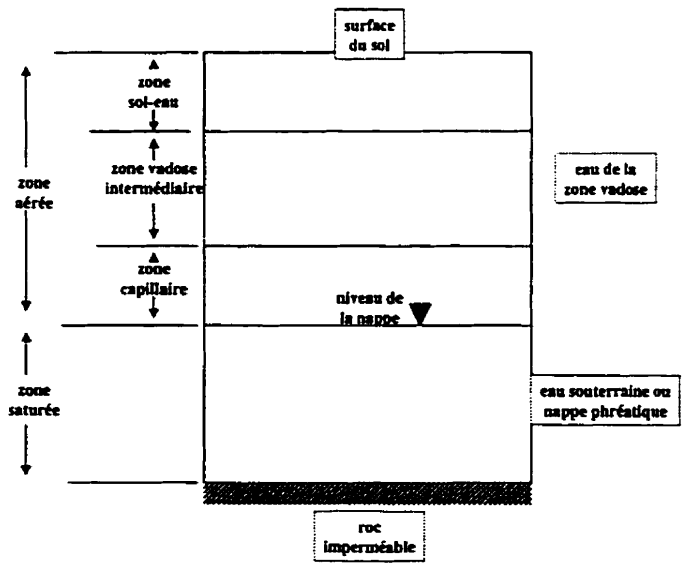


Figure 2.1 Divisions des eaux du sol

2.1.1 Biogéochimie des eaux souterraines

La géochimie des eaux souterraines vise à déterminer la distribution des éléments chimiques dans ce milieu. Cette détermination se baserait uniquement sur les principes d'équilibre minéral si ce n'était de la présence de la flore microbienne. À ce compte, l'étude s'élargit et on se réfère aux cycles biogéochimiques (Chapelle, 1992). Les changements de conditions physico-chimiques dans la nappe aquifère, telle l'injection de nutriments et d'accepteurs d'électrons, sont susceptibles d'amener des modifications à la flore microbienne, son écologie et aux cycles biogéochimiques (Matthess et Harvey, 1982).

2.1.1.1 Composition chimique et dissolution du roc calcaire

La composition chimique des eaux souterraines varie considérablement. Elle est grandement influencée par la composition du matériel géologique. La classification des composés chimiques se divise entre les composés solubles et insolubles (Tableau 2.1). Plusieurs éléments mineurs peuvent être présents dont notamment: le sélénium, le cadmium et des composés radioactifs (Matthess et Harvey, 1982). À titre d'exemple, la composition chimique de l'eau souterraine de Montréal est présentée en Annexe 2 (p. 225).

Tableau 2.1 Composés chimiques principaux des eaux souterraines

composés solubles		composés insolubles	
organiques	inorganiques	organiques	inorganiques
acides humiques	sodium	organismes	hydroxyde de fer
pectines	potassium	biopolymères	argile
hydrocarbures	calcium		silt

Tableau 2.1 Composés chimiques principaux des eaux souterraines (suite)

acides gras simples	magnésium	sable
sels d'acides gras	fer	
tannins	manganèse	
comp. arom. polycyc.	carbonates	
métabolites microbiens	sulfates	
	nitrates	
	chlorures	
	silice	

L'eau souterraine peut dissoudre plus de 150 mg/L de roc calcaire en fonction du pH (Tableau 2.2). Cette dissolution est en relation avec la concentration en dioxyde de carbone dissous (habituellement entre 20 et 50 mg/L) (Matthess et Harvey, 1982). De façon générale, les eaux souterraines s'écoulant dans les rocs calcaires ont un pH supérieur à 7, contiennent majoritairement des ions carbonates, calcium et, dans une moindre mesure, des ions sulfates et chlorures. La composition minéralogique du roc calcaire utilisé pour l'essai de biocolmatage en condition dynamique est présentée à l'Annexe 4 (p. 231).

Tableau 2.2 Ions du roc calcaire

Ions	concentration (% poids du calcaire)
Na^+	0.008
K^+	0.003
Ca^{2+}	0.017
Mg^{2+}	0.003
HCO_3^-	0.014
SO_4^{2-}	0.038
Cl^-	0.012

(Matthess et Harvey, 1982)

2.1.1.2 Microflore générale et métabolisme significatif pour la biostimulation

La survie et la croissance des micro-organismes dans les aquifères sont influencées par la nature des matériels géologiques, la composition des eaux, la température, la pression, la salinité, la vitesse de l'eau, la concentration en ions hydrogène et le potentiel d'oxydoréduction (Atlas et Bartha, 1987). Les micro-organismes présents dans les eaux souterraines appartiennent à l'un des quatre groupes suivants: les procaryotes (bactéries), les eucaryotes (algues, champignons et protozoaires), les archaebactéries ou les virus.

De loin, ce sont les bactéries qui se retrouvent en plus grand nombre dans les eaux souterraines; la différence en abondance est de l'ordre de 1000 à 10 000 entre les procaryotes et les eucaryotes. Le Tableau 2.3 présente quelques-uns un des genres bactériens les plus répandus, classifiés selon leurs types d'enveloppes cellulaires et leurs formes (Chapelle, 1992). Les bactéries se distinguent également par leur physiologie en utilisant comme source d'énergie: la lumière, les composés organiques et les composés inorganiques. Le métabolisme des micro-organismes joue un rôle important dans les

cycles biogéochimiques et l'écologie microbienne assurant une part importante de l'équilibre de la vie terrestre (Reaka-Kudla *et al.*, 1997). Les différents groupes physiologiques bactériens se retrouvant dans le processus de formation des biofilm sont présentés à la section 2.2.2.1 (p. 31).

Tableau 2.3 Genres bactériens typiques des eaux souterraines

type de paroi	morphologie	respiration	genre bactérien
Gram négatif	bâtonnet	aérobie	*Pseudomonas*
			Azotobacter
			Rhizobium
			Alcaligenes
			Flavobacterium
			Bordetella
			Agrobacterium
			Microcyclus
			Gallionella
			Caulobacter
	coque	aérobie	*Neisseria*
			Maxorella
			Acinetobacter
	bâtonnet	aérobie facultatif	*Escherichia*
			Shigella
			Salmonella
			Klebsiella
			Enterobacter
			Aerobacter
		anaérobie	*Bacteroide*
			Fusobacterium
			Desulfovibrio
Gram positif	coque		*Micrococcus*
			Staphylococcus
			Streptococcus
	«coryneforme»		*Arthrobacter*
	bâtonnet et spores		*Bacillus*
			Clostridium

Dans une perspective de stimulation d'une microflore indigène pour le colmatage d'un aquifère de roc fracturé, trois aspects du métabolisme bactérien s'avèrent importants. Le

premier aspect concerne la capacité des bactéries à réduire leur diamètre en conditions oligotrophes (pauvres en nutriments) pour assurer leur survie. En effet, la réduction du rapport surface/volume faciliterait l'assimilation des nutriments (Amy et Morita, 1983). La taille dite normale des bactéries se situe entre 1 et 10 µm (Madigan *et al.*, 1999). Cependant, plusieurs études ont montré que dans les milieux naturels (oligotrophes), tels les sols, les océans et les eaux souterraines, une proportion des bactéries ont des diamètres significativement inférieurs à 1 µm (Iizuka *et al.*, 1998; Janssen *et al.*, 1997; Schut *et al.*, 1997). Ces petites bactéries, nommées ultramicrobactéries (UMB), ont été arbitrairement définies comme ayant un diamètre inférieur à 0.3 µm (Marshall, 1982). Dans les eaux souterraines, les genres bactériens suivants ont été retrouvés sous forme UMB: *Alcaligenes, Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Rhizobium, Desulfocapsa* (Kemp *et al.*, 1993; Rheinheimer, 1991). Ces UMB représentent un intérêt pour la biostimulation *in situ* pour deux raisons: 1- leur petite taille leur permet de s'infiltrer dans des fractures d'ouvertures inférieures (< 1 µm) et 2- leur hydrophobicité de surface, significativement inférieure aux bactéries de taille «normale», leur permet un meilleur transport dans l'aquifère, réduisant les risques de colmatage des puits d'injection de nutriments et d'accepteurs d'électrons (Ralph et Stevenson, 1995; Sharp *et al.*, 1999).

Les deuxième et troisième aspects du métabolisme bactérien réfèrent à la sécrétion de produits suite à la biostimulation: les exopolysaccharides (EPS) et les produits microbiens solubles (PMS). Les EPS représentent, avec les micro-organismes, les principales composantes du biofilm. Plusieurs genres bactériens sécrètent des EPS qui se retrouvent soit attachés à l'enveloppe cellulaire, en suspension dans le milieu, ou adsorbés sur une surface. Dans l'environnement, la sécrétion d'EPS par les bactéries a un rôle nutritionnel (agissant comme une résine échangeuse d'ions) et de protection contre les agents antimicrobiens (ex. bactériophages, surfactants) (Amy et Morita, 1983). Les conditions physico-chimiques du milieu stimulent les bactéries à produire des EPS. Plusieurs travaux ont montré les effets des conditions suivantes: le type et la concentration de la source de carbone, le rapport C/N, la concentration en oxygène, la

température et le pH (Costerton, 1979; De Vuyst *et al.*, 1987; Gancel et Novel, 1994; Gibbs et Seviour, 1996; Hacking *et al.*, 1983; Linton *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1995). Des exemples de bactéries productrices d'EPS dans l'eau souterraine sont: *Pseudomonas, Azotobacter, Rhizobium, Alcaligenes et Agrobacterium* (Characklis et Marshall, 1990). La composition des EPS ainsi que leurs rôles dans la formation du biofilm sont présentés à la section 2.2.2.1 (p. 31)

Les PMS se définissent par l'ensemble des produits organiques relargués en solution suite au métabolisme de substrats et à la mort des cellules (Barker et Stuckey, 1999). Ils comprennent : des acides humiques et fulviques, des acides organiques, des antibiotiques, des exopolymères, des stéroïdes, des coenzymes, du matériel extracellulaire, des morceaux d'enveloppes cellulaires, des fragments d'ADN et des protéines provenant de la lyse des cellules (Noguera *et al.*, 1994). Ces produits ont été retrouvés autant dans les cultures bactériennes en phase de croissance de latence, qu'en décomposition (Pitter et Chudoba, 1990). En phase de latence, les PMS sont essentiellement des exopolymères. Tandis qu'en phase de croissance, le renouvellement de différentes structures cellulaires amène une sécrétion d'autres PMS dans le milieu (ex. lipopolysaccharides). Où il y a croissance bactérienne, les PMS sont susceptibles d'être générés et ce, en concentration proportionnelle à la concentration de substrat (Baskir et Hansford, 1980; Chudoba, 1985; Daigger et Grady, 1977; Grady et Williams, 1975). Schiener *et al.* (1998) ont rapporté un effet inversement proportionnel de la température sur la génération de PMS dans un réacteur anaérobie. Les PMS sont reconnus pour être difficilement biodégradables, potentiellement toxiques et interférant dans les processus de floculation (Barker et Stuckey, 1999; Chudoba, 1985). Les effets potentiellement toxiques des PMS sont discutés à la section 2.3.2 (p. 56).

2.1.1.3 Écologie microbienne

La biostimulation d'une microflore indigène peut changer la structure de la communauté microbienne et donc, de modifier l'équilibre existant. L'écologie microbienne étudie les relations entre les micro-organismes et les facteurs biotiques (ex. populations microbiennes, plantes, etc.) et abiotiques (ex. influence du pH, de la température, etc.). On dénombre huit types d'interactions entre les populations microbiennes: (1) le neutralisme, (2) le commensalisme, (3) le synergisme, (4) le mutualisme, (5) la compétition, (6) l'antagonisme, (7) la prédation et (8) le parasitisme (Tableau 2.4) (Atlas et Bartha, 1987).

Tableau 2.4 Effets des interactions entre populations microbiennes

	effet de l'interaction*	
nature de l'interaction	population A	population B
neutralisme	0	0
commensalisme	0	+
synergisme	+	+
mutualisme	+	+
compétition	-	-
antagonisme	- ou +	-
prédation	+	-
parasitisme	+	-

* : 0 = sans effet, + = effet positif, - = effet négatif.

Le neutralisme signifie l'absence d'interaction. Cette absence d'interaction est souvent due à l'isolement des populations les unes par rapport aux autres. Chapelle (1992) relève un manque dans les techniques de mesure du neutralisme dans les eaux souterraines.

Néanmoins, on croit que le neutralisme y est présent, étant donnés le grand nombre de niches et la faible densité de population (Matthess et Harvey, 1982).

Du commensalisme résulte un effet bénéfique pour une population alors que la deuxième population n'est affectée d'aucune façon. Le meilleur exemple de commensalisme dans les eaux souterraines est la consommation de l'oxygène par les micro-organismes aérobies permettant le développement des populations anaérobies (Appelo et Postma, 1993).

Les interactions de synergie et de mutualisme sont profitables aux deux populations en interaction. La différence étant que deux populations en interaction de synergie peuvent survivre sans la présence de l'autre population. Une réaction synergique typique dans les eaux souterraines est l'interaction en condition anaérobie entre les micro-organismes fermentaires et les anaérobes non-fermentaires. Alors que les bactéries anaérobies non-fermentaires (sulfato-réductrices, méthanotrophes, réductrices du fer) sont incapables de métaboliser les glucides complexes et la lignine, les bactéries fermentaires utilisent directement ces composés et rejettent en retour des produits de la fermentation (ex. acétate), utilisables par les anaérobes non-fermentaires. Cette interaction est également bénéfique pour les bactéries fermentaires en ce sens que les produits de la fermentation, qui représentent des déchets pour ces dernières, sont métabolisés par les bactéries anaérobies non-fermentaires (Madigan *et al.*, 1999).

L'objet des interactions de compétition est l'utilisation d'un même substrat. Par exemple, certaines zones d'eau souterraine très concentrées en fer dissous résultent en une compétition entre les bactéries sulfato-réductrices, méthanotrophes et réductrices de fer. Cette compétition exclusive vient de la forte affinité des bactéries réductrices de fer pour l'hydrogène en comparaison à l'affinité des bactéries méthanotrophes et sulfato-réductrices pour ce composé (Chapelle, 1992).

Dans les eaux souterraines, les interactions antagonistes, où une population produit une substance inhibitrice pour une autre population, ont reçu peu d'attention. Par contre, des bactéries résistantes à certains antibiotiques ont été isolées des eaux souterraines. D'après Chapelle (1992), cette résistance laisse supposer la capacité de certaines espèces de produire des antibiotiques.

Les interactions de type parasite, où une population soutire ses nutriments d'une population hôte, sont bien illustrées dans la dynamique entre les virus et les bactéries (Matthess et Harvey, 1982). La migration des virus vers la nappe aquifère dépendra du matériel géologique de surface. Un matériel géologique grossier et peu adsorbant, tel le sable, facilitera leur migration. Une nappe aquifère de roc fracturé sera particulièrement susceptible à la contamination par les virus.

Les interactions de prédation s'effectuent habituellement dans les aquifères aérobies entre les protozoaires et les bactéries (Harvey *et al.*, 1995). Un nombre élevé de protozoaires dans un aquifère contaminé limiterait la biodégradation des contaminants (Chapelle, 1992). Dans le cas d'une biostimulation pour le colmatage d'un milieu géologique, la présence de protozoaires risque d'augmenter le temps nécessaire à la formation du biofilm (DeLeo et Baveye, 1997).

2.1.1.4 Les cycles biogéochimiques

Dans les eaux souterraines, la plupart des composés chimiques solubles circulent à travers une chaîne alimentaire. Pour cette raison, l'étude des cycles biogéochimiques est primordiale pour la compréhension de la distribution de ces composés. Les cycles les plus importants sont ceux de l'oxygène, du carbone, de l'azote, du fer et du soufre (Madigan *et al.*, 1999).

Le cycle de l'oxygène est balancé par une production via le processus de la photosynthèse et la respiration des micro-organismes. La quantité d'oxygène dissous dépendra du matériel géologique de la zone vadose et des contacts de la nappe avec l'atmosphère. La distribution de l'oxygène dissous dépend du taux de respiration des micro-organismes. En effet, des aquifères riches en composés organiques sont souvent en condition anaérobie. Les équations stœchiométriques de production de l'oxygène via la photosynthèse et la consommation par les micro-organismes se traduisent respectivement comme suit:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{lumière}} CH_2O + O_2$$

$$CH_2O + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + \text{énergie}$$

où CH_2O est le carbone organique réduit présent dans les glucides. L'absence de photosynthèse dans les eaux souterraines amène rapidement un épuisement de l'oxygène.

L'absence de photosynthèse amène également une troncature du cycle du carbone. Il en résulte une accumulation de CO_2 et d'autres carbonates dissous (Figure 2.2). Une accumulation abondante de ces produits donne naissance à des sources minérales bien connues pour leurs effets médicinaux. La quantité de CO_2 dégagé est en relation avec les propriétés de l'aquifère (Chapelle, 1992).

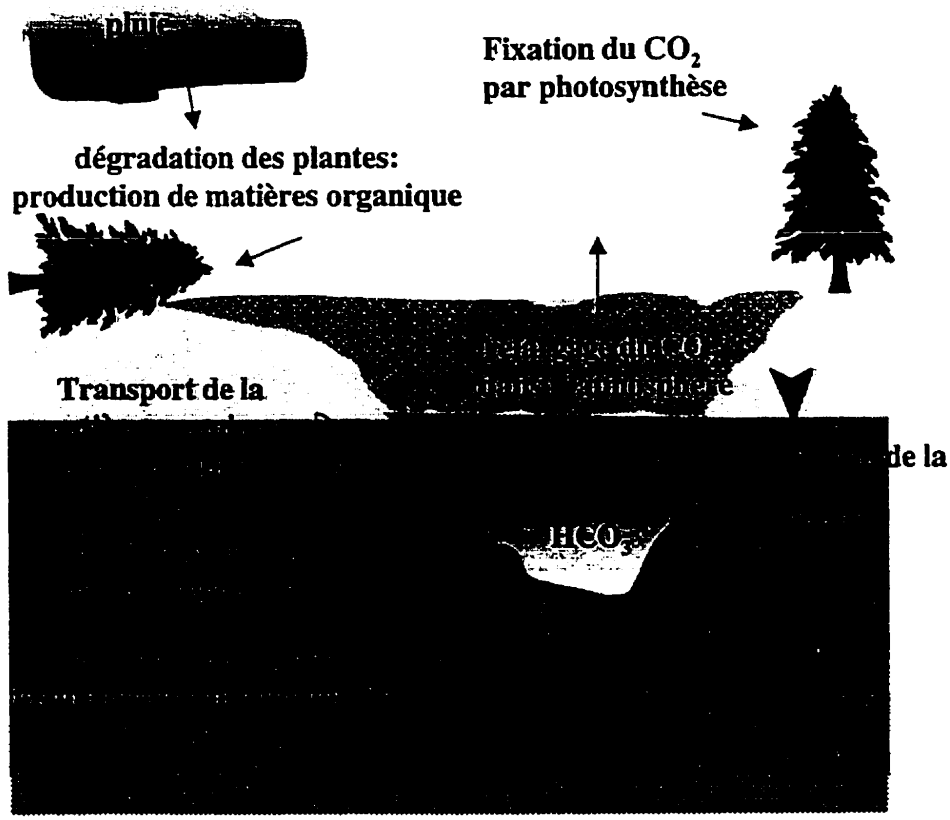


Figure 2.2 Cycle du carbone

adaptée de Chapelle (1992)

Le cycle de l'azote est affecté en trois points dans les eaux souterraines. Premièrement, la fixation de l'azote organique provenant de l'azote gazeux demande beaucoup d'énergie au système. Deuxièmement, la nitrification, c'est-à-dire l'oxydation de l'azote organique en nitrate, s'effectue en milieu aérobie. Troisièmement, la dénitrification se réalise en condition anaérobie (Figure 2.3). Il en résulte que certaines eaux souterraines accumulent les nitrates ou les nitrites relativement au potentiel d'oxydoréduction. Plusieurs activités humaines influencent le cycle de l'azote dans le sol et les eaux souterraines (ex. fèces, effluents urbains et fertilisants) (Chapelle, 1992).

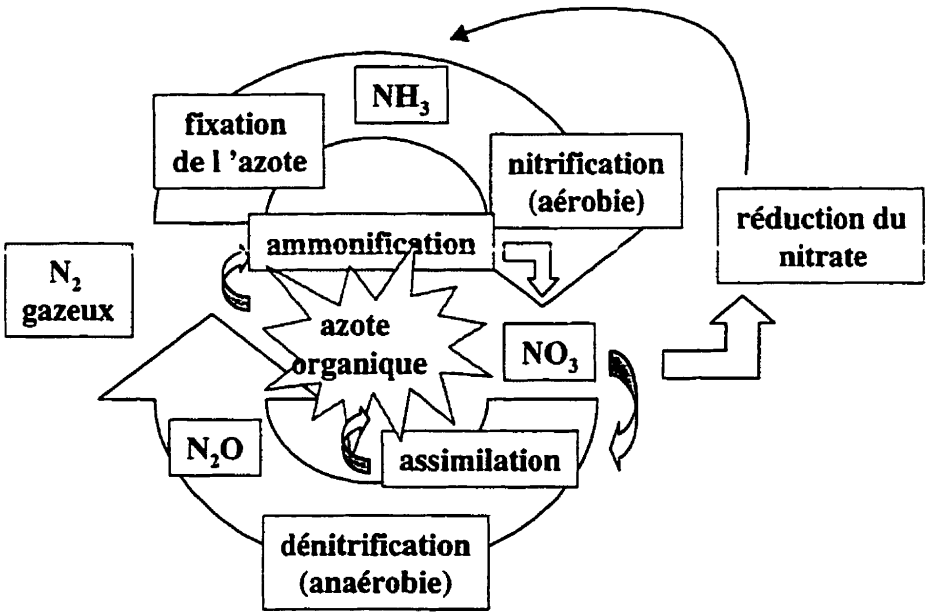


Figure 2.3 Cycle de l'azote

adaptée de Chapelle (1992)

Le cycle du fer est un des processus les plus importants dans les eaux souterraines étant donné ses impacts sur le plan économique. En effet le fer dissous (Fe(II)), sans danger pour les humains et les animaux, cause de graves problèmes de colmatage des conduites et de coloration de l'eau. De plus, le Fe(II) amène un goût désagréable à l'eau de consommation. Également, la productivité agricole est affectée par une baisse du pH des sols suite à l'oxydation du Fe(II). Les coûts de traitement des eaux souterraines pour le retrait du Fe(II) représentent plusieurs millions de dollars à travers le monde. Le cycle biogéochimique du fer se résume à une réduction du Fe(III) en Fe(II) sous condition anaérobie. Le Fe(II) demeure en solution dans les eaux souterraines. Ce composé pourra être précipité sous forme Fe(III) en présence d'oxygène dissous. L'accumulation de Fe(II) dissous dans les eaux souterraines est le résultat d'une troncature du cycle en raison d'un manque de ré-oxydation (Figure 2.4) (Chapelle, 1992). Les réactions stœchiométriques sont les suivantes:

$$Fe^{2+} + H^{+} + 1/4\ O_2 \rightarrow Fe^{3+} + 1/2\ H_2O$$

$$Fe^{3+} + 3\,H_2O \rightarrow Fe(OH)_3 + 3\,H^+$$

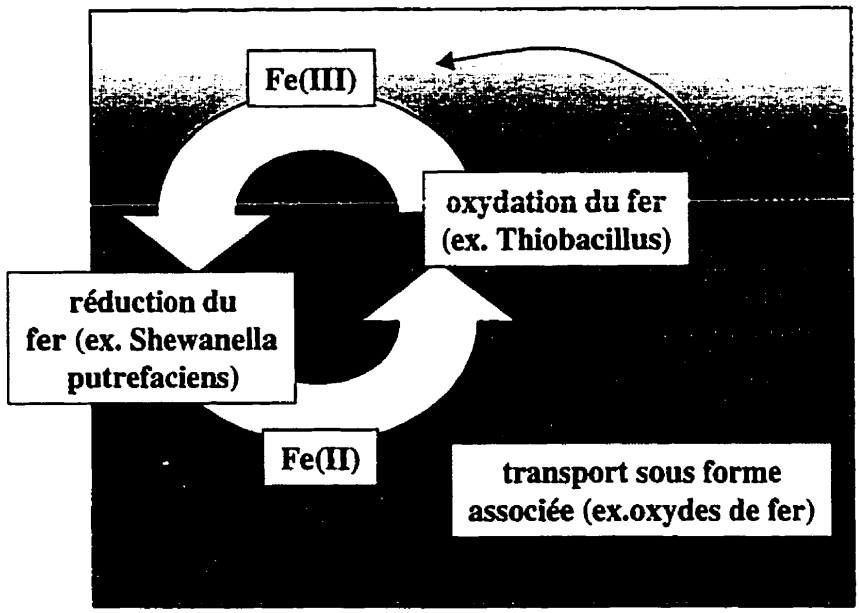


Figure 2.4 Cycle du fer

adaptée de Chapelle (1992)

Le cycle du soufre est complété avec la présence de minéraux coupleurs du soufre. Comme pour les cycles de l'oxygène, du carbone et de l'azote, le manque d'apport d'énergie amènera une troncature dans le cycle (Figure 2.5) (Chapelle, 1992).

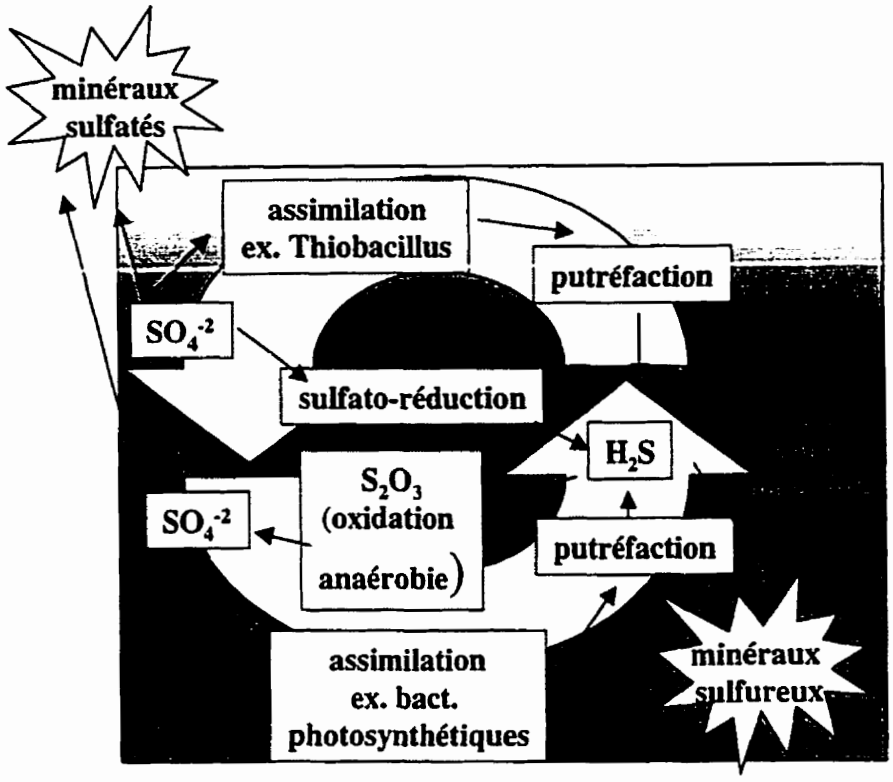


Figure 2.5 Cycle du soufre

adaptée de Chapelle (1992)

2.1.2 Écoulement dans les milieux rocheux fracturés

On entend par rocs fracturés ceux montrant soit des joints, des failles et des fissures. Une nomenclature des fractures selon leur longueur et largeur est donnée au Tableau 2.5 (Chernyshev et Dearman, 1990). Le roc intact possède une porosité primaire soit celle correspondant aux vides des pores et des fissures entre les grains et les cristaux. Les vides sous forme de fractures représentent la porosité secondaire nommée porosité de fracture (Tableau 2.6) (Franklin et Dusseault, 1990). Cette dernière permet de transporter l'eau efficacement, comme dans les conduites.

Tableau 2.5 Classification des fractures d'après leur longueur et leur largeur

longueur ou largeur (cm)	longueur	largeur
$10^{7} - 10^{8}$	faille tectonique large	
$10^{4} - 10^{6}$	faille	
10^{3}	fracture longue	faille
10^{2}	fracture moyenne	
10	fracture courte	fissure
1	microfracture	fracture large
10^{-1}		fracture moyenne
10^{-2}		fracture étroite
10^{-3}		microfracture
$10^{-4} - 10^{-5}$		microfissure

Tableau 2.6 Porosité primaire et conductivité hydraulique de rocs intacts et fracturés

	matériel	porosité (%)	K (cm/s)
roc intact	schiste	6	$10^{-11} - 10^{-7}$
	roc métamorphique	n.d.	$10^{-11} - 10^{-8}$
roc fracturé	grès	35	$10^{-8} - 10^{-4}$
	calcaire	30	$10^{-7} - 10^{-4}$
	dolomite	26	$10^{-7} - 10^{-4}$
	roc métamorphique	n.d.	$10^{-6} - 10^{-2}$
	basalte perméable	17	10^{-5} - 1

(Todd, 1980), n.d.: non déterminé

2.1.2.1 Conductivité hydraulique dans une fracture simple

Le mouvement de l'eau dans un aquifère de roc fracturé dépendra de la nature du roc, la densité, les interconnections, l'orientation, la largeur et la longueur des fractures (Tableau 2.6) (Palmer, 1992). Dans une fracture simple et lisse sous un écoulement laminaire (Re < 100), la conductivité hydraulique et la vitesse de l'eau souterraine peuvent être évaluées avec la loi cubique (Amade et Illangasekare, 1994; Zimmerman et Bodvarsson, 1996) :

$K_f = (\rho g / 12\mu)\ \beta^2$; $Q = (\rho g / 12\mu)\ Ia\beta^3$ (1)

et $V = -K_f I$ (2)

où K_f est la conductivité hydraulique équivalente dans les fractures, ρ est la masse volumique de l'eau, g est la gravité, μ est la viscosité de l'eau, β est l'ouverture des fractures, I est le gradient hydraulique dans les fractures et a est la profondeur des fractures. Dans le cas d'une fracture rugueuse, l'équation incorpore un paramètre de rugosité (Chernyshev et Dearman, 1990):

$Q = (\rho g / 12\mu)\ Ia\beta^3\ (1/(1 + 6(e/b)^{1.5}))$ (3)

où e est la rugosité, mesurée expérimentalement et valide pour e/b > 0,066.

2.1.2.2 Croissance et transport des micro-organismes

L'équation de Monod est utilisée pour évaluer le taux de croissance des micro-organismes dans les aquifères:

$\mu_{net} = (Yk_s) / (K_s + S) - b$ (4)

où Y est le rendement, k_s est le taux maximum d'utilisation, S est la concentration du substrat, K_s est la constante de saturation et b est le taux de mortalité des micro-organismes (Characklis et Marshall, 1990).

Le transport des micro-organismes est influencé par cinq facteurs: (1) la convection, (2) la dispersion, (3) l'adsorption, (4) la filtration et (5), la survie des micro-organismes (Hurst, 1991). Les micro-organismes sont transportés essentiellement par convection,

c'est-à-dire par transport à la même vitesse que l'eau, sans interaction avec le roc fracturé. Une dispersion mécanique, la dispersion, s'effectue en raison de la variation de la vitesse de l'eau dans les pores du roc. Les connaissances sur la dispersion des micro-organismes sont limitées. Hurst (1991) souligne qu'elle est fortement influencée par la structure du matériel géologique. À l'échelle laboratoire, les coefficients de dispersivité varient entre 0.01 m et 1 m alors que sur le terrain, ces valeurs s'échelonnent de 10 m à 1000 m.

L'adsorption des micro-organismes dépend de leurs propriétés de surface, du pH de l'eau et de la tension de surface du roc, tandis que leur filtration est liée à l'ouverture et l'orientation des fractures. Des facteurs spécifiques aux espèces microbiennes, par exemple l'hydrophobicité, le mouvement des flagelles, la production d'EPS et la charge des micro-organismes ont un effet sur leur attachement et leur transport. Dans les aquifères, les facteurs physico-chimiques déterminant pour la survie des micro-organismes sont la température, le pH, la concentration en nutriments, le potentiel d'oxydoréduction et la pression (Hurst, 1991).

2.2 Les barrières verticales de confinement des eaux souterraines

Le confinement et le traitement représentent deux alternatives de contrôle de la contamination des eaux souterraines. Les barrières physiques de confinement s'avèrent très efficaces pour la diminution de la perméabilité mais on déplore, entre autres, leur toxicité et leur coût d'implantation (Canter et Knox, 1986). Le développement du concept de la barrière biologique *in situ* prend de l'envergure mais les applications à l'échelle de terrain demeurent limitées.

2.2.1 Avantages et inconvénients des barrières physiques traditionnelles

Il existe plusieurs techniques physiques de contrôle de l'écoulement de l'eau souterraine dont l'édification d'une barrière verticale. Ces techniques sont de natures diverses, les plus répandues sont un rideau d'injection (grout curtains), une paroi moulée (slurry wall trench) et des palplanches (sheet piling) (EPA, 1984). Traditionnellement, les barrières verticales étaient érigées dans le sol pour le contrôle de l'infiltration, des flux et de la pression de l'eau. L'utilisation de telles techniques dans un contexte de contrôle et de réduction de la pollution oblige à tenir compte de variables additionnelles à savoir d'une part, les interactions entre les agents contaminants et la barrière, et d'autre part, la rétention des contaminants par la barrière (Boscardin et Ostendorf, 1993). Une grande variété de matériaux est utilisée pour leur construction (Tableau 2.7) (Boscardin et Ostendorf, 1993). Ces matériaux offrent un intervalle de conductivité hydraulique allant de $0{,}01 \times 10^{-10}$ à $10\,000 \times 10^{-10}$ (m/s).

Tableau 2.7 Conductivité hydraulique des matériaux utilisés pour la construction d'une barrière verticale

matériau	K (laboratoire) ($m/s \times 10^{10}$)	K (terrain) ($m/s \times 10^{10}$)
silicate	14	10000
bentonite sous forme de boue	5	50
acrylamide	0.5	10000
ciment plastique	0.1 à 40	0.01
sol-bentonite compactés	0.1	10
asphalte sous forme de boue	0.1	1
ciment	0.1	n.d.
chlorure de polyvinyle	0.00007	0.01
polyéthylène haute densité	0.0001	0.01

n.d. : non déterminé

2.2.1.1 Les rideaux d'injection

La méthode du rideau d'injection est utilisée depuis le début du 19e siècle pour le contrôle de l'eau et l'augmentation de la résistance du sol (Boscardin et Ostendorf, 1993). La méthode consiste à injecter sous pression soit un liquide, une boue ou une émulsion appelé mortier. Du point d'injection, le liquide se déplace et colmate les pores du sol. Par la suite, le fluide se solidifie engendrant une diminution de la perméabilité (Canter et Knox, 1986).

On distingue deux types de mortiers: les mortiers particulaires (ex. ciment de Portland) et les mortiers chimiques (ex. silicate de sodium) (EPA, 1984). Dans l'élaboration du design de la barrière, la composition du mortier représente un point majeur. Par exemple, l'utilisation des mortiers chimiques est à éviter dans un environnement très acide ou très alcalin en raison de la formation d'un gel suite à une réaction acide-base. Par ailleurs, un certain nombre de mortiers chimiques est maintenant proscrit depuis que leur toxicité a été démontrée. Parmi ceux-ci, on note les mortiers fabriqués à base de lignine et de formaldéhyde (Canter et Knox, 1986).

L'optimisation du design d'une barrière par rideau d'injection nécessite également un contrôle de la pression d'injection. En effet, une pression trop faible entraîne la solidification du mortier dans un délai trop court et à l'inverse, une pression trop importante peut occasionner une fracturation du sol (EPA, 1984). Canter et Knox (1985) ont répertorié un certain nombre d'avantages et d'inconvénients concernant cette technique (Tableau 2.8). Le rideau d'injection est surtout utilisé pour le colmatage des fractures où les méthodes actuelles de colmatage sont inapplicables (EPA, 1984).

Tableau 2.8 Avantages et inconvénients des rideaux d'injection

avantages	inconvénients
1. très efficace lorsque bien conçus	1. technique restreinte aux matériaux géologiques avec une porosité suffisante pour supporter la pression à l'application
2. produits bien connus puisque utilisés depuis plus de 100 ans dans les domaines de la construction et de la stabilisation des sols	2. les aquifères multicouches peuvent être mal colmatées due à la méthode d'injection
3. plusieurs types de matériaux d'injection disponibles	3. des techniques d'application sont brevetées
	4. la technologie demande une planification et plusieurs tests

2.2.1.2 Les parois moulées

Les parois moulées sont érigées dans les zones saturées soit pour contenir ou prévenir une contamination. La méthode de construction se résume à l'excavation d'une tranchée, la préparation du mélange et le remplissage de la tranchée. Les matériaux de remplissage utilisés en zone saturée se divisent en trois catégories de mélange: sol-bentonite, ciment-bentonite ou ciment-plastique (Canter et Knox, 1986).

Les paramètres importants à considérer sont la perméabilité, la déformation et la permanence de la barrière. À cet égard, Canter et Knox (1986) rapportent que les barrières de mélange sol-bentonite se détériorent dans un milieu acide ou riche en sulfate. Par contre, on a observé une augmentation de la perméabilité avec un mélange sol-bentonite en présence de certains composés organiques, de calcium, de magnésium et de métaux lourds. Relativement peu de projets de contrôle des eaux souterraines ont été

réalisés avec cette technique. Les quelques barrières érigées, surtout aux É.U., ont permis de mettre en évidence les avantages et inconvénients tels qu'énumérés au Tableau 2.9.

Tableau 2.9 Avantages et inconvénients des parois moulées

avantages	inconvénients
1. méthode de construction simple	1. les coûts de transport de la bentonite peuvent être élevés
2. le niveau de la nappe n'est pas affecté	2. certaines techniques de construction ont été brevetées
3. certaines bentonites ne lixivient pas	3. une sur-excavation est nécessaire dans les rocs en raison de la dimension de la machinerie
4. peu d'équipement nécessaire pour l'entretien	4. la bentonite se détériore lorsque exposée à des lixiviats fortement ionisés

2.2.1.3 Les palplanches

Les palplanches sont un assemblage de sections, habituellement en acier, introduites dans le sol dans le but de contenir une eau souterraine contaminée ou encore, d'acheminer l'eau vers une unité de traitement (système entonnoir-barrière) (EPA, 1984). Dans un sol non contaminé, il a été démontré que la corrosion des palplanches n'était pas suffisante pour entraîner des fissures. Par contre, la possibilité de corrosion en présence de contaminant et le coût des palplanches rendent peu attrayante cette technologie de contrôle de l'eau souterraine (Canter et Knox, 1986).

Le système entonnoir-barrière (funnel-and-gate system) utilise des palplanches, ou des parois moulées (sol-bentonite et ciment de Portland-bentonite), en association avec une barrière réactive. D'après Starr et Cherry (1994) cinq types de barrières perméables peuvent être envisagés. La première utilise des conditions spécifiques de pH et de

potentiel d'oxydoréduction pour la précipitation ou la dégradation des contaminants (ex. bactéries sulfato-réductrices) (McGregor *et al.*, 1999). Un deuxième type de barrière contient un matériau se dissolvant dans l'eau et permettant la précipitation du contaminant (ex. précipitation de minéraux de plomb phosphatés issus du plomb de l'eau et du phosphate de calcium de la barrière) (Gu *et al.*, 1999). Le troisième type permet l'adsorption des contaminants (ex. le charbon activé via des liaisons hydrophobes) ou une résine synthétique échangeuse d'ions (via des liaisons ioniques) (Jacobs et Förstner, 1999). Le quatrième type vise à fournir les éléments nutritifs aux micro-organismes pour stimuler la biodégradation des contaminants (Borden *et al.*, 1997). Enfin, le cinquième type de barrière consiste en un enlèvement ou une transformation directe des contaminants, tel un puits de biobarbotage (Pankow *et al.*, 1992). Quoique la technique entonnoir-barrière représente une option pertinente pour l'enlèvement et la biodégradation des contaminants d'un aquifère poreux, son application dans un roc fracturé demeure problématique en raison de la complexité des réseaux de fractures et des coûts d'excavation de tranchées.

2.2.2 La barrière biologique

Depuis une dizaine d'années, l'approche de traitement des eaux souterraines via une biobarrière retient l'attention de nombreuses équipes de recherche (In Situ and on-Site Bioremediation : The Fourth International Symposium, 1997, New Orleans, Louisiana, and the Fifth International Symposium, 1999, San Diego, California). Dans la littérature, les biobarrières *in situ* réfèrent à plusieurs approches de confinement et de traitement de la contamination. Les appellations sont variées (traduction libre française): barrière active de biofilm (active biofilm barrier), bio-rideaux *in situ* actifs (active *in situ* bioscreens or biocurtains), mur réactif biologique (biological reactive wall), barrière perméable (permeable barrier) et barrière biologique (microbial fence).

Dans le présent projet, la biobarrière réfère au développement d'un biofilm pour le confinement de la contamination. Turner (1995) présente les potentiels d'application de la biobarrière, laquelle serait formée, selon sa vision, suite à l'injection d'UMB et de nutriments. Selon l'auteur, la barrière pourrait servir de barrière horizontale, comme recouvrement ou couche de fond des sites d'enfouissement, ou de barrière verticale pour le confinement et la biodégradation des contaminants dans la nappe aquifère. Les principaux intérêts de l'approche des biobarrières étant leur résistance aux agents biocides et le faible coût associé à son développement.

Les biofilms se forment sur une surface solide suite à l'attachement des micro-organismes sur une surface solide et leur sécrétion d'EPS. Cette formation représente dans certains cas un bénéfice (ex. diminution des effets toxiques dans les procédés de traitement) (Chen et Stewart, 1996; Tashiro *et al.*, 1991) et dans d'autres cas, un inconvénient (ex. biocorrosion) (Costerton, 1979; Lee et Characklis, 1993). Les recherches dans le domaine des biofilms sont actives et multidisciplinaires (ex. médecine, environnement, procédés) et le nombre de publications sur le sujet en témoigne (plus de 1350 articles parus dans des revues spécialisées entre 1993 et 1999 contenant le mot «biofilm» dans le titre, référence: ICIST). Dans une perspective de développement d'une biobarrière, l'information pertinente se regroupe en trois sujets: les constituants du biofilm, les étapes de formation et le biocolmatage de milieux géologiques.

2.2.2.1 Le système de biofilm et ses constituants

Le système de biofilm peut être représenté schématiquement par quatre compartiments dans lesquels des interactions physico-chimiques et microbiologiques prennent place (Figure 2.6) (Characklis et Wildener, 1989). Les matériaux géologiques, de par leur porosité, leur rugosité et leurs nombreux sites d'adsorption électrochimiques, offrent une surface adéquate pour la colonisation microbienne et la formation d'un biofilm (Becker, 1996; Korber *et al.*, 1997; Rijnaarts *et al.*, 1996; Rouxhet et Mozes, 1990): le sol

comprenant du silt (Baveye *et al.*, 1998; Dennis et Turner, 1998; Jennings *et al.*, 1995), le sable (Mazor *et al.*, 1996; Okubo et Matsumoto, 1983; Vandevivere et Baveye, 1992), le gravier (Bellamy *et al.*, 1993; Braithwaite et Gribble, 1998) et le roc (Davey *et al.*, 1998).

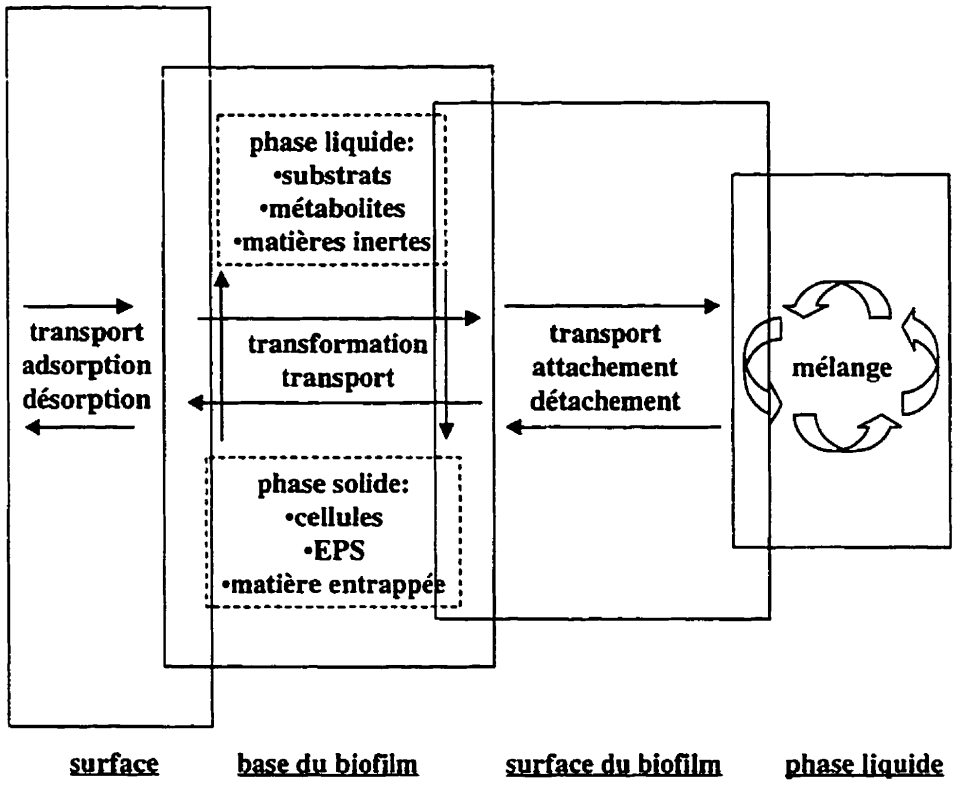


Figure 2.6 Le système de biofilm et les interactions caractéristiques

La base d'un biofilm est habituellement ferme et structurée. Dans ce compartiment, le transport des constituants s'effectue en majeure partie via une diffusion moléculaire. La surface du biofilm s'avère plus lâche et les molécules y sont transportées par advection. Le développement du biofilm dépend de l'hydrodynamique de la phase liquide. Aux vitesses d'eau souterraine prévalant dans les aquifères de roc fracturé, les interactions initiales de sorption et de désorption, le transfert de masse dans le biofilm ainsi que la dynamique de détachement seront significativement influencés (Characklis, 1973; Lau et Liu, 1993; Lewandowski *et al.*, 1991; Mueller *et al.*, 1992; Nicolella *et al.*, 1997;

Pederson *et al.*, 1986; Percival *et al.*, 1999; Peyton et Characklis, 1993; Schultz et Swain, 1999; Sharp *et al.*, 1999).

Un biofilm est formé de deux constituants principaux: les micro-organismes (algues, protozoaires, champignons aquatiques et bactéries) et la matrice d'EPS, sécrétée par les bactéries et les algues. Cette matrice, fortement adsorbante et poreuse, permet l'adsorption et la pénétration de matières solubles (ex. source de carbone) et de particules inorganiques (ex. silt, argile) (Flemming, 1995; Nelson *et al.*, 1996). Dans les aquifères, où la photooxydation est inexistante et la concentration en oxygène dissous est souvent faible, les biofilms renferment presque exclusivement des bactéries (Characklis et Marshall, 1990).

Les biofilms sont formés par des bactéries appartenant à différents groupes physiologiques, soit les hétérotrophes, oxydant le carbone organique (hétérotrophes aérobies, hétérotrophes anaérobies et hétérotrophes anaérobies facultatives) (ex. *Pseudomonas, Bacillus*) (Characklis et Marshall, 1990; Paksy *et al.*, 1998) et les chemilitotrophes, oxydant la matière inorganique (les bactéries méthanogènes, sulfato-réductrices, réductrices du fer et nitrifiantes) (ex. *Hydrogeomonas, Desulfovibrio, Thiobacillus ferrooxidans, Nitrosomonas*) (Ralph et Stevenson, 1995; Sanchez de Lozada *et al.*, 1994).

La matrice d'EPS influence les activités métaboliques bactériennes principalement en raison de la résistance à la diffusion, résultant en un gradient de concentration en oxygène, en carbone organique et en composés inorganiques. Plusieurs travaux ont montré une diminution de la viabilité bactérienne en fonction de l'épaisseur du biofilm (Rittmann et Manen, 1992). Par exemple dans un biofilm formé par des bactéries hétérotrophes, la viabilité est passée de 72-91 %, près de l'interface liquide, à 31-39 % près de la surface solide (Bishop *et al.*, 1995).

En présence de consortiums bactériens et d'oxygène, les biofilms présentent une zone aérobie à l'interface liquide, suivi d'une zone anaérobie, puis une zone de sulfato-réduction à la surface solide (Figure 2.7) (Bishop et Yu, 1999; Characklis et Wildener, 1989; Flood *et al.*, 1999; Okabe *et al.*, 1995). Une étude sur des biofilms hétérotrophes aérobies a montré que des bactéries sulfato-réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans*) ajoutées au système après le développement de la matrice d'EPS (d'épaisseur 1 mm) n'ont pas pénétré en profondeur malgré des zones anaérobies (profondeur 500 µm) et une structure poreuse (Power *et al.*, 1999). Par contre, la même souche bactérienne, co-inoculée avec les bactéries hétérotrophes aérobies (isolées d'une tour de refroidissement d'eau), s'est retrouvée dans toute l'épaisseur du biofilm. Les auteurs ont expliqué ce résultat par la lyse des bactéries sulfato-réductrices en solution et l'activité des protozoaires.

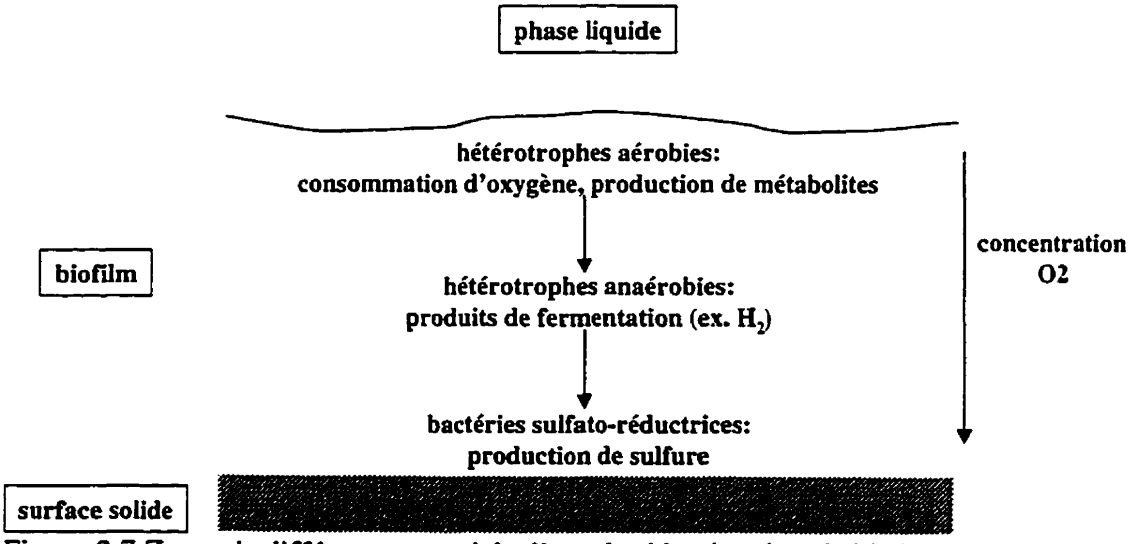


Figure 2.7 Zones de différents potentiels d'oxydoréduction dans le biofilm

Les bactéries méthanogènes peuvent également avoir une activité oxydative près de la surface solide en concentration faible en sulfate (Noguera *et al.*, 1999). L'activité des bactéries aérobies entraîne un épuisement de l'oxygène et les conditions deviennent complètement anoxies, donnant lieu au développement du biofilm en deux phases. Ce

changement de conditions oxydatives ralentit le développement du biofilm (Bellamy *et al.*, 1993; Okubo et Matsumoto, 1983).

Les EPS bactériens, majoritairement composés de polysaccharides et fortement hydratés, sont divisés en deux groupes en fonction de leur composition, leur spécificité et leur mode de synthèse: les EPS spécifiques et non spécifiques (Schmitt et Flemming, 1999). Typiquement, les EPS spécifiques sont formés d'une série d'oligosaccharides, habituellement entre deux et neuf monosaccharides, reliés entre eux par des molécules lipidiques (Tableau 2.10). D'autres composés chimiques, tels le pyruvate et l'acétate peuvent être également présents (Characklis et Marshall, 1990). La gomme xantane est un exemple d'EPS spécifiquement sécrété par *Xantomonas campestris*, un biopolymère largement utilisé pour ses propriétés visqueuses maintenues sur de grands intervalles de températures et de concentrations salines. Les EPS non spécifiques sont sécrétés par plusieurs genres bactériens et possèdent généralement une structure chimique plus simple que les EPS spécifiques. Plusieurs ne contiennent qu'un type de monomère, tel la cellulose, sécrétée par plusieurs espèces d'*Alcaligenes*.

Tableau 2.10 Composition en glucides des EPS sécrétés par *Pseudomonas atlantis*

composé	ratio molaire relatif au glucose
rhamnose	0.09
fucose	< 0.05
arabinose	< 0.05
xylose	0.03
mannose	0.36
galactose	0.67
acide glucuronique	0.31
acide galacturonique	0.35
acide mannuronique	0.10

(Characklis et Marshall, 1990)

Les EPS possèdent des propriétés rhéologiques exploitées commercialement par les industries alimentaires (ex. xantane comme agent épaississant), agro-chimiques (ex. alginate comme matrice d'encapsulation des fertilisants), pétrochimiques (ex. xantane pour la récupération tertiaire de l'huile brute), médicales (ex. cellulose comme peau artificielle), pharmaceutique (acide glucuronique comme agent hydratant dans les lotions). Les bactéries sont alors cultivées en fermenteurs et les EPS se retrouvent en suspension (Bryan *et al.*, 1986; De Vuyst *et al.*, 1987; Dlamini et Peiris, 1997; Fialho *et al.*, 1999; Hacking *et al.*, 1983; Linton *et al.*, 1987; Mian *et al.*, 1978; Morin *et al.*, 1993).

Dans les biofilms, les EPS représentent entre 50 et 90% du carbone organique (Tableau 2.11) (Characklis et Marshall, 1990). On rapporte trois rôles importants des EPS dans la formation d'un biofilm. Premièrement, les EPS capsulaires (attachés à la cellule) permettent une adhésion irréversible des bactéries à la surface. On entend par adhésion irréversible, une chemisorption via des interactions: dipôle-dipôle, ion-dipôle,

hydrophobes et ponts hydrogène. Sans les EPS, les bactéries sont principalement adsorbées aux surfaces de façon réversible via les interactions de la double couche électronique (forces électrostatiques et forces de London – van der Walls) ainsi que la réduction de l'énergie libre interfaciale (Characklis et Marshall, 1990; Rouxhet et Mozes, 1990).

Le deuxième rôle des EPS est d'assurer l'intégrité du biofilm. Des analyses de microscopie électronique ont montré que les EPS étaient organisés en fibres condensées à partir des cellules, assurant une structure au biofilm. Le troisième rôle concerne la capacité d'échange cationique des EPS agissant comme piège à nutriments. En effet, les EPS possèdent pour la plupart une charge négative permettant des liaisons avec des nutriments chargés positivement. Pour ce faire, les liaisons chimiques des nutriments avec les EPS doivent être plus importantes que celles des cations inorganiques de la phase aqueuse.

Tableau 2.11 Comparaison de la composition d'un biofilm avec celle de la biomasse en suspension

	type bactérien	volatils solides (%)			poids sec (%)	
		C	H	N	volatils	cendres
biofilm	*Pseudomonas*	53	6	12	87	13
	consortium hétérotrophe, en laboratoire	29	6	10	92	8
	consortium hétérotrophe, en milieu naturel	43	n.d.	10	80	20
biomasse	*Pseudomonas*	46	7	13	97	3
	Klebsiella	49	7	12	96	4

(Characklis et Marshall, 1990)

2.2.2.2 Étapes de formation et propriétés physico-chimiques des biofilms

La formation d'un biofilm sur une surface est le résultat d'une série de processus physiques, chimiques et biologiques (Characklis et Marshall, 1990). Ces processus peuvent être résumés en huit étapes :

1. Un transport de molécules organiques de la phase liquide sur le support, appelé le conditionnement de la surface;
2. Un transport des micro-organismes de la phase liquide vers la surface conditionnée;
3. Une adsorption réversible des micro-organismes;
4. Une désorption des micro-organismes due principalement aux forces de cisaillement;
5. Une fixation irréversible d'une fraction des micro-organismes préalablement adsorbés;
6. Une multiplication des cellules et une production d'EPS;
7. Une accumulation du biofilm due à l'attachement de nouvelles cellules et de particules;
8. Un relargage de portions de biofilm dans la phase liquide.

Le conditionnement de la surface est un processus presque instantané, autant en régime laminaire que turbulent, tandis que le transport des bactéries à la surface solide est directement proportionnel au mélange de la phase liquide. L'adsorption réversible réfère aux interactions de faible énergie d'adsorption (20-50 kJ mol^{-1}) alors que l'adsorption irréversible implique une énergie d'adsorption plus élevée (40-400 kJ mol^{-1}). À titre d'exemple, l'adsorption des cellules, via une réduction de l'énergie libre entre sa surface et la surface solide, sera réversible mais une adsorption hydrophobe avec la surface conditionnée sera irréversible (ex. groupements hydroxyles et acides aminés de la mélasse et des bactéries). L'accumulation des cellules et des particules sur le biofilm dépendra de la composition des EPS et des conditions hydrodynamiques du système.

Le détachement du biofilm se catégorise par l'érosion, la mutation et l'abrasion. L'érosion représente la perte de petites portions de biofilm et est fortement dépendante

des conditions hydrodynamiques. Huang et Pinder (1994) ont montré que la présence de calcium (100 à 120 mg/L dans la phase aqueuse) donnait une meilleure structure au biofilm et prévenait l'érosion. La perte importante du biofilm réfère à la mutation. Ce type de détachement se produit avec les biofilms formés en conditions riches en nutriments, habituellement plus épais et moins denses. Les collisions entre les particules d'un système de biofilm engendre l'érosion, telles les collisions en lits fluidisés (Nicolella *et al.*, 1997).

Les caractéristiques physico-chimiques des biofilms pertinentes à l'étude de biostimulation sont l'épaisseur, la densité et la diffusivité. L'épaisseur d'un biofilm varie considérablement en fonction des genres bactériens (produisant des EPS à des taux variables) et des conditions hydrodynamiques du système (augmentation du détachement avec les forces de cisaillement) (Tableau 2.12). Typiquement, les biofilms de monoculture s'avèrent plus minces que ceux formés par un consortium bactérien. Règle générale, l'épaisseur se situe entre une dizaine de micromètres jusqu'à quelques millimètres.

Tableau 2.12 Épaisseur et densité de biofilms formés par différentes populations bactériennes

Type bactérien	épaisseur (µm)	densité (kg/m^3)
Pseudomonas aeruginosa	0 - 60	27
nitrifiantes, consortium	150 - 580	42 – 109
hétérotrophes, consortium	30 - 1300	20 - 105

La densité des biofilms s'échelonne entre 10 et 110 kg m^{-3} (Tableau 2.12). Sa valeur varie en fonction de facteurs hydrodynamiques (diffusivité des substrats et des matières inorganiques), physico-chimiques (présence d'ions Ca^{2+} facilitant la formation de gel, type et taux d'alimentation en substrat, présence de particules) et microbiologiques (types

et concentration des bactéries). La densité augmente alors que la porosité diminue avec la profondeur du biofilm. Bishop *et al.* (1995) ont corroboré cette affirmation en mesurant une densité de biofilm passant de 0.6 à 1.2 mg/cm^3 et une porosité de diminuant de 340 à 240 % basé sur une épaisseur de biofilm normalisée.

La diffusivité varie avec l'âge du biofilm. En effet, due à la succession des populations dans la matrice (aérobies puis anaérobies), la densité et la composition changent, ayant un impact sur la diffusivité. Une relation directe a été établie entre la densité et la diffusivité, en utilisant des gels de polyacrylamide et d'agar comme modèles (White et Dorion, 1961). Characklis et Marshall (1990) rapportent des valeurs de diffusion de différentes molécules chimiques égalant 0.5 à 0.9 fois celle de l'eau dans un biofilm (Tableau 2.13).

Tableau 2.13 Diffusivité relative dans les biofilms

composé	diffusivité relative (D_f/D_{H_2O})
oxygène	0.7
ammoniaque	0.8
nitrate	0.9
sodium	0.6
bromure	0.6
glucose	0.5

2.2.2.3 Biocolmatage de milieux géologiques saturés

La croissance bactérienne et la sécrétion d'EPS dans les milieux géologiques saturés mènent à la réduction de la conductivité hydraulique (Baveye *et al.*, 1998). L'activité métabolique des bactéries peut également générer l'accumulation de précipités (ex. FeS suite à l'activité des bactéries sulfato-réductrices) et de bulles de gaz (ex. CO_2 et CH_4) se traduisant en une obstruction des pores et des fractures. Plusieurs recherches ont été

réalisées sur la compréhension des processus de biocolmatage dans une optique de les prévenir (ex. colmatage de tranchées de recharge d'eau souterraine (Okubo et Matsumoto, 1983)) ou de les favoriser (ex. barrières de confinement (Johnston *et al.*, 1999)). Le Tableau 2.14 présente l'étendue de réductions de conductivité hydraulique (K) obtenues dans divers milieux géologiques saturés suite à un biocolmatage. La majorité des recherches ont porté sur les milieux poreux. Les études utilisant les milieux fracturés visaient habituellement à optimiser la technique de récupération de l'huile brute.

Tableau 2.14 Biocolmatage de milieux géologiques saturés

conditions de l'étude	milieu géologique	étendue du biocolmatage
Comparaison de 2 bactéries ne produisant pas d'EPS[1]	colonne de sable (D = 2.7 cm et L = 8 cm) (K_i = 0.49 cm min^{-1})	• *Arthrobacter* (souche AK19): diminution de K de 100 fois après 10 jours • SLΓ (isolée des eaux souterraines): diminution de K de 5 fois après 20 jours.s
Colmatage par une souche bactérienne méthanogène (*Methanosarcina barkeri* 227)[2]	colonne de sable (D = 2.5 cm et L = 7 cm) (K_i = 5.55 × 10-3 cm s^{-1})	• Une diminution de K de 10 % dans les premiers jours était attribuable au tassement du sable • Une phase plateau jusqu'au 80e jour, due à l'activité métabolique relativement lente des bactéries méthanogènes • Un déclin rapide de K pour atteindre, après 140 jours, 3 % de sa valeur initiale
Comparaison de bactéries produisant des EPS capsulaires et formant un biofilm[3]	colonne de sable (D = 2.6 cm et L = 4 cm) (K_i = 0.38 cm min^{-1})	• En 40 jours, les bactéries formant des capsules ont diminué K de 2 fois comparativement à 300 fois avec les bactéries formant un biofilm
Comparaison des nutriments pour le colmatage à partir d'une microflore indigène[4]	colonne de terreau argileux silteux (D = 3.4 cm et L = 20.1 cm)	• En 80 jours, les nutriments testés : KNO_3, glucose et KNO_3 + glucose ont donné lieu à une diminution de K de 150, 300 et 2000 fois, respectivement
Pénétration et colmatage par des UMB isolées d'une eau de puits de récupération d'huile[5]	carotte de calcaire (16 cm × 10.2 cm)	• Suite à l'inoculation d'UMB et l'addition de milieu nutritif, la pression dans le simulateur de réservoir *in situ* est passée de 0 kPa à plus de 160 kPa en environ 35 jours

Tableau 2.14 Biocolmatage de milieux géologiques saturés (suite)

Comparaison du colmatage de minéraux utilisant *Bacillus cereus* [6]	pipettes remplies de minéraux argileux (illite, kaolinite, montmorillonite) et non argileux (quartz, feldspar, calcite, olivine)	• Avant l'injection des bactéries, la migration des particules – dans le cas des minéraux non argileux – et le gonflement des argiles – pour les minéraux argileux – a mené à la réduction de 40 et 67% de la perméabilité, respectivement. • Après l'injection des bactéries et le passage de 100 ml dans les pipettes, l'effet combiné du gonflement des particules et de l'attachement des bactéries ont permis une réduction de la perméabilité de 75 et 73 % pour les deux types de montmorillonite (Ca M. et Na M.). • Les pores de la calcite et de l'olivine ont été le plus fortement colmatés, menant à une réduction de 83 et 89 %, respectivement.
Simulation du colmatage d'une recharge d'eau souterraine[7]	colonne de sable sur un lit de gravier (D = 10 cm et L = 74 cm) alimentée avec trois types d'eaux usées synthétiques inoculées de flocs de boues activées ($K_i \equiv 5$ m j^{-1})	• Les résultats ont montré trois étapes de diminution du débit en sortie de colonne: 1- une phase rapide (diminution de 10 à 20 fois) entre les jours 0 et 8 équivalant à une étape aérobie, 2- une phase plateau de transition entre l'étape aérobie et anaérobie (jours 8 à 16) puis 3- une étape anaérobie où le débit diminuait moins rapidement que pendant la phase aérobie pour se stabiliser vers le 60e jour à environ 500 fois moins que la conductivité initiale.
Colmatage anaérobie d'un matériau granulaire utilisé pour le drainage d'un site d'enfouissement[8]	colonne d'agrégats de calcaire (D = 35 cm et L = 90 cm) alimentée avec 5 types de lixiviats synthétiques	• En moyenne, une réduction de la porosité variant entre 1 et 12 % a été mesurée entre 400 et 800 jours d'alimentation. • Les conditions hydrauliques ainsi que la charge biologique ont significativement influencé le colmatage.

[1](Vandevivere et Baveye, 1992) [2](Sanchez de Lozada *et al.*, 1994) [3](Vandevivere et Baveye, 1992) [4](Frankenberger *et al.*, 1979) [5](Cusack *et al.*, 1992) [6](Hayatdavoudi et Ghalambor, 1996) [7](Okubo et Matsumoto, 1983) [8] (Paksy *et al.*, 1998)

Les travaux portant sur la participation des bactéries et des EPS dans la réduction de la conductivité hydraulique, de même que les conditions de potentiel d'oxydoréduction nécessaires, sont particulièrement pertinents dans une perspective de biostimulation de la microflore indigène pour le colmatage d'une nappe aquifère de roc fracturé. Traditionnellement, le colmatage de milieux géologiques était associé à des conditions anaérobies. Vandevivere et Baveye (1992) ont montré le potentiel de biocolmatage d'un sable suite à l'activité de *Arthrobacter* sp., une bactérie aérobie obligatoire. En 22 jours, K a diminué de 100 fois (K_i = 0.072 mm s^{-1}); une diminution associée à la formation d'agrégats de cellules et la sécrétion d'EPS. En absence d'oxygène, suite à sa consommation dans la colonne, autant qu'en conditions limitées en carbone et en azote, une réduction de K, pouvant atteindre 5 fois moins que la valeur initiale, était due à l'obstruction des pores uniquement par les cellules, tel que montré par microscopie électronique. Les photos de microscopie révélaient un développement de bactéries et d'EPS en amas, ce qui contredit l'hypothèse d'un biofilm uniforme lorsque développé par une seule souche bactérienne (Characklis et Marshall, 1990).

Les résultats d'une étude pilotée par Sanchez de Lozada *et al.* (1994) ont montré qu'une diminution de K de l'ordre de 95 %, dans une colonne de sable, était réalisable en condition anaérobie, après l'injection de *Methanosarcina barkeri*, une bactérie méthanotrophe. Selon les auteurs, cette diminution était majoritairement attribuable à la production de méthane (jusqu'à 20×10^{-6} m^3 j^{-1}), telle qu'observée visuellement à travers la colonne. Cette hypothèse était corroborée par une faible accumulation des cellules dans la colonne.

L'importance du transport des bactéries dans le colmatage d'un milieu poreux saturé a été montrée en utilisant deux bactéries ne formant pas d'EPS, non mobiles et aérobies obligatoires: *Arthrobacter* et SLΓ (Vandevivere et Baveye, 1992). La bactérie SLΓ avait un taux de croissance inférieur à *Arthrobacter* en conditions pauvre de source de carbone,

se traduisant en un colmatage significativement inférieur (95 fois moins). Malgré la faible densité de cellules SLI⁻ dans la colonne, la densité mesurée dans l'effluent s'est avérée de deux ordres de grandeur supérieure à la celle d'*Arthrobacter*. Les auteurs ont conclu leur étude en reliant l'hydrophobicité des cellules à leur mobilité dans les matériaux poreux; une caractéristique affectant leur attachement et leur transport. Il est reconnu que la concentration en nutriments peut affecter l'hydrophobicité des cellules (Cusack *et al.*, 1992). Une souche bactérienne ayant des exigences nutritionnelles élevées, telle SLI⁻, peut posséder une hydrophobicité de surface moindre en condition pauvre de source de carbone, menant à une mobilité plus importante.

Dans une autre étude, Vandevivere et Baveye (1992) montrent la participation des EPS dans le colmatage d'un sable. La conductivité hydraulique diminue de 150 fois plus lorsque la souche SLI est inoculée au sable en comparaison avec sa variante SLI⁻, ne produisant pas d'EPS. Les essais avec les souches bactériennes CAP et CAP⁻ (référant à la formation d'EPS capsulaires) ont amené une réduction de K de 5 fois seulement. La densité cellulaire en sortie de colonne était non significativement différente entre les quatre souches bactériennes testées ($\equiv 10^6$ cell. ml^{-1}). Par contre, la densité de biomasse dans la colonne était quelque peu supérieure dans le cas des bactéries SLI et SLI⁻. Malgré cette différence, les auteurs assument que la densité de la biomasse dans la colonne (entre 0 et 15 mg cm^{-3}) était insuffisante pour diminuer la conductivité hydraulique et associent le colmatage à la sécrétion d'EPS.

Les UMB ont été étudiées dans les milieux géologiques saturées quant à leur capacité à pénétrer des pores plus petits que ne le feraient les bactéries de diamètre supérieur. De même, leur hydrophobicité de surface inférieure, leur permettant d'être transportées sur une plus grande distance, a retenu l'attention des chercheurs. Utilisant la souche *Pseudomonas* sp. FC3., Cusack *et al.* (1992) ont montré la colonisation et la sécrétion d'EPS dans toutes les sections d'une carotte de calcaire donnant une réduction de K de 95 % en 24 jours. Sharp *et al.* (1999) ont mesuré le transport de *Klebsiella, Pseudomonas et*

Shewanella en milieux poreux. Injectées en phase de dormance avec des nutriments, les UMB ont retrouvé leur taille normale entre 48 et 104 heures. Comparativement aux cellules végétatives, ces UMB ont été transportées sur des distances significativement plus grandes, atteignant jusqu'à 50 mètres. Selon ces auteurs, un intérêt certain de l'injection d'UMB réside dans la prévention du colmatage des puits d'injection de nutriments.

Récemment, un essai à l'échelle terrain à été effectué dans une perspective de biocolmatage via la stimulation de la microflore indigène d'un aquifère de sable (granulosité médium) ($K \cong 8\text{-}10$ m j^{-1} et $S \cong 0.002$) (Trefry *et al.*, 1998). Le dispositif consistait en une série de puits d'injection de nutriments (20 g L^{-1} glucose, 1.6 gL^{-1} NH_4Cl, 1.0 gL^{-1} $NaNO_3$ et 130 mg L^{-1} NaBr) disposés afin de diminuer la conductivité hydraulique sur 10 m de longueur et 2 m de largeur et ce, 4 m en dessous du niveau de la nappe phréatique. L'injection des nutriments a été maintenue pendant trois jours. Dès les premières heures, K a diminué pour atteindre, après 4 jours, 75 % de sa valeur initiale. Cependant, après 22 jours, les valeurs de K avaient retrouvé leurs valeurs initiales. La concentration d'EPS dans l'aquifère est passée de 0.06-0.25 mg g^{-1}, avant l'injection de nutriments, à 4 mg g^{-1}, mesuré au 4e jour de l'essai. Cependant au 20e jour, les EPS avaient une concentration de 0.1-0.7 mg g^{-1}. Le site, contaminé aux hydrocarbures, avait un panache s'étendant sur 200 m. Une réduction massique allant jusqu'à 70 % en benzène, éthylbenzène et m,p-xylènes a été mesurée suite à l'addition de nutriments. La biodégradation a certainement contribué à la réduction des contaminants. Les auteurs ont également soulevé l'hypothèse d'une dilution pendant le pompage et l'injection de nutriments de même qu'une volatilisation avec les gaz produits par les bactéries. Quoique l'étendue du colmatage se soit avérée inférieure aux objectifs de l'essai, ces travaux ont permis de valider l'approche de biostimulation d'une microflore indigène pour le colmatage d'un aquifère. De même, le dispositif d'injection des nutriments ainsi que le plan de monitorage ont été efficace d'une part, à induire et, d'autre part, à suivre le changement de conductivité hydraulique.

2.3 L'innocuité des biotechnologies environnementales

La notion de protection de la biodiversité est devenue un sujet d'intérêt mondial depuis une dizaine d'années, comme en témoignent la *Convention des Nations Unies sur la diversité biologique*, adoptée en 1992 au Sommet de la Terre de Rio, et la *Convention sur la diversité biologique du Ministère de l'Environnement du Québec*, entrée en vigueur en avril 1996 (Ministère de l'environnement et de la faune, 1996). De même, les préoccupations de la population face au devenir des produits issus de la biotechnologie ont incité les instances gouvernementales à instaurer des lois et règlements relatifs à leur contrôle (Environnement Canada, 1997; United States Environmental Protection Agency, 1997).

Au Canada, les modifications au *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (RRSN), adoptées le 1er septembre 1997 en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE), visent à garantir que les produits biotechnologiques, dont les micro-organismes, ne soient pas introduits en territoire canadien tant que leur potentiel de toxicité n'aura pas été démontré. Sous ce règlement, n'importe quelle personne qui fabrique, cultive ou importe des produits biotechnologiques doit fournir une déclaration à Environnement Canada. Relativement aux biotechnologies environnementales, où des micro-organismes peuvent être injectées, des renseignements concernant les effets sur la biodiversité et une évaluation écotoxicologie sont requis. L'Annexe 9 énumère les renseignements exigés à l'égard des micro-organismes, plus spécifiquement dans une perspective d'application *in situ*.

2.3.1 Effets sur la diversité de la microflore indigène

La diversité microbienne joue un rôle important dans la régulation de la composition de l'atmosphère (ex. photosynthèse) ainsi que dans le contrôle de la structure et la fertilité

des sols (ex. cycles biogéochimiques) (Reaka-Kudla *et al.*, 1997). Pour répondre aux exigences du RRSN, les renseignements exigés viseront d'une part, à vérifier l'innocuité et le devenir des micro-organismes injectés *in situ*, et d'autre part, à mesurer les effets de la biotechnologie sur la communauté microbienne indigène (Environnement Canada, 1997).

Une approche conceptuelle de la biodiversité microbienne comprend trois éléments: la diversité taxonomique, génétique et fonctionnelle (Figure 2.8) (Zak *et al.*, 1994). Alors que la taxonomie vise à classifier les organismes et la diversité génétique les différencie selon leur génome, la diversité fonctionnelle réfère aux activités métaboliques. La diversité génétique repose sur les différenciations évolutionnaires (Madigan *et al.*, 1999). Tandis que la diversité fonctionnelle provient à la fois de la variabilité génétique à l'intérieur des taxons (espèces, genres, familles, etc.), des effets des facteurs environnementaux sur l'expression génétique et des interactions écologiques entre les taxons. Une intégration des paramètres de diversité génétique et fonctionnelle, lors d'études d'impacts sur un écosystème, est de plus en plus rapportée dans la littérature (Arias *et al.*, 1997; Baath *et al.*, 1998; El Fantroussi *et al.*, 1999; Lebaron *et al.*, 1998; van Elsas *et al.*, 1998).

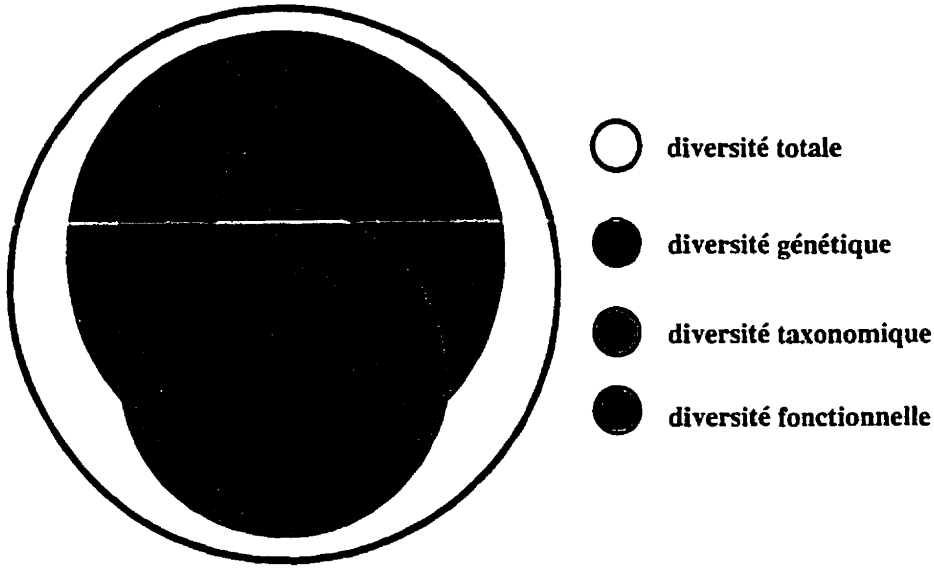


Figure 2.8 Concept de biodiversité totale reliant la diversité génétique, taxonomique et fonctionnelle

Afin d'évaluer les effets de l'ajout de micro-organismes sur la microflore *in situ*, une approche multi-techniques est proposée : techniques de culture (ex. décompte de bactéries hétérotrophes), techniques de dénombrement direct, pour le décompte des cellules cultivables et non cultivables (ex. microscopie à épifluorescence, Annexe 1-protocole P12 - A), techniques basées sur l'analyse des acides nucléiques (ex. séquençage des gènes ARNr 16S, section 5.5.3) et techniques basées sur les changements de structure de la communauté microbienne (ex. système de microplaques Biolog, Annexe 1-protocole P12 - D) (Stotzky *et al.*, 1993).

2.3.1.1 Changements de diversité génétique

Relativement peu de recherches ont été réalisées sur les effets écologiques suite à l'ajout de micro-organismes ou de la stimulation de la microflore indigène. Les micro-organismes injectés évoluent dans les sols selon différents processus: 1- une croissance, 2- une adaptation physiologique aux conditions environnementales, 3- une conversion en

cellules non cultivables et 4- un transfert des gènes (Roszak et Colwell, 1987). À ce jour, le manque de connaissances sur le processus de conversion des cellules cultivables en cellules non cultivables ainsi que la détermination des valeurs-seuils impliquant un risque environnemental représentent deux limitations majeures.

van Elsas *et al.* (1998) ont récemment évalué les changements de densité ainsi que la proportion cultivable d'un inoculum de *Pseudomonas fluorescens* R2f (une bactérie modifiée génétiquement) dans un sol. Les résultats ont montré qu'entre l'inoculation et le 120e jour, la densité bactérienne est passée de 7.6 à 2.6 log UFC g^{-1} sol, lorsque mesurée sur Petri sélectifs. Pour le même intervalle de temps, un décompte bactérien par microscopie pour la détermination de cellules viables montrait une diminution de 7.6 à 5.2 log cellules g^{-1} sol. La différence de trois ordres de grandeur entre les deux mesures suggère une augmentation substantielle de bactéries viables mais non cultivables.

Les changements de la diversité génétique d'une communauté microbienne indigène ont été principalement étudiés sous l'angle de l'effet d'une exposition à une contamination (Crozier *et al.*, 1999; Gsell *et al.*, 1997; Sandaa *et al.*, 1999) et du suivi pendant la biodégradation (Dojka *et al.*, 1998; Ducrocq *et al.*, 1999). Lors d'application d'une biotechnologie sur le terrain, les résultats en découlant peuvent être jumelés à des mesures chimiques pour le monitorage et l'évaluation du risque (Macnaughton *et al.*, 1999; Power *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 1999). Les résultats de ces recherches pourront servir de base de comparaison lors d'études sur les effets de la biostimulation sur une communauté microbienne indigène (Tableau 2.15).

Tableau 2.15 Changements de diversité génétique de communautés microbiennes exposées à des contaminants

sujet	résultats pertinents
Mesure des effets d'une zone de décharge et des variations saisonnières sur une communauté bactérienne de l'eau souterraine: [1]	• La synthèse des lipides était significativement supérieure en amont versus en aval de la zone de décharge (ex. 14000 vs 9000 DPM/g respectivement, équivalant au nombre de désintégrations par minute du glucose-C^{14} incorporé dans les phospholipides). • En amont, la communauté microbienne avait un rapport d'incorporation de C^{14} dans les membranes supérieure à la communauté en aval (ex. en septembre : 3.2 vs 1.5 PL/GL, rapport phospholipides sur glycolipides).
Comparaison des microflores de quatre zones de potentiel d'oxydoréduction (1- méthanogène, 2- sulfato-réductrice, 3- réductrice du fer et sulfato-réductrice et 4- réductrice du nitrate) d'un site contaminé aux hydrocarbures et solvants chlorés en processus d'atténuation naturelle[2]	• Sur les 104 types de séquences de gènes ADNr 16S, la biodiversité de la zone 3 était significativement différente des trois autres zones (ex. *Exiguobacterium aurantiacum*, affiliée à 99%, *Duganella zoogloeoides*, affiliée à 97%). • L'abondance des types de séquences OP (entre 10 et 25 % dans chaque zone) suggèrent un rôle important de ce groupe bactérien dans la bioremédiation. • Deux types de séquences ont été sélectionnés comme indicateurs de l'atténuation naturelle en conditions méthanogène, pour le cas de cet aquifère, et pouvant servir pour d'autres aquifères (types de séquences: *Methanosaeta* pour la méthanogénèse et *Syntrophus* pour la fermentation).
Mesure des effets de l'addition de boues activées et de métaux lourds sur une communauté du domaine *Archaea* (ex. bactéries méthanogènes)[3]	• Par rapport au sol témoin, la structure de la communauté était significativement modifiée, tel que montré visuellement par la répartition des bandes d'ADNr 16S sur un gel d'électrophorèse. • L'ajout de boues activées a contribué à baisser le pH, donc à augmenter la solubilité des métaux lourds, amenant une structure significativement différente des échantillons sans boues activées. • En présence de métaux lourds, la proportion d'*Archaea* dans le sol est passée de 1.3% à en-deça de la limite de détection.

Tableau 2.15 Changements de diversité génétique de communautés microbiennes exposées à des contaminants (suite)

Comparaison des communautés microbiennes de quatre parcelles de sol (4 x 9 m) recevant différents types de traitements : 1- un témoin sans huile, 2- un ajout d'huile, 3- idem avec nutriments et 4- idem avec un inoculum[4]	• Le témoin contenait significativement moins de bactéries gram négatives que les trois autres sols, bactéries représentées par le phylum *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides.* • La structure et la diversité des échantillons ont évolué pendant la bioremédiation, sans montrer de différence significative entre les trois échantillons contaminés. • Après 14 semaines de bioremédiation, des résultats contradictoires ont été notés : le profil des acides gras des communautés bactériennes montrait des similitudes entre les 4 traitements tandis que les gels d'électrophorèse montraient d'importantes différences de structure.

[1](Gsell *et al.*, 1997); [2](Dojka *et al.*, 1998); [3](Sandaa *et al.*, 1999); [4](Macnaughton *et al.*, 1999)

2.3.1.2 Changements de diversité fonctionnelle mesurés par l'oxydation de sources de carbone

La diversité fonctionnelle réfère aux activités intrinsèques des organismes. Ces activités ont un rôle crucial au niveau de l'écologie microbienne (section 2.1.1.3), ayant elle-même une importance primordiale dans le réseau de la vie terrestre (ex. agriculture et décontamination des sites). Des exemples de diversité fonctionnelle sont présentés à la section 2.1.1.4 (p.17) : oxydation du carbone, fixation du CO_2, nitrification, dénitrification, oxydation et réduction du fer, sulfato-réduction.

En 1991, Garland et Mills (1991) proposent d'évaluer les changements de diversité fonctionnelle en mesurant l'oxydation des sources de carbone (Annexe 1). Cette méthode permet de comparer les profils d'utilisation de source de carbone par des communautés microbiennes provenant de différents échantillons (ex. différentes locations d'un site) ou encore, sur une même population suite à des changements environnementaux (Garland,

1997). Le principe de la méthode repose sur le développement d'une coloration, mesurée par spectrophotométrie, indiquant l'oxydation des sources de carbone, lesquels sont disposés individuellement sur une plaque contenant 96 puits (95 sources de carbone et un témoin). L'intérêt de la technique réside dans sa simplicité (ne nécessitant pas d'étapes de culture et d'isolation des bactéries), sa reproductibilité et son faible coût (Haack *et al.*, 1995).

Tout comme la diversité génétique, les études sur le changement de la diversité fonctionnelle ont surtout porté sur les effets d'une contamination (Tableau 2.16). Dans le cas d'une phytoremédiation, l'effet d'un inoculum (*Pseudomonas aeruginosa et P. savastanoi*) sur la communauté microbienne entourant les racines de seigle (*Elymus dauricus*) et de safran (*Bromus biebersteinii*) a été mesurée (Siciliano et Germida, 1998). L'inoculation des plantes en processus de phytoremédiation stimule l'activité enzymatique de ces dernières (Mawdsley et Burns, 1994). Et, les enzymes excrétées permettent la biodégradation des contaminants. L'étude visait à observer les effets sur: 1- la capacité de dégradation de l'acide 2-chlorobenzoïque (A2CB), 2- la diversité fonctionnelle (système Biolog) et 3- la diversité génétique (extraction des esters d'acide méthylés) de la microflore racinaire de ces deux plantes. Les résultats ont montré que l'inoculum a affecté différemment la microflore des racines de seigle et de safran et ainsi, a stimulé différemment la phytoremédiation. La diversité génétique et fonctionnelle n'était pas significativement différente entre les communautés microbiennes des racines du témoin et du seigle. Par contre, une analyse des sources de carbone oxydées par la microflore entourant le safran a montré une augmentation de l'utilisation des amines, des amides et des polymères de la microplaque Biolog. De même, le profil des esters d'acide méthylés dans le cas du safran était également significativement différent du témoin. En comparaison avec la plante non inoculée, l'inoculation du seigle a permis une augmentation la dégradation de l'A2CB de 30 % et de 3,5 fois dans le cas du safran.

Tableau 2.16 Changements de diversité fonctionnelle de communautés microbiennes exposées à des contaminants

sujet	résultats pertinents
Effets de métaux lourds (Cu, Ni, Zn) sur la communauté microbienne d'un sol[1]	• Alors que les comptes totaux bactériens n'étaient pas différents, le sol exposé au Cu a montré une diminution significativement plus importante de sa capacité oxydative des sources de carbone.
Effets de la présence de trichloroéthylène (TCE) et de toluène sur une communauté microbienne d'un sol[2]	• En comparaison à un sol témoin, plusieurs échantillons montraient un profil différent d'oxydation de sources de carbone. • Même après 30 jours suivant la volatilisation des contaminants, le nombre de sources de carbone oxydé est demeuré significativement inférieur pour les sols exposés à la contamination (ex. 37 pour le témoin vs 3 pour le sol ayant été exposé à 100 µg de toluène).
Effets d'un lixiviat contenant des phénols sur la communauté microbienne isolée d'une rivière[3]	• Le système Biolog a montré des changements de diversité fonctionnelle différents pour les échantillons où la viabilité, le pH et le phosphore total différaient, indiquant des zones de potentiel de biodégradation.
Comparaison des effets de l'addition de boues contenant des métaux lourds (Cu, Ni et Zn, à différentes concentrations) sur deux types de sols (terreau silteux et terreau sablonneux)[4]	• Dans le cas du terreau silteux, les profils d'oxydation du carbone étaient similaires aux profils des acides gras (diversité génétique) de la communauté microbienne pour l'ensemble des traitements. • Pour ce même sol, la diversité fonctionnelle s'est avérée différente seulement en présence de Cu à de hautes concentrations (282 mg/kg). • Pour le terreau sablonneux, aucune différence significative de diversité fonctionnelle n'a été mesurée ($p > 0.05$) quoique l'analyse des acides gras suggère une modification dans la structure de la communauté microbienne.

Tableau 2.16 Changements de diversité fonctionnelle de communautés microbiennes exposées à des contaminants (suite)

Comparaison entre la diversité fonctionnelle de communautés microbiennes échantillonnées de sols contaminés par la créosote vs un sol témoin[5]	• Aucune différence significative entre les sols lorsque la microplaque Biolog GN (Gram négatif, comprenant 95 sources de carbone) était utilisée. • En sélectionnant 23 sources de carbone pertinentes, certains sols contaminés avaient un indice de diversité plus élevé que les sols non contaminés (ex. 2.79 vs 2.96) (une oxydation plus importante, i.e. une coloration plus prononcée) même si l'indice de richesse (le nombre de sources de carbone oxydé) n'était pas significativement différente (22.7 sources de carbone utilisées en moyenne) ($p > 0.05$).
Évaluation des changements de diversité fonctionnelle de sols contaminés par des hydrocarbures[6]	• Après 94 jours d'incubation d'un sol ayant une longue historique de contamination, la concentration des hydrocarbures totaux a diminué de 58 % et le nombre de bactéries hydrocarbonoclastes a augmenté de 51 %. • Lorsque inoculé dans la microplaque Biolog, la communauté microbienne n'a pas oxydé significativement plus ou moins de sources de carbone en comparaison avec le sol contaminé non incubé. • Par contre, le profil d'oxydation différait: 16 sources de carbone n'étaient plus oxydées mais la communauté microbienne incubée avait la capacité d'oxyder 12 nouvelles sources de carbone sur l'ensemble de la microplaque.

[1](Campbell *et al.*, 1995) [2](Fuller *et al.*, 1997) [3](Talpsep *et al.*, 1997) [4](Baath *et al.*, 1998) [5](Derry *et al.*, 1998) [6](Wunsche *et al.*, 1995)

La technique utilisant le système Biolog s'est avérée efficace pour montrer des changements de diversité fonctionnelle d'une communauté microbienne dans son ensemble mais n'informe pas sur le nombre ni le genre bactériens présents dans la

communauté. Pour cette raison, l'interprétation des résultats doit se limiter à une indication globale des changements de diversité fonctionnelle. Plusieurs travaux illustrent cette réalité. Haack *et al.* (1995) ont montré que l'oxydation et le taux d'oxydation des sources de carbones par une communauté microbienne n'égalait pas la somme des oxydations par les membres de la communauté testés séparément. À titre d'exemple, l'absorbance mesurée dans le puits contenant du galactose, était respectivement de 1.6, 0.6 et 0 pour les genres *Cytophaga, Pseudomonas et Corynebacterium*, alors que la combinaison des trois bactéries dans ce même puits a permis de développer une coloration d'adsorbance égale à 0.7 (A = 590 nm, après 25 heures d'incubation de la microplaque). Cette étude a montré qu'aucune association ne peut être avancée entre l'oxydation d'une source de carbone et le nombre d'utilisateurs dans la communauté, étant donné l'absence de synergisme.

Seules les bactéries hétérotrophes aérobies et cultivables contribuent à l'établissement du profil d'oxydation. Également, ces profils reflètent l'activité des bactéries croissant le plus rapidement dans la communauté (Smalla *et al.*, 1998; Verschuere *et al.*, 1997). L'activité des bactéries croissant relativement plus lentement peut alors être masquée. Une comparaison entre une communauté comprenant 90 % de *Vibrio alginolyticus* (croissance très rapide) et 10 % de *Cytophaga marinoflava* (croissance lente) a montré que l'oxydation des sources de carbone était attribuable majoritairement à la souche *Vibrio* (une similitude de 98 % entre le patron de *Vibrio* et celui de la communauté).

Plusieurs auteurs ont soulevé la problématique de la densité de l'inoculum dans les puits de la microplaque (Haack *et al.*, 1995; Konopka *et al.*, 1998). En effet, le développement de la coloration s'avère proportionnel au nombre de bactéries, rendant problématique la comparaison de communautés microbienne de densités différentes. Pour remédier à cette limitation, Garland (1996) a proposé une normalisation des résultats en divisant les valeurs d'adsorbance de chaque puits par la moyenne de la coloration de la plaque (95 puits). Selon Howard (1997), cette approche permet effectivement un nivellement des

réponses mais ne traduit pas une réalité biologique, prétextant que la densité des communautés microbiennes ne se traduit pas directement en taux d'oxydation.

2.3.2 Évaluation écotoxicologique

Comme le mot l'invoque, l'écotoxicologie est dérivée des termes écologie et toxicologie. Cette science étudie les effets des produits chimiques (toxicologie) dans un contexte écosystémique. Relativement aux biotechnologies environnementales, l'écotoxicologie est utilisée dans une perspective de gestion des sites (Ministère de l'environnement et de la faune, 1996) et d'évaluation des effets écologiques de l'introduction de micro-organismes dans l'écosystème (Environnement Canada, 1997).

Étant donnée l'importance qu'occupe l'évaluation écotoxicologique dans la gestion des sites, il convient de la positionner cette science dans la démarche de gestion. L'évaluation écotoxicologique entre dans les stratégies de gestion afin d'établir le danger, l'impact et le risque des substances toxiques sur l'écosystème (Forbes et Forbes, 1994). L'évaluation du danger vise à fournir l'information nécessaire pour juger du danger ou de l'innocuité d'une substance chimique (ex. sélection des essais de toxicité et détermination de l'incertitude du risque) (Cairns *et al.*, 1978). L'impact se définit comme l'identification des problèmes environnementaux spécifiques à un projet ou à un site (Barnthouse *et al.*, 1986). Enfin, Volmer *et al.* (1988) définissent l'évaluation du risque comme une méthode d'estimation de l'importance et la probabilité des effets néfastes des substances chimiques sur l'environnement.

Le gestionnaire de site peut être supporté dans sa démarche en utilisant des procédures publiées (CCME, 1996; USEPA, 1992). Au Québec, comme support à la *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés*, le Ministère de l'environnement du Québec prépare une *Procédure d'évaluation du risque écotoxicologique* (PÉRÉ) (Ministère de l'environnement et de la faune, 1996). Dans cette

procédure, l'évaluation écotoxicologique se réalise suivant deux étapes: une évaluation du danger suivie d'une évaluation du risque. La caractérisation du danger regroupe: la caractérisation des effets (potentiels toxiques et génotoxiques), la caractérisation de la source (caractérisation des substances toxiques) et l'estimation du sort (devenir, potentiel de dégradation, de mobilité et de bioconcentration). Le risque s'évalue par: la caractérisation des récepteurs (composantes biologiques en présence, leur abondance, leur sensibilité), l'identification du danger et l'estimation de l'exposition (voies d'exposition, durée, fréquence et amplitude).

Le défi de l'écotoxicologie réside dans l'établissement de liens entre les réponses toxiques mesurées sur des organismes et les changements écosystémiques (Figure 2.9) (Forbes et Forbes, 1994; Walker *et al.*, 1996). En relation avec la problématique des sites contaminés, plusieurs ouvrages ont ciblé la caractérisation des récepteurs écologiques d'intérêt, une analyse des effets directs et indirects causés par la présence de contaminants et la traduction en répercussions à court et moyen termes sur les écosystèmes spécifiques (Thellen *et al.*, 1995).

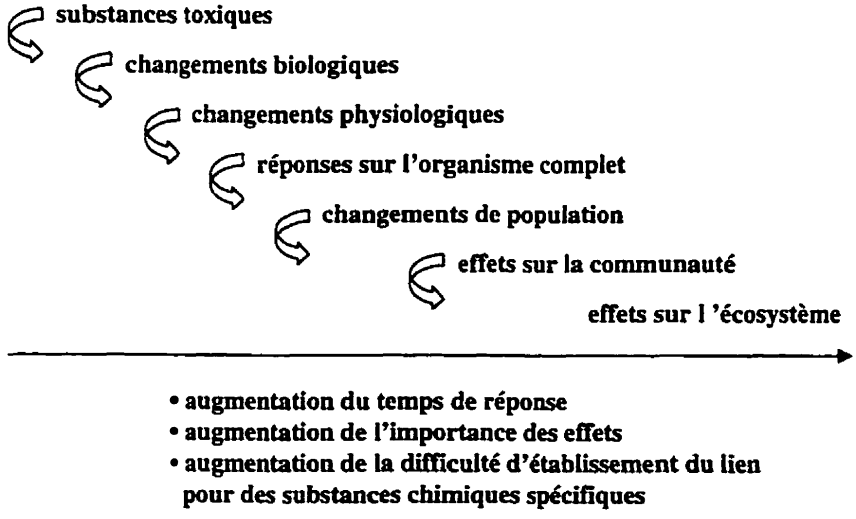


Figure 2.9 Hiérarchisation des effets des substances toxiques sur un écosystème (Forbes et Forbes, 1994)

Les substances toxiques étudiées se rapportent habituellement aux contaminants relargués dans l'environnement suite aux activités humaines. Ces contaminants peuvent se regrouper en quatre grandes classes: les polluants issus de l'agriculture (ex. pesticides), les polluants de sources non agricoles (ex. hydrocarbures), les métaux lourds (ex. le cadmium) et les déchets radioactifs (^{239}Pu, résidu des réacteurs nucléaires) (Guthrie et Perry, 1980). Les nouvelles exigences réglementaires quant à l'introduction de micro-organismes sur un site demandent de vérifier leurs effets écologiques (ex. effets du micro-organisme sur les espèces aquatiques de plantes, d'invertébrés et de vertébrés susceptibles d'y être exposées) (Environnement Canada, 1997). Dans cette optique, les micro-organismes, ainsi que leurs métabolites, doivent être étudiés en fonction d'une génération potentielle de toxicité sur l'écosystème (Figure 2.9).

Lors d'une évaluation écotoxicologique, l'approche comprend habituellement l'application d'une batterie de bioessais, incluant plusieurs niveaux trophiques dont les micro-organismes (Guthrie et Perry, 1980; Keddy *et al.*, 1995; Sloterdijk *et al.*, 1989). Des exemples de réponses mesurées sur les micro-organismes exposés à des substances chimiques sont montrés au Tableau 2.17. Ces résultats pourront servir de référence pour l'évaluation écotoxicologique de micro-organismes injectés *in situ*.

Tableau 2.17 Utilisation des bactéries pour l'évaluation écotoxicologique

type de réponse	organisme cible	substance testée
génotoxicité (SOS chromotest)	• *Escherichia coli*	• 83 composés, ex. benzo-a-pyrène[1] • sol contaminé par le PCP, en processus de bioremédiation[8]
	• *Salmonella* sp.	• eau potable, municipale, souterraine, effluent d'industries de pâtes et papier, lixiviats de sites d'enfouissement[6]
inhibition de la bioluminescence	• *Photobacterium phosphoreum*	• sédiments contaminés par les métaux lourds[2] • plus de 50 composés, ex. phénols halogénés[3] • eau usée municipale[4] • sol contaminé par le PCP, en processus de bioremédiation[8]
inhibition de production de gaz	• bactéries méthanogènes	• plus de 50 composés, ex. phénols halogénés[3]
inhibition de la respiration aérobie	• consortium d'une liqueur mixte prélevé d'un procédé de traitement par boues activées	• plus de 50 composés, ex. phénols halogénés[3]
	• Polytox: consortium vendu commercialement comprenant 12 souches bactériennes isolées de boues activées	• 22 produits chimiques, ex. benzène, toluène, éthylbenzène[7]
inhibition de la consommation d'ammoniaque	• consortium d'une liqueur mixte prélevé d'un procédé de traitement par boues activées	• plus de 50 composés, ex. phénols halogénés[3]
variation du profil des protéines	• micro-organismes indigènes d'eau de surface et de sédiments	• benzène, toluène, xylène et trichloroéthylène[5]

[1] (Quillardet *et al.*, 1985) [2] (Sloterdijk *et al.*, 1989) [3] (Blum et Speece, 1991) [4] (Zhang et Sun, 1995) [5] (Ogunseitan, 1996) [6] (Helma *et al.*, 1996) [7] (Peace *et al.*, 1997) [8] (Knoke *et al.*, 1999)

D'après Guthrie et Perry (1980), les substances toxiques générées dans l'environnement par les micro-organismes proviennent majoritairement du métabolisme des pesticides (ex. DDT métabolisé en DDD), de la transformation du mercure en méthylmercure (s'accumulant dans la chaîne alimentaire), du métabolisme de l'arsenic, de la formation de drainage minier acide et du dégagement de H_2S par les bactéries sulfato-réductrices. L'évaluation écotoxicologique de biotechnologies environnementales a montré que la biodégradation de plusieurs contaminants (ex. hydrocarbures aromatiques polycycliques) pouvait mener à la formation de produits intermédiaires parfois plus toxiques que le contaminant lui-même (Alexander, 1994; Renoux, 1996; Santini, 1998; Seymour *et al.*, 1997).

Dans une perspective de biostimulation d'une microflore indigène la croissance de souches bactériennes pathogènes ainsi que l'accumulation de PMS pourraient potentiellement générer une écotoxicité. À titre d'exemple, l'espèce *Escherichia coli*, se retrouvant dans les eaux souterraines contaminées, croît rapidement en condition riche en source de carbone (Matthess et Harvey, 1982). Le potentiel écotoxique des PMS reste à être démontré. Néanmoins, certains résultats de travaux suggèrent une toxicité, telles une inhibition de la nitrification en condition cuvée (Chudoba, 1985) et une réponse mutagène d'un effluent secondaire d'un procédé de traitement d'eaux usées (Barker et Stuckey, 1999). Parallèlement, la capacité des PMS à agir comme agents chélateurs pourrait contribuer à diminuer la toxicité en présence de métaux (Callander et Barford, 1983; Kuo *et al.*, 1996).

CHAPITRE 3
SYNTHÈSE DU PROJET

Initialement, le projet se voulait une exploration du concept des biobarrières pour son application dans les aquifères. La problématique typique des rocs fracturés a stimulé le choix de ce milieu. L'adoption de nouveaux règlements fédéraux concernant les produits biotechnologiques a incité à évaluer les impacts environnementaux parallèlement à l'étude des bases scientifiques de validation du concept. Dans le présent document, les chapitres IV, V et VI forment le corps de la thèse. Ils sont présentés sous forme de manuscrits rédigés en langue anglaise et publiés, ou soumis, à des revues scientifiques avec comités de lecture. Le corps de la thèse est complété par des résultats présentés en annexes. Le chapitre de synthèse expose la démarche scientifique et permet une visualisation de l'ensemble des travaux.

3.1 Vue d'ensemble du projet

La biostimulation d'une microflore indigène des eaux souterraines représente le point central du projet. Cette biostimulation a été étudiée sous quatre aspects: 1- physico-chimique, 2- écotoxicologique, 3- microbiologique et 4- dynamique (Figure 3.1). Ces aspects ont permis d'évaluer le potentiel d'utiliser la microflore indigène dans une perspective de développement de la barrière biologique *in situ*, en tenant compte des récentes orientations normatives et politiques en matière environnementale.

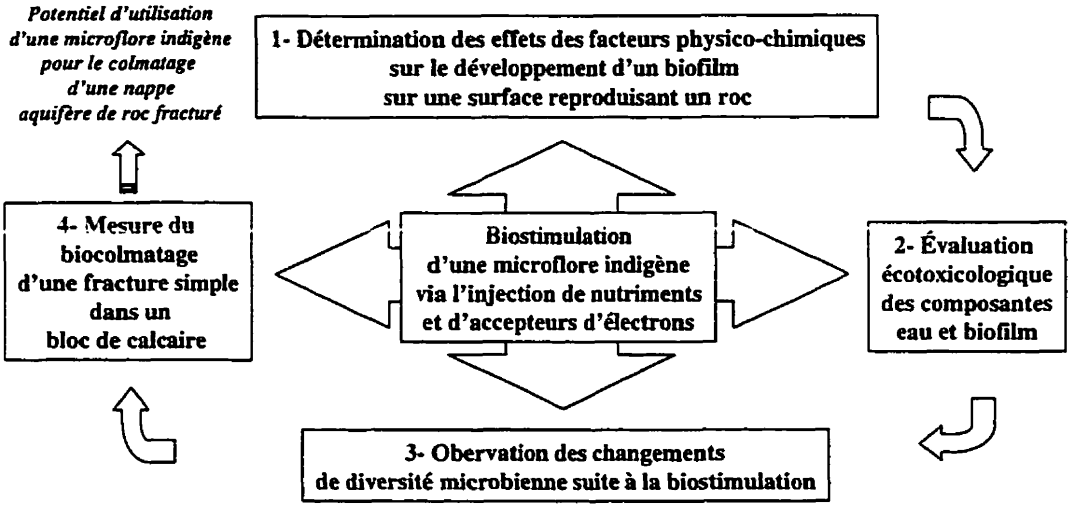


Figure 3.1 Démarche scientifique du projet

3.2 Approvisionnement en eau souterraine et conservation de la microflore

Les échantillons d'eau souterraine ont été obtenus d'un puits de surveillance entourant le Complexe environnemental de Saint-Michel (CESM, Montréal, Qc, Canada). Ils ont été pompés d'une profondeur de 70 m et recueillis après une purge de trois volumes de puits (≡ 1000 L), suivant une méthode proposée par le Ministère de l'environnement et de la faune (Tableau 3.1) (Ministère de l'environnement et de la faune, 1994). Dans un premier temps, une analyse des principaux ions de l'eau a servit pour la formulation d'une eau souterraine synthétique. L'eau souterraine synthétique a été utilisée pour pallier la problématique d'approvisionnement annuel et de reproductibilité des résultats (Matthess et Harvey, 1982). En effet, la composition d'une eau souterraine naturelle varie pendant l'année, principalement en raison des différences de température qui modifient les équilibres chimiques (pH, solubilité).

Tableau 3.1 Références relative à l'échantillonnage de l'eau souterraine et la conservation de la microflore indigène

type d'information	référence section	référence page
• croquis du puits de pompage	Annexe 2	225
• schéma de l'appareillage de pompage	Annexe 2	225
• analyse chimique de l'eau souterraine	Annexe 2	225
• composition de l'eau souterraine synthétique	4.5.1	76
• protocole de conservation de la microflore (P12-B)	Annexe 1	199

Dans un deuxième temps, la microflore indigène de l'eau était conservée pour inoculations de l'eau souterraine synthétique. La méthode de conservation consistait en une concentration de la microflore suivie d'une congélation rapide à –80 °C, utilisant du glycérol comme agent cryoprotecteur (Tableau 3.1). L'eau a été recueillie deux fois par année (au printemps et à l'automne) entre 1995 et 1999. Les concentrats de la microflore indigène ont été utilisés à l'intérieur d'une période de 6 mois.

3.3 Détermination des effets des facteurs physico-chimiques sur le développement d'un biofilm sur une surface reproduisant un roc

Il est reconnu que la microflore des eaux souterraines peut contenir des bactéries productrices d'exopolysaccharides (EPS) (Hurst *et al.*, 1997). Également, des études ont démontré que l'injection de bactéries productrices d'EPS dans un milieu géologique saturé pouvait mener à une réduction substantielle de la conductivité hydraulique (article de revue: (Baveye *et al.*, 1998)). Considérant l'approche de biostimulation, la première démarche du projet a été de déterminer les facteurs favorisant la sécrétion d'EPS et de mesurer dans quelle mesure un biofilm s'accumulerait sur une surface reproduisant un roc.

Une revue de la littérature a permis de déterminer les facteurs physico-chimiques susceptibles d'influencer la sécrétion d'EPS et l'accumulation du biofilm pour l'application de biocolmatage dans un milieu géologique fracturé: le type de source de carbone, la concentration de la source de carbone, le ratio C :N :P, la concentration en oxygène, l'agitation du milieu, la présence d'ions calcium et la présence de contaminants (Characklis et Marshall, 1990; De Philippis *et al.*, 1996; De Vuyst *et al.*, 1987; Gancel et Novel, 1994; Gibbs et Seviour, 1996; Huang et Pinder, 1994; Lau et Liu, 1993; Linton *et al.*, 1987; Linton *et al.*, 1987; Ludensky, 1998; Morin *et al.*, 1993; Ohashi *et al.*, 1995; van der Wende *et al.*, 1989). Dans le système utilisé, certains facteurs chimiques, physiques et microbiologiques étaient fixés: le pH (pH = 8.3 initialement), la composition ionique de l'eau, la température (10°C), la composition et la rugosité de la surface, la composition ainsi que la concentration initiale de la microflore (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 Références relatives à la détermination des effets des facteurs physico-chimiques

type d'information	référence section	référence page
• méthodologie de l'étude sur les facteurs physico-chimiques : description du montage, choix des facteurs, statistiques	4.5	76
• protocole de mesure de l'épaisseur du biofilm (P12 - E)	Annexe 1	199
• protocole de la détermination de la concentration en EPS (P12 - F)	Annexe 1	199
• protocole de détermination de la concentration en glucides (P12 - G)	Annexe 1	199

Tableau 3.2 Références relatives à la détermination des effets des facteurs physico-chimiques (suite)

• analyses chimiques des sources de carbone	Annexe 3	230
• composition géochimique de la céramique	Annexe 4	231
• résultats et discussion	4.6.1	81
• autres analyses du biofilm	Annexe 5	234
• production d'EPS et développement de biofilms par deux autres microflores indigènes des eaux souterraines	Annexe 7	259

Pour la réalisation de l'étude, un système, permettant la comparaison des effets de plusieurs facteurs ainsi que la duplication des essais, a été développé (Figure 3.2). Les paramètres présents dans tous les réservoirs étaient: un volume de 500 ml d'eau souterraine synthétique, une inoculation avec 1 mL de concentrat de la microflore indigène (concentration initiale dans le réservoir 10^5 bact. hétérotrophes/ml), une addition journalière des nutriments et la présence d'une plaque de céramique (2.5 × 15 cm dont 2.5 × 7 cm immergés). Les facteurs physico-chimiques à l'étude, ainsi que les niveaux, sont présentés au Tableau 4.1 (p.78). Un plan statistique de Plackett-Burman a permis de déterminer les effets de ces facteurs sur six variables: la concentration de la biomasse en suspension, la concentration d'EPS en suspension, l'épaisseur du biofilm, le pH, le potentiel d'oxydoréduction et l'accumulation des glucides dans le milieu. Ce plan statistique a été choisi en raison de sa puissance à déterminer les effets significatifs de plusieurs facteurs simultanément tout en demandant un nombre relativement restreint d'essais et de réplicats (32 réservoirs de 1 L) (Clément, 1990). Les résultats de cette section du projet sont présentés au chapitre IV, ainsi qu'aux Annexe 5 & Annexe 7 (Tableau 3.2).

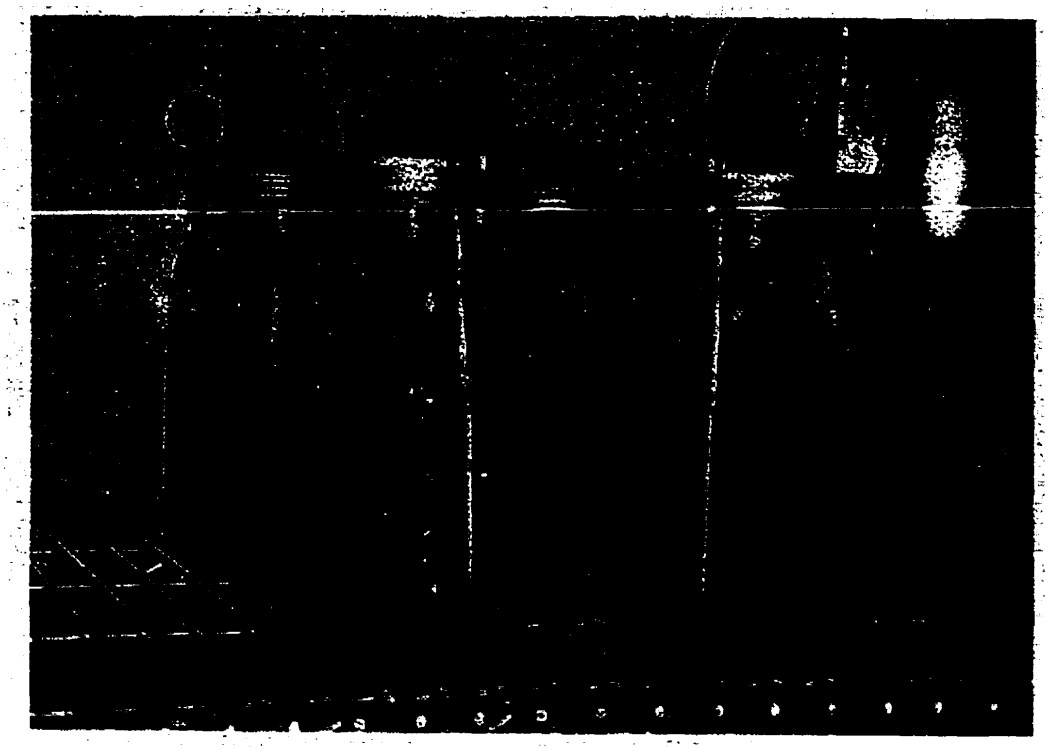


Figure 3.2 Réservoirs de 1 L utilisés pour l'étude des facteurs physico-chimiques, l'évaluation écotoxicologique et l'observation des changements de diversité microbienne

3.4 Évaluation écotoxicologique des composantes eau et biofilm

En vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, la preuve de l'innocuité fait maintenant partie de la démarche de développement des biotechnologies environnementales (Environnement Canada, 1997). Quoique l'approche de biostimulation de la microflore indigène, via l'addition de nutriments et d'accepteurs d'électrons, soit exclue de l'obligation de fournir une déclaration à Environnement Canada, il importait de vérifier le potentiel de génération d'une écotoxicité suite au développement d'un biofilm. Plusieurs recherches ont montré l'écotoxicité des contaminants et de leurs sous-produits de dégradation (Addison et Holmes, 1995; Adema, 1978; Blum et Speece, 1991; Boxall et Maltby, 1995; Helma *et al.*, 1996; Knoke *et al.*,

1999; Mäkelä et Oikari, 1995; Quillardet *et al.*, 1985; Rodgers *et al.*, 1996; Sixt *et al.*, 1995; Sloterdijk *et al.*, 1989; Traunspurger et Drews, 1996) et peu de travaux ont été réalisés sur la toxicité due aux micro-organismes ou à leurs sous-produits (Chudoba, 1985; Schiener *et al.*, 1998; Schlimme *et al.*, 1999). Dans une perpective de développement d'une biobarrière, la génération de produits microbiens solubles (PMS), était susceptible d'amener une écotoxicité dans la nappe aquifère (Pitter et Chudoba, 1990).

Pour réaliser l'évaluation écotoxicologique, des réservoirs de 1 L ont été utilisés en appliquant les conditions physico-chimiques significatives pour le développement du biofilm sur la céramique (Tableau 3.3). Ce système permettait l'accumulation des substances potentiellement écotoxiques; une condition souhaitée à cette étape-ci du projet. Les deux bioessais sélectionnés représentaient des organismes couramment utilisés pour des mesures d'écotoxicité en milieu aqueux (Keddy *et al.*, 1995; Sloterdijk *et al.*, 1989). Pour fins de comparaison des réponses écotoxiques, la biostimulation a été effectuée en réservoirs ne contenant pas de contamination et en réservoirs ayant reçus une concentration de 10 mg L^{-1} de pentachlorophénate de sodium (NaPCP). En tout, les organismes ont été exposés à neuf échantillons: trois témoins (eau saline 0.85% NaCl, eau souterraine synthétique, eau souterraine synthétique et mélasse), quatre solutions (1- eau souterraine synthétique et mélasse fraîchement inoculée, 2- la même solution après 8 jours de biostimulation, 3- eau souterraine synthétique, mélasse et NaPCP fraîchement inoculée et 4- même solution après huit jours de biostimulation) et deux échantillons de biofilms, en suspension dans une solution saline, provenant des réservoirs avec et sans NaPCP, respectivement.

Tableau 3.3 Références relatives à l'évaluation écotoxicologique

type d'information	référence section	référence page
• méthodologie des bioessais et de la production de PMS	4.5.7 & 4.5.6	80
• résultats & discussion de l'évaluation écotoxicologique et de la production de PMS	4.6.2	86
• Informations additionnelles des analyses écotoxicologiques	Annexe 5	234

Ainsi, il fût possible de comparer les réponses induites par la présence d'un contaminant, ayant fait l'objet de plusieurs études, aux réponses induites par l'accumulation de PMS dans le système, de même que de comparer les échantillons d'eau souterraine et de biofilms (Gifford *et al.*, 1996; Rao, 1978; Schmidt *et al.*, 1999). La quantité de PMS générés a été évaluée en déterminant la demande chimique en oxygène attribuable à ces produits (APHA *et al.*, 1992; Chudoba, 1985). Les résultats de l'évaluation écotoxicologique sont présentés au chapitre IV et à l' Annexe 5 (Tableau 3.3).

3.5 Observation des changements de diversité microbienne suite à la biostimulation

La démonstration de l'innocuité des biotechnologies nécessite également une évaluation des changements de structures dans la communauté microbienne indigène (Environnement Canada, 1997). Ces changements peuvent avoir comme effet de diminuer la biodiversité et entraîner un débalancement dans l'écosystème (ex. les cycles biogéochimiques). Un tel débalancement est d'autant plus indésirable s'il favorise la croissance de souches microbiennes pathogènes (Reaka-Kudla *et al.*, 1997). Il est reconnu que la modification des conditions physico-chimiques d'un milieu, telle l'injection de nutriments et d'accepteurs d'électrons, entraîne des changements de structure dans les communautés microbiennes. La majorité des recherches sur le sujet se

rapportent aux modifications dues à la présence de contaminants (Derry *et al.*, 1998; Dojka *et al.*, 1998; El Fantroussi *et al.*, 1999; Fuller *et al.*, 1997; Hubert *et al.*, 1999; Massol-Deya *et al.*, 1997) et peu ont exploré les effets d'une biostimulation *in situ* (Bossio et Scow, 1995; Insam *et al.*, 1996).

L'étude de changement de diversité microbienne a été réalisée en utilisant les réservoirs de 1 L et appliquant les conditions physico-chimiques significatives pour le développement d'un biofilm sur la céramique. Deux expérimentations ont été conduites. La première visait à comparer la diversité génétique et fonctionnelle des ultramicrobactéries (UMB) de l'eau souterraine au biofilm développé sur la céramique. La deuxième étude comparait la diversité fonctionnelle des UMB et des bactéries de taille « normale » ainsi que leur aptitude à sécréter des EPS et former un biofilm (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 Références relatives à l'étude de changements de diversité microbienne

type d'information	référence section	référence page
• méthodologie de l'étude : isolation des UMB, diversité génétique, diversité fonctionnelle, statistiques	5.5.2, 5.5.3 & 5.5.4	103 & 106
• protocole d'énumération et de viabilité des bactéries (P12 – A)	Annexe 1	199
• protocole de mesure de l'hydrophobicité de surface des cellules (P12 – C)	Annexe 1	199
• protocole de profil physiologique (diversité fonctionelle) (P12 – D)	Annexe 1	199
• photos de microscopie par épifluorescence	Annexe 2	225
• résultats et discussion de l'étude sur les UMB	5.6	108
• résultats de la comparaison des UMB et des bactéries de taille «normale»	Annexe 6	253

Il a été démontré que les UMB colmataient des pores et des fractures plus petits et étaient transportés sur des distances plus grandes, dans un matériel géologique, en comparaison avec les bactéries de taille «normale» (Cusack *et al.*, 1992; Cusack *et al.*, 1992; Sharp *et al.*, 1999). Dans une perspective de biostimulation d'une microflore indigène pour le colmatage de fractures, il importait de connaître la proportion de bactéries sous forme UMB et les différences en terme de diversité.

La première expérimentation jumelait des analyses de diversité génétique (SSCP et gènes ARNr 16S) – pour l'observation du changement de la quantité d'espèces UMB dans la communauté – et des analyses de diversité fonctionelle (système Biolog) – pour l'observation des changements dans la capacité oxydative de la communauté d'UMB. Pour ce faire, les UMB étaient obtenues suite à une filtration de la microflore indigène sur un filtre de diamètre de pores 0,4 µm. Des échantillons d'eau souterraine fraîchement inoculée d'UMB indigènes ont été comparés à des échantillons de biofilms, formés sur la céramique après 13 jours de biostimulation. La deuxième expérimentation mettait en parallèle les UMB et les bactéries de taille «normale» quant à la viabilité initiale, la diversité fonctionnelle, la sécrétion d'EPS et l'épaisseur du biofilm. Les résultats sont présentés au chapitre V et à l'Annexe 6.

3.6 Mesure du biocolmatage d'une fracture simple dans un bloc de calcaire

La démonstration du potentiel de biocolmatage d'une microflore indigène suite à une biostimulation représentait une étape cruciale du projet. En effet, bien que la preuve du biocolmatage par des bactéries injectées dans un sol ait été faite (Baveye *et al.*, 1998; Bellamy *et al.*, 1993; Characklis et Marshall, 1990; Dennis et Turner, 1998; Frankenberger *et al.*, 1979; Okubo et Matsumoto, 1983; Paksy *et al.*, 1998; Sanchez de Lozada *et al.*, 1994; Vandevivere et Baveye, 1992; Vandevivere et Baveye, 1992; Vandevivere et Baveye, 1992; Vandevivere *et al.*, 1995), la validation de l'approche de

biostimulation se profile depuis peu (Johnston *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1999; Turner, 1995). Plus particulièrement, cette approche devait être démontrée dans un milieu géologique fracturé (Cusack *et al.*, 1992; Shaw *et al.*, 1985).

Une étude préliminaire en colonne de sable a permis d'évaluer le temps de biocolmatage de la microflore lorsque biostimulée (Tableau 3.5). Le défi du colmatage d'un milieu géologique fracturé demeurait significatif en raison de la différence du volume des vides et de la vitesse de l'eau souterraine (Todd, 1980). Également, un montage expérimental représentatif devait être développé. Suite à plusieurs essais, il a été décidé d'utiliser un roc calcaire ayant une fracture simple (0.05 × 0.5 × 50 cm). Le montage avait la particularité, outre celle d'être constitué d'un matériel naturel, de permettre une alimentation en eau souterraine et en nutriments sous une charge hydraulique constante. Aussi, le monitorage du débit de l'effluent et de la différence de hauteur des piézomètres à l'entrée et à la sortie de la fracture ont permis d'évaluer le biocolmatage dans la fracture. Les piézomètres permettaient une mesure de variation de la conductivité hydraulique de l'ordre de 2 cm min^{-1}. La Figure 6.1 et le Tableau 6.1 décrivent les caractéristiques du montage.

Tableau 3.5 Références relatives à l'étude de biocolmatage

type d'information	référence section	référence page
• résultats d'un essai préliminaire de colmatage dans une colonne de sable	Annexe 8	262
• méthodologie: caractérisation de la microflore initiale, montage, essai de biocolmatage	6.5.2, 6.5.3 & 6.5.4	136, 137 & 139
• courbe de croissance de la microflore	Annexe 2	225
• composition géochimique du calcaire	Annexe 4	231
• résultats de l'étude: caractérisation de la microflore initiale et biocolmatage	6.6	141

L'étude de biocolmatage comportait deux parties: une caractérisation de la microflore initiale de l'eau souterraine et une mesure du biocolmatage. La caractérisation a consisté en une analyse des gènes ARNr 16S. Cette caractérisation a permis d'expliquer en partie les résultats de biocolmatage. Le biocolmatage s'est effectué, dans un premier temps, en inoculant le bloc de calcaire avec la microflore indigène et dans un deuxième temps, en instaurant la charge hydraulique constante en eau et en nutriments. L'inoculation a été répétée à tous les sept jours afin de reproduire l'apport de micro-organismes retrouvé dans les aquifères. Le suivi du biocolmatage consistait en une mesure de la diminution de la conductivité hydraulique de la fracture et un suivi de paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'effluent (concentration en glucides, concentration en bactéries hétérotrophes, concentration en EPS, pH et potentiel d'oxydoréduction). Les résultats de cette étude sont présentés au chapitre VI et à l'Annexe 8.

CHAPITRE 4
ÉVALUATION ÉCOTOXICOLOGIQUE ET EFFETS DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN BIOFILM EN CONDITIONS D'EAU SOUTERRAINE

4.1 Titre du manuscrit

« Ecological assessment and effects of physico-chemical factors on biofilm development in groundwater conditions »

4.2 Auteure et co-auteurs

Nathalie Ross[1], Louise Deschênes[2], Jacques Bureau[2], Bernard Clément[3], Yves Comeau[1], et Réjean Samson[2]

[1] Département de génie civil géologique et des mines, École Polytechnique de Montréal

[2] Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites, Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal

[3] Département de mathématiques et génie industriel, École Polytechnique de Montréal

4.3 « Abstract »

A new concept in groundwater containment is the development of a biobarrier formed by the biostimulation of a microbial population and exopolysaccharides (EPS) production. Although the efficiency of biofilms to clog porous media and biotransform contaminants suggests their application in aquifers, work on groundwater conditions has to be performed to confirm the potential of this technology. To determine the feasibility and the ecotoxic potential of biobarrier development, a groundwater indigenous population was inoculated in semi-continuous reactors. The effects of aeration, carbon source, feeding rate, C:N:P ratio, calcium ions, and pentachlorophenol (PCP) on biomass, EPS, and biofilm production was studied by a statistical design. The ecotoxic effect of soluble

microbial products (SMPs) was assessed using two biotests: the *Selenastrum capricornutum* and Microtox® (*Vibrio fischeri*) tests. Results showed that the carbon source type and its feeding rate had a significant impact on biofilm development leading to a maximum biofilm thickness of 250 µm after only 144 hours. The ecotoxicological assessment revealed that *Selenastrum capricornutum* growth inhibition reached 80 % while 90 % of *Vibrio fischeri* bioluminescence was affected by the presence of SMPs. Also, a toxic response was induced by the presence of PCP. These results showed the potential use of an indigenous microbial population and suggested that the ecotoxic potential have to be taken into account for *in situ* biobarrier development.

Key words: Groundwater containment, biobarrier, indigenous micro-organisms, exopolysaccharide, physico-chemical conditions, ecotoxicology.

4.4 « Introduction »

Microbial barriers formed with micro-organisms and exopolymeric matter produced in an aquifer offer an excellent potential as a means to prevent the spreading of a contaminant plume (Bellamy *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1991). The indigenous microbial population of groundwater usually contains exopolysaccharide (EPS) producers which could be stimulated to produce such compounds by injection of nutrients and electron acceptors.

The physico-chemical conditions will affect the micro-organisms' growth, EPS production, as well as biofilm density and thickness in the aquifer (Characklis et Marshall, 1990). Very few experiments have been performed on biobarrier development at groundwater temperature in darkness. When dealing with a mixed microbial population, the use of *in situ* temperature (10 °C in Québec) is important in order to promote the development of the appropriate class of micro-organisms. Psychrophilic and psychrotrophic organisms have optimum enzyme production and transport system at low

temperature (Prescott *et al.*, 1995). The transport of micro-organisms from the bulk to the porous or fractured media is a key step for biobarrier development (Characklis et Marshall, 1990).

In situ application of a biobarrier for the control of groundwater movement has not been reported in the literature. The concept of the biobarrier has been studied on lab-scale under two approaches (i) a bioaugmentation with either a pure culture or a microbial consortium, and (ii) a biostimulation of the indigenous population. Bioaugmentation was achieved by injecting starved cells in a porous media followed by nutrient stimulation, resulting in production of a plugging biofilm (Turner, 1995). Such approach has been studied on small scale models (one-dimensional glass beads or sandstone cores) and larger scale models (three-dimensional reservoirs and natural reservoir cores) using ultramicrobacteria (UMB) formed from oilwell water isolates (Cusack *et al.*, 1992). Results showed that when the matrix was flooded with nutrients, injected UMB penetrated and returned to their full vegetative size and their normal level of EPS production. The permeability of the matrix was reduced by at least 99 % within 30 days.

Biostimulation for lab-scale biobarrier development is achieved by stimulating indigenous bacteria to produce EPS which eventually will clog the pore space. Flow-through experiments were developed for continuous recirculation of natural groundwater (Bellamy *et al.*, 1993). Results showed that 1 L gravel and sand columns were biofouled up to 95 % in about 90 days for gravel, and 21 days for sand at room temperature. Another laboratory study used aquifer material contaminated by BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) to measure the production of EPS and the effect on hydraulic conductivity in the presence of different electron acceptors and carbon sources. Columns studies (0.5 m x 80 mm) showed that atmospheric O_2 resulted in the largest production of EPS while the presence of H_2O_2 limited the production of EPS. Hydraulic conductivity decreased from an initial value of 0.33 m/day to 0.023 m/day after 390 hours (Johnston *et al.*, 1997).

Ecotoxicological assessments are increasingly used in conjunction with site remediation technologies to ensure that soil and groundwater matrixes are not only decontaminated, but also detoxified (Renoux, 1996). The presence of intermediate degradation products and the formation of microbial compounds such as soluble microbial products (SMPs) is also believed to increase the ecotoxic potential (Alexander, 1994), (Pitter et Chudoba, 1990). An ecotoxicological assessment of SMPs has not yet been conducted in the prospect of *in situ* biobarrier as a containment technology. The objectives of this study were : first, to determine physico-chemical conditions for the formation of biofilm on a ceramic in groundwater using an indigenous microbial population at 10°C in darkness and second, to assess the ecotoxic potential of the biofilm and SMPs produced.

4.5 « Methodology »

4.5.1 « Natural and synthetic groundwater »

Non-contaminated natural groundwater was obtained from an observation well (Centre environnemental Saint-Michel, Montreal, Canada). A purge of 3 well volumes was conducted before water samples were collected. The groundwater sample provided the biomass used for biofilm development. Also, a chemical analysis of the groundwater was performed to prepare a synthetic groundwater with the following composition (mg/L): Na_2CO_3 (679), NaCl (617), $MgSO_4$ (19), $CaCO_3$ (15), K_2HPO_4 (11), KNO_3 (6) and $FeCl_2$ (1) (pH ≡ 8.3). The synthetic water was sterilized at 121 °C and 103.4 kPa (20 min.).

4.5.2 « Microbial Enrichment »

Indigenous micro-organisms were cultured in an Erlenmeyer flask (1 L) enriched with black strap molasses (5 g/L) (West Indies Molasses, Montreal, Canada) shaken at 200 rpm and placed at 10 °C in darkness, until microbial concentration reached 10^7

heterotrophic micro-organisms / ml. Heterotrophic micro-organisms concentration was determined by the most probable number (MPN) method (APHA *et al.*, 1992). Carbohydrate concentration was determined by the phenol-sulfuric acid method (Dubois *et al.*, 1956). The culture was maintained at -20 °C with glycerol (15 g/L) before utilization (Cargill *et al.*, 1992). Stock cultures were resuspended in fresh synthetic groundwater (1 ml culture / 500 ml synthetic groundwater).

4.5.3 « Biofilm Development Apparatus »

Experiments were conducted in semi-continuous reactors (1 L) to which a ceramic coupon (2.5 x 15 cm) was attached at the top (Cargill *et al.*, 1992). This simple system was chosen to achieve a large number of physico-chemical conditions, to duplicate, and also to measure the effects of by-products accumulation on biomass, EPS, and biofilm development. Ceramic was used to simulate a rock surface (Ceramica Industriale, Casalgrande, Italy). Its geochemical composition was : 62.6 % SiO_2, 0.7 % TiO_2, 18.9 % AlO_3, 1.3 % CaO, 2.9 % MgO, 1.9 % Na_2O, 4.0 % K_2O and 7.0 % Fe_2O_3. The reactors were placed at 10 °C in darkness to represent aquifer conditions and prevent photolysis of PCP (Rao, 1978). Reactors were filled with synthetic groundwater (500 ml) and inoculated with 1 ml of the microbial culture. Air bubbles were isolated from the ceramic coupon to prevent biofilm sloughing. The physico-chemical conditions tested are presented in Tableau 4.1.

Tableau 4.1 Physico-Chemical Conditions for the Optimization of Biofilm Development on a Porous Media in Synthetic Groundwater

Condition	Designation	Level (-)	Level (+)
Carbon Source Feeding Rate	A	2 mg/m^2.min	20 mg/m^2.min
Aeration	B	Agitation 200 rpm	Sparging 4.2 cm^3/s
Carbon Source	C	Saccharose	Molasses
PCP Concentration	D	0 mg/L	10 mg/L
Calcium Ion Concentration	E	0 mg/L	100 mg/L
C: N : P Ratio	F	50: 10: 1	200: 10: 1

4.5.4 « Carbon sources, ions enrichment and model contaminant »

Two carbon sources were tested : saccharose and black strap molasses (Sucre Lantic and West Indies Molasses, Montreal, Canada). The carbon source was fed once a day with a syringe at a rate of 20 ml/d (concentrations 4.09 and 40.9 g/L for levels (-) and (+), respectively). Since divalent ions are known to improve biofilm texture, calcium chloride solution (100 mg/L) was injected at the beginning of the test (Bellamy *et al.*, 1993). Sodium pentachlorophenate (NaPCP, 10 mg/L) was added to measure the effect of a soluble contamination on biofilm development. Since many studies have shown that intensive use of PCP as a herbicide, insecticide, and for the protection and preservation of wood products this compound was chosen as a model to measure the effect of such a contamination on biofilm development (Rao, 1978).

4.5.5 « Determination of the physico-chemical conditions effects »

A Plackett-Burman statistical design was used to determine the significant effects of physico-chemical conditions on biomass growth and biofilm development (Clément, 1990) (Tableau 4.1). Each of the 6 physico-chemical conditions tested was maintained at

2 levels those being (-) and (+). The complete experimental design was divided in 2 sets of 8 trials: a basic design and a reflected design (Tableau 4.2). In the reflected block, levels (-) became (+) and vice-versa. Each trial was performed in duplicate for a total of 32 reactors.

Tableau 4.2 The 8-run Basic[1] Experimental Design to Determine the Effects of Physico-Chemical Conditions on Biomass Growth and Biofilm Development[2]

Trials	Conditions					
	A	B	C	D	E	F
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	+	+
3	-	+	+	+	+	-
4	-	+	+	-	-	+
5	+	+	-	-	+	+
6	+	+	-	+	-	-
7	+	-	+	+	-	+
8	+	-	+	-	+	-

[1]: In the 8-run reflected design, levels are interchanged from (-) to (+) and vice versa.

[2]: The combination of both statistical designs (16-runs) yields a resolution IV design: main effects are separated from two-factor interactions.

The physico-chemical effects were measured on 6 variables : suspended biomass, suspended EPS, biofilm thickness, pH, oxydoreduction potential (ORP) and carbon source concentration. A volume of 20 ml of the inoculated groundwater was sampled everyday over 192 hours. After this time, PCP residual concentration was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) (Barbeau, 1996). Biomass and EPS concentrations were determined on a dry weight basis as described by Hacking *et al.* (1983). Biofilm thickness was evaluated by microscopy with correction for light

refraction (Trulear et Characklis, 1982). Specific probes were used to measure pH and ORP (APHA *et al.*, 1992; ASTM, 1990). The phenol-sulfuric acid method was used to measure carbohydrate concentration (Dubois *et al.*, 1956).

4.5.6 « Evaluation of SMP production »

Chemical oxygen demand (COD) tests were conducted to evaluate the production of SMPs by a closed reflux colorimetric method (Chudoba, 1985), (APHA *et al.*, 1992). $COD_{particulate}$ was obtained by subtracting the $COD_{filterable}$ from the COD_{total}. $COD_{particulate}$ came from suspended biomass and EPS. $COD_{filterable}$ came from SMPs, PCP and the carbon source. $COD_{filterable}$ was obtained from filtered culture sample (Hydrophilic PVDF filters of 0.45 µm, Milipore Millex-HV, Bedford, MA). The concentration of SMP (COD_{SMP}) was obtained by subtracting the COD of soluble components from the filtered COD (Equation 1).

$$COD_{SMP} = COD_{filterable} - (COD_{molasses} + COD_{PCP}) \quad (1)$$

The COD of molasses and of PCP were calculated theoretically, using 0.5863 g COD/g for molasses and 0.499 g COD/g for Na-PCP. SMPs were assumed to include compounds resulting from the bacterial metabolism and intermediate compounds of PCP degradation.

4.5.7 « Ecotoxicological assessment »

Evaluation of the ecotoxic potential was conducted on synthetic groundwater and biofilm sampled from the reactors with molasses fed at 20 $mg/m^2.min$, sparging aeration (4.2 cm^3/s), calcium ions (100 mg/L) and a C: N: P ratio of 50: 10: 1. Biofilm samples were collected from the ceramic coupons after they were placed in 500 ml saline solution (0.85 % NaCl) and sonicated for 2 minutes at minimal power (Mathieu *et al.*, 1992). Growth inhibition of the green algae *Selenastrum capricornutum* was measured as described in the method suggested by Environnement Canada (Environnement Canada, 1992). The statistical method used was an interpolated linear method with a confidence coefficient of

α = 95 %. Due to the large variations in inhibition results obtained from the diluted samples, only the non diluted samples (100 % v/v) were considered. Results of the algal growth inhibition test were expressed in percentage. The bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri* test (Microtox®) , was conducted according to the method suggested by Bureau de normalisation du Québec (1987). Results are given as sample concentrations needed to inhibit the bioluminescence of 20 % and 50 % of a *Vibrio fischeri* population (IC_{20} and IC_{50}).

4.6 « Results and Discussion »

4.6.1 « Effects of physico-chemical conditions on microbial growth and biofilm development »

The physico-chemical conditions studied significantly influenced the microbial growth and biofilm development. The minimum and maximum effects of the significant conditions on biomass concentration, EPS concentration, biofilm thickness, pH, ORP and carbon source concentration over 192 hours are shown in Figure 4.1. This implies that all the results obtained with the Plackett-Burman experimental design were between those minima and maxima. The growth of indigenous groundwater micro-organisms showed a typical batch growth curve (Characklis et Marshall, 1990) (Figure 4.1-I). The suspended EPS concentration curve resembled a logistic curve such as those obtained in batch cultures and the biofilm thickness increased following a sigmoidal curve (Figure 4.1- II & III) (Characklis et Marshall, 1990). The global effects of the physico-chemical conditions on microbial production over 192 hours are given in Tableau 4.3. These results, expressed in percentages, show the effect on suspended biomass, suspended EPS, and biofilm thickness of changing the condition level from (-) to (+) (α = 95 %) (Tableau 4.1).

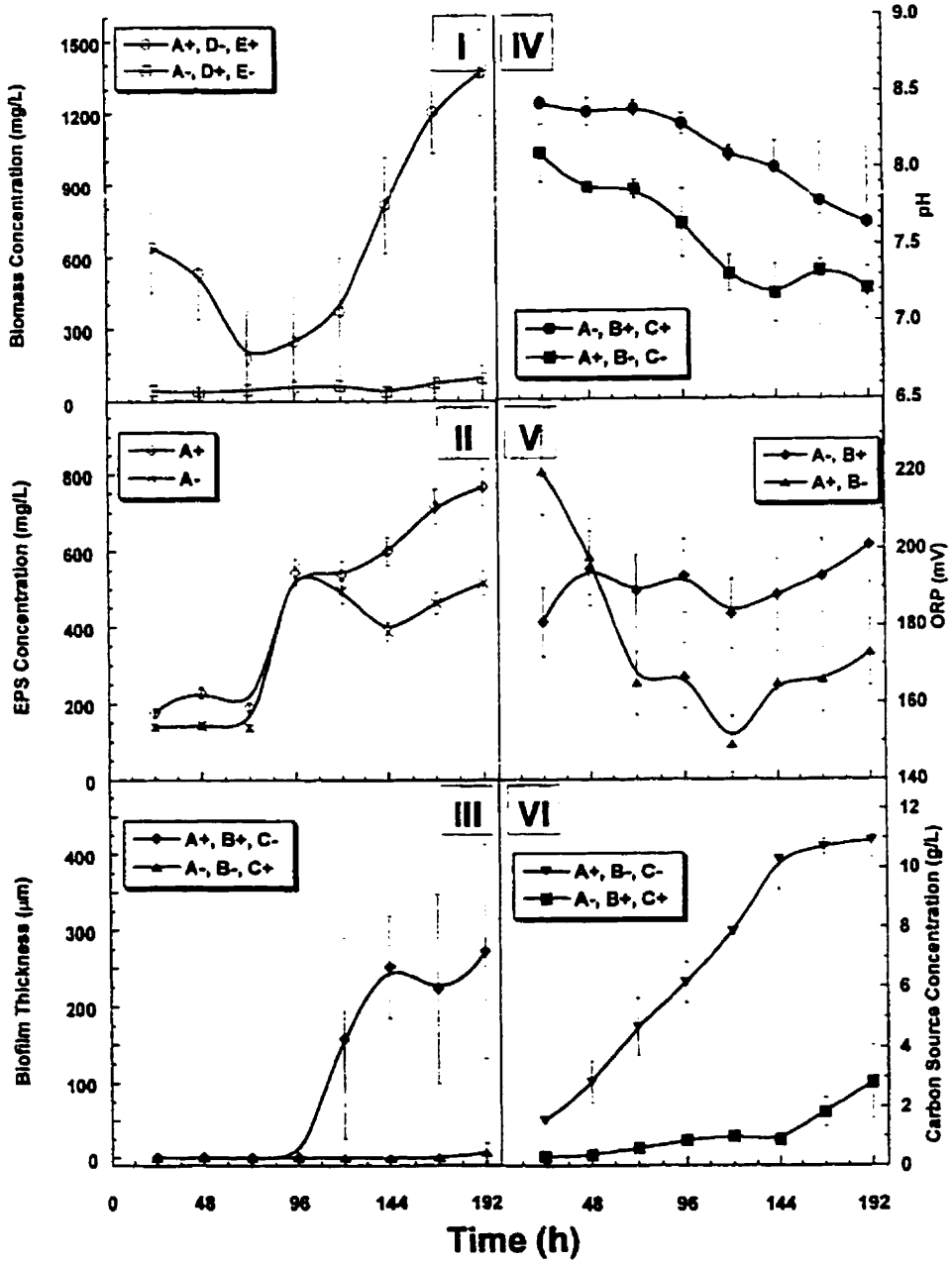


Figure 4.1 Microbial growth and biofilm development under groundwater conditions in semi-continuously fed reactors. Conditions not statistically different were grouped together ($\alpha = 95$ %). Tableau 4.1 describes conditions tested

Tableau 4.3 Significant Effects of Physico-Chemical Factors on Microbial Production Variables over 192 hours (α = 95 %)

Variables	Conditions	Effect[a] (%)	p > F
Suspended Biomass Concentration	A	+77.7 ± 8.7	0.0001
	D	-21.8 ± 8.7	0.0131
	E	+17.2 ± 8.7	0.0500
Suspended EPS Concentration	A	+16.3 ± 6.2	0.0094
Biofilm Thickness	A	+90.4 ± 14.0	0.0001
	B	+69.9 ± 14.0	0.0001
	C	+69.2 ± 14.0	0.0001

[a] : signs + and - are related to the condition effect on the variable when level (-) is changed for level (+).

The type of carbon source and the feeding rate had the most significant effect on biomass growth, EPS production and biofilm development (Figure 4.1 & Tableau 4.3). Biofilms, when molasses was used as the carbon source, were 70 % thicker than biofilms developed in saccharose-fed reactors (Figure 4.1 & Tableau 4.3) (p = 0.0001). The carbon source played several roles in the system. First, it promoted the growth of the microbial population, and conditioned the ceramic surface before cell attachment which is a key step in biofilm development (Honig, 1953). The molasses composition probably contributed to an effective conditioning of the ceramic. Inorganic salts (≅ 8 %) and amino acids (≅ 2 %) in molasses could adsorb onto ceramic by ionic interactions (Characklis et Marshall, 1990). Second, divalent ions in molasses (≅ 3%) could have promoted the irreversible cell adhesion onto the ceramic (Characklis et Cooksey, 1983). Third, the molasses offered more interactions between cells, EPS and the surface with hydrogen, hydrophobic, and ionic bonding (Bryan *et al.*, 1986; Flemming, 1995). Saccharose, which contained less than 0.02 % of ashes and no trace of amino acids, was probably not

effective in conditioning the ceramic surface and promoting cell attachment. Although some bacteria are stimulated to produce more EPS in nitrogen starvation condition, it has been shown that the response was not a general rule (De Philippis *et al.*, 1996). That could explain the finding that no significant effect was measured between C :N :P ratio of 50 :10 :1 and 200 : 10 : 1 ($p > 0.05$).

A high carbon source feeding rate (20 mg/m^2.min) resulted in the production of 78 % more suspended biomass than at low rate (2 mg/m^2.min) on average during the 192 hours ($p = 0.0001$). This large production of biomass also contributed to a decrease in pH due to the production of organic acids (Figure 4.1- IV). Also, carbon sources accumulated in the water at concentrations up to 10.9 g/L after 192 hours (Figure 4.1 - VI). Meanwhile, the production of suspended EPS and the development of the biofilm on ceramic at 20 mg/m^2.min were 16 % and 90 % respectively more important than at 2 mg/m^2.min ($p = 0.0094$ and $p = 0.0001$, respectively). ORP was higher (195 mV in average) at a low feeding rate and when air was sparged rather than dissolved by agitation (Figure 4.1- V). The effect of a high substrate loading rate is well known to contribute to the formation of a thick and uniform biofilm (Wanner *et al.*, 1995). But under such condition, the sloughing of the biofilm into the bulk could be more important than with a low feeding rate. Such biofilm detachment explains in part the increase in the EPS concentration between 144 and 156 hours which corresponded to a noticeable decrease in biofilm thickness (Figure 4.1).

The type of aeration system used in the reactors influenced the dissolved oxygen concentration and water turbulence. On average, air sparging resulted in a biofilm 70 % thicker than with agitation at 200 rpm (Figure 4.1 & Tableau 4.3) ($p = 0.0001$). However, a closer analysis of the biofilm development revealed that a biofilm was visible after 24 hours with agitated water (1.5 µm) compared to 96 hours with air sparging (1.1 µm). In addition, the suspended biomass and EPS concentrations were not significantly affected by the type of aeration ($p > 0.05$). Those results indicate that the dissolved oxygen

concentration was not a limiting factor in the reactor but the water turbulence would have played a key role in the development of the biofilm. It is well known that transport controls the rate of initial deposition on the surface (Characklis, 1981). A possible explanation for the longer lag period for biofilm development with air sparging is the increase in the hydrodynamic forces. A visual observation of the system under air sparging and agitation showed a difference in the water velocity. Such difference could have improved the lift force which generated a normal force to the ceramic. As reported by Characklis (1981) and Characklis et Marshall (1990) the desorption of cells weakly adsorbed to the ceramic could have been greater when the water velocity increased. In the same way, the overall thicker biofilm with air sparging could be explained in part by an increase in downsweep forces. After the conditioning and the irreversible adsorption of cells on the ceramic, greater drag and lift forces would improve the mass transfer from the bulk into the biofilm leading to a thicker film (Characklis et Marshall, 1990). Moreover, Marshall (1982) reported that an increase in water turbulence led to a thicker biofilm due to (i) a preferential attachment by certain species, (ii) a microbial physiological response to environmental stress, and (iii) the squeezing of loosely bound water from the film by the fluid pressure force. The fact that the oxygen concentration was not limiting to the growth of the indigenous micro-organisms could be that mixed microbial population from groundwater usually contains a large fraction of facultative aerobic bacteria (Fetter, 1992).

Enrichment with calcium chloride (100 mg/L) contributed to an increase in the microbial population ($p = 0.0131$) which suggested that the number of micro-organisms in the biofilm also increased (Huang et Pinder, 1994)). The concentration of calcium ions in the synthetic groundwater was probably not optimum for the development of the suspended biomass. An increase in the microbial population in biofilms is associated with a densification of the biofilm rather than an increase in thickness (Ramsay *et al.*, 1989). The biofilm mass was not measured but it would not have been surprising that it had

increased with the calcium enrichment due to a higher biomass content and EPS gelation (Vandamme et Soetaert, 1995).

PCP addition (10 mg/L), to simulate groundwater contamination, affected microbial growth by decreasing the population on average by 22 % (Figure 4.1 & Tableau 4.3) ($p=0.0131$). A decrease in PCP concentration from 10 mg/L down to zero was also observed in some cases which indicated the presence of PCP degraders. Biodegradation of PCP either by a microbial consortium from a PCP-contaminated soil or a biofilm developed with pure culture bacteria has been reported at high concentration such as 500 mg/L and 366 mg/L respectively with lab-scale experiments (Edgehill, 1996; Panneton *et al.*, 1995). 10 mg/L PCP addition did not influence significantly either EPS production or biofilm thickness over 192 hours ($p > 0.05$). No assumptions of the biofilm fixed biomass viability can be made because of the resistance mechanisms for penetration of toxic substances such as PCP. Those mechanisms include EPS binding, chemical reaction with EPS, uptake of the PCP by cells, and catalytic detoxification of PCP in the biofilm (Characklis et Wildener, 1989).

4.6.2 « SMPs accumulation and ecotoxicological assessment »

The green algae (*Selenastrum capricornutum*) and Microtox® (*Vibrio fischeri*) tests are known to be very sensitive and they are widely used for water toxicity assessment (Keddy *et al.*, 1995; Sloterdijk *et al.*, 1989). The algal growth inhibition results, when submitted to non diluted groundwater samples at different period of the microbial development, are shown in Figure 4.2. The Microtox® test results are presented as the concentration of the sample needed to inhibit 20 % and 50 % of the bioluminescence (IC_{20} and IC_{50}). IC_{20} is considered as the threshold of detection and IC_{50} is the reference measurement used in ecotoxicology (Tableau 4.4). As the presence of SMPs in water was suspected to increase the toxicity, COD was measured to evaluate the production over 192 hours. Controls I and II, which consisted of synthetic groundwater with and without

molasses (3.2 mg/L) respectively, were moderately toxic (algae growth inhibition = 39.3 % and Microtox® $IC_{20,\ 15\ min}$ = 45.1 %) (Figure 4.2 and Tableau 4.4). Addition of the microbial indigenous culture to synthetic groundwater and molasses did not significantly affect bioluminescence of *Vibrio fischeri* but *Selenastrum capricornutum* growth was inhibited of to 72.6 % (Tableau 4.4) (Figure 4.2).

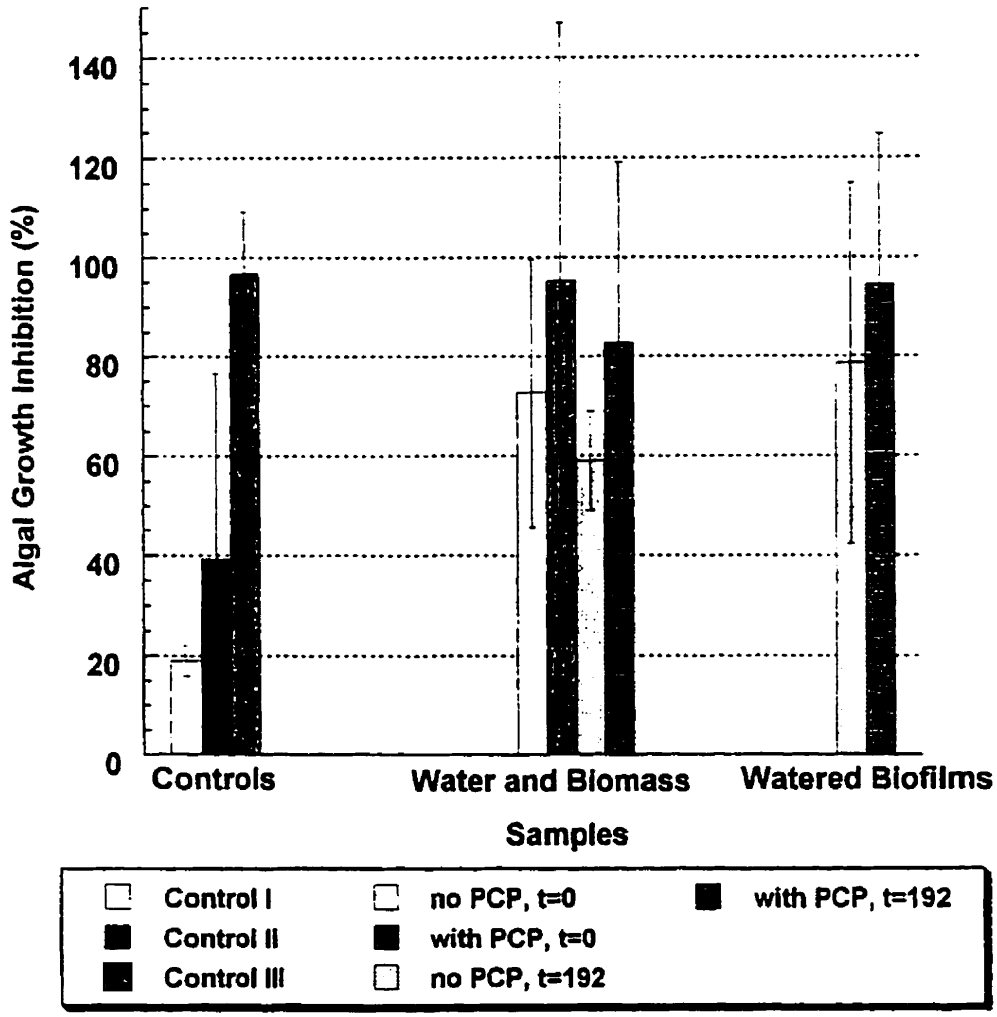


Figure 4.2 Growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* submitted to different synthetic groundwater and biofilm samples. Physico-chemical conditions in the reactor were: molasses fed at of 20mg/m^2.min, sparging aeration (4.2 cm^3/s), addition of calcium ions (100 mg/L) and a C: N: P ratio of 50: 10: 1. Controls : I : synthetic groundwater, II : synthetic groundwater and molasses (3.2 mg/L) and III : saline solution (0.85%)

Tableau 4.4 Bioluminescence Inhibition of *Vibrio fischeri* Exposed to Water and Biofilm Samples for Different Inhibition Concentrations and Time Exposures. Physico-chemical conditions in the reactor were: molasses as carbon source fed at a rate of 20 mg/m^2.min, sparging aeration (4.2 cm^3/s), addition of calcium ions (100 mg/L) and a C: N: P ratio of 50: 10: 1.

Sample		IC_{20} ± C.C. (%)		IC_{50} ± C.C. (%)	
		5 min	15 min	5 min	15 min
Controls	I	> 49.5	> 49.5	> 49.5	> 49.5
	II	47.4 ± 0.6	45.1 ± 10.4	> 49.5	> 49.5
Groundwater	no PCP, t=0	45.3 ± 14.8	41.8 ± 1.5	> 49.5	> 49.5
& Microbial	with PCP, t=0	4.5 ± 0.8	2.9 ± 0.3	13.3 ± 1.2	8.4 ± 0.9
Population	no PCP, t=192h	21.3 ± 0.7	20.4 ± 2.7	42.5 ± 3.7	30.8 ± 1.4
	with PCP, t=192h	5.2 ± 0.7	4.2 ± 0.8	15.6 ± 1.2	11.0 ± 1.2
Biofilms	no PCP, t=192h	> 49.5	> 49.5	> 49.5	> 49.5
	with PCP, t=192h	> 49.5	> 49.5	> 49.5	> 49.5

IC: Inhibition Concentration, C.C.: Confidence Coefficient, Control I: synthetic groundwater, Control II: synthetic groundwater and molasses (4.09 mg/L)

Selenastrum capricornutum growth showed an inhibition of up to 80.4 % on average when algae were exposed to inoculated synthetic groundwater or saline watered biofilm samples, whether or not PCP (10 mg/L) was present (Figure 4.2). Standard deviations were so wide that no significant difference was detected between the inhibition results of groundwater and saline watered biofilm samples (α = 95 %). Competition for nutrients between micro-organisms and algae could explain the inhibitory effect on algae growth when the microbial population was added. The presence of SMPs after 192 hours, especially abundant when PCP was added to water (COD_{SMP} = 8427 mgO_2/L), did not affect more the growth of the algae (Figure 4.2). SMPs might have provided nutrients for algae growth (Landis et Yu, 1995). Results also showed that the Control III (0.85% NaCl) had a repression effect on algal growth. The toxicity of the saline solution on the

green algae probably interfered with the possible ecotoxic effect of biofilm dispersed in the solution.

Microtox® IC_{20} results revealed that addition of PCP to the culture (t = 0 h) allowed IC_{20} to decrease by 12.2-fold (Tableau 4.4). Even if the PCP concentration considerably decreased between 0 and 192 hours, (from 10.0 to 1.6 mg/L), bioluminescence inhibition was not significantly different. Phenolic compounds are known to disrupt cell membranes, resulting in the leakage in solution of nucleic material, proteins and other organic material (Dutka et Bitton, 1986). The intermediary metabolites of PCP degradation, the release of endotoxins, and the lysis of bacteria are also SMPs that may have contributed to the inhibition of *Vibrio fischeri* bioluminescence (Figure 4.3). Cultivation in a semi-batch reactor under aerobic conditions is known to promote the accumulation of SMPs (Pitter et Chudoba, 1990). Moreover, cultivation with a high concentration of glucose results in the release of organic compounds into the medium (Daiggeret Grady, 1977). In water with no PCP addition, the COD_{SMP} increased from 92 to 4149 mg/L in 192 hours. Such production might explain the fact that bioluminescence of *Vibrio fischeri* was reduced by half when exposed to the culture at times 0 and 192 hours (Tableau 4.4). Biofilms which were detached from the ceramic in a saline solution were non toxic to *Vibrio fischeri*, possibly because the organic compounds were too diluted.

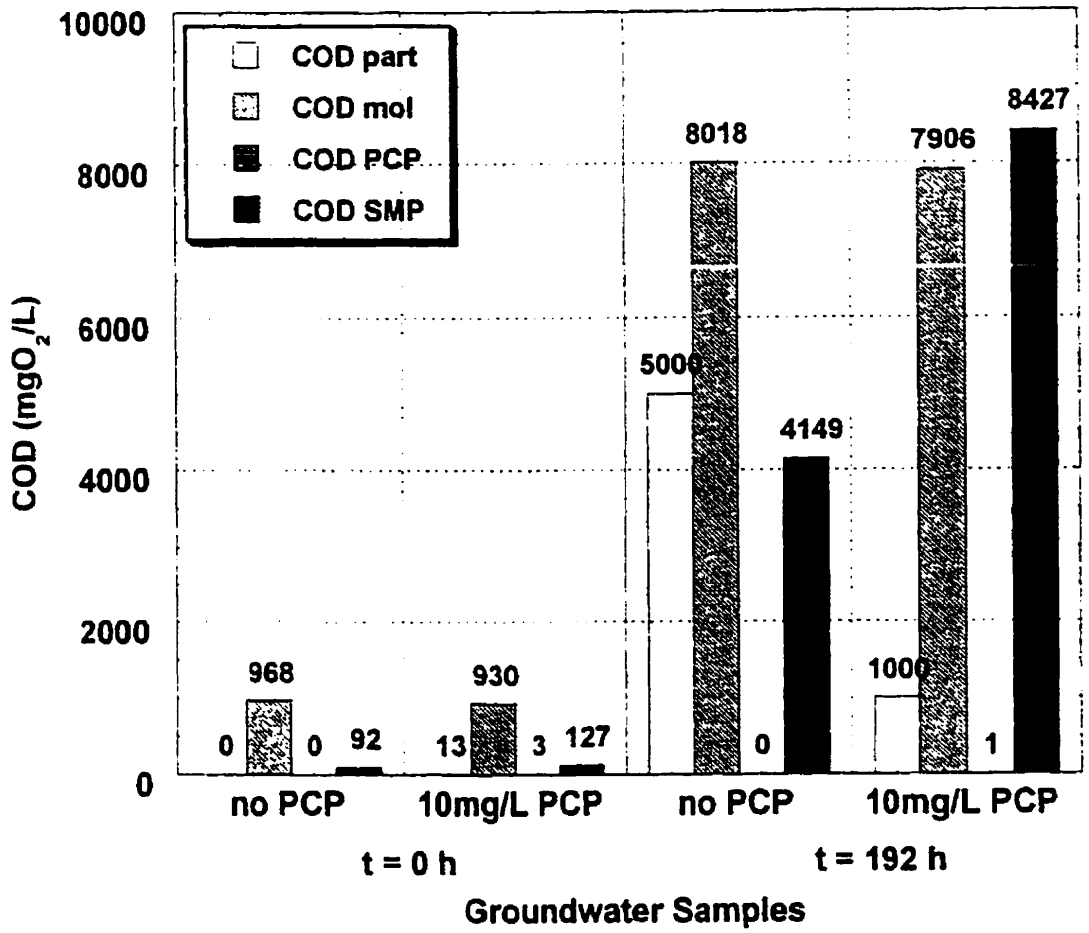


Figure 4.3 COD values of culture constituents for the evaluation of SMP production. Physico-chemical conditions in the reactor were: molasses fed at of 20 mg/m^2.min, sparging aeration (4.2 cm^3/s), addition of calcium ions (100 mg/L) and a C: N: P ratio of 50: 10: 1

In conclusion, the stimulation of an indigenous microbial population to produce EPS and biofilms was effective under groundwater conditions, at 10 °C in darkness. In this oligotrophic milieu, the type of carbon source and the feeding rate significantly influenced the speed and the magnitude of biofilm development suggesting a large contribution of ionic, hydrophobic and hydrogen bonding interactions between the solid surface, microbial cells, and EPS. The resistance of biofilm to the presence of PCP (10 mg/L) supports the concept of using a biobarrier for contaminated groundwater

containment. The relative ecotoxicity revealed by the green algae growth and a marine bacteria bioluminescence inhibition tests indicated that compounds such as SMPs could possibly be adverse to the ecosystem if accumulated on a local basis. Future investigation on biobarrier development should focus on (i) fractured media hydrodynamics, (ii) accumulation and/or biodegradation of contaminants in the biobarrier, and (iii) comprehension of the ecological significance of SMPs production in groundwater environment.

4.7 « Acknowledgments »

The authors acknowledge the financial support from the Chair partners: Alcan, Analex, Bell Canada, Browning-Ferris Industries, Cambior, Centre québécois de valorisation de la biomasse, Hydro-Québec, Natural Science and Engineering Research Council, Petro-Canada, Premier Tech and SNC-Lavalin. This research was also supported by the *Fondation québécoise de la recherche en environnement.* We thank Dr. Élise Marcandella for her valuable recommendations on the manuscript. Participation of Martin Héroux and Michel Demers from the CESM in providing groundwater sample was appreciated. Assistance of Denis Bouchard in chemical analysis is gratefully acknowledged.

4.8 « Literature Cited »

ALEXANDER, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. Academic Press, Inc., San Diego, 302.

APHA, AWWA et WEF (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater.

ASTM (1990). Standard Test Method for pH of Water. 350-358.

BARBEAU, C. (1996). Bioaugmentation de sols contaminés au pentachlorophénol par la méthode des sols activés. Mémoire, École Polytechnique de Montréal, Montréal.

BELLAMY, K.L., DE LINT, N., CULLIMORE, D.R. ET ABIOLA, A. (1993). In-situ Intercedent Biological Barriers for the Containment and Remediation of Contaminated Grounwater, Droycon Bioconcepts Inc. Regina.

BRYAN, B.A., LINHARDT, R.J. ET DANIELS, L. (1986). Variation in Composition and Yield of Exopolysaccharides Produced by *Klebsiella* sp. Strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus*. Applied and Environmental Microbiology, 51 (6), 1304-1308.

BUREAU DE NORMALISATION DU QUÉBEC (1987). Eaux - détermination de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente *Vibrio fisheri*, BNQ.

CARGILL, K.L., PYLE, B.H., SAUER, R.L. ET MCFETTERS, G.A. (1992). Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. Can. J. Microbiol., 38 423-429.

CHARACKLIS, W.G. (1981). Bioengineering Report Fouling Biofilm Development: A Process Analysis. Biotechnology and Bioengineering, 23 1923-1960.

CHARACKLIS, W.G. ET COOKSEY, K.E. (1983). Biofilms and Microbial Fouling. Advances in Applied Microbiology, 29 93-138.

CHARACKLIS, W.G. ET MARSHALL, K.C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, 796.

CHARACKLIS, W.G. ET WILDENER, P.A. (1989). Structure and Function of Biofilms. Bernhard, S., John Wiley & Sons, New York, 387.

CHUDOBA, J. (1985). Quantitative Estimation of COD Units in Refractory Organic Compounds Produced by Activated Sludge Microorganisms. Water Research, 19 (1), 37-43.

CLÉMENT, B. (1990). La qualité par la planification d'expérience (méthode Taguchi) in Congrès Association québécoise de la qualité. régionale de Québec, 17.

CUNNINGHAM, A.B., CHARACKLIS, W.G., ABEDEEN, F. ET CRAWFORD, D. (1991). Influence of Biofilm Accumulation on Porous Media Hydrodynamics. Environ. Sci. Technol., 25 (7), 1305-1311.

CUSACK, F.M., SINGH, S., NOVOSAD, J., CHMILAR, M., BLENKINSOPP, S.A. ET COSTERTON, J.W. (1992). The Use of Ultramicrobacteria for Selective Plugging in Oil Recovery by Waterflooding in SPE Internaltional Meeting on Petroleum Engineering. Beijhing, China, 341-355.

DAIGGER, G.T. ET GRADY, C.P.L.J. (1977). A model for the Bio-Oxidation Process Based on Product Formation Concepts. Water Research, 11 1049-1057.

DE PHILIPPIS, R., SILI, C. ET VINCENZINI, M. (1996). Response of an exopolysaccharide-producing heterocystous cyanobacterium to changes in metabolic carbon flux. J. Appl. Phycology, 8 275-281.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. ET SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, 28 (3), 350-353.

DUTKA, B.J. ET BITTON, G. (1986). Toxicity Testing Using Microorganisms. II, CRC Press, Inc., Boca Raton, 202.

EDGEHILL, R.U. (1996). Degradation of Pentachlorophenol (PCP) by *Arthrobacter* Strain ATCC 33790 in Biofilm Culture. Water Research, 30 (2), 357-363.

ENVIRONNEMENT CANADA (1992). Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*, Ottawa.

FETTER, C.W. (1992). Contaminant Hydrogeology. Maxwell Macmillan Canada, Toronto, 458.

FLEMMING, H.-C. (1995). Sorption Sites in Biofilms. Water Science and Technology, 32 (8), 27-33.

HACKING, A.J., TAYLOR, I.W.F., JARMAN, T.R. ET GOVAN, J.R.W. (1983). Alginate Biosynthesis by *Pseudomonas mendocina*. Journal of General Microbiology, 129 3473-3480.

HONIG, P. (1953). Principles of Sugar Technology, Elsevier Press, 767.

HUANG, J. ET PINDER, K.L. (1994). Effects of Calcium on Development of Anaerobic Acidogenic Biofilms. Biotechnology and Bioengineering, 45 212-218.

Johnston, C.D., Rayner, J.L., De Zoysa, D.S., Ragusa, S.R., Trefry, M.G. et Davis, G.B. (1997). Studies of Bioclogging for Containment and Remediation of Organic Contaminants in Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. New Orleans, Louisiana, 241-245.

KEDDY, C.J., GREENE, J.C. ET BONNELL, M.A. (1995). Review of Whole-Organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada. Ecotoxicology and Environmental Safety, 30 221-251.

LANDIS, W.G. ET YU, M.-H. (1995). Introduction to Environmental Toxicology. Lewis Publishers, 328.

MARSHALL, K.C. (1982). Advances in Microbial Ecology, Plenum press, New York.

MATHIEU, L., PAQUIN, J.L., BLOCK, J.C., RANDON, G., MAILLARD, J. ET REASONER, D. (1992). Parametres gouvernant la prolifération bacterienne dans les réseaux de distribution. Revue des sciences de l'eau, 5 91-112.

PANNETON, C., RAMSAY, J., BERTRAND, J.-L., MAYER, R. ET CHAVARIE, C. (1995). Biodegradation Potential of a Pentachlorophenol-Degrading Microbial Consortium in Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium. San Diego, California, 205-211.

PITTER, P. ET CHUDOBA, J. (1990). Biodegradability of Organic Substances in the Aquatic Environment. CRC Press, Inc., Boca Raton, 305.

PRESCOTT, HARLEY ET KLEIN (1995). Microbiologie. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles, 1014.

RAMSAY, J.A., COOPER, D.G. ET NEUFELD, R.J. (1989). Effects of Oil Reservoir Conditions on the Production of Water-Insoluble Levan by *Bacillus lichenformis*. Geomicrobiology Journal, 7 155-165.

RAO, K.R. (1978). Pentachlorophenol - Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology. Plenum Press, New York, 402.

RENOUX, A.Y. (1996). Évaluation de bioprocédés d'assainissement en phase solide/liquide par l'utilisation de biotests écotoxicologiques. Institut national de la recherche scientifique (INRS-Eau), Sainte-Foy.

SLOTERDIJK, H., CHAMPOUX, L., JARRY, V., COUILLARD, Y. ET ROSS, P. (1989). Bioassay responses of micro-organisms to sediment elutriates from the St. Lawrence River (Lake St. Louis). Hydrobiologia, 188/189 317-335.

TRULEAR, M.G. ET CHARACKLIS, W.G. (1982). Dynamics of biofilm process. Journal WPCF, 54 (9), 1288-1301.

TURNER, J.P. (1995). Biofilm Barriers: A New Concept for Waste Management in Proceedings of the National Conference on Innovative Technologies on Site Remediation and Hazard Waste Management. 101-109.

VANDAMME, E.J. ET SOETAERT, W. (1995). Biotechnical modification of carbohydrates. FEMS Microbiology Reviews, 16 163-186.

WANNER, O., CUNNINGHAM, A.B. ET LUNDMAN, R. (1995). Modeling Biofilm Accumulation and Mass Transport in a Porous Media Under High Substrate Loading. Biotechnology and Bioengineering, 47 703-712.

CHAPITRE 5
STIMULATION D'UNE COMMUNAUTÉ D'ULTRAMICROBACTÉRIES DES EAUX SOUTERRAINES POUR LA FORMATION D'UN BIOFILM: COMPARAISON DES CHANGEMENTS DE DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET FONCTIONNELLE

5.1 Titre du manuscrit

« Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater and Stimulated to Form a Biofilm: Assessment of Changes in the Biodiversity by Combining Genetic and Functional Methods »

5.2 Auteure et co-auteurs

Nathalie Ross[1], Richard Villemur[2], Élise Marcandella[3] et Louise Deschênes[3]

[1] Département des génies civil, géologique et des mines, École Polytechnique de Montréal

[2] Microbiologie et Biotechnologie, INRS – Institut Armand-Frappier

[3] Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites, Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal

5.3 « Abstract »

The stimulation of groundwater microflora to form biofilms is a worthwhile study for the remediation of polluted aquifers. This biostimulation, as an environmental biotechnology, is subjected to risk assessment, which often includes measurement of changes in biodiversity. In this study, the ability of naturally occurring ultramicrobacteria to secrete exopolysaccharides and form a biofilm on a ceramic surface was investigated in reactors reproducing groundwater conditions. Also, the microbial communities of groundwater and the resulting biofilm were compared for changes in genetic and functional

biodiversity using the Single Strand Conformational Polymorphism method, the sequencing of representative 16S rRNA genes and the Biolog microplates system. Results showed that within 13 days of biostimulation, ultramicrobacteria produced 700 mg/L of exopolysaccharides and formed a biofilm up to a thickness of 1100 µm. The genetic diversity decreased while the functional diversity increased in the biofilm compared to groundwater. The decrease in the genetic diversity was shown by a reduced number of bands in the DNA profiles of amplified 16S rRNA gene sequences, examined by the Single Strand Conformational Polymorphism method. The sequencing of representative clones from the biofilm revealed the predominance of four bacterial groups: *Bacillus/Paenibacillus*, Enterobacteriaceae, Pseudomonads and Zoogloae. The significant increase in functional diversity was revealed by a highest substrate richness profile and a lower substrate evenness profile of the biofilm microflora ($p = 0.0$ and $p = 0.09$, respectively). Biostimulation of ultramicrobacteria, isolated from groundwater, was effective to form a biofilm having a high functional biodiversity. This combination of molecular-based and functional-based methods expanded the insight into monitoring biodiversity changes.

5.4 « Introduction »

The technology of biobarriers for the remediation and containment of polluted aquifers is increasingly used (Gavaskar *et al.*, 1998). A specific application consists in bioclogging the geologic media either by injecting bacteria directly in the aquifer or stimulating the indigenous microflora to form a biofilm (Bellamy *et al.*, 1993). Groundwater is known to contain biofilm-forming bacteria and it has been demonstrated that a biofilm can develop when growth conditions are adequate (Characklis et Marshall, 1990; Marshall, 1982). Several studies reported effective bioclogging resulting from bacterial injection (Brough *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1991; Sharp *et al.*, 1999; Vandevivere et Baveye, 1992) whereas the biostimulation of indigenous microflora remains an unexploited option (Ross *et al.*, 1998). The biostimulation approach has its niche of applications when

environmental regulations restrict the spreading of bacteria in ecosystems (Environment Canada, 1997; United States Environmental Protection Agency, 1997), such as an addition of genetically modified micro-organisms, or where the geologic media is difficult to reach using conventional injection techniques, such as fractured rock aquifers (Ketcheson et Zwiers, 1997).

An aquifer, the saturated zone of the ground, is basically composed either of unconsolidated geologic materials, such as sand and gravel, or consolidated materials, such as limestone and sandstone (Todd, 1980). The voids in these geological formations are named: intergranular and fractured type, respectively. The principle of the biobarrier is based on the stimulation of bacteria to secrete exopolysaccharides (EPS), leading to the clogging of the voids. This bioclogging decreases the hydraulic conductivity (m / day) of the aquifer, which results in the containment of the groundwater. Although several studies have focused on porous media (unconsolidated materials) (Bellamy *et al.*, 1993; Brough *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1991; Vandevivere et Baveye, 1992), few have explored the bioclogging of fractured media (consolidated materials) (Ross *et al.*, 1998).

In order to maintain and protect the biodiversity, a vast investigation of microbial communities in ecosystems has intensified since the mid-1980s (Derry *et al.*, 1998; El Fantroussi *et al.*, 1999; Power *et al.*, 1998; van Elsas *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). In relation to environmental biotechnologies, such as the biobarrier, assessment of changes in microbial ecology aims to verify the biosafety of the technology itself and/or to complement the monitoring of remediation (El Fantroussi *et al.*, 1999; Lehman *et al.*, 1995; Power *et al.*, 1998; van Elsas *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998; Wunsche *et al.*, 1995). According to reported literature, a comparative study of the biodiversity of naturally occurring micro-organisms in groundwater and into biofilm, developed following biostimulation in aquifer conditions, had not yet been assessed.

Among different strategies of studying biodiversity, one approach combines genetic characteristics of bacterial communities, such as species identification, and functional characteristics, such as nutrient cycling (El Fantroussi *et al.*, 1999; Lehman *et al.*, 1995; White *et al.*, 1998). This multifaceted approach allows the establishment of interrelations between genetic, taxonomic and functional diversity towards changes in an ecosystem. Ribosomal RNA (16S) sequences analyses are the most utilized methods for studying the genetic diversity of micro-organisms in natural environments (El Fantroussi *et al.*, 1999; Gillan *et al.*, 1998; Head *et al.*, 1998; Iizuka *et al.*, 1998; Janssen *et al.*, 1997; Marilley *et al.*, 1998; Power *et al.*, 1998; van Elsas *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). One important advantage of these methods is the possibility of identifying bacteria without cultivation. Knowing that a small proportion (0.1 – 10 %) of bacteria present in samples from natural environments is actually culturable, the development of that type of molecular methods led to a better understanding of structural ecology (Head *et al.*, 1998; Marilley *et al.*, 1998). Garland et Mills (1991), by using the Biolog microplate identification system for studying the functional diversity of heterotrophic bacterial communities, propelled the comparison and differentiation of environmental samples based on carbon source utilization patterns (Derry *et al.*, 1998; Lehman *et al.*, 1995; van Elsas *et al.*, 1998). Because of the fundamental role of groundwater in the hydrogeological cycle, impacts of biotechnologies on its microbial biodiversity must be more extensively studied (Schut *et al.*, 1997; Todd, 1980).

The utilization of ultramicrobacteria (UMB) for the development of biobarriers in aquifers is effective because of their capacity to reach smaller pore size or fracture aperture than "normal size" bacteria (Sharp *et al.*, 1999). Generally, UMB are defined as bacteria having a diameter length $\cong 0.3\ \mu m$ (Marshall, 1982). Such small cells exist both as "normal size" bacteria reduced in volume by starvation-survival conditions, and, as naturally occurring small active bacteria (Iizuka *et al.*, 1998; Kemp *et al.*, 1993). While the latter micro-organisms grow slowly in oligotrophic conditions and keep their small size in copiotrophic conditions, the former are in dormancy state in oligotrophic

conditions and return to their full vegetative size, and metabolic activities, when flooded with nutrients (Janssen *et al.*, 1997).

Naturally occurring UMB are present in environments where the carbon source concentration is low, such as soils, oceans and groundwaters (Iizuka *et al.*, 1998; Janssen *et al.*, 1997; Kemp *et al.*, 1993; Marshall, 1982; Schut *et al.*, 1997). Studies on oligotrophic waters showed that less than 0.01 % of the total direct count of UMB were culturable (Novitsky et Morita, 1976). This finding suggests that previously investigated strains, which have been identified as starved forms of identified taxa, represented, in fact, a minute fraction of the UMB community. It is increasingly evident that the majority of naturally occurring UMB are metabolically active, growing, and form an unknown group of bacteria (Schut *et al.*, 1997). UMB from groundwater represent a mostly uncharacterized bacterial community for which data such as the physiological status (starved or active) and the biodiversity, are lacking. Also, the participation of naturally occurring UMB in the formation of a biofilm in aquifer conditions had not yet been demonstrated.

Starvation-survival conditions are known to induce changes in bacterial physiology and morphology, including a reduction in volume, a diminution in EPS production and a decrease in outer membrane hydrophobicity (Holmquist et Kjelleberg, 1993; Novitsky et Morita, 1976; Schut *et al.*, 1997). Such modifications limit the physicochemical interactions between the cells and the geologic material, which enhances the transportation of the cells through the aquifer (Cusack *et al.*, 1992). Transportation is a major concern when bacteria are injected in the aquifer because of the potential of bacterial adherence and biofilm development in close proximity of the injection well, leading to well bioclogging (Driscoll, 1989). It as been demonstrated that UMB cultivated under starvation-survival conditions recovered their "normal size" and shape within less than 48 hours when inoculated into fresh medium or flooded with a carbon source (Holmquistet Kjelleberg, 1993; Novitsky et Morita, 1976). As shown by Cusack *et*

al. (1992), EPS production takes place rapidly after carbon source addition, when EPS-producing bacteria are resuscitated from starvation. The injection of both nutrients and starved UMB in an aquifer leads to the formation of a biofilm which could act either as a containment barrier (cut-off wall) or a permeable reactive barrier (Bellamy *et al.*, 1993; Sharp *et al.*, 1999).

This work focused on UMB from groundwater with the prospect of validating the concept of *in situ* biostimulation for the development of a biobarrier in a fractured rock aquifer. Specifically, the potential of a groundwater UMB community to produce a biofilm when growth conditions are changed from oligotrophic to copiotrophic was investigated. Also, the effects of that biostimulation on the biodiversity were monitored. Using a ceramic coupon to simulate a rock surface and considering bacteria filtered through a 0.4 µm pore size membrane as UMB, the present study aimed to: 1- measure the biofilm thickness formed by groundwater UMB, and 2- assess both the genetic and the functional diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm. The assessment of the biodiversity was realized by observation of, respectively, 16S rRNA gene sequence profiles, using the Single Strand Conformational Polymorphism method (SSCP) and community-level physiological profiles, using the Biolog microplates system. The cloning and the sequencing of representative 16S rRNA gene sequences were performed to evaluate the type of bacteria contained in the biofilm.

5.5 « Material and Methods »

5.5.1 « Groundwater sampling and UMB isolation »

The groundwater was obtained in May 1997 from a subsurface observation well (70 m deep) located in the metropolitan Montreal area, Canada. A purge of three well volumes was conducted before water samples were collected. Then, a volume of groundwater (1 L) was filtered through a 0.4 µm pore membrane filter (HTTP filter type, Millipore,

Bedford, MA, USA). The bacteria in the filtrate were centrifuged (7 500 rpm, 20 min., Rotor JA-20, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) and concentrated 100 times. They were considered as UMB. A chemical analysis of the groundwater was performed to prepare a synthetic groundwater with the following composition (mg/L): Na_2CO_3 (679), NaCl (617), $MgSO_4$ (19), $CaCO_3$ (15), K_2HPO_4 (11), KNO_3 (6) and $FeCl_2$ (1) (pH ≡ 8.3). The UMB population was stored at -80 °C with glycerol (15 g/L).

5.5.2 « UMB enumeration, EPS production, and biofilm development »

UMB were inoculated (1 mL microbial suspension / 500 mL synthetic groundwater) in 1 L reactors and a biofilm developed on a ceramic coupon (2.5 x 15 cm) immersed in the synthetic groundwater as previously described (Ross *et al.*, 1998). To simulate aquifer conditions, the reactors were kept at 10 °C in darkness. The growth conditions were selected according to a previous study on biofilm development in groundwater conditions: molasses fed at 20 mg m^{-2} min^{-1}, sparging aeration (4.2 cm^3/s), addition of calcium ions (100 mg/L) and a C:N:P ratio of 50:10:1 (Ross *et al.*, 1998). The viable bacterial counts were determined using the LIVE/DEAD®BacLight™ epifluorescence kit (L-7007) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) following the method described by Boulos *et al.* (1999). The concentration of suspended EPS was determined on a dry weight basis (Hacking *et al.*, 1983) and the biofilm thickness was evaluated by direct microscopic measurements (100 × magnification) with correction for light refraction (Characklis et Marshall, 1990).

5.5.3 « Genetic Diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm »

5.5.3.1 "DNA extraction"

Bacterial samples were centrifuged then resuspended in TEN buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 150 mM) containing lysozyme (5 mg/mL) and incubated 30

min at 37 °C. The biofilm sample was dispersed with a hand homogenizer before the incubation. Sodium dodecyl sulfate (SDS) and β-mercaptoethanol were added to a final concentration of 0.5% (w/v) and 1% (v/v), respectively. The suspensions were frozen in dry ice/ethanol for 10 min then thawed at 65° C. This step was repeated twice. The extracts were incubated at 45° C for 2-3 hrs with proteinase K (50 µg/mL). DNA was extracted once with phenol (saturated with Tris-HCl pH 8.0), once with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and once with chloroform/isoamyl alcohol (24:1). DNA was then precipitated with ethanol and resuspended in TE buffer (Tris-HCl 1 mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM). Finally, DNA was treated with 1 µg of RNAse A for 15 min at 37° C.

5.5.3.2 "PCR amplification and cloning of the 16S rRNA gene"

Universal eubacterial primers (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 5'-TTACCGCGGC(T/G)GCTGGCAC-3') corresponding to positions 8 to 27 and 533-515, respectively, in the 16S rRNA gene of *Escherichia coli* (Genbank accession #J01695) were synthesized by the Gene Assembler Plus (Pharmacia, Baie d'Urfé, Canada). Amplifications were accomplished in 50 µL reaction volume with 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 10 pmol of each primers, and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Pharmacia). Amplifications were done at 80 °C for 3-5 min in which the bacterial DNA (100 pg-10 ng) was added, 94°C 5 min, 55 °C 5 min, then 30 cycles at 72 °C 2 min, 94°C 40 sec, 55°C 1 min, and finally, an extension time at 7 2°C for 10 min.

The PCR products were cloned in a T-vector according to the manufacturer specifications (pCRII, Invitrogene, San Diego, CA, USA). Ninety-six white colonies were picked from each PCR samples, grown in SOB medium in 96-well microplates (Sambrook *et al.*, 1989). Cultures were then frozen at –70 °C in 15 % glycerol. Plasmid extraction of several clones were performed and digested by *Eco*R1 and *Rsa*I restriction endonucleases

as recommended by the company (Pharmacia) (Sambrook *et al.*, 1989). DNA fractionation was performed on 10 % polyacrylamide gel electrophoresis (29:1) as described in Sambrook *et al.* (1989).

5.5.3.3 "Single Strand Conformational Polymorphism"

PCR products from each bacterial DNA extractions were precipitated with ¼ vol. of ammonium acetate 10 M and 2 vol. ethanol 100 %. DNA were resuspended in 10 µL of water and 1-3 µL were mixed with water (3 µL final volume) and 5 µL of the loading buffer (formamide 95 %, EDTA 20 mM, bromophenol blue 0.02 % and xylene cyanol 0.02%, NaOH 10 mM [NaOH was freshly prepared]). This mixture was heated in boiling water for 5-10 min, put on ice for 5 min, centrifuged for 30 s and put on a 5 % polyacrylamide gel (49:1) containing 10 % glycerol. The electrophoresis was run in a Microprotean II apparatus (Bio-Rad Laboratories Ltd. Mississauga, Canada) at 150 volts for 70-90 min. DNA was stained with silver nitrate as described by Bassam *et al.* (1991).

5.5.3.4 "DNA sequence and phylogenetic study"

Plasmid DNAs were prepared by the alkaline lysis protocol (Sambrook *et al.*, 1989). One strand of the cloned 16S rRNA gene sequences was sequenced by the dideoxynucleotide method (Sanger *et al.*, 1977). The BLAST program (National Center for Biotechnology Information) was used to find in gene banks the most similar 16S sequences to the ones obtained from groundwater and biofilm. Typical 16S sequences were chosen and aligned with the respective 16S sequences using the PILEUP program (Genetics Computer Group Inc.). Phylogenetic analyses were carried out with different softwares from the PHYLIP package 3.5 (Felsenstein, 1989). Pairwise comparisons were achieved using the DNADIST program with the Kimura 2-parameter (Kimura, 1980). Distance matrixes representing a number of substitutions per site for each pairwise comparison were generated. The FITCH program was used to derive the best phylogenetic trees. Bootstrap

of 500 replicates was also derived with the SEQBOOT program. A distance matrix for each replicate was calculated with the DNADIST program with the Kimura 2-parameter and the FITCH program was used to generate the best tree of each replicate. The CONSENSE program was used to derive consensus trees.

5.5.4 « Functional diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm »

5.5.4.1 "Microplate inoculation and incubation"

Biolog Gram-negative (GN) 96-well microplates (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) were used to compare the functional diversity of UMB from groundwater to the bacterial community developed into a biofilm after 16 days. Biolog GN microplates include one blank and 95 carbon substrates, in addition to buffered nutrient medium and a tetrazolium dye on a dried form. Reduction of the tetrazolium dye produces a color indicating oxidation of the carbon sources. The 95 substrates of the GN plate have been grouped into 11 guilds : polymers, carbohydrates, esters, carboxylic acids, brominated chemicals, amides, amino acids, aromatic chemicals, amines, alcohols and phosphorylated chemicals (Garland et Mills, 1991).

Groundwater samples (150 µl) were inoculated directly into Biolog microplates. Biofilms that developed on the ceramic coupon were rinsed with a sterile saline solution (0.85 % NaCl) and were detached from the surface by a sonication treatment as described by Mathieu *et al.* (1992). Biolog GN microplates were inoculated with 150 µl of the biofilm suspension. Duplicate plates were incubated at 10 °C in darkness to simulate aquifer conditions. The absorbance was read at 590 nm (OD_{590}) (MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) over 14 days at different time intervals varying from 1 to 7 days.

5.5.4.2 "Data processing"

Before profiling the patterns of carbon source utilization and performing the statistical analysis, the raw data were adjusted by subtracting the OD_{590} from the blank. To eliminate the effect of the inoculum density on the color development between groundwater and biofilm samples, OD_{590} were corrected by dividing with the Average Well Color Development as suggested by Garland et Mills (1991). Results of the functional biodiversity are presented as community-level physiological profiles: substrate richness (*S*), substrate evenness (*E*) and substrate diversity (*H*) defined as (Zak *et al.*, 1994): *S*: the number of substrates utilized (maximum 95), *E*: a measure of the equability of substrate utilization between all utilized substrates, and *H*: diversity which encompasses both substrate *S* and *E*:

$$H = -\sum p_i (ln\ p_i) \quad (1)$$

where p_i is the proportional color development of the ith well over total color development of all wells of a plate, and:

$$E = H / \log S \quad (2)$$

Information about the type of substrate oxidized was obtained by counting positive responses (adjusted $OD_{590} > 0.15$) in each of the 11 substrate guilds using the adjusted OD_{590} at day 7 (Zak *et al.*, 1994). Day 7 was selected because kinetics of color development showed maximum values for most substrates at that time, as well as being similar to other studies using the Biolog technique for environmental samples (Zak *et al.*, 1994).

5.5.4.3 "Statistical analysis"

The overall adjusted OD_{590} from groundwater and biofilm samples were processed following a repeated measure analysis of variance, using time as a within factor (α = 95 %), and a principal component analysis (PCA) (Sigmaplot, Jandel Scientific, San Rafael,

CA, USA). Responses from the substrate utilization within guilds (% of substrate utilization) were analyzed by the Duncan test ($\alpha = 0.05$).

5.6 « Results »

5.6.1 « Groundwater UMB growth, EPS production, and biofilm development »

Groundwater was filtered on a 0.4 µm pore membrane filter to separate UMB, contained in the filtrate, from non-filterable bacteria, retained on the filter. UMB were then added in reactors in which copiotrophic conditions were supplied to favor the secretion of EPS, by EPS-producing bacteria, and the formation of a biofilm on a ceramic surface. These conditions allowed UMB to reach 9.0×10^5 viable bact. / ml after six days, including a lag phase of four days (initial concentration = 2×10^5 viable bact. / ml), while producing 700 mg / L suspended EPS (initial concentration = 125 mg / L suspended EPS) (Figure 5.1). The development of a biofilm on the ceramic coupon took place after seven days and it reached a maximum thickness of 1100 µm within 13 days.

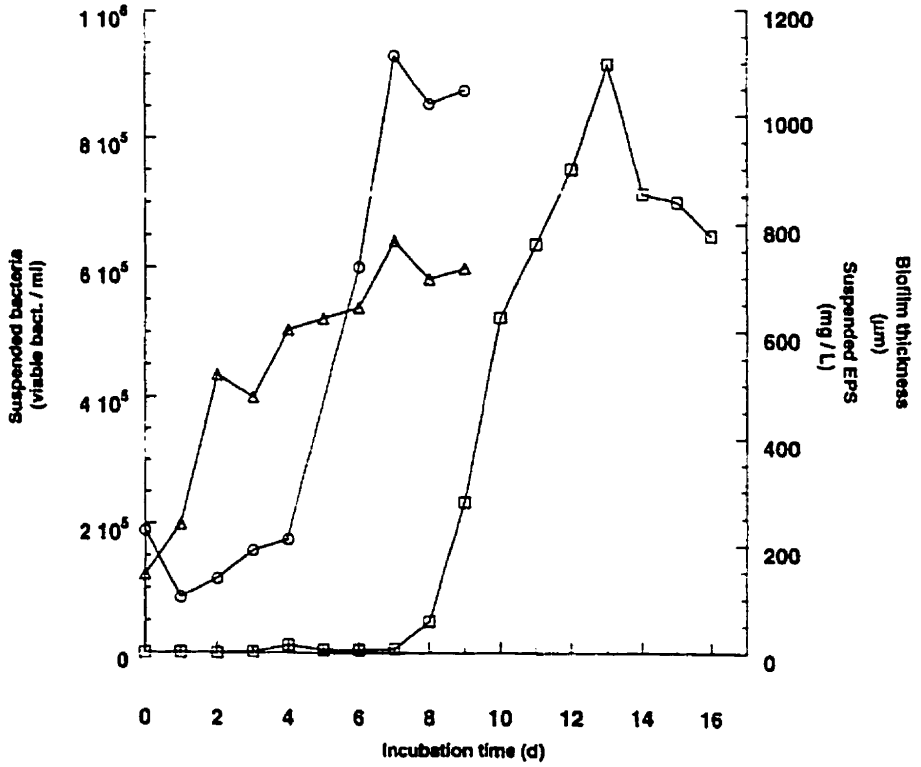


Figure 5.1 Changes in suspended viable bacteria concentration (O), suspended EPS concentration (Δ), and biofilm thickness on a ceramic coupon (□), from groundwater indigenous UMB inoculated in reactors maintained at 10 °C in darkness. The values are averages of duplicate experiments.

5.6.2 « Genetic diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm »

5.6.2.1 "Monitoring microbial diversity by SSCP"

Total DNA was extracted from each bacterial samples. The 5' region of the 16S rRNA genes (appr. 500 nt) was amplified by PCR. Although the PCR products had the same lengths, they were composed of numerous DNA fragments of different sequences. To

determine the diversity of these fragments representing the total microbial diversity, PCR products were tested by the Single Strand Conformational Polymorphism method (SSCP) in which PCR products were denatured and the single strand DNAs were fractionated onto a non-denaturing 5% polyacrylamide gel (Figure 5.2) (Lee *et al.*, 1996). A smear pattern composed of numerous DNA fragments was observed with the groundwater sample reflecting the high microbial diversity of this habitat. Notably, a lower number of DNA fragments were generated from the biofilm sample indicating a decreased biodiversity in the biofilm community.

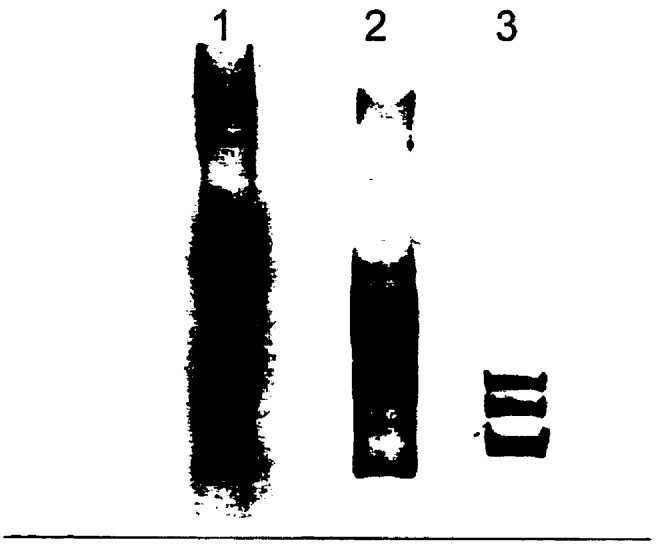


Figure 5.2 Determination of the diversity of the 16S rRNA gene sequences generated from the groundwater and biofilm bacterial samples by SSCP. The 5' portion of the 16S rRNA genes from each bacterial sample was amplified by PCR. DNA were then denatured and run onto a 5% PAGE. Lane 1: groundwater sample, lane 2: biofilm sample, lane 5: a 600 nt DNA fragment.

5.6.2.2 "16S rRNA gene cloning"

Mini 16S rRNA gene libraries were derived from each PCR product. DNA extracted from several clones was digested by *Rsa*I. Among 20 clones from the groundwater sample examined, no specific restriction patterns were observed confirming the high microbial diversity of this community. Four clones were sequenced. None of the groundwater UMB were found in the biofilm samples, even though a small percentage of clones was examined (Tableau 5.1).

Tableau 5.1 Possible affiliation of the seventeen 16S rRNA cloned sequences obtained from groundwater UMB and the resulting biofilm community

Clones	% homology between clones	Possible affiliation	% homology
Groundwater			
F2C6		*Rhizobium* spp.	93.5
F2C7		Strain BD7-1[a]	82.0
F2C10		*Desulfocapsa thiozymogenes*	93.0
F2D4		Strain 72chol[b]	92.5
Biofilm			
B2D3, B2C8	98.0	Strain OCS7[c]	95.0 – 96.0
B2D8		*Paenibacillus amylolyticus*	99.0
B2G8		*Paenibacillus macquariensis*	93.0
B2B6, B2C1, B2C5, B2H3	99.2 – 99.8	*Rahnella* genosp. 3	99.0
B2D2, B2G2, B2G4	96.2 – 98.8	*Pseudomonas* spp.	97.0 – 99.0

Tableau 5.1 Possible affiliation of the seventeen 16S rRNA cloned sequences obtained from groundwater UMB and the resulting biofilm community (suite)

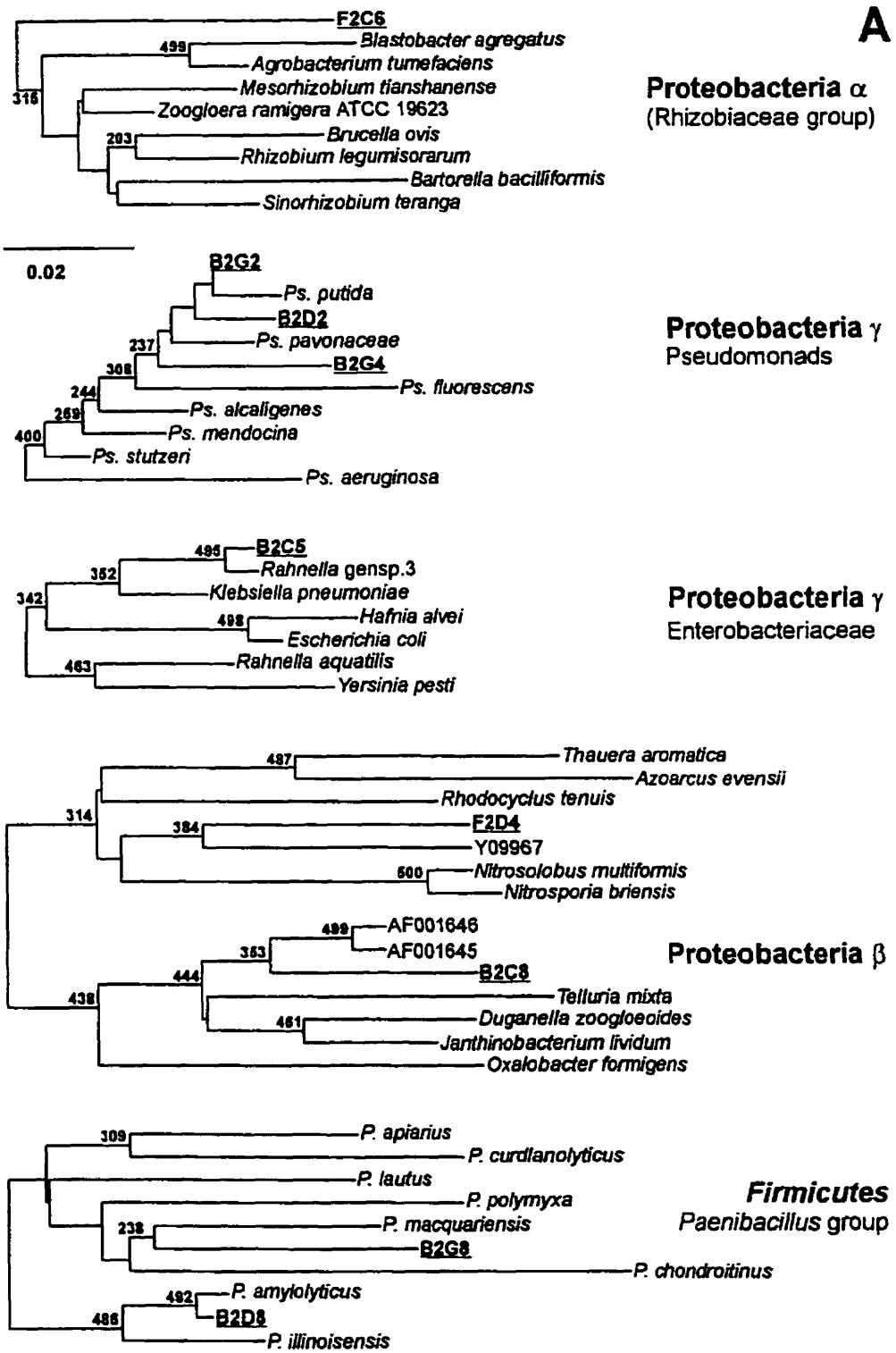
Chimera	
B2G9	Strain OCS7 / *Rhanella* genosp. 3
B2A4	*Pseudomonas* / Strain OCS7

[a] unclassified bacteria.

[b] denitrifying bacteria.

[c] β subdivision, proteobacteria.

Three repetitive specific restriction patterns were observed among the 57 clones from the biofilm sample examined. Pattern #1 contains no *Rsa*I site leading to a 550 bp uncut insert. Pattern #2 contains one *Rsa*I site leading to 500 and 50 bp fragments. Pattern #3 contains two *Rsa*I sites generating 350, 150 and 50 bp fragments. Three clones had no specific pattern. Ten clones representing each restriction pattern plus the three unrelated pattern clones were sequenced. Tableau 5.1 shows the relationship between the tested sequence types and the most related sequences found in the gene banks. A phylogenetic analysis was done with the sequence types and representative bacterial species from different bacterial groups (Figure 5.3).


A
F2C6
Blastobacter agregatus
Agrobacterium tumefaciens
Mesorhizobium tianshanense
Zoogloera ramigera ATCC 19623
Brucella ovis
Rhizobium legumisorarum
Bartorella bacilliformis
Sinorhizobium teranga
499
316
203
Proteobacteria α
(Rhizobiaceae group)
0.02
B2G2
Ps. putida
B2D2
Ps. pavonaceae
B2G4
Ps. fluorescens
Ps. alcaligenes
Ps. mendocina
Ps. stutzeri
Ps. aeruginosa
237
308
244
269
400
Proteobacteria γ
Pseudomonads
B2C5
Rahnella gensp.3
Klebsiella pneumoniae
Hafnia alvei
Escherichia coli
Rahnella aquatilis
Yersinia pesti
496
352
342
498
463
Proteobacteria γ
Enterobacteriaceae
Thauera aromatica
Azoarcus evensii
Rhodocyclus tenuis
F2D4
Y09967
Nitrosolobus multiformis
Nitrosporia briensis
487
314
384
500
AF001646
AF001645
B2C8
Telluria mixta
Duganella zoogloeoides
Janthinobacterium lividum
Oxalobacter formigens
499
353
444
438
461
Proteobacteria β
P. apiarius
P. curdlanolyticus
P. lautus
P. polymyxa
P. macquariensis
B2G8
P. chondroitinus
309
238
P. amylolyticus
B2D8
P. illinoisensis
492
486
Firmicutes
Paenibacillus group

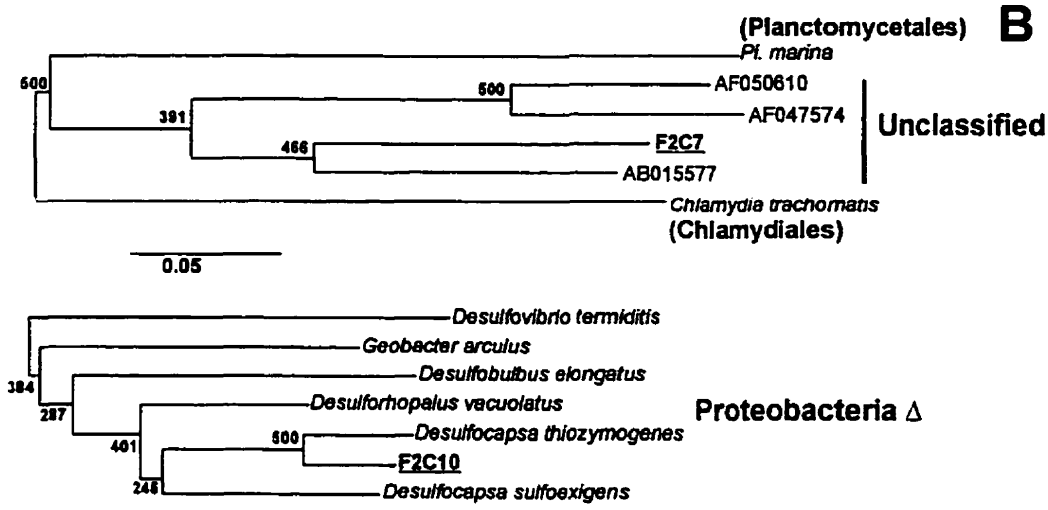


Figure 5.3 Unrooted phylogenetic trees showing the relationship among our sequence types and some representative members of different bacterial families. Trees were inferred from a matrix of pairwise distances using a total of 488 to 522 aligned positions. The numbers at the nodes of the trees indicate bootstrap values for each node of 500 bootstrap resamplings. Only values above 200 were shown. The scale bar represents 0.02 (panel A) and 0.05 (panel B) base changes per nucleotide position. *P.: Paenibacillus, Ps.: Pseudomonas, Pi.: Pirella.* Unnamed species are referred to their GenBank accession number.

The four 16S rRNA gene sequences from the groundwater sample grouped to four different lineages of the *Bacteria* domain. Clone F2C10 grouped with the delta subdivision of the proteobacteria more specifically to the sulfate-reducing *Desulfocapsa thiozymogenes* (93%) (Janssen *et al.*, 1996). Most genera in this subdivision are sulfate or sulfur-reducing bacteria that are usually found in anaerobic sediment of aquatic environments (Bergey, 1984; VanDemark et Batzing, 1987). Clone F2C6 grouped with the alpha subdivision of proteobacteria, more specifically to the Rhizobiaceae without, however being related to any specific known genus. These bacteria are present in the

rhizosphere and are often associated with plants (Vandemark et Batzing, 1987). Clone F2D4 grouped with the beta subdivision of proteobacteria. The closest 16S rRNA gene sequence (92.5% identity) is the denitrifying bacterium strain 72chol that can mineralize cholesterol anaerobically (#Y09967). Harder et Probian (1997) related strain 72chol to *Rhodocyclus*, *Thauera*, and *Azoarcus* species. However, the bootstrap analysis revealed that the affiliation of strain 72chol and F2D4 could not be related to either these three genera (bootstrap less than 40%) or to other ammonia-oxidizing bacteria such as *Nitrosospira* or *Nitrosolobus* species. The 16S sequence of clone F2C7 is the most diverse and deeply branched with unclassified bacteria. Most of them are environmental bacteria such as strain BD7-1 (#AB015577), isolated from deep-sea sediments (from Genebank annotations) (Janssen *et al.*, 1997; Schut *et al.*, 1997).

The thirteen 16S rRNA gene sequences from the biofilm sample grouped in four specific bacterial families. Clones B2D8 and B2G8 grouped with the *Paenibacillus* genus. *Paenibacillus* species represents a new phylum that encompassed several species described as nitrogen-fixing bacilli (Rosado *et al.*, 1998). Bacteria in that genus have the property to secrete extracellular polysaccharide-hydrolyzing enzymes (Shida *et al.*, 1997). Sequences of clone B2D8 is almost identical to *P. amylolyticus*, a starch dissolving bacterium and clone B2G8 is related to *P. macquariensis*, a psychrotrophic bacterium isolated from a subantarticus soil (Bergey, 1984; Marshall et Ohye, 1966).

The second group is composed of two clones (B2D3, B2C8) highly identical to each other and that grouped with the beta subdivision of the proteobacteria. Their 16S rRNA sequences are highly identical to two unpublished 16S rRNA sequences retrieved from the uncultured proteobacteria strains OCS7 and OCS111 (#AF001646, #AF001646, respectively), that were found in a bacterioplankton community (unpublished, from Genebank annotations). These two strains were grouped with the *Zoogloea* species, which are found often in organically polluted freshwater and wastewater treatments and are involved in floc formation (Bergey, 1984; Rossello-Mora *et al.*, 1995).

The third and fourth groups are composed of seven clones that branched with the gamma subdivision of proteobacteria. Four of them are almost identical to each other and are related to the *Enterobacteriaceae* more specifically to the *Rahnella* genosp. 3 (Brenner *et al.*, 1998). However, our phylogenic analysis revealed that these species are more related to the *Klebsiella* genus than to the *Rahnella* genus. The three remaining clones are related to Pseudomonads such as *Ps. putida*, *Ps. pavonaceae* and *Ps. stutzeri*. These bacteria are widely distributed in the environment. Analysis of two chimeras obtained from the biofilm samples revealed sequences that originated from *Pseudomonas*, *Rahnella* genosp. 3 and strain OCS7 sequences.

5.6.3 « Functional diversity of UMB from groundwater and the resulting biofilm »

Samples of groundwater (t = 0 d) and of biofilm developed on the ceramic coupon (t = 16 d) were inoculated in Biolog GN microplates to study the difference in functional biodiversity. Compared to the UMB from groundwater, the microbial community from the biofilm significantly oxidized a larger number of substrates (*S*) while the equability of color development between all positive wells (*E*) was significantly lower ($p = 0.00$, and $p = 0.09$, respectively) (Figure 5.4). However, the pattern of substrate diversity (*H*), which was obtained from the ratio of the color development on a particular substrate to the total color development of all substrates, was not significantly different between groundwater and biofilm microbial communities ($p = 0.21$). The patterns of *S*, *E* and *H* showed limited variations after 4 days of incubation at 10 °C in darkness both for groundwater and biofilm bacterial communities (Figure 5.4). Between days 4 and 14, the *S* index of the biofilm community was 2.2-fold the one of groundwater community by utilizing 93 substrates compared to 43 substrates, respectively. Even if the *E* index of the biofilm community was lower than of the groundwater community, 0.86 and 1.04 respectively, it remained uniformly high for both communities.

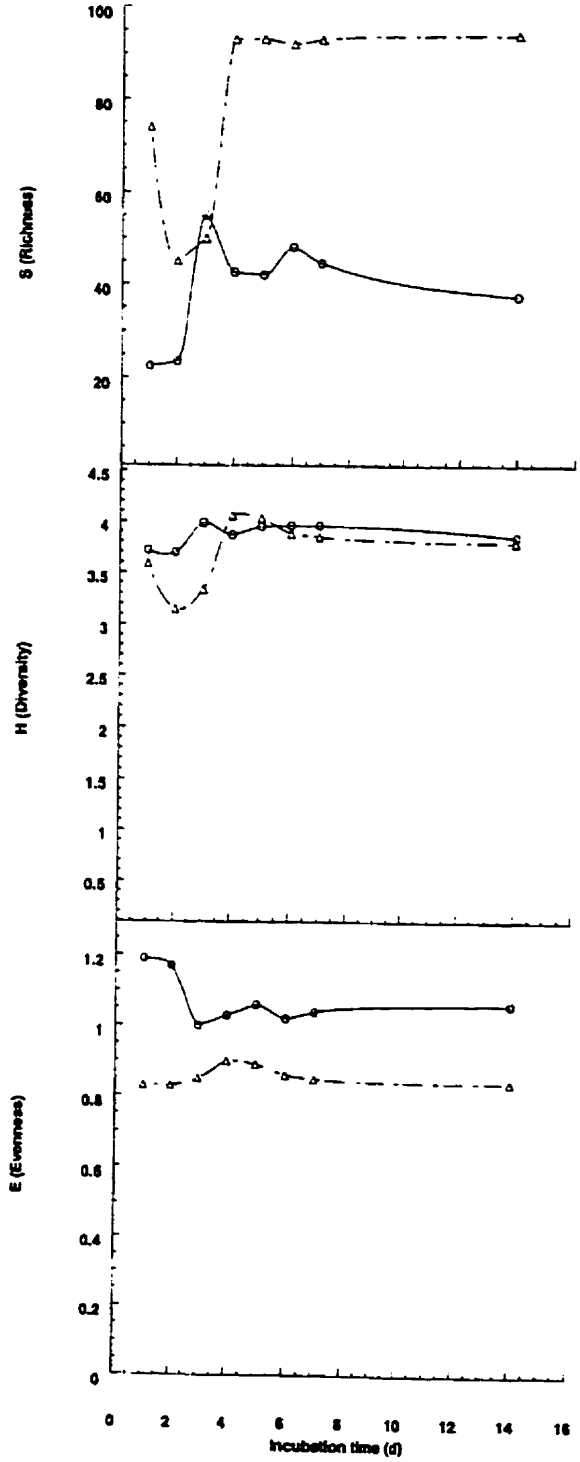

S (Richness)
H (Diversity)
E (Evenness)
Incubation time (d)

Figure 5.4 Community-level physiological profiles of UMB isolated from groundwater (O), and the resulting biofilm (Δ): substrate richness (*S*), substrate diversity (*H*), and substrate evenness (*E*). The Biolog GN microplates were incubated at 10 °C in darkness

The guild-structure analysis revealed that the oxidation of the 95 carbon sources was different between the groundwater UMB and the biofilm community (Tableau 5.2). The substrate utilization within guilds varied from 0 % to a maximum of 60 % by the groundwater community, whereas the biofilm community oxidized between 88 % and 100 % of the substrates in each guild. Notably, the biofilm community was able to oxidize substrates, such as brominated chemicals (100 %) and aromatic chemicals (88 %), that the groundwater community did not oxidize at all.

Tableau 5.2 Substrate-guild analysis of UMB isolated from groundwater and the resulting biofilm community following 7 days of incubation of the Biolog GN microplates at 10 °C in darkness. Substrate utilization in guilds with the same exponent was not significantly different ($\alpha = 95$ %).

	% Utilization within guild	
Substrate guild	Groundwater	Biofilm
Polymers [a]	60.0	100.0
Carbohydrates [a, b]	51.8	98.2
Phosphorylated Chemicals [a, c]	50.0	100.0
Esters [a, d]	50.0	100.0
Carboxylic Acids [a, e]	47.9	100.0
Amino Acids [a, f]	42.5	95.0
Alcohols [a, f]	25.0	100.0
Amides [a, f]	16.7	100.0
Amines [a, f]	16.7	100.0

Tableau 5.2 Substrate-guild analysis of UMB isolated from groundwater and the resulting biofilm community following 7 days of incubation of the Biolog GN microplates at 10 °C in darkness. Substrate utilization in guilds with the same exponent was not significantly different ($\alpha = 95$ %) (suite)

Brominated Chemicals [b, c, d, e, f]	0.0	100.0
Aromatic Chemicals [f]	0.0	87.5

5.7 « Discussion »

The stimulation of UMB isolated from groundwater was effective to form a biofilm on a surface simulating a rock surface. The growth of UMB suggests that a fraction of the community contains actively growing cells (Kemp *et al.*, 1993; Schut *et al.*, 1997). Even if a fraction of the bacterial community was possibly in a dormancy state, these UMB became active when flooded with nutrients, as shown by the rapid production of EPS and the development of a thick biofilm in aquifer conditions. Biofilm accumulation on the ceramic coupon followed a typical sigmoidal curve that is comparable in shape and magnitude to biofilms developed in groundwater conditions (Characklis et Marshall, 1990; Marshall, 1982; Ross *et al.*, 1998). These results confirm the potential of naturally occurring UMB to participate in the formation of a biofilm for the clogging of geologic media.

Globally, the diversity of the bacterial community genetically decreased but functionally increased when the biofilm was compared to the groundwater, suggesting a reduction in the number of species coupled to a shift in the population structure (Marshall, 1984; Zak *et al.*, 1994). The genetic analysis results, as well as community-level physiological profiles, seem to indicate that the biostimulation led to a shift from a specialized population (ex. *Desulfocapsa thiozymogenes*) to a more generalist population (ex. *Pseudomonas* spp.) (Tableau 5.1 & Tableau 5.2) (Vandemark et Batzing, 1987).

A high genetic diversity was observed in groundwater as shown by the SSCP method. Examination of cloned 16S rRNA gene sequences analysis, by restriction enzyme digestion, confirmed the latter observation, as no specific *Rsa*I pattern was observed. Nucleotide sequences of some clones were all related to bacteria known to be found in aquatic and terrestrial environments. Compared to the groundwater samples, the biofilm samples showed an important decrease in the number of bands of DNA fragments in SSCP patterns, suggesting that a major change occurred in the microbial diversity. Analysis of 57 clones from biofilm samples revealed three major *Rsa*I patterns. Among the 13 representative clones sequenced, it was found that the subjected sequences were related to four bacterial groups: *Bacillus/Paenibacillus*, Enterobacteriaceae, Pseudomonads and Zoogloae. None of the UMB identified in groundwater were found in the biofilm samples, even though only a small percentage of clones was examined. Bacteria identified in the biofilm must have been present in groundwater even at a very low level. However, in presence of oxygen and a complex carbon source, the biofilm bacteria should possess a growth advantage over the denitrifying and sulfate-reducing bacteria present in the groundwater.

The Biolog microplates identification system was effective to detect a change in the functional diversity from groundwater UMB to the resulting biofilm, after feeding with molasses (20 mg m^{-2} min^{-1}) and other nutrients for 14 days. This change was due to the selection of bacteria having the capacity to participate in the formation of a biofilm, and, to the environmental changes from oligotrophic to copiotrophic conditions and from anaerobic to aerobic conditions. The Biolog technique measures the potential of aerobic respiratory activity, which can be expected to be inferior in groundwater samples, where the concentration of dissolved oxygen was limited (sulfate reducing conditions, $[S^{-2}]$ = 34 mg/L).

The significant difference in the substrate richness (S = the number of positive wells) from groundwater to biofilm communities is explained by the structural change in microbial communities, as confirmed by the SSCP analysis. This result is in agreement with the ecological principle stating that oligotrophic populations include non-dominant species that may adapt and develop when environmental conditions change, such as a variation in nutrients concentration or oxydoreduction potential (Marshall, 1984). As demonstrated in marine ecosystems, naturally occurring microbial communities are physiologically and nutritionally diverse and they use many substrates under varied environmental conditions (Horowitz *et al.*, 1983).

The S index is generally defined as the number of different groups of micro-organisms found occurring together (Marshall, 1984). In the present study, the significant increase in S index between groundwater and the resulting biofilm rather suggests that bacterial communities had to be stimulated in order to oxydize a larger number of organic molecules. Wunsche *et al.* (1995) obtained an increase in the S pattern using both Biolog GN and Biolog GP microplates when they compared a soil microbial community before and after an acclimatization to hydrocarbons pollutants. The identification of dominant species in the acclimated-community showed the presence of Pseudomonads, which had played an minor role in the non-contaminated soil and therefore, did not contribute to the substrate utilization pattern. The catabolic versatility of Pseudomonads was also demonstrated using the Biolog microplates system when the contribution of individual populations (*Pseudomonas fluorescens, Vibrio alginolyticus* and *Cytophaga marinoflava*) were compared (Verschuere *et al.*, 1997).

The substrate diversity index (H) informs about the proportional color development in all the wells. Thus, the H index indicates the homogeneity of responses for the microplate taking into account the total color development. High H indexes (H from 3.6 – 4.0) are typical of oligotrophic conditions (Horowitz *et al.*, 1983). It has been demonstrated that non-dominant species act to stabilize the community and to give a high H index

(Marshall, 1984). This stability is attributable either to parasitism, commensalism and/or mutualism (Gillan *et al.*, 1998). Although bacterial communities in groundwater and into the biofilm were different, the homogeneities of color development throughout each microplate were not significantly different. That means, even though the diversity decreased in the biofilm, the community was still diversified enough to oxidize substrates with an intensity of the same range. Such trends were reported in a study conducted in a thermal stream, in which the substrate diversity did not deviate significantly, despite abundant seasonal changes, and shift in species of diatoms (Stocker, 1968). This result was interpreted as an indication of the community stability under environmental changes even if a modification in the structure occurred. Derry *et al.* (1998) reported no significant difference in the *H* indexes between uncontaminated and creosote-contaminated soil microbial communities. They associate this absence of difference to the adaptation of the community to creosote, as the soil was contaminated for more than three years.

The substrate evenness (*E*) is an index of equability of color development across all utilized substrates (Zak *et al.*, 1994). It relates the homogeneity of color development through the microplate (*H*) to the number of positive responses (*S*), giving an average of the activities [Eq. (2)]. The ecological meaning of *E* index is the expected distribution of microbial groups within the community (Marshall, 1984). A relationship has been previously established between a decrease in genetic diversity and a lower *E* index (Marshall, 1984). In the present study, the significant inferior *E* index of the biofilm, indicating a poor distribution of bacterial groups in the community, reinforces the assumption of an acclimatization of the community. This acclimatization includes a reduction in the number of species, as shown by the SSCP method, and the predominance of some species over the community, as suggested by the *E* index.

The confirmation of generalist species in the biofilm has been obtained with the substrate guild analysis. The biofilm community oxidized 100 % of the substrates in 8 guilds,

utilizing types of substrates that were not used by the groundwater UMB. Results from the guild-structure analysis validate the approach of stimulating a groundwater microbial population to form a biofilm in an aquifer in prospect of using the biobarrier as a reactive wall. Indeed, a biofilm containing generalist bacteria would probably be efficient to oxidize a wider range of organic pollutants.

The stimulation of groundwater indigenous UMB, by the addition of a carbon source and aeration in reactors kept at 10 °C in darkness, led not only to the production of a thick biofilm, but also to a shift in the microbial population. Bacterial species in the biofilm were less diverse but more physiologically versatile than the initial groundwater community. The use of the SSCP method, the analysis of 16S rRNA gene sequences and the Biolog microplates system were complementary to monitor structural and functional changes in the biodiversity.

5.8 « Acknowledgements »

The authors acknowledge the financial support from the Industrial Chair partners: Alcan, Bodycote/Analex, Bell Canada, Browning-Ferris Industries, Cambior, Canadian Pacific Railways, Centre québécois de valorisation de la biomasse (CQVB), City of Montreal, Elf Aquitaine, Hydro-Québec, Natural Science and Engineering Research Council (NSERC), Petro-Canada and SNC-Lavalin.

The contribution of Michel Demers (Complexe environnemental de St-Michel, Montreal, Canada) in providing groundwater samples and Prof. Bernard Clément, for the statistical treatment of the data is appreciated. We also thank Prof. Réjean Samson, Benoit Barbeau, Francine Turcotte-Rivard, and Éric Déziel for their support in laboratory analyses and recommendations for the manuscript.

5.9 « References »

BASSAM, B.J., CAETANO-ANOLLÉS, G. ET GRESSHOFF, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 196 80-83.

BELLAMY, K.L., DE LINT, N., CULLIMORE, D.R. ET ABIOLA, A. (1993). In-situ Intercedent Biological Barriers for the Containment and Remediation of Contaminated Grounwater, Droycon Bioconcepts Inc. Regina.

BERGEY, D.H. (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Holt, J.G., 1599.

BOULOS, L., PRÉVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER, J. ET DESJARDINS, R. (1999). LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Microbiological Methods, 37 77-86.

BRENNER, D.J., MULLER, H.E., STEIGERWALT, A.G., WHITNEY, A.M., O'HARA, C.M. ET KAMPFER, P. (1998). Two new *Rahnella* genemospecies that cannot be phenotypically differentiated from *Rahnella aquatilis*. International Journal of Systematic Bacteriology, 48 141-149.

BROUGH, M.J., AL-TABBAA, A. ET MARTIN, R.J. (1997). Active Biofilm Barriers for Waste Containment and Bioremediation: Laboratory Assessment in Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. New Orleans, Louisiana, 233-238.

CHARACKLIS, W.G. ET MARSHALL, K.C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, 796.

CUNNINGHAM, A.B., CHARACKLIS, W.G., ABEDEEN, F. ET CRAWFORD, D. (1991). Influence of Biofilm Accumulation on Porous Media Hydrodynamics. Environ. Sci. Technol., 25 (7), 1305-1311.

CUSACK, F., SINGH, S., MCCARTHY, C., GRIECO, J., DE ROCCO, M., NGYEN, D., LAPPIN-SCOTT, H. ET COSTERTON, J.W. (1992). Enhanced oil recovery - three-dimensional sandpack simulation of ultramicrobacteria resuscitation in reservoir formation. Journal of General Microbiology, 138 647-655.

DERRY, A.M., STADDON, W.J. ET TREVORS, J.T. (1998). Functional Diversity and Community Structure of Micro-organisms of Uncontaminated and Creosote-Contaminated Soils as Determined by Sole-Carbon-Source-Utilization. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 14 571-578.

DRISCOLL, F.G. (1989). Groundwater and Wells. Johnson Filtration Systems Inc., St.Paul, 1089.

EL FANTROUSSI, S., VERSCHUERE, L., VERSTRAETE, W. ET TOP, E.M. (1999). Effect of phenyluera herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. Applied and Environmental Microbiology, 65 (3), 982-988.

ENVIRONMENT CANADA (1997). Règlement modifiant le règlement de renseignement sur les substances nouvelles. Loi canadienne de protection sur l'environnement.

FELSENSTEIN, J. (1989). PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics, 5 164-166.

GARLAND, J.L. ET MILLS, A.L. (1991). Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon -Source Utilization. Applied and Environmental Microbiology, 57 (8), 2351-2359.

GAVASKAR, A.R., GUPTA, N., SASS, B.M., JANOSY, R.J. ET O'SULLIVAN, D. (1998). Permeable Barriers for Groundwater Remediation - Design, Construction, and Monitoring. Battelle Press, Columbus, 176.

GILLAN, D.C., SPEKSNIJDER, A.G.C.L., ZWART, G. ET DE RIDDER, C. (1998). Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 64 (9), 3464-3472.

HACKING, A.J., TAYLOR, I.W.F., JARMAN, T.R. ET GOVAN, J.R.W. (1983). Alginate Biosynthesis by *Pseudomonas mendocina*. Journal of General Microbiology, 129 3473-3480.

HARDER, J. ET PROBIAN, C. (1997). Anaerobic mineralisation of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. Arch. Microbiol., 167 269-274.

HEAD, I.M., SAUNDERS, J.R. ET PICKUP, R.W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbial Ecology, 35 1-21.

HOLMQUIST, L. ET KJELLEBERG, S. (1993). Changes in Viability, Respiratory Activity and Morphology of the Marine *Vibrio* sp. Strain S14 during Starvation of Individual Nutrients and Subsequent Recovery. FEMS Microbiology Ecology, 12 215-224.

HOROWITZ, A., KRICHEVSKY, M.I. ET ATLAS, R.M. (1983). Characteristics and Diversity of Subartic Marine Oligotrophic, Stenoheterotrophic, and Euryheterotrophic Bacterial Populations. Canadian Journal of Microbiology, 29 527-535.

IIZUKA, T., YAMANAKA, S., NISHIYAMA, T. ET HIRAISHI, A. (1998). Isolation and Phylogenetic Analysis of Aerobic Copiotrophic Ultramicrobacteria from Urban Soil. Journal of General and Applied Microbiology, 44 75-84.

JANSSEN, P.H., SCHUHMANN, A., BAK, F. ET LIESAK, W. (1996). Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* ge. nov. sp. nov. Arch. Microbiol., 166 184-192.

JANSSEN, P.H., SCHUHMANN, A., MORSCHEL, E. ET RAINEY, F.A. (1997). Novel Aerobic Ultramicrobateria Belonging to the Verrucomicrobiales Lineage of Bacterial Descent Isolated by Dilution Culture from Anoxic Rice Paddy Soil. Applied and Environmental Microbiology, 63 (4), 1382-1388.

KEMP, P.F., SHERR, B.F., SHERR, E.B. ET COLE, J.J. (1993). Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers, Boca raton, 777.

KETCHESON, D.R. ET ZWIERS, W.G. (1997). Evaluation of in-situ restoration technologies for a DNAP impacted fractured carbonate rock site at Smithville, Ontario in Air and Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition. Toronto, Ontario, Canada,

KIMURA, M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16 111-120.

LEE, D.H., ZO, Y.G. ET KIM, S.J. (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation-polymorphism. Applied and Environmental Microbiology, 62 3112-3120.

LEHMAN, R.M., COLWELL, F.S., RINGELBERG, D.B. ET WHITE, D.C. (1995). Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. Journal of Microbiological Methods, 22 263-281.

MARILLEY, L., VOGT, G., BLANC, M. ET ARAGNO, M. (1998). Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis. Plant and Soil, 198 219-224.

MARSHALL, B.J. ET OHYE, D.F. (1966). *Bacillus macquariensis* n.sp., a psychrotrophic bacterium from sub-antarctic soil. Journal of General Microbiology, 44 41-46.

MARSHALL, K.C. (1982). Advances in Microbial Ecology. 6, Plenum Press.

MARSHALL, K.C. (1984). Advances in Microbial Ecology. 7, Plenum Press, 223.

MATHIEU, L., PAQUIN, J.L., BLOCK, J.C., RANDON, G., MAILLARD, J. ET REASONER, D. (1992). Parametres gouvernant la prolifération bacterienne dans les réseaux de distribution. Revue des sciences de l'eau, 5 91-112.

NOVITSKY, J.A. ET MORITA, R.Y. (1976). Morphological Characterizatrion of Small Cells Resulting from Nutrient Starvation of a Psychrophilic Marine Vibrio. Applied and Environmental Microbiology, 32 (4), 617-622.

POWER, M., VAN DER MEER, J.R., TCHELET, R., EGLI, T. ET EGGEN, R. (1998). Molecular-based methods can contribute to assessment of toxicological risks and bioremediation strategies. Journal of Microbiological Methods, 32 107-119.

ROSADO, A.S., DUARTE, G.F., SELDIN, L. ET VAN ELSAS, J.D. (1998). Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in *Paenibacillus azotofixans* Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments. Applied and Environmental Microbiology, 64 (8), 2770-2779.

ROSS, N., DESCHENES, L., BUREAU, J., CLÉMENT, B., COMEAU, Y. ET SAMSON, R. (1998). Ecotoxicological Assessment and Effects of Physicochemical Factors on Biofilm Development in Groundwater Conditions. Environmental Science and Technology, 32 (8), 1105-1111.

ROSSELLO-MORA, R.A., WAGNER, M., AMANN, R. ET SCHLEIFER, K.H. (1995). The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants. Applied and Environmental Microbiology, 61 702-707.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. ET MANIATIS, T. (1989). Molecular Biology, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor,

SANGER, F., NICKLEN, S. ET COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibotors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 1408-1412.

SCHUT, F., GOTTSCHAL, J.C. ET PRINS, R.A. (1997). Isolation and Characterization of the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. FEMS Microbiology Reviews, 20 363-369.

SHARP, R.R., GERLACH, R. ET CUNNINGHAM, A. (1999). Bacterial Transport Issues Related to Subsurface Biobarriers in In Situ and On-Site Bioremediation The Fifth International Symposium. San Diego, California,

SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., NAKAMURA, L.K. ET KOMAGATA, K. (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus, Bacillus chondroitinus, Bacillus curdlanolyticus, Bacillus glucanolyticus, Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 47 289-298.

STOCKER, J.G. (1968). The Ecology of a Diatom Community in a Thermal Stream. British Phycology Bulletin, 3 501-514.

TODD, D.K. (1980). Groundwater Hydrology. John Wiley & Sons, New York, 535.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997). Point to consider in the preparation of TSCA biotechnology submissions for microorganisms, Office of Pollution Prevention and Toxics. Washington, D.C.

VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.F., ROSADO, A.S. ET SMALLA, K. (1998). Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. Journal of Microbiological Methods, 32 133-154.

VANDEMARK, P.J. ET BATZING, B.L. (1987). The Microbes - An Introduction to their Nature and Importance. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 991.

VANDEVIVERE, P. ET BAVEYE, P. (1992). Relationship between Transport of Bacteria and Their Clogging Efficiency in Sand Columns. Applied and Environmental Microbiology, 58 (8), 2523-2530.

VERSCHUERE, L., FIEVEZ, V., VAN VOOREN, L. ET VERSTRAETE, W. (1997). The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities. FEMS Microbiology Ecology, 24 353-362.

WHITE, D., C., FLEMMING, C.A., LEUNG, K.T. ET MACNAUGHTON, S.J. (1998). In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. Journal of Microbiological Methods, 32 93-105.

WUNSCHE, L., BRUGGEMANN, L. ET BABEL, W. (1995). Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess polulation changes after hydrocarbon pollution. FEMS Microbiology Ecology, 17 295-306.

ZAK, J.C., WILLIG, M.R., MOORHEAD, D.L. ET WILDMAN, H.G. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biology and Biochemistry, 26 (9), 1101-1108.

CHAPITRE 6
BIOCOLMATAGE D'UN CALCAIRE FRACTURÉ AVEC UNE MICROFLORE INDIGÈNE DES EAUX SOUTERRAINES

6.1 Titre du manuscrit

« Clogging of a single fracture in limestone with a groundwater microbial community »

6.2 Auteure et co-auteurs

Nathalie Ross[1], Richard Villemur[2], Louise Deschênes[3] et Réjean Samson[3]

[1] Département des génies civil, géologique et des mines, École Polytechnique de Montréal

[2] Microbiologie et Biotechnologie, INRS – Institut Armand-Frappier

[3] Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites, Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal

6.3 « Abstract »

Biological clogging is promoted in aquifers either to contain or to decontaminate groundwater. In this study, an apparatus was developed to measure the potential of an indigenous microflora to clog a single fracture in limestone, with a section of 2.5 mm^2 and a length of 50 cm. Results from the initial characterization of groundwater revealed a bacterial viability of 63 % and concentrations of heterotrophic and sulfate-reducing bacteria of 2.5×10^4 and 56 bact ml^{-1}, respectively. The sequencing of representative clones from 16S rRNA genes, isolated from groundwater, showed significant affiliation with seven bacterial groups. Among them, *Cytophaga* spp., *Arcobacter* spp. and *Rhizobium* spp. are well known to secrete exopolysaccharides and form biofilms. A decrease in hydraulic conductivity occurred after 8 days, to reach after 22 days, 0.8 % of its initial value (initial K_{fi} = 340 cm min^{-1}). Measurements of heterotrophic bacteria and

exopolysaccharides in the effluent confirmed the colonization of the rock surface. This study showed that an indigenous microflora from groundwater was effective to clog a macrofracture in limestone, suggesting a potential application of biobarriers in fractured rock aquifers.

Key words: fractured rock, clogging, biofilm, groundwater, indigenous microbial population, exopolysaccharides

6.4 « Introduction »

The biological clogging of an aquifer leads to a decrease in hydraulic conductivity (Johnston *et al.*, 1999; Sharp *et al.*, 1999). This bioclogging represents, in some cases, a limiting factor, such as the recharge of groundwater through injection wells or infiltration in recharge basins, land disposal of septic tank effluents, generation of black plug layers in the soil of cereal crops and in the greens of golf courses (Lindenbach et Cullimore, 1989; Okubo et Matsumoto, 1983; Paksy *et al.*, 1998; Ralph et Stevenson, 1995). In others cases, bioclogging is promoted to control the movement of contaminated groundwater, to enhance oil recovery by selective plugging of high permeability zones, or to seal the bottom of artificial lakes and ponds (Cusack *et al.*, 1992; Davey *et al.*, 1998; Gallagher, 1998).

Bioclogging of aquifers in the perspective of remediation is increasingly studied for the last 10 years. Such techniques, grouped under the designation of biobarriers, aim to control the groundwater movement for its containment or biotreatment (Bellamy *et al.*, 1993; Turner, 1995). Biobarriers are formed primarily by micro-organisms and exopolysaccharides (EPS) secreted by bacteria (Vandevivere et Baveye, 1992). However, the reduction of hydraulic conductivity in an aquifer is also attributable to poorly soluble gas, produced by methanogenic and denitrifying bacteria, precipitation of metals via the activity of sulfate-reducing bacteria (SRB), deposition of hydroxides produced by Fe

bacteria, filtration of suspended particles in groundwater, and soil swelling (Baveye *et al.*, 1998).

Several studies have demonstrated effective clogging of geologic materials via microbial injection (Sanchez de Lozada *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1999; Vandevivere et Baveye, 1992). However, the persistence of some injected micro-organisms and the introduction of new environmental regulations created a need to investigate aquifer bioclogging via stimulation of the indigenous microflora (Environment Canada, 1997; United States Environmental Protection Agency, 1997; van Elsas *et al.*, 1998). Recent work, achieved by Johnston *et al.* (1999), showed the potential of an indigenous groundwater population to bioclog an aquifer of medium grained sand using biostimulation. The biostimulation was performed by injecting a nutrient solution (glucose 20000 mg L^{-1}, NH_4Cl 1600 mg L^{-1}, $NaNO_3$ 1000 mg L^{-1} and NaBr 130 mg L^{-1}) for two days in delivery wells. The objective was to reduce the hydraulic conductivity (initial $K \cong 7$ m d^{-1}) on a volume of 10 m long by 2 m wide and 4 m below the water table. The biobarrier generated a measured fivefold decrease in hydraulic conductivity within 5 days. After stopping nutrient addition, the hydraulic conductivity returned to ambient values within a 2-weeks period. In another study, the hazard potential of biostimulating a groundwater microflora when forming a biofilm was assessed in a batch system, using a ceramic to simulate a rock surface (Ross *et al.*, 1998). In that batch system, a biofilm developed up to a thickness of 250 µm after 6 days and an ecotoxic effect, associated with the accumulation of soluble microbial products, was showed using two biotests (growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* and bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*).

Fractured rock aquifers, because of their complex flow patterns, still represent a challenge for remediation (Hardisty *et al.*, 1994). A summary of limitations for restoration technologies in a fractured rock impacted by DNAPLs have been reported by Ketcheson et Zwiers (1997). According to the literature, several studies have focused on porous media and few have explored the bioclogging of fractured media (Cunningham *et*

al., 1991; Dennis et Turner, 1998; Vandevivere et Baveye, 1992). Shaw *et al.* (1985) have obtained a decrease in hydraulic conductivity of two orders of magnitude when they have inoculated a model core system with *Pseudomonas* sp., an EPS producer bacteria isolated from natural water systems. Using starved bacteria, Cusack *et al.* (1992) demonstrated the penetration, resuscitation and plugging of a rock matrix up to a reduction of 99 % of the hydraulic conductivity.

Hydraulic conductivities in fractured rock aquifers can be significantly higher than in aquifers of unconsolidated geologic material (Todd, 1980). As a result, the dynamic of biofilm formation is different from porous media, particularly because of 1- the difference in the transport of organic molecules and microbial cells and 2- the higher fluid shear stress (Peyton et Characklis, 1993; Trulear et Characklis, 1982). In addition to micro-organisms and EPS involved in the formation of a biofilm, changes in the chemical composition of rock and groundwater will influence the extent of bioclogging. Indeed, rock weathering could be detrimental to bioclogging, by accentuating the porosity, whereas formation of precipitates would accumulate on the biofilm and then, contribute to the clogging. Ferris et Lowson (1997) reported significant weathering of limestone by endolithic micro-organisms, showing an enrichment of some elements (e.g. magnesium, calcium, iron, and copper) in the endolithic zone, over the host rock. On the opposite, chemical precipitation of ions from the limestone to form insoluble compounds (e.g. calcium carbonate) would participate to the clogging (Todd, 1980). In the present work, the porosity of the limestone matrix was not taken into account, considering the large volume of the single fracture.

Stimulation of indigenous groundwater micro-organisms could lead to a potential hazard. The concern about ecological impacts of biotechnologies has intensified for the last 20 years, and effective tools have been developed to study genetic and taxonomic diversity (Tunlid, 1999; van Elsas *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). Ribosomal RNA (16S) sequences analyses are the most utilized methods for studying the genetic diversity of

micro-organisms in natural environments (Head *et al.*, 1998; Power *et al.*, 1998). One important advantage of these methods is the possibility of identifying bacteria without cultivation. Knowing that a small proportion (0.1 – 10 %) of bacteria sampled from natural environments is actually cultivable, the development of this type of molecular methods led to a better understanding of structural ecology (White *et al.*, 1998). Although EPS-producers bacteria have been isolated from rocks, relations between bioclogging, potential hazard and groundwater microbial population have to be established (Ferris et Lowson, 1997).

The study aimed to verify the potential of a groundwater microbial population to clog a fractured media by: 1- characterizing the initial microbial population via direct counts, cultivable counts and sequencing of representative clones from 16S rRNA genes, in order to relate with bioclogging results and 2- observing the formation of a biofilm in a single fractured limestone using a dedicated apparatus.

6.5 « Material and methods »

6.5.1 « Groundwater sampling and preparation of the microbial population »

The groundwater was obtained in June 1998 from a subsurface observation well (70 m deep) located in the metropolitan Montreal area, Canada. A purge of three well volumes was conducted before water samples were collected. The groundwater was used to provide the indigenous microbial population and a chemical analysis was performed to prepare a synthetic groundwater with the following composition (mg L^{-1}): Na_2CO_3 (679), NaCl (617), $MgSO_4$ (19), $CaCO_3$ (15), K_2HPO_4 (11), KNO_3 (6) and $FeCl_2$ (1) (pH ≡ 8.3). The preparation of the microbial population consisted of a centrifugation (7 500 rpm, 20 min., Rotor JA-20, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) and a concentration (100 times). The microbial population was stored at -80 °C with glycerol (15 g L^{-1}).

6.5.2 « Characterization of the microbial population »

Prior inoculation of the limestone, 1.1 ml of the concentrated microbial population was resuspended in 100 ml of synthetic groundwater and enumerated for viability, heterotrophic bacteria and sulfate-reducing bacteria (SRB). Bacterial identification was performed with representative clones issued from 16S rRNA gene sequences by affiliation with gene sequences banks. The viable bacterial counts were determined using the LIVE/DEAD®BacLight™ epifluorescence kit (L-7007) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) following the method described by Boulos *et al.* (1999). Heterotrophic bacteria (APHA *et al.*, 1992) and SRB (ASTM, 1990) were enumerated using a most probable number (MPN) method with a modification in the incubation time and temperature. Several incubation periods, varying from 1 day to 56 days, have been tested previously and showed that an incubation of 21 days was adequate to obtain reproducible results. The culture tubes were maintained at 10 °C in darkness to simulate groundwater conditions.

The processes of DNA extraction, PCR amplification and cloning of the 16S rRNA gene sequences are described extensively by Ross *et al.* (1999). After total DNA was extracted from groundwater, the 5' region of the 16S rRNA genes (appr. 500 nt) was amplified by PCR. Although the PCR products had the same lengths, they were composed of numerous DNA fragments of different sequences. Mini 16S rRNA gene libraries were derived from each PCR product. DNA extracted from several clones was digested by *Rsa*I. Among the 20 clones isolated from the groundwater sample, no specific restriction patterns were observed confirming the high microbial diversity of this community. Then, eight clones were chosen randomly and sequenced. The BLAST program (National Center for Biotechnology Information) was used to find in gene banks the most similar 16S sequences to the ones obtained from groundwater.

6.5.3 « Single fracture apparatus and inoculation with the groundwater microbial population »

The single fracture apparatus was made of limestone rock obtained from a quarry operating in the metropolitan Montreal area, Canada. A large block was extracted and two pieces of 5 × 10 × 60 cm were cut (Figure 6.1 and Tableau 6.1). A natural limestone rock was chosen to simulate aquifer conditions, which includes heterogeneities in chemical and pore structures resulting from dissolution and precipitation of mineral matters (Chernyshev et Dearman, 1990). The geochemical composition of the limestone rock was: SiO_2 (9.30%), Al_2O_3 (2.56%), TiO_2 (0.02%), CaO (27.35%), MgO (17.40%), K_2O (1.86%), Na_2O (0.05%), MnO (0.06%) and Fe_{tot} (0.93%).

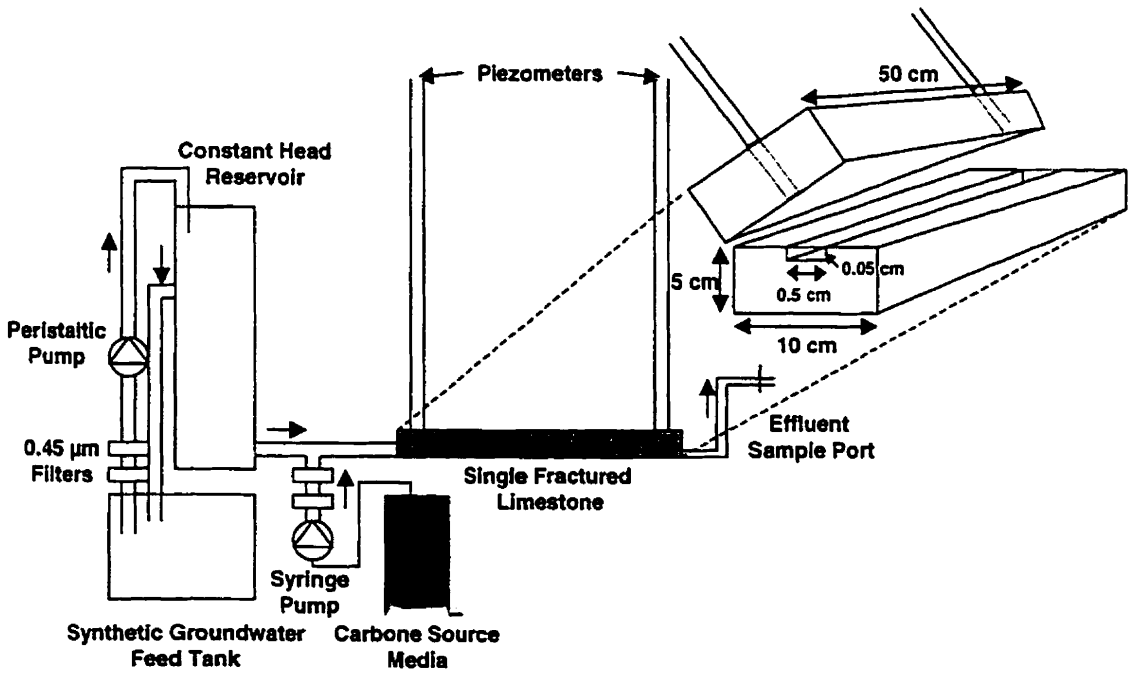


Figure 6.1 Schematic diagram of the single fractured apparatus

Tableau 6.1 Characteristics of the single fractured apparatus and initial conditions

Parameter	Symbol	Value	Units
Fracture width	β	0.5	cm
Fracture aperture	a	0.05	cm
Fracture length	L	50	cm
Fracture cross sectional area	A_s	2.5×10^{-2}	cm^2
Fracture surface	A_f	55	cm^2
Fracture volume	V_f	1.25	cm^3
Initial hydraulic conductivity	K_{fi}	340.6	cm min^{-1}
Initial hydraulic gradient[a]	I	0.35	
Fracture Reynolds number	Re_f	8.6	
Effluent initial flow rate	Q_i	2.98	ml min^{-1}
Effluent initial volumetric flow rate	Q_v	2.38	ml ml $fracture^{-1}$ min^{-1}
Effluent initial velocity	v_i	119.2	cm min^{-1}
Initial carbon source loading rate[b]		1.08×10^{-2}	mg C ml^{-1} min^{-1}
Initial surface loading rate		2.45×10^{-4}	mg C cm^{-2} min^{-1}

[a] $I = (\Delta h)\ L^{-1}$

[b] 366 mg C / g molasses

A single fracture, having the width (β) of 0.5 cm, an aperture (a) of 0.05 cm and a length (L) of 50 cm (fracture volume = 1.25 cm^3), has been cut on one limestone block using a lame core cutting (JKS Lamage, Dorval, Quebec, Canada) (Figure 6.1 and Tableau 6.1). Aquarium silicone and clamps were used to fix the limestone pieces together. Two piezometers (Teflon tubing, I.D. 5 mm) were installed at both ends of the fracture to measure changes in the hydraulic head (Vandevivere et Baveye, 1992). Flexible Teflon tubing (I.D. 5 mm) and stainless steel quick connections were attached to the limestone rock. Except for the limestone rock cartridge, all parts in contact with groundwater and the carbon source media were autoclaved at 121°C and 103.4 kPa (20 min).

The experimental apparatus consisted of limestone, single fractured, fed with synthetic groundwater and molasses (carbon source loading rate = 1.08×10^{-2} mg C ml^{-1} min^{-1}), maintained at 10 °C to simulate aquifer conditions (Figure 6.1 and Tableau 6.1). Synthetic groundwater was pumped (Cole-Palmer, Chicago, IL, USA) in a constant head reservoir (volume: 18L, initial flow rate: 2.98 ml min^{-1}) whereas the molasses was supplied directly to the inlet at a rate of 0.1 ml min^{-1} using a syringe pump. Molasses, as a carbon source, and its feeding rate were selected according to a previous study on biofilm development in groundwater conditions (Ross *et al.*, 1998). Both groundwater and the carbon source media were filtered through a series of two 0.45 µm pore membrane filters (Millipore, Bedford, MA, USA) before their injection in the limestone.

Before microbial inoculation, synthetic groundwater was fed to the apparatus at a rate of 5 ml min^{-1} for two days to saturate the single fracture. Then the limestone rock was disconnected from the constant head reservoir. The micro-organisms were introduced in a closed-loop system, using a peristaltic pump at a flow rate of 0.15 ml min^{-1}. The closed-loop system consisted of aseptic Teflon tubes (I.D. 5 mm) and a 250 ml flask, containing the microbial population freshly resuspended in 100 ml of synthetic groundwater and molasses (0.88 g L^{-1}). Following this method, the rock was inoculated once a week during the bioclogging experiment. This interval was chosen in relation to the growth curve of the microbial population in similar growth conditions, which showed a stationary phase at day 7 (unpublished data). Those inoculations were achieved to simulate aquifer conditions and to prevent a microbial shift in the population (Crozier *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1999).

6.5.4 « Bioclogging measurement and analyses of the effluent »

The effluent flow rate (cm min^{-1}), the eluted volume (L) and piezometers levels (cm) were recorded daily for the calculation of hydraulic conductivity (Figure 6.3). The

hydraulic conductivity of the fracture was evaluated using the cubic law (Fetter, 1992): $Q = K_f \beta a (\Delta h)/L$, where Q is the outflow rate (initial rate = 2.98 ml min^{-1}), K_f is the hydraulic conductivity of the fracture (cm min^{-1}), β is the fracture width (0.5 cm), a is the fracture aperture (0.05 cm), Δh is the difference in levels of water between the two piezometers (cm), and L is the distance between the two piezometers (50 cm). The reduction in the hydraulic conductivity was expressed as a percentage of the initial value (K_f/K_{fi}). The initial value of K_f was 340 cm min^{-1}, a value found typically in karst limestone and permeable basalt rocks (Freeze et Cherry, 1979). The cubic law is valid for laminar flow ($Re_f < 2000$, in open channels). The Reynolds number of the fracture (Re_f = 8.6) was calculated according to flow in a slit (Bird *et al.*, 1960): $Re_f = a v_f \rho/\mu$, where v_f is the water velocity in the fracture ($v_{fi} = -K_{fi} (\Delta h)/L$ = 119.2 cm min^{-1}), ρ is the fluid density (0.999×10^{-3} kg m^{-3}, at 10 °C) and μ is the viscosity (1.15 N • sec m^{-2}, at 10 °C).

Effluent samples were collected every two days to monitor carbon source concentration, bacterial concentration, suspended EPS concentration, pH and oxydoreduction potential (ORP). The microbial population was separated from the suspended EPS by addition of NaCl (5 M), EDTA (0.5 M) and a centrifugation (24000 × g, 40 min) (Hacking *et al.*, 1983). Then ethanol was added to the supernatant to precipitate EPS, which were recuperated on a Whatman GF/A filter. The filtrate was analyzed for its carbohydrate concentration, determined by the phenol-sulfuric acid method (Dubois *et al.*, 1956). The concentration of suspended EPS was determined on a dry weight basis (Hacking *et al.*, 1983) and specific probes were used to measure pH (ASTM, 1990) and ORP (ASTM, 1993). Heterotrophic bacteria were enumerated using a MPN method (APHA *et al.*, 1992).

6.6 « Results and discussion »

6.6.1 « Characterization of the microbial population »

Prior to the bioclogging experiment in the single fractured limestone rock, the initial microbial community from groundwater was characterized to relate with bioclogging results. The viability of the groundwater microbial population was 63%, representing 9.9 $\times 10^4$ viable bact. ml^{-1} and 5.8 $\times 10^4$ non-viable bact. ml^{-1}. Cultivable counts of total heterotrophic bacteria were 2.5 $\times 10^4$ bact. ml^{-1} whereas the SRB concentration was 56 bact. ml^{-1}. Compared to reported literature, the viability of the microbial population was higher of approximately one log whereas the concentration of SRB was one or two orders of magnitude lower (Martino *et al.*, 1998).

The phylogenetic analyses revealed that seven out of the eight 16S rRNA sequences were related to seven different bacterial groups (Tableau 6.2 and Figure 6.2). Clones B3 and A5 were related to the cytophale phylum with 89 % homology to Flavobacteriaceae and Cytophagaceae. Species included in these groups were isolated from marine waters, and freshwater (Manz *et al.*, 1996). They are known to secrete EPS and were isolated from biofilms (Gillan et De Ridder, 1997; Manz *et al.*, 1999). Clone A6 was related to the Verrucomicrobiales, more specifically to *Verrucomicrobium* sp. strain VeCb1 (94 %), bacteria found in anoxic rice paddy soil. These bacteria were found in soil, freshwater and marine pelagic environment. Clone B6 grouped with the epsilon subdivision of proteobacteria, more specifically to the *Arcobacter* genus (91 % homology). Bacteria in this genus are potentially pathogens for animal and human, as it can cause enteritis. They were found in different environments, such as activated sludge and contaminated aquifers (Rice *et al.*, 1999; Snair *et al.*, 1997).

Tableau 6.2 Possible affiliations of the eight 16S rRNA cloned sequences obtained from groundwater

Clones	Possible Affiliation	Homology
A5, B3[a]	*Cytophaga* spp.	89 %
A6	*Verrucomicrobium* spp.	94 %
B6	*Arcobacter* spp.	91 %
C6	*Rhizobium* spp.	93.5 %
C7	Strain BD7-1[b]	82 %
C10	*Desulfocapsa thiozymogenes*	93 %
D4	Strain 72chol[c]	92.5 %

[a] Homology between clones: 99.6 %

[b] unclassified bacteria

[c] denitrifying bacteria

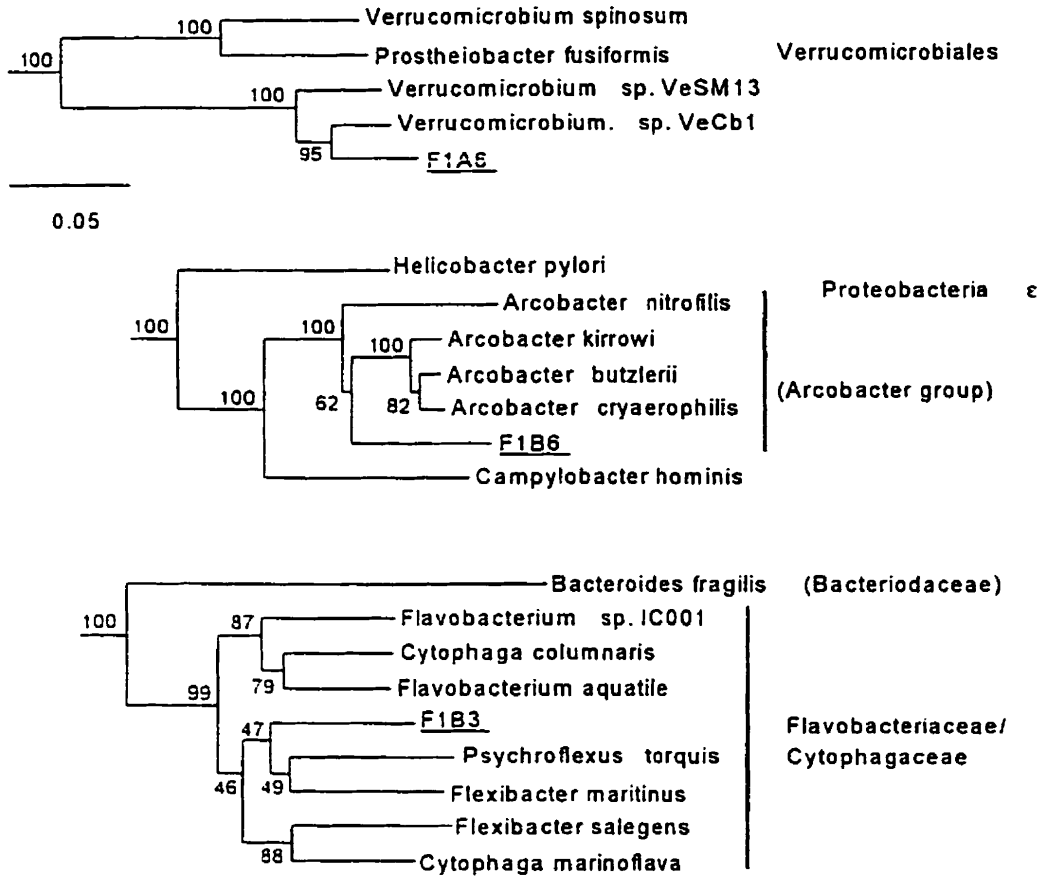


Figure 6.2 Unrooted phylogenetic trees showing the relationship among sequences types obtained in the present study and some representative members of different bacterial families. Trees were inferred from a matrix of pairwise distances using a total of approximately 500 aligned positions. The numbers at the nodes of the trees indicate bootstrap values for each node of 100 bootstrap resampling. Only values above 40 were shown. The scale bar represents 0.05 base changes per nucleotide position. Unnamed species are referred to their GenBank accession number

In a previous study on the groundwater microbial population, four other clones, isolated from a filtered fraction of groundwater (0.45 µm pore membrane filter), were characterized: C6, C7, C10 and D4 (Tableau 6.2) (Ross *et al.*, 1999). Cells that passed through the filter were refered to as ultramicrobacteria (UMB). These types of bacteria are found naturally in environments where the carbon source concentration is low, such as soils, oceans and groundwaters (Iizuka *et al.*, 1998; Schut *et al.*, 1997). The clones represent bacteria that belong to Rhizobiaceae (C6), denitrifying bacteria (D4), *Desulfocapsa* sp. (C10) or unclassified bacteria (C7). Rhizobiaceae are present in the rhizosphere but were also isolated from biofilms, particularly in sand filters, and are known to secrete EPS (Leigh et L., 1992; Neef *et al.*, 1996). Denitrifying bacteria (D4) grow at high ORP (100 mV < ORP< 700 mV) whereas *Desulfocapsa* sp. are active in sulfate reduction conditions (ORP< 200 mV) (Appeloet Postma, 1993). Most of unclassified bacteria, such as BD7-1 (C7), were isolated from deep-sea sediments (from Genebank annotations) (Schut *et al.*, 1997; Vandemark et Batzing, 1987). Amy *et al.* (1992) isolated cells from rock samples, the bacteria of which were smaller than 1 µm and remained small even when cultured. Indeed, although it is known that UMB can be obtain from starvation of «normal size» cells (1-10 µm), it has been shown that several UMB, isolated from natural environments, keep their small size either in oligotrohic or copiotrophic conditions (Amy et Morita, 1983; Janssen *et al.*, 1997). The presence of such small cells represents an advantage for the bioclogging of microfissures (fracture width $\equiv 10^{-1}$ µm), while «normal size» bacteria have access to microfractures (fracture width $\equiv 10^{0} - 10^{1}$ µm) and macrofractures (fracture width $\equiv 10^{2}$ µm - 1 cm) (Chernyshev et Dearman, 1990).

6.6.2 « Bioclogging of the single fractured limestone rock »

When the groundwater microbial population was stimulated to secrete EPS, a decrease in the hydraulic conductivity of the single fractured limestone took place after 8 days, where K_f/K_i dropped from 100 % to 86 % (Figure 6.3). The process of clogging accelerated

after 16 days to reach, after 22 days, 100 times less than the initial hydraulic conductivity. This bioclogging was obtained after the passage of 63 L of synthetic groundwater, representing 50720 fracture volumes. Total heterotrophic bacteria in the effluent varied of 1 log during the experiment (between 2.3×10^4 and 4.6×10^5 bact ml^{-1}) while the suspended EPS concentration was between 104 mg L^{-1} and 188 mg L^{-1}. The pH of the effluent increased from 7.8 to 8.2 whereas the ORP decreased from 206 mV to 150 mV. Those conditions were favorable for the growth of aerobic EPS-producing bacteria.

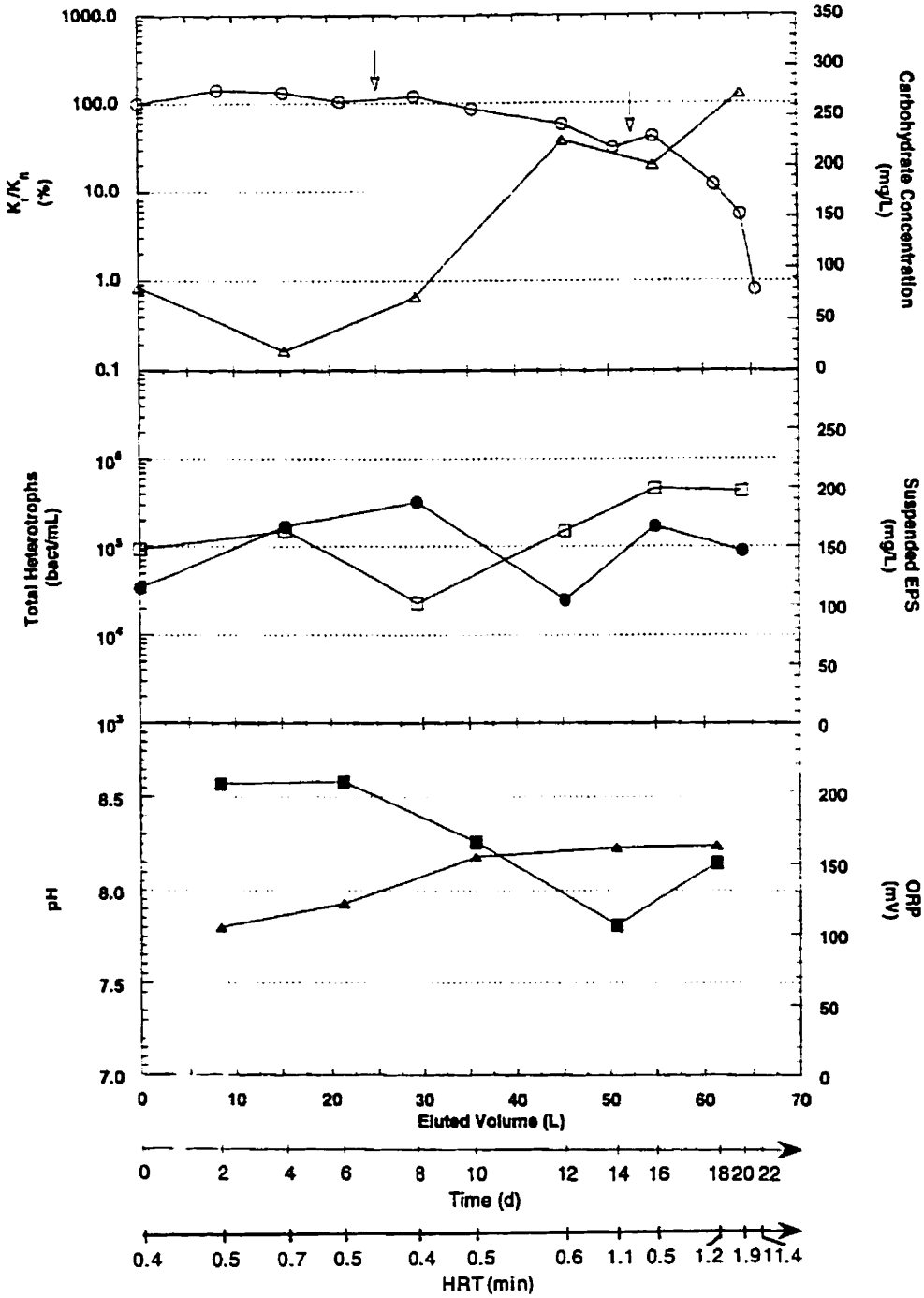


Figure 6.3 Eluted volume, time and hydraulic retention time (HRT) changes of hydraulic conductivity in the single fractured limestone (O) and effluent analyses: carbohydrate

concentration (Δ), total aerobic heterotrophic bacteria (□), EPS concentration (●), pH (▲) and ORP (■). Arrows indicates bacterial inoculations of the limestone rock

The magnitude of the clogging of the single fractured limestone (2 orders of magnitude within 22 days) is comparable to experiments conducted in porous media, such as sand and soil columns (Dennis et Turner, 1998; Frankenberger *et al.*, 1979; Vandevivere et Baveye, 1992; Vandevivere et Baveye, 1992). However, the fracture section (2.5 mm^2) was large in comparison to the typical pore volume of sand (porosity ≅ 40 %, being the ratio of the volume of interstices to the total volume) (Todd, 1980). Typically, hydraulic conductivity in porous and fractured media is affected by the presence of cells, secretion of EPS, metabolic precipitates and gas bubbles produced by bacteria (Baveye *et al.*, 1998). In addition to the presence of EPS and bacteria, a possible explanation for the substantial decrease in K_f could be an accumulation of precipitates due to changes in chemical composition of groundwater and limestone. Indeed, the high sodium ions concentration in the synthetic groundwater could have led to a displacement of calcium ions on the rock surface and a precipitation as calcium carbonate (Todd, 1980). Also, the oxydoreduction potential and the pH of the groundwater could have promoted the formation of $Fe(OH)_3$, a precipitate, and formation of carbon dioxide (
Figure 6.3) (Appeloet Postma, 1993). The formation of both calcium carbonate and ferrous hydroxides contribute to increase pH. However, in the range of pH and ORP measured in the present study, neither sulfate reduction by SRB nor methanogenic production by methanogenic bacteria could have occurred. Hence, *Desulfocapsa thiozymogenes* (clone C10) could not have participate in the biofilm formation. Also, the precipitation of divalent metallic ions with sulfide and methane gas bubbles production was prevented (Sanchez de Lozada *et al.*, 1994).

Reduction in the hydraulic conductivity of the limestone rock fracture seemed to have a relation with bacterial inoculations made on days 7 and 15 (

Figure 6.3). Indeed, hydraulic conductivity dropped of 14% after day 8 and the decrease accelerated after day 16, to reach after 22 days, 0.8 % of the initial value. Although the dynamic of attachment and detachment of bacteria is governed by several factors, including shear stress, surface roughness and cell surface hydrophobicity, it is difficult to predict their concentration in limestone. As an example, Clement *et al.* (1997) reported a first order attachment and detachment rates from a soil column operated under denitrification conditions. Vandevivere et Baveye (1992) reported that 60 % of *Pseudomonas putida* cells in the effluent accounted for cells newly formed within a sand column, in which EPS secretion was copious (visual observation with scanning electron microscopy). The decrease in EPS concentration in the effluent, following bacterial inoculations, could be an indication of EPS attachment on the rock surface, leading to a decrease in the fracture porosity and an enhancement of cells adhesion and retention (Vandevivere et Baveye, 1992).

The capacity of aggregated cells to bioclog a porous media was demonstrated by (Vandevivere et Baveye, 1992), using *Arthrobacter* sp. strain AK19. The strain did not produce EPS, was an obligatory aerobic and non-motile. In that case, the hydraulic conductivity in sand column decreased 100 times after 10 days (initial $K = 0.49$ cm min^{-1}) and only 1.2% of the cells were washed out. The authors attributed the high biomass accumulation in the column to the convective transport of cells, which remained attached on sand particle after cell division, via physical adsorption. Stenstrom (1989) have demonstrated the evidence of bacterial adhesion on quartz particles, according to cell surface hydrophobicity. Previous analyses on the groundwater microbial population used in the present study showed an increase in cell surface hydrophobicity (an increase from 5 % to 25 % of cells adsorbed on hexadecane, after 6 days) when cultivated in a batch system (unpublished data). Another work demonstrated that sandstones and limestones are the most common rocks colonized by endolithic microbial communities, such as cyanobacteria, heterotrophic bacteria, green algae and fungi (Bell et Sommerfeld, 1987).

Those results suggest that limestone offers a large quantity of adsorption sites for organic molecules (molasses), bacteria and EPS (Characklis et Marshall, 1990).

Other findings from literature showed that 1- bacteria fouled preferentially high permeability zones of an heterogeneous sandstone because of the better transport of nutrients to bacteria (Cusack *et al.*, 1992) and 2- a bioclogging of only 1.6 % of the total void space was sufficient to decreased the hydraulic conductivity of a sand column by half, and 3- a bioclogging of 3.0 % led to a decrease of 2 orders of magnitude (by measurement of the biovolume occupied by biomass vs the porosity of porous media) (Vandevivere et Baveye, 1992). Those results, as well as the clogging of the single fractured limestone obtained in this study, suggest that the biostimulation of an indigenous groundwater microbial population could be applicable to reduce the hydraulic conductivity of a fractured rock aquifer. However, the stimulation of an indigenous microflora could result in a biological hazard such as an increase in the release of pathogens (e.g. *Arcobacter* sp., Tableau 6.2). Also, the decrease in water velocity, as clogging occurs, would lead to oxygen depletion and changes in redox potential. Hence, the biodiversity could shift to anaerobic bacteria and SRB, such as Strain BD7-1 and *Desulfocapsa thiozymogenes*.

6.7 « Conclusions »

The hydraulic conductivity of a limestone, having a single fracture of a width of 0.5 cm, an aperture of 0.05 cm and a length of 50 cm, was decreased by a magnitude of 100 times at the end of 22 days, after inoculations with a groundwater microbial community. This result suggest the potential of an effective bioclogging in microfractured aquifers (fracture width $\cong$ 1 - 10 µm) following stimulation of the indigenous microflora. Analyses of chemical composition of groundwater and limestone, as well as identification of representative bacterial groups in groundwater, provided insights about microbial activity and physical processes involved in the clogging. Further research should address

the measurement of bioclogging resistance to organic contaminants and persistence over time, including the effects of carbon source depletion and a shift in microbial population, following a decrease in fracture volume. Evolution of biological hazard over time needs also to be addressed.

6.8 « Acknowledgements »

The authors acknowledge the financial support from the Industrial Chair partners: Alcan, Bodycote/Analex, Bell Canada, Browning-Ferris Industries, Cambior, Canadian Pacific Railways, Centre québécois de valorisation de la biomasse (CQVB), City of Montreal, Elf Aquitaine, Hydro-Québec, Natural Science and Engineering Research Council (NSERC), Petro-Canada, SNC-Lavalin and Solvay. The contribution of Mr. Antonio Gatien in designing the apparatus and Mrs. Francine Turcotte-Rivard in analyzing the biodiversity is appreciated.

6.9 « References »

AMY, P.S., HALDEMAN, D.L., RINGELBERG, D., HALL, D.H. ET RUSSELL, C. (1992). Comparison of Identification Systems for Classification of Bacteria Isolated from Water and Endolithic Habitats within the Deep Surface. Applied and Environmental Microbiology, 58 (10), 3367-3373.

AMY, P.S. ET MORITA, R.Y. (1983). Starvation-Survival Patterns of Sixteen Freshly Isolated Open-Ocean Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 45 (3), 1109-1115.

APHA, AWWA et WEF (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater.

APPELO, C.A.J. ET POSTMA, D. (1993). Geochemistry, Groundwater and Pollution. A. A. Balkema, Brookfield, 536.

ASTM (1990). Standard test methods for sulfate reducing bacteria in water and water-formed deposits - D4412-84. 533-535.

ASTM (1990). Standard Test Method for pH of Water. 350-358.

ASTM (1993). Standard Practice for Oxidation-Reduction Potential of Water. 345-349.

BAVEYE, P., VANDEVIVERE, P., HOYLE, B.L., DELEO, P.C. ET SANCHEZ DE LOZADA, D. (1998). Environmental Impact and Mechanisms of the Biological Clogging of Saturated Soils and Aquifer Materials. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 28 (2), 123-191.

BELL, R.A. ET SOMMERFELD, M.R. (1987). Algal biomass and primary production within a temperate zone sandstone. American Journal of Botany, 74 294-297.

BELLAMY, K.L., DE LINT, N., CULLIMORE, D.R. ET ABIOLA, A. (1993). In-situ Intercedent Biological Barriers for the Containment and Remediation of Contaminated Grounwater, Droycon Bioconcepts Inc. Regina.

BIRD, R.B., STEWART, W.E. ET LIGHTFOOT, E.N. (1960). Transport Phenomena. John Wiley & Sons, New York, 780.

BOULOS, L., PRÉVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER, J. ET DESJARDINS, R. (1999). LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Microbiological Methods, 37 77-86.

CHARACKLIS, W.G. ET MARSHALL, K.C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, 796.

CHERNYSHEV, S.N. ET DEARMAN, W.R. (1990). Rock Fractures. Butterworth-Heinemann, London,

CLEMENT, T.P., PEYTON, B.M., SKEEN, R.S., JENNINGS, D.A. ET PETERSON, J.N. (1997). Microbial growth and transport in porous media under denitrification conditions: experiments and simulations. Journal of Contaminant Hydrology, 24 269-285.

CROZIER, R.H., AGAPOW, P.-M. ET PEDERSEN, K. (1999). Towards complete biodiversity assessment: an evaluation of the subterranean bacterial communities in the Oklo region of the sole surviving natural nuclear reactor. FEMS Microbiology Ecology, 28 325-334.

CUNNINGHAM, A.B., CHARACKLIS, W.G., ABEDEEN, F. ET CRAWFORD, D. (1991). Influence of Biofilm Accumulation on Porous Media Hydrodynamics. Environ. Sci. Technol., 25 (7), 1305-1311.

CUSACK, F.M., SINGH, S., NOVOSAD, J., CHMILAR, M., BLENKINSOPP, S.A. ET COSTERTON, J.W. (1992). The Use of Ultramicrobacteria for Selective Plugging in Oil Recovery by Waterflooding in SPE Internaltional Meeting on Petroleum Engineering. Beijhing, China, 341-355.

DAVEY, M.E., GEVERTZ, D., WOOD, W.A., CLARK, J.B. ET JENNEMAN, G.E. (1998). Microbial selective plugging of sandstone through simulation of indigenous bacteria in a hypersaline oil reservoir. Geomicrobiology, 15 335-352.

DENNIS, M.L. ET TURNER, J.P. (1998). Hydraulic conductivity of compacted soil treated with biofilm. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, February 120-127.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. ET SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, 28 (3), 350-353.

ENVIRONMENT CANADA (1997). Règlement modifiant le règlement sur les renseignement concernant les substances nouvelles. Loi canadienne de protection sur l'environnement.

FERRIS, F.G. ET LOWSON, E.A. (1997). Ultrastructure and geochemistry of endolithic microorganisms in limestone of the Niagara Escarpment. Canadian Journal of Microbiology, 43 (3), 211-219.

FETTER, C.W. (1992). Contaminant Hydrogeology. Maxwell Macmillan Canada, Toronto, 458.

FRANKENBERGER, W.T., TROEH, F.R. ET DUMENIL, L.C. (1979). Bacterial Effects on Hydraulic Conductivity of Soils. Soil Sci. Soc. Am., 43 333-338.

FREEZE, R.A. ET CHERRY, J.A. (1979). Groundwater. Prentice - Hall, Inc., Englenwood Cliffs,

GALLAGHER, E.M. (1998). Biological clogging of geocomposites exposed to raw landfill leachate over an extended period. Waste Manage Res., 16 (5), 421-429.

GILLAN, D.C. ET DE RIDDER, C. (1997). Morphology of a ferric iron-encrusted biofilm forming on the shell of a burrowing bivalve (Mollusca). Aquatic Microbial Ecology, 12 1-10.

HACKING, A.J., TAYLOR, I.W.F., JARMAN, T.R. ET GOVAN, J.R.W. (1983). Alginate Biosynthesis by *Pseudomonas mendocina*. Journal of General Microbiology, 129 3473-3480.

HARDISTY, P.E., ROSS, S.D. ET JOHNSON, P.M. (1994). Characterization of LNAPL in Fractured Sedimentary Rock: Techniques, Behavior and Implications for Remediation in 4e Symposium annuel sur la restauration des eaux souterraines et des sols contaminés. Calgary, Alberta, 185-200.

HEAD, I.M., SAUNDERS, J.R. ET PICKUP, R.W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbial Ecology, 35 1-21.

IIZUKA, T., YAMANAKA, S., NISHIYAMA, T. ET HIRAISHI, A. (1998). Isolation and Phylogenetic Analysis of Aerobic Copiotrophic Ultramicrobacteria from Urban Soil. Journal of General and Applied Microbiology, 44 75-84.

JANSSEN, P.H., SCHUHMANN, A., MORSCHEL, E. ET RAINEY, F.A. (1997). Novel Aerobic Ultramicrobateria Belonging to the Verrucomicrobiales Lineage of Bacterial Descent Isolated by Dilution Culture from Anoxic Rice Paddy Soil. Applied and Environmental Microbiology, 63 (4), 1382-1388.

JOHNSTON, C.D., TREFRY, M.G., RAYNER, J.L., RAGUSA, S.R., DE ZOYSA, D.S. ET DAVIS, G.B. (1999). In situ bioclogging for the confinement and remediation of groundwater hydrocarbon plumes in 1999 Contaminated Site Remediation Conference. Fremantle, Western Australia, 649-651.

KETCHESON, D.R. ET ZWIERS, W.G. (1997). Evaluation of in-situ restoration technologies for a DNAP impacted fractured carbonate rock site at Smithville, Ontario in Air and Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition. Toronto, Ontario, Canada,

LEIGH, J.A. ET L., C.D. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. Annual Review in Microbiology, 12 (2), 67-70.

LINDENBACH, S.K. ET CULLIMORE, D.R. (1989). Preliminary *in vitro* observations on the bacteriology of the black plug layer phenomenon associated with the biofouling of golf greens. Journal of Applied Bacteriology, 67 11-17.

MANZ, W., AMMAN, R., VANCANNEYT, M. ET SCHLEIFER, K.-H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to

investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the naural environment. Microbiology, 142 1097-1106.

MANZ, W., WENDT-POTTHOFF, K., NEU, T.R., SZEWZYK, U. ET LAWRENCE, J.R. (1999). Phylogenetic composition, spatial strcuture, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. Microbial Ecology, 37 225-237.

MARTINO, D.P., GROSSMAN, E.L., ULRICH, G.A., BURGER, K.C., SCHLICHENMEYER, J.L., SUFLITA, J.M. ET AMMERMAN, J.W. (1998). Microbial abundance and activity in a low-conductivity aquifer system in East-Central Texas. Microbial Ecology, 35 224-234.

NEEF, A., ZAGLAUER, A., MEIER, H., AMANN, R., LEMMER, H. ET SCHEIFER, K.-H. (1996). Population Analysis in a Denitrifying Sand Filter: Conventional and In Situ identification of *Paracoccus* spp. in Methanol-Fed Biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 62 (12), 4329-4339.

OKUBO, T. ET MATSUMOTO, J. (1983). Biological Clogging of Sand and Changes of Organic Constituents During Artificial Recharge. Water Research, 17 (7), 813-821.

PAKSY, A., POWRIE, W., ROBINSON, J.P. ET PEELING, L. (1998). A laboratory investigation of anaerobic microbial clogging in granular landfill drainage media. Géotechnique, 48 (3), 389-401.

PEYTON, B.M. ET CHARACKLIS, W.G. (1993). A Statistical Analysis of the Effect of Substrate Utilization and Shear Stress on the Kinetics of Biofilm Detachment. Biotechnology and Bioengineering, 41 728-735.

POWER, M., VAN DER MEER, J.R., TCHELET, R., EGLI, T. ET EGGEN, R. (1998). Molecular-based methods can contribute to assessment of toxicological risks and bioremediation strategies. Journal of Microbiological Methods, 32 107-119.

RALPH, D.E. ET STEVENSON, J.M. (1995). The role of bacteria in well clogging. Water Research, 29 (1), 365-369.

RICE, E.W., RODGERS, M.R., WESLEY, I.V., JOHNSON, C.H. ET TANNER, S.A. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. Letters in Applied Microbiology, 28 (1), 31-35.

ROSS, N., DESCHENES, L., BUREAU, J., CLÉMENT, B., COMEAU, Y. ET SAMSON, R. (1998). Ecotoxicological Assessment and Effects of Physicochemical Factors on Biofilm Development in Groundwater Conditions. Environmental Science and Technology, 32 (8), 1105-1111.

ROSS, N., VILLEMUR, R., MARCANDELLA, É. ET DESCHÊNES, L. (1999). Ultramicrobacteria isolated from groundwater and stimulated to form a biofilm: Assessment of changes in the biodiversity by combining genetic and functional methods. Soumis à Applied and Environmental Microbiology, Juillet 1998.,

SANCHEZ DE LOZADA, D., VANDEVIVERE, P., BAVEYE, P. ET ZINDER, S. (1994). Decrease of the hydraulic conductivity of sand columns by *Methanosarcina barkeri*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 10 325-333.

SCHUT, F., GOTTSCHAL, J.C. ET PRINS, R.A. (1997). Isolation and Characterization of the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. FEMS Microbiology Reviews, 20 363-369.

SHARP, R.R., GERLACH, R. ET CUNNINGHAM, A. (1999). Bacterial Transport Issues Related to Subsurface Biobarriers in In Situ and On-Site Bioremediation The Fifth International Symposium. San Diego, California,

SHAW, J.C., BRAMHILL, B., WARDLAW, N.C. ET COSTERTON, J.W. (1985). Bacterial Fouling in a model core system. Applied and Environmental Microbiology, 49 (3), 693-701.

SNAIR, J., AMANN, R., HUBER, I., W., L. ET SCHLEIFER, K.H. (1997). Phylogenic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. Applied and Environmental Microbiology, 63 2884-2896.

STENSTROM, T.A. (1989). Bacterial hydrophobocity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particle. Applied and Environmental Microbiology, 55 142-147.

TODD, D.K. (1980). Groundwater Hydrology. John Wiley & Sons, New York, 535.

Trulear, M.G. et Characklis, W.G. (1982). Dynamics of biofilm process. Journal WPCF, 54 (9), 1288-1301.

TUNLID, A. (1999). Molecular biology: a linkage between microbial ecology, general ecology and organismal biology. Oikos, 85 177-189.

TURNER, J.P. (1995). Biofilm Barriers: A New Concept for Waste Management in Proceedings of the National Conference on Innovative Technologies on Site Remediation and Hazard Waste Management. 101-109.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997). Point to consider in the preparation of TSCA biotechnology submissions for microorganisms, Office of Pollution Prevention and Toxics. Washington, D.C.

VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.F., ROSADO, A.S. ET SMALLA, K. (1998). Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. Journal of Microbiological Methods, 32 133-154.

VANDEMARK, P.J. ET BATZING, B.L. (1987). The Microbes - An Introduction to their Nature and Importance. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 991.

VANDEVIVERE, P. ET BAVEYE, P. (1992). Effect of Bacterial Extracellular Polymers on the Saturated Hydraulic Conductivity of Sand Columns. Applied and Environmental Microbiology, 58 (5), 1690-1698.

VANDEVIVERE, P. ET BAVEYE, P. (1992). Relationship between Transport of Bacteria and Their Clogging Efficiency in Sand Columns. Applied and Environmental Microbiology, 58 (8), 2523-2530.

VANDEVIVERE, P. ET BAVEYE, P. (1992). Saturated Hydraulic Conductivity Reduction Caused by Aerobic Bacteria in Sand Columns. Soil Science Society of America Journal, 56 (1), 1-13.

WHITE, D., C., FLEMMING, C.A., LEUNG, K.T. ET MACNAUGHTON, S.J. (1998). In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. Journal of Microbiological Methods, 32 93-105.

CHAPITRE 7
CONCLUSIONS ET AVENUES DE RECHERCHE

Dans une perspective de remédiation à la problématique des rocs fracturés contaminés, le concept des biobarrières est envisagé. En utilisant l'approche de stimulation de la microflore indigène, le projet visait à évaluer le potentiel de biocolmatage d'un milieu géologique fracturé. Parallèlement, l'innocuité environnementale de la biostimulation a été évaluée en observant les changements de diversité de la communauté microbienne et en mesurant les effets écotoxicologiques.

7.1 Aspects physico-chimiques

Le concept de la biobarrière repose sur un apport en nutriments et accepteurs d'électron dans la nappe aquifère. L'objectif premier était de mesurer les effets des facteurs physico-chimiques sur la croissance des micro-organismes, la sécrétion d'EPS et la formation d'un biofilm sur une surface reproduisant un roc. Mettant en évidence les effets significatifs du type de source de carbone ainsi que son taux d'injection dans le système, ces travaux ont permis de montrer une production d'EPS et une formation d'un biofilm en quantité suffisante pour envisager le colmatage d'un milieu géologique fracturé. Également, les essais effectués en présence de NaPCP ont suggéré une résistance du biofilm à la contamination et une protection des bactéries hétérotrophes présentes dans le biofilm.

Dans une perspective d'application du concept des biobarrières à l'échelle de terrain, la viscosité de la mélasse comme source de carbone sera à considérer. En effet, l'injection *in situ* ($\cong$ 10 °C) de mélasse non diluée pourrait amener une problématique de dispersion. Dans cette optique, un substrat substitut, tel le sirop de maïs, pourrait être utilisé en s'assurant préalablement d'une composition aussi riche que la mélasse en ce qui concerne les nutriments mineurs (ex. Ca^{2+}, acides aminés).

L'injection d'air et de nutriments *in situ* risque d'entraîner un colmatage des puits par les micro-organismes et les minéraux. Pour y remédier, il est possible d'envisager dans un premier temps, l'utilisation de pompes à jets pulsés. Dans un deuxième temps, la solution d'injection devra contenir un minimum de minéraux pouvant former des précipités avec les minéraux de l'eau souterraine (ex. Fe^{2+}).

Afin d'approfondir la compréhension des mécanismes de biocolmatage *in situ*, le monitorage de l'eau souterraine pour les paramètres physico-chimiques suivants seront primordiaux: la concentration ainsi que le type de colloïdes géologiques, la concentration ainsi que la composition des EPS, la production de gaz par la microflore (CO_2, CH_4) et concentration des contaminants.

7.2 Aspects d'écotoxicité

La recherche dans le domaine de l'écotoxicité des biotechnologies *in situ* est récente et la littérature s'avère limitée surtout en ce qui a trait aux concepts de biostimulation. En utilisant deux biotests, la comparaison des effets écotoxiques d'échantillons d'eau souterraine et de biofilms a permis d'évaluer le potentiel de générer une écotoxicité suite à la biostimulation en condition cuvée. Les travaux ont montré que l'accumulation de PMS dans le système peut engendrer une écotoxicité relative et indiquent la nécessité d'une prise en considération pour le développement du concept des biobarrières.

L'écotoxicité de la biostimulation à l'échelle terrain devra être considérée en terme de taux d'écotoxicité. En effet, le mouvement de l'eau souterraine amènera une dilution des PMS et les organismes cibles seront exposés à un certain taux de PMS. Pour la poursuite des recherches sur les aspects écotoxicologiques, il est suggéré d'élargir la batterie de biotests et y intégrer des tests de différents niveaux trophiques. Le choix de ces tests pourra être guidé par le milieu récepteur avec lequel l'eau souterraine communiquera. À

titre d'exemple, un bioessai utilisant la truite serait pertinent dans le cas où un lac serait un milieu récepteur de l'eau souterraine.

Puisque peu de données existent concernant les biotechnologies *in situ*, les réponses écotoxicologiques devront être observées en comparant l'ensemble des données physico-chimiques et ce, afin d'isoler les éléments responsables de la toxicité. Quoique la génération de PMS ait montré une écotoxicité dans un système en cuvée, les effets écotoxiques sur le terrain pourront également provenir d'autres sources, telles les changements de composition en eau, la contamination et même, le changement de température de l'eau.

La perspective de démantèlement de la biobarrière, via une biodégradation suite à un arrêt de l'injection de nutriments, représente un avantage du concept. L'étape de démantèlement devra comprendre un volet de monitorage des effets écotoxicologiques puisque qu'elle pourrait être synonyme de relargage de contaminants organiques et inorganiques adsorbés sur le biofilm, de PMS provenant de la lyse des cellules et d'EPS.

7.3 Aspects de diversité microbienne

Les modifications physico-chimiques d'un système se traduisent de façon générale par des changements de diversité de la communauté microbienne présente. La majorité des travaux effectués ont étudié les changements de diversité microbienne dus à la présence de contaminants. La biostimulation, par l'ajout de source de carbone et d'oxygène, a diminué la diversité génétique tandis que la diversité fonctionnelle a augmenté, en condition cuvée. Ces résultats ont suggéré une modification de structure de la communauté et une stimulation de bactéries oxydant un large spectre de sources de carbone. La présence de bactéries généralistes dans la biobarrière pourrait contribuer à une augmentation de la tolérance à la contamination organique présente dans l'eau souterraine.

Les UMB de l'eau souterraine ont été peu étudiées à ce jour. Une comparaison des UMB et des bactéries de taille «normale» a montré que l'eau souterraine comprenait une majorité d'UMB dont une faible proportion était hétérotrophe cultivable. Le séquençage de gènes 16S ARNr a permis d'identifier certaines bactéries se trouvant sous forme UMB et d'autres ayant formé la matrice de biofilm. La présence d'une large fraction d'UMB dans l'eau souterraine indique que des fractures de l'ordre du micron pourraient être colmatées.

Un aspect d'innocuité environnementale à considérer pour le concept des biobarrières est le risque de stimuler la croissance de bactéries potentiellement pathogènes. Parmi les bactéries identifiées, un seul genre bactérien potentiellement pathogène a été trouvé dans la communauté initiale de l'eau souterraine. Tandis que le séquençage de certaines bactéries du biofilm n'a pas permis d'affiliations avec des espèces bactériennes reconnues comme pathogènes.

L'approche multi-techniques a été pertinente pour l'observation des changements de diversité d'une microflore indigène suite à une biostimulation en condition cuvée. À l'échelle de terrain, l'approche devrait comprendre des techniques pour déceler la stimulation de bactéries potentiellement pathogènes, mesurer la fraction de cellules cultivables et non cultivables et évaluer la diversité génétique et fonctionnelle. Les changements de diversité génétique, hormis le séquençage des gènes 16S ARNr, pourraient se mesurer par le profil des acides gras bactériens. Le système de microplaques Biolog, utilisé pour observer les changements de diversité fonctionnelle, pourrait être complété en incorporant des sources de carbone spécifiques avec l'étude de terrain. À titre d'exemple, le potentiel d'oxydation des contaminants organiques présents dans la nappe aquifère pourrait être comparé. L'innocuité environnementale devra également être étudiée sous l'aspect des modifications à long terme de la biodiversité. En

effet, il importera de vérifier la persistance des changements de diversité suite au démantèlement de la biobarrière.

7.4 Aspects d'hydrogéologie

En condition dynamique, le biocolmatage avait été étudié principalement dans les milieux poreux. Suite à la biostimulation des micro-organismes indigènes de l'eau souterraine, le montage expérimental développé a permis de mesurer le colmatage d'un calcaire fracturé avec une sensibilité de l'ordre du cm min^{-1}. Une diminution de la conductivité hydraulique de 2 ordres de grandeur à l'intérieur d'un délai d'un mois a confirmé le potentiel de l'approche des biobarrières appliquées aux milieux géologiques fracturés.

Le montage expérimental possédait certaines caractéristiques se retrouvant *in situ* dont une alimentation en eau souterraine sous une charge constante, une vitesse d'eau souterraine comparable à celle des nappes aquifères de roc fracturé ainsi qu'un milieu naturel, le calcaire, permettant d'établir des équilibres minérales. Afin de valider le concept des biobarrières *in situ*, plusieurs autres facteurs hydrogéologiques devront être étudiés, à savoir: l'ouverture des fractures, la géométrie des fractures, la pression dans l'aquifère et la vitesse de l'eau souterraine.

À l'échelle terrain, une connaissance approfondie de l'hydrogéologie du site permettra d'établir le réseau de puits d'injection de nutriments et de puits de pompage. Des essais de traceur serviront à connaître la distribution des nutriments dans la nappe. À l'aide de tests de pompage, il sera possible de mesurer la conductivité hydraulique et la transmissivité de l'aquifère. Un essai de terrain informera sur le mouvement de la nappe aquifère suite au colmatage local et sur la nécessité d'une injection soutenue de nutriments. Les effets de l'arrêt de la biostimulation seront également mesurés quant à la conductivité hydraulique et la transmissivité de l'aquifère.

7.5 Aspects socio-politiques

Comparativement aux technologies de décontamination physico-chimiques et thermiques, les biotechnologies environnementales jouissent de la faveur des citoyens canadiens. Cet intérêt s'avère toutefois accompagné de craintes quant à l'injection de bactéries non-indigènes. Cette réalité, jumelée à certaines incertitudes scientifiques concernant le devenir des micro-organismes dans l'environnement, a incité Environnement Canada à amender la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement.*

Ainsi, la preuve de l'innocuité environnementale d'une biotechnologie comprenant une injection de micro-organismes doit être démontrée avant son application *in situ*. D'après le RRSN, le concept de développement d'une biobarrière suite à la biostimulation des micro-organismes indigènes est exempt de la nécessité de vérifier l'innocuité environnementale. Or, les travaux ont montré que l'activité de la microflore stimulée peut amener une réponse écotoxique chez certains organismes cibles. Ces résultats incitent à investiguer davantage sur la portée scientifique de la toxicité des PMS. De même, la recherche devra permettre de mettre en perspective les demandes de renseignements exigés en vertu du RRSN.

7.6 Projets de recherche découlant des travaux

Ce projet ouvre la voie au créneau du biocolmatage d'une nappe aquifère de roc fracturé pour le confinement d'une contamination. Les travaux ont donné suite à un projet de maîtrise qui sera réalisé à la Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites, du département de génie chimique de l'École Polytechnique de Montréal. Le projet portera sur la résistance du biofilm à différentes sources de contamination et sa persistance suite à l'arrêt de l'injection de nutriments, dans un milieu géologique fracturé.

Également, un essai à l'échelle de terrain se prépare, visant le biocolmatage d'une nappe aquifère de roc fracturé contaminée aux hydrocarbures. Cet essai sera réalisé par une équipe multidisciplinaire provenant de l'École Polytechnique de Montréal, de l'Université de Ste-Catharines et du National Water Research Institute, situé à Burlington, Ontario. Au cours de ce projet, une série de puits d'injection de nutriments seront installés pour favoriser la formation d'un biofilm dans les fractures. Parallèlement, des essais de traceur et des tests de pompage permettront de suivre le biocolmatage et de modéliser le mouvement de la nappe d'eau souterraine. Des échantillons d'eau souterraine seront également recueillis pour des analyses physico-chimiques, écotoxicologiques et microbiologiques, permettant d'approfondir les connaissances sur l'innocuité environnementale de la biostimulation.

RÉFÉRENCES

ABDEL-SALAM, A. ET CHRYSIKOPOULOS, C.V. (1995). Analysis of a model for contaminant transport in fractured media in the presence of colloids. Journal of Hydrology, 165 261-281.

ADDISON, J.A. ET HOLMES, S.B. (1995). Comparison of Forest Soil Microcosm and Acute Toxicity Studies for Determining Effects of Fenitrothion on Earthworms. Ecocoxicology and Environmental Safety, 30 127-133.

ADEMA, D.M.M. (1978). *Daphna Magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. Hydrobiologia, 59 (2), 125-134.

ALEXANDER, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. Academic Press, Inc., San Diego, 302.

AMADI, B. ET ILLANGASEKARE, T. (1994). A mathematical model for flow and solute transport in non-homogeneous rock fractures. Int. J. Rock Mech. Min. Sci. & Geomech. Abst., 31 (6), 719-731.

AMY, P.S., HALDEMAN, D.L., RINGELBERG, D., HALL, D.H. ET RUSSELL, C. (1992). Comparison of Identification Systems for Classification of Bacteria Isolated from Water and Endolithic Habitats within the Deep Surface. Applied and Environmental Microbiology, 58 (10), 3367-3373.

AMY, P.S. ET MORITA, R.Y. (1983). Starvation-Survival Patterns of Sixteen Freshly Isolated Open-Ocean Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 45 (3), 1109-1115.

APHA, AWWA et WEF (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater.

APPELO, C.A.J. ET POSTMA, D. (1993). Geochemistry, Groundwater and Pollution. A. A. Balkema, Brookfield, 536.

ARIAS, C.R., VERDONCK, L., SWINGS, J., AZNAR, R. ET GARAY, E. (1997). A polyphasic approach to study the intraspecific diversity amongst *Vibrio vulnificus* isolates. System. Appl. Microbiol., 20 622-633.

ASTM (1990). Standard test methods for sulfate reducing bacteria in water and water-formed deposits - D4412-84. 533-535.

ASTM (1990). Standard Test Method for pH of Water. 350-358.

ASTM (1993). Standard Practice for Oxidation-Reduction Potential of Water. 345-349.

ATLAS, R.M. ET BARTHA, R. (1987). Microbial ecology: fundamentals and application. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, 533.

BAATH, E., DIAZ-RAVINA, M., FROSTEGARD, A. ET CAMPBELL, C.D. (1998). Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Applied and Environmental Microbiology, 64 (1), 238-245.

BARBEAU, C.(1996). Bioaugmentation de sols contaminés au pentachlorophénol par la méthode des sols activés. Mémoire, École Polytechnique de Montréal, Montréal.

BARKER, D.J. ET STUCKEY, D.C. (1999). A review of soluble microbial products (SMP) in waste water treatment systems. Water Research, 33 (14), 3063-3082.

BARNTHOUSE, B.W., O'NEIL, V.O., BARTELL, S.M. ET SUTER II, G.W. (1986). Population and ecosystem theory in ecological risk assessment. Aquatic Toxicology and Environmental Fate, 9th, Poston, T.M. and Purdy, R., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 82-96.

BASKIR, C.I. ET HANSFORD, G.S. (1980). Product Formation in the Continuous Culture of Microbial Populations Grown on Carbohydrates. Biotechnology and Bioengineering, 22 1857-1875.

BASSAM, B.J., CAETANO-ANOLLÉS, G. ET GRESSHOFF, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 196 80-83.

BAVEYE, P., VANDEVIVERE, P., HOYLE, B.L., DELEO, P.C. ET SANCHEZ DE LOZADA, D. (1998). Environmental Impact and Mechanisms of the Biological Clogging of Saturated Soils and Aquifer Materials. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 28 (2), 123-191.

BECKER, K. (1996). Exopolysaccharide Production and Attachment Strength of Bacteria and Diatoms on Substrates with Different Surface Tensions. Microbial Ecology, 32 23-33.

BELL, R.A. ET SOMMERFELD, M.R. (1987). Algal biomass and primary production within a temperate zone sandstone. American Journal of Botany, 74 294-297.

BELLAMY, K.L., DE LINT, N., CULLIMORE, D.R. ET ABIOLA, A. (1993). In-situ Intercedent Biological Barriers for the Containment and Remediation of Contaminated Grounwater, Droycon Bioconcepts Inc. Regina.

BERGEY, D.H. (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Holt, J.G., 1599.

BIRD, R.B., STEWART, W.E. ET LIGHTFOOT, E.N. (1960). Transport Phenomena. John Wiley & Sons, New York, 780.

BISHOP, P.L. ET YU, T. (1999). A microelectrode study of redox potential change in biofilms. Water Science and Technology, 39 (7), 179-185.

BISHOP, P.L., ZHANG, T.C. ET FU, Y.-C. (1995). Effects of Biofilm Structure, Microbial Distributions and Mass Transport on Biodegradation Processes. Water Science and Technology, 31 (1), 143-152.

BLUM, D.J. ET SPEECE, R.E. (1991). A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. Research Journal WPCF, 63 (3), 198-207.

BORDEN, R.C., GOIN, R.T. ET KAO, C.-M. (1997). Control of BTEX migration using a biological enhanced permeable barrier. Groundwater Monitoring and Remediation, Winter 70-80.

BOSCARDIN, M.D. ET OSTENDORF, D.W. (1993). Chapter 19 - Barrier Walls to contain Contaminated Soils. Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils, Calabrese, E.J. and Kostecki, P.T., Lewis Publishers, Chelsea, 433-451.

BOSSIO, D. ET SCOW, K.M. (1995). Impact of Carbon and Flooding on the Metabolic Diversity of Microbial Communities in Soils. Applied and Environmental Microbiology, 61 (11), 4043-4050.

BOULOS, L., PRÉVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER, J. ET DESJARDINS, R. (1999). LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Microbiological Methods, 37 77-86.

BOXALL, A.B. ET MALTBY, L. (1995). The Characterization and Toxicity of Sediment Contaminated with Road Runoff. Water Research, 29 (9), 2043-2050.

BRAITHWAITE, C.J.R. ET GRIBBLE, C.D. (1998). Phosphatic Microbial Biofilms Cementing Gravels in a Vadose Environment. Journal of Coastal Research, 14 (4), 1425-1425.

BRENNER, D.J., MULLER, H.E., STEIGERWALT, A.G., WHITNEY, A.M., O'HARA, C.M. ET KAMPFER, P. (1998). Two new *Rahnella* genemospecies that cannot be phenotypically differentiated from *Rahnella aquatilis*. International Journal of Systematic Bacteriology, 48 141-149.

BROUGH, M.J., AL-TABBAA, A. ET MARTIN, R.J. (1997). Active Biofilm Barriers for Waste Containment and Bioremediation: Laboratory Assessment in Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. New Orleans, Louisiana, 233-238.

BRYAN, B.A., LINHARDT, R.J. ET DANIELS, L. (1986). Variation in Composition and Yield of Exopolysaccharides Produced by *Klebsiella* sp. Strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus*. Applied and Environmental Microbiology, 51 (6), 1304-1308.

BUREAU DE NORMALISATION DU QUÉBEC (1987). Eaux - détermination de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente *Vibrio fisheri*, BNQ.

CAIRNS, J.J., DICKSON, K.L. ET MAKI, A.W. (1978). Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life, American Standard Test Methods, Philadelphia.

CALLANDER, I.J. ET BARFORD, J.P. (1983). Precipitation, Chelation, and the Availibility of Metals as Nutrients in Anaerobic Digestion. I. Methodology. Biotechnology and Bioengineering, 25 1947-1957.

CAMPBELL, C.D., VAN GELDER, J., DAVIDSON, M.S. ET CAMERON, C.M. (1995). Use of Sole Carbon Source Utilization Patterns to Detect Changes in Soil Microbial Communities Affected by Cu, Ni and Zn in International Conference on Heavy Metals in the Environment. 447-450.

CANTER, L.W. ET KNOX, R.C. (1986). Groundwater Pollution Control. Lewis Publishers, Inc., Chelsea,

CARGILL, K.L., PYLE, B.H., SAUER, R.L. ET MCFETTERS, G.A. (1992). Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. Can. J. Microbiol., 38 423-429.

CCME (1996). Cadre pour l'évaluation du risque écotoxicologique, Conseil canadien des ministres en environnement.

CHAPELLE, F.H. (1992). Ground-water microbiology and geochemistry. John Wiley & Sons, New York, 424.

CHARACKLIS, W.G. (1973). Review Paper - Attached Microbial Growths - I. Attachement and Growth. Water Research, 7 1113-1127.

CHARACKLIS, W.G. (1981). Bioengineering Report Fouling Biofilm Development: A Process Analysis. Biotechnology and Bioengineering, 23 1923-1960.

CHARACKLIS, W.G. ET COOKSEY, K.E. (1983). Biofilms and Microbial Fouling. Advances in Applied Microbiology, 29 93-138.

CHARACKLIS, W.G. ET MARSHALL, K.C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, 796.

CHARACKLIS, W.G. ET WILDENER, P.A. (1989). Structure and Function of Biofilms. Bernhard, S., John Wiley & Sons, New York, 387.

CHEN, X. ET STEWART, P.S. (1996). Chlorine Penetration into Artificial Biofilm is Limited by a Reaction - Diffusion Interaction. Environmental Science and Technology, 30 (6), 2078-2083.

CHERNYSHEV, S.N. ET DEARMAN, W.R. (1990). Rock Fractures. Butterworth-Heinemann, London,

CHUDOBA, J. (1985). Inhibitory Effect of Refractory Organic Compounds Produced by Activated Sludge Micro-organisms on Microbial Activity and Flocculation. Water Research, 19 (2), 197-200.

CHUDOBA, J. (1985). Quantitative Estimation of COD Units in Refractory Organic Compounds Produced by Activated Sludge Microorganisms. Water Research, 19 (1), 37-43.

CLÉMENT, B. (1990). La qualité par la planification d'expérience (méthode Taguchi) in Congrès Association québécoise de la qualité. régionale de Québec, 17.

CLEMENT, T.P., PEYTON, B.M., SKEEN, R.S., JENNINGS, D.A. ET PETERSON, J.N. (1997). Microbial growth and transport in porous media under denitrification conditions: experiments and simulations. Journal of Contaminant Hydrology, 24 269-285.

COSTERTON, J.W. The Role of Bacterial Exopolysaccharides in Nature and Disease in Symposium: Extracellular Microbial Polysaccharides. 249-261.

CROZIER, R.H., AGAPOW, P.-M. ET PEDERSEN, K. (1999). Towards complete biodiversity assessment: an evaluation of the subterranean bacterial communities in the Oklo region of the sole surviving natural nuclear reactor. FEMS Microbiology Ecology, 28 325-334.

Cunningham, A.B., Characklis, W.G., Abedeen, F. et Crawford, D. (1991). Influence of Biofilm Accumulation on Porous Media Hydrodynamics. Environ. Sci. Technol., 25 (7), 1305-1311.

CUSACK, F., SINGH, S., MCCARTHY, C., GRIECO, J., DE ROCCO, M., NGYEN, D., LAPPIN-SCOTT, H. ET COSTERTON, J.W. (1992). Enhanced oil recovery - three-dimensional sandpack simulation of ultramicrobacteria resuscitation in reservoir formation. Journal of General Microbiology, 138 647-655.

CUSACK, F.M., SINGH, S., NOVOSAD, J., CHMILAR, M., BLENKINSOPP, S.A. ET COSTERTON, J.W. (1992). The Use of Ultramicrobacteria for Selective Plugging in Oil Recovery by Waterflooding in SPE Internaltional Meeting on Petroleum Engineering. Beijhing, China, 341-355.

DAIGGER, G.T. ET GRADY, C.P.L.J. (1977). A model for the Bio-Oxidation Process Based on Product Formation Concepts. Water Research, 11 1049-1057.

DAVEY, M.E., GEVERTZ, D., WOOD, W.A., CLARK, J.B. ET JENNEMAN, G.E. (1998). Microbial selective plugging of sandstone through simulation of indigenous bacteria in a hypersaline oil reservoir. Geomicrobiology, 15 335-352.

DE PHILIPPIS, R., SILI, C. ET VINCENZINI, M. (1996). Response of an exopolysaccharide-producing heterocystous cyanobacterium to changes in metabolic carbon flux. Journal of Applied Phycology, 8 275-281.

DE VUYST, L., LOO, J.V. ET VANDAMME, E.J. (1987). Two-step Fermentation Process for Improved Xanthan Production by *Xanthomonas Campestris* NRRL-B-1459. J. Chem. Tech. Biotechnol., 39 263-273.

DECAMP, O., RAJENDRAN, N., NAKANO, H. ET BALKRISH NAIR, G. (1997). Estimation of the viability of *Vibrio cholera* 0139 by assessing cell membrane integrity. Microbios, 92 83-89.

DELEO, P.C. ET BAVEYE, P. (1997). Factors affecting protozoan predation of bacteria clogging laboratory aquifer microcosms. Geomicrobiology Journal, 14 127-149.

DENNIS, M.L. ET TURNER, J.P. (1998). Hydraulic conductivity of compacted soil treated with biofilm. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, February 120-127.

DERRY, A.M., STADDON, W.J. ET TREVORS, J.T. (1998). Functional Diversity and Community Structure of Micro-organisms of Uncontaminated and Creosote-

Contaminated Soils as Determined by Sole-Carbon-Source-Utilization. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 14 571-578.

DLAMINI, A.M. ET PEIRIS, P.S. (1997). Production of exopolysaccharide by *Pseudomonas* sp. ATCC 31461 (*Pseudomonas eloda*) using whey as fermentation substrate. Applied Microbiology and Biotechnology, 47 52-57.

DOJKA, M.A., HUGENHOLTZ, P., HAACK, S.K. ET PACE, N.R. (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Applied and Environmental Microbiology, 64 (10), 3869-3877.

DOYLE, R.J. ET ROSENBERG, M. (1990). Microbial cell surface microbiology. American Society for Microbiology, washington, D.C.

DRISCOLL, F.G. (1989). Groundwater and Wells. Johnson Filtration Systems Inc., St.Paul, 1089.

DRONSFIELD, D.G. ET SILLIMAN, S.E. (1993). Velocity dependence of dispersion for transport through a single fracture of variable roughness. Water Resources Research, 29 (10), 3477-3483.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. ET SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, 28 (3), 350-353.

DUCROCQ, V., PANDARD, P., HALLIER-SOULIER, S., THYBAUD, E. ET TRUFFAUT, N. (1999). The use of Quantitative PCR, plant and earthworm bioassays, plating and chemical analysis to monitor 4-chlorobiphenyl biodegradation in soil microcaosms. Applied Soil Ecology, 12 15-27.

DUTKA, B.J. ET BITTON, G. (1986). Toxicity Testing Using Microorganisms. II, CRC Press, Inc., Boca Raton, 202.

EDGEHILL, R.U. (1996). Degradation of Pentachlorophenol (PCP) by *Arthrobacter* Strain ATCC 33790 in Biofilm Culture. Water Research, 30 (2), 357-363.

EL FANTROUSSI, S., VERSCHUERE, L., VERSTRAETE, W. ET TOP, E.M. (1999). Effect of phenyluera herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. Applied and Environmental Microbiology, 65 (3), 982-988.

ENVIRONMENT CANADA (1997). Règlement modifiant le règlement sur les rensignements concernant les substances nouvelles, Loi canadienne de protection sur l'environnement.

ENVIRONNEMENT CANADA (1992). Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*, Ottawa.

ENVIRONNEMENT CANADA (1997). Reglement modifiant le Reglement sur les renseignements concernant les substances nouvelles,

EPA (1984). Handbook Groundwater. EPA - 540 / 2- 84 - 001, Information, C.f.E.R., Cincinnati, OH.,

ESPOSITO, S.J. ET THOMSON, N.R. (1999). Two-phase flow and transport in a single fracture-porous medium system. Journal of Contaminant Hydrology, 37 319-341.

FELSENSTEIN, J. (1989). PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics, 5 164-166.

FERRIS, F.G. ET LOWSON, E.A. (1997). Ultrastructure and geochemistry of endolithic microorganisms in limestone of the Niagara Escarpment. Canadian Journal of Microbiology, 43 (3), 211-219.

FETTER, C.W. (1992). Contaminant Hydrogeology. Maxwell Macmillan Canada, Toronto, 458.

FIALHO, A.M., MARTINS, L.O., DONVAL, M.-L., LEITAO, J.H., RIDOUT, M.J., JAY, A.J., MORRIS, V.J. ET SA-CORREIA, I. (1999). Structure and proterties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. Applied and Environmental Microbiology, 65 (6), 2485-2491.

FLEMMING, H.-C. (1995). Sorption Sites in Biofilms. Water Science and Technology, 32 (8), 27-33.

FLOOD, J.A., ASHBOLT, N.J. ET POLLARD, P.C. (1999). Complementary independent molecular, radioisotopic and fluorogenic techniques to assess biofilm communities in two wastewater wetlands. Water Science and Technology, 39 (7), 65-70.

FORBES, V.E. ET FORBES, T.L. (1994). Ecotoxicology in Theory and Practice. Series, C.H.E., Chapman & Hall, London, 247.

FRANKENBERGER, W.T., TROEH, F.R. ET DUMENIL, L.C. (1979). Bacterial Effects on Hydraulic Conductivity of Soils. Soil Sci. Soc. Am., 43 333-338.

FRANKLIN, J.A. ET DUSSEAULT, M.B. Rock Engineering. McGraw Hill Publishing Company, New York,

FREEZE, R.A. ET CHERRY, J.A. (1979). Groundwater. Prentice - Hall, Inc., Englenwood Cliffs,

FULLER, M.E., SCOW, K.M., LAU, S. ET FERRIS, H. (1997). Trichloroethylene (TCE) and Toluene Effects on the Structure and Function of the Soil Community. Soil Biology and Biochemistry, 29 (1), 75-89.

GALLAGHER, E.M. (1998). Biological clogging of geocomposites exposed to raw landfill leachate over an extended period. Waste Manage Res., 16 (5), 421-429.

GANCEL, F. ET NOVEL, G. (1994). Exopolysaccharide Production by Streptococcus salivarius ssp. thermophilus Cultures. 1. Conditions of Production. Journal of Dairy Science, 77 685-688.

GARLAND, J.L. (1996). Anlalytical Approaches to the Characterizarion of Samples of Microbial Communities using Patterns of Potential C Sourcce Utilization. Soil Biology and Biochemistry, 28 (2), 213-221.

GARLAND, J.L. (1997). Mini Review - Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiology Ecology, 24 289-300.

GARLAND, J.L. ET MILLS, A.L. (1991). Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon -Source Utilization. Applied and Environmental Microbiology, 57 (8), 2351-2359.

GAVASKAR, A.R., GUPTA, N., SASS, B.M., JANOSY, R.J. ET O'SULLIVAN, D. (1998). Permeable Barriers for Groundwater Remediation - Design, Construction, and Monitoring. Battelle Press, Columbus, 176.

GIBBS, P.A. ET SEVIOUR, R.J. (1996). Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? Applied Microbiology and Biotechnology, 46 503-510.

GIFFORD, J.S., BUCKLAND, S.J., JUDD, M.C., MCFARLANE, P.N. ET ANDERSON, S.M. (1996). Pentachlorophenol (PCP), PCDD, PCDF and Pesticide Concentrations in a Freshwater Lake Catchment. Chemosphere, 32 (11), 2097-2113.

GILLAN, D.C. ET DE RIDDER, C. (1997). Morphology of a ferric iron-encrusted biofilm forming on the shell of a burrowing bivalve (Mollusca). Aquatic Microbial Ecology, 12 1-10.

GILLAN, D.C., SPEKSNIJDER, A.G.C.L., ZWART, G. ET DE RIDDER, C. (1998). Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 64 (9), 3464-3472.

GRADY, C.P.L. ET WILLIAMS, D.R. (1975). Effects of Influent Substrate Concentration on the Kinetics of Natural Microbial Populations in Continuous Culture. Water Research, 9 171-180.

GSELL, T.C., HOLBEN, W.E. ET VENTULLO, R.M. (1997). Characterization of the Sediment Bacterial Community in Groundwater Discharge Zones of an Alkaline Fen: a Seasonal Study. Applied and Environmental Microbiology, 63 (8), 3111-3118.

GU, B., PHELPS, T.J., LIANG, L., DICKEY, M.J., ROH, Y., KINSALL, B.L., PALUMBO, A.V. ET JACOBS, G.K. (1999). Biogeochemical dynamics in zero-valent iron columns: Implications for permeable reactive barriers. Environmental Science and Technology, 33 (13), 2170-2177.

GUTHRIE, F.E. ET PERRY, J.J. (1980). Introduction to Environmental Toxicology. Elsevier North Holland, Inc., New York, 484.

HAACK, S.K., GARCHOW, H., KLUG, M.J. ET FORNEY, L.J. (1995). Analysis of Factors Affecting the Accuracy, Reproducibility, and Interpretation of Microbial Community Carbon Source Utilization Patems. Applied and Environmental Microbiology, 61 (4), 1458-1468.

HACKING, A.J., TAYLOR, I.W.F., JARMAN, T.R. ET GOVAN, J.R.W. (1983). Alginate Biosynthesis by *Pseudomonas mendocina*. Journal of General Microbiology, 129 3473-3480.

HAKAMI, E. ET LARSSON, E. (1996). Aperture measurements and flow experiments on a single natural fracture. Int. J. Rock Mech. Min. Sci. & Geomech. Abstr., 33 (4), 395-404.

HARDER, J. ET PROBIAN, C. (1997). Anaerobic mineralisation of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. Arch. Microbiol., 167 269-274.

HARDISTY, P.E., ROSS, S.D. ET JOHNSON, P.M. (1994). Characterization of LNAPL in Fractured Sedimentary Rock: Techniques, Behavior and Implications for Remediation in 4e Symposium annuel sur la restauration des eaux souterraines et des sols contaminés. Calgary, Alberta, 185-200.

HARVEY, R.W., KINNER, N.E., BUNN, A., MACDONALD, D. ET METGE, D. (1995). Transport Behavior of Groundwater Protozoa and Protozoan-Sized Microspheres in Sandy Aquifer Sediments. Applied and Environmental Journal, 61 (1), 209-217.

HAYATDAVOUDI, A. ET GHALAMBOR, A. (1996). A study of formation damage of selective clay and other minerals caused by bacterial plugging. SPE Drilling & Completion, September 160-167.

HEAD, I.M., SAUNDERS, J.R. ET PICKUP, R.W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbial Ecology, 35 1-21.

HELMA, C., MERSCH-SUNDERMANN, V., HOUK, V.S., GLASBRENNER, U., KLEIN, C., WENQUING, L., KASSIE, F., SCHUTLE-HERMANN, R. ET KNASMULLER, S. (1996). Comparative Evaluation of Four Bacterial Assays for the Detection of Genotoxic Effects in the Dissolved Water Phases of Aqueous Matrices. Environmental Science and Technology, 30 (3), 897-907.

HOLMQUIST, L. ET KJELLEBERG, S. (1993). Changes in Viability, Respiratory Activity and Morphology of the Marine *Vibrio* sp. Strain S14 during Starvation of

Individual Nutrients and Subsequent Recovery. FEMS Microbiology Ecology, 12 215-224.

HONIG, P. (1953).

HOROWITZ, A., KRICHEVSKY, M.I. ET ATLAS, R.M. (1983). Characteristics and Diversity of Subartic Marine Oligotrophic, Stenoheterotrophic, and Euryheterotrophic Bacterial Populations. Canadian Journal of Microbiology, 29 527-535.

HOWARD, P.J.A. (1997). Analysis of data from Biolog plates: comments on the method of Garland and Mills. Soil Biology and Biochemistry, 29 (11/12), 1755-1757.

HUANG, J. ET PINDER, K.L. (1994). Effects of Calcium on Development of Anaerobic Acidogenic Biofilms. Biotechnology and Bioengineering, 45 212-218.

HUBERT, C., SHEN, Y. ET VOORDOUW, G. (1999). Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. Applied and Environmental Microbiology, 65 (7), 3064-3070.

HURST, C.J. (1991). Modeling the environmental fate of microorganisms. American Society for Microbiology, Washington, 292.

HURST, C.J., KNUDSEN, G.R., MCINERNEY, M.J., STETZENBACH, L.D. ET WALTER, M.V. (1997). Manual of environmental micrbiology. American Society for Microbiology, Massachusetts, 894.

IIZUKA, T., YAMANAKA, S., NISHIYAMA, T. ET HIRAISHI, A. (1998). Isolation and Phylogenetic Analysis of Aerobic Copiotrophic Ultramicrobacteria from Urban Soil. Journal of General and Applied Microbiology, 44 75-84.

INSAM, H., AMOR, K., RENNER, M. ET CREPAZ, C. (1996). Changes in functional abilities of the microbial community during composting manure. Microbial Ecology, 31 77-87.

JACOBS, P.H. ET FÖRSTNER, U. (1999). Concept of subaqueous capping of contaminated sediments with active barrier system (ABS) using natural and modified zeolites. Water Research, 33 (9), 2083-2087.

JANSSEN, P.H., SCHUHMANN, A., BAK, F. ET LIESAK, W. (1996). Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* ge. nov. sp. nov. Arch. Microbiol., 166 184-192.

JANSSEN, P.H., SCHUHMANN, A., MORSCHEL, E. ET RAINEY, F.A. (1997). Novel Aerobic Ultramicrobateria Belonging to the Verrucomicrobiales Lineage of Bacterial Descent Isolated by Dilution Culture from Anoxic Rice Paddy Soil. Applied and Environmental Microbiology, 63 (4), 1382-1388.

JENNINGS, D.A., PETERSEN, J.N., SKEEN, R.S., HOOKER, B.S., PEYTON, B.M., JOHNSTONE, D.L. ET YONGE, D.R. (1995). Effects of slight variations in nutrients loadings on pore plugging in soil columns. Applied Biochemistry and Biotechnology, 51-52 727-734.

JOHNSTON, C.D., RAYNER, J.L., DE ZOYSA, D.S., RAGUSA, S.R., TREFRY, M.G. ET DAVIS, G.B. (1997). Studies of Bioclogging for Containment and Remediation of Organic Contaminants in Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. New Orleans, Louisiana, 241-245.

JOHNSTON, C.D., TREFRY, M.G., RAYNER, J.L., RAGUSA, S.R., DE ZOYSA, D.S. ET DAVIS, G.B. (1999). In situ bioclogging for the confinement and remediation of groundwater hydrocarbon plumes in 1999 Contaminated Site Remediation Conference. Fremantle, Western Australia, 649-651.

KEDDY, C.J., GREENE, J.C. ET BONNELL, M.A. (1995). Review of Whole-Organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada. Ecotoxicology and Environmental Safety, 30 221-251.

KEMP, P.F., SHERR, B.F., SHERR, E.B. ET COLE, J.J. (1993). Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers, Boca raton, 777.

KETCHESON, D.R. ET ZWIERS, W.G. (1997). Evaluation of in-situ restoration technologies for a DNAP impacted fractured carbonate rock site at Smithville, Ontario in Air and Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition. Toronto, Ontario, Canada,

KIMURA, M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16 111-120.

KNOKE, K.L., MARWOOD, T.M., CASSIDY, M.B., LIU, D., SEECH, A.G., LEE, H. ET TREVORS, J.T. (1999). A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil. Water, Air, and Soil Pollution, 110 157-169.

KONOPKA, A., OLIVER, L. ET TURCO, R.F.J. (1998). The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. Microbial Ecology, 35 103-115.

KORBER, D.R., CHOI, A., WOLFAARDT, G.M., INGHAM, S.C. ET CALDWELL, D.E. (1997). Substratum Topography Influences Susceptibility of *Salmonella enteriditis* Biofilms to Trisodium Phosphate. Applied and Environmental Microbiology, 63 (9), 3352-3358.

KUO, W.C., SNEVE, M.A. ET PARKIN, G.F. (1996). Formation of Soluble Microbial Products During Anaerobic Treatment. Water Environment Research, 68 (3), 279-285.

LANDIS, W.G. ET YU, M.-H. (1995). Introduction to Environmental Toxicology. Lewis Publishers, 328.

LAU, Y.L. ET LIU, D. (1993). Effect of Flow Rate on Biofilm Accumulation in Open Channels. Water Research, 27 (3), 355-360.

LEBARON, P., GHIGLIONE, J.-F., FAJON, C., BATAILLER, N. ET NORMAND, P. (1998). Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. FEMS Microbiology Ecology, 160 137-143.

LEE, D.H., ZO, Y.G. ET KIM, S.J. (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation-polymorphism. Applied and Environmental Microbiology, 62 3112-3120.

LEE, W. ET CHARACKLIS, W.G. (1993). Corrosion of Mild Steel Under Anaerobic Biofilm. Corrosion, 49 (3), 186-199.

LEHMAN, R.M., COLWELL, F.S., RINGELBERG, D.B. ET WHITE, D.C. (1995). Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. Journal of Microbiological Methods, 22 263-281.

LEIGH, J.A. ET L., C.D. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. Annual Review in Microbiology, 12 (2), 67-70.

LEWANDOWSKI, Z., WALSER, G. ET CHARACKLIS, W.G. (1991). Reaction Kinetics in Biofilm. Biotechnology and Bioengineering, 38 877-882.

LINDENBACH, S.K. ET CULLIMORE, D.R. (1989). Preliminary *in vitro* observations on the bacteriology of the black plug layer phenomenon associated with the biofouling of golf greens. Journal of Applied Bacteriology, 67 11-17.

LINTON, J.D., EVANS, M., JONES, D.S. ET GOULDNEY, D.N. (1987). Exocellular Succinoglucan Production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883. Journal of General Microbiology, 133 2961-2969.

LINTON, J.D., JONES, D.S. ET WOODARD, S. (1987). Factors that Control the Rate of Exopolysaccharide Production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883. Journal of General Microbiology, 133 2979-2987.

LUDENSKY, M.L. (1998). An automated system for biocide testing on biofilms. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 20 109-115.

MACNAUGHTON, S.J., STEPHEN, J.R., VENOSA, A.D., DAVIS, G.A., CHANG, Y.-J. ET WHITE, D., C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied and Environmental Microbiology, 65 (8), 3566-3574.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. ET PARKER, J. (1999). Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River,

MÄKELÄ, T.P. ET OIKARI, A.O.J. (1995). Pentachlorophenol accumulation in fresh water mussels *Anodonta anatina* and *Pseudanodonta complanata* and some physiological consequences of laboratory maintenance. Chemosphere, 31 (7), 3651-3662.

MANZ, W., AMMAN, R., VANCANNEYT, M. ET SCHLEIFER, K.-H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the naural environment. Microbiology, 142 1097-1106.

MANZ, W., WENDT-POTTHOFF, K., NEU, T.R., SZEWZYK, U. ET LAWRENCE, J.R. (1999). Phylogenetic composition, spatial strcuture, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. Microbial Ecology, 37 225-237.

MARILLEY, L., VOGT, G., BLANC, M. ET ARAGNO, M. (1998). Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis. Plant and Soil, 198 219-224.

MARSHALL, B.J. ET OHYE, D.F. (1966). *Bacillus macquariensis* n.sp., a psychrotrophic bacterium from sub-antarctic soil. Journal of General Microbiology, 44 41-46.

MARSHALL, K.C. (1982). Advances in Microbial Ecology. 6, Plenum Press.

MARSHALL, K.C. (1984). Advances in Microbial Ecology. 7, Plenum Press, 223.

MARTINEAU, G.(1999). Développement et caractérisation d'un biofiltre pilote pour le traitement des eaxu souterraines contaminées par les BTEX. Mémoire, École Polytechnique de Montréal, Montréal.

MARTINO, D.P., GROSSMAN, E.L., ULRICH, G.A., BURGER, K.C., SCHLICHENMEYER, J.L., SUFLITA, J.M. ET AMMERMAN, J.W. (1998). Microbial abundance and activity in a low-conductivity aquifer system in East-Central Texas. Microbial Ecology, 35 224-234.

MASSOL-DEYA, A., WELLER, R., RIOS-HERNANDEZ, L., ZHOU, J.-Z., HICKEY, R.F. ET TIEDJE, J.M. (1997). Succession and Convergence of Biofilm Communities in Fixed-Film Reactors Treating Aromatic Hydrocarbons in Groundwater. Applied and Envirinmental Microbiology, 63 (1), 270-276.

MATHIEU, L., PAQUIN, J.L., BLOCK, J.C., RANDON, G., MAILLARD, J. ET REASONER, D. (1992). Parametres gouvernant la prolifération bacterienne dans les réseaux de distribution. Revue des sciences de l'eau, 5 91-112.

MATTHESS, G. ET HARVEY, J.C. (1982). The Properties of Groundwater. John Wiley & Sons, New York, 406.

MAWDSLEY, J.L. ET BURNS, R.G. (1994). Inoculation of plants with a *Flavobacterium* species results in altered rhizosphere enzyme activities. Soil Biology and Biochemistry, 26 871-882.

MAZOR, G., KIDRON, G.J., VONSHAK, A. ET ABELOVICH, A. (1996). The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. FEMS Microbiology Ecology, 21 121-130.

MCCABE, N. ET LAURENT, T.C. (1975). Biochem. Biophys. Acta, 399 131.

MCGREGOR, R., BLOWES, D., LUDWIG, R., PRINGLE, E. ET POMEROY, M. (1999). Remediation of heavy metal plume using a reactive wall in In Situ and On-Site Bioremediation - The Fifth International Symposium. San Diego, California, 19-24.

MIAN, F.A., JARMAN, T.R. ET RIGHELATO, R.C. (1978). Biosynthesis of Exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 134 (2), 418-422.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE (1994). Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales - Cahier 3: Échantillonnage des eaux souterraines, Les éditions le Griffon d'argile. Sainte-Foy.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE (1996). La problématique des eaux souterraines au Québec - projet, Québec.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE (1996). Procédure d'évaluation du risque écotoxicologique applicable dans le cadre de la politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés (PÉRÉ), Écotoxicologie et développement, Direction des laboratoires. Québec.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE (1996). Projet de politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés - Document de consultation, Service des lieux contaminés, Direction des Politiques du secteur industriel. Québec.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE (1996). Stratégie québécoise sur la diversité biologique.

MORIN, A., MORESOLI, C., RODRIGUE, N., DUMONT, J., RACINE, M. ET POITRAS, E. (1993). Effect of carbon, nitrogen, and agitation on exopolysaccharide production by *Enterobacter agglomerans* grown on low-grade maple sap. Enzyme Microb. Technol., 15 (June), 500-507.

MUELLER, R.F., CHARACKLIS, W.G., JONES, W.L. ET SEARS, J.T. (1992). Characterization of Initial Events in Bacterial Surface Colonization by Two *Pseudomonas* Species Using Image Analysis. Biotechnology and Bioengineering, 39 1161-1170.

NEEF, A., ZAGLAUER, A., MEIER, H., AMANN, R., LEMMER, H. ET SCHEIFER, K.-H. (1996). Population Analysis in a Denitrifying Sand Filter: Conventional and In Situ identification of *Paracoccus* spp. in Methanol-Fed Biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 62 (12), 4329-4339.

NELSON, Y.M., LION, L.W., SHULER, M.L. ET GHIORSE, W.C. (1996). Modeling Oligotrophic Biofilm Formation and Lead Adsorption to Biofilm Component. Environment Science and Technology, 30 (6), 2027-2035.

NERETNIEKS, I., ERIKSEN, T. ET TÄHTINEN, P. (1982). Tracer movement in a single fissure in granite rock: some experimental results and their interpretation. Water Research Research, 18 (4), 849-858.

NICOLELLA, C., CHIARLE, S., DI FELICE, R. ET ROVATTI, M. (1997). Mechanisms of biofilm detachment in fluidized bed reactors. Water Science and Technology, 36 (1), 229-235.

NOGUERA, D.R., ARAKI, N. ET RITTMANN, B.E. (1994). Soluble Microbial Products (SMP) in Anaerobic Chemostats. Biotechnology and Bioengineering, 44 (9), 1040-1047.

NOGUERA, D.R., PIZARRO, G., STAHL, D.A. ET RITTMANN, B.E. (1999). Simulation of multispecies biofilm development in three dimensions. Water Science and Technology, 39 (7), 123-130.

NOVITSKY, J.A. ET MORITA, R.Y. (1976). Morphological Characterizatrion of Small Cells Resulting from Nutrient Starvation of a Psychrophilic Marine Vibrio. Applied and Environmental Microbiology, 32 (4), 617-622.

OGUNSEITAN, O.A. (1996). Protein Profile Variation in Cultivated and Native Freshwater Microorganisms Exposed to Chemical Environmental Pollutants. Microbial Ecology, 31 291-304.

OHASHI, A., DE SYLVA, D.G.V., MOBARRY, B., MANEM, J.A., STAHL, D.A. ET RITTMANN, B.E. (1995). Influence of Substrate C/N Ratio on the Structure of Multi-species Biofilms Consisting of Nitrifiers and Heterotrophs. Water Science and Technology, 32 (8), 75-84.

OKABE, S., HIRATA, K. ET WATANABE, Y. (1995). Dynamic Changes in Spatial Microbial Distribution in Mixed-population Biofilms: Experimental Results and Model Simulation. Water Science and Technology, 32 (8), 67-74.

OKUBO, T. ET MATSUMOTO, J. (1983). Biological Clogging of Sand and Changes of Organic Constituents During Artificial Recharge. Water Research, 17 (7), 813-821.

PAKSY, A., POWRIE, W., ROBINSON, J.P. ET PEELING, L. (1998). A laboratory investigation of anaerobic microbial clogging in granular landfill drainage media. Géotechnique, 48 (3), 389-401.

PALMER, C.M. (1992). Principles of contaminant hydrogeology. Lewis Publishing, Inc., Chelsea, 211.

PANKOW, J.F., JOHNSON, R.L. ET CHERRY, J.A. (1992). Air sparging in gate wells within cutoff walls and in trenches for the control of plumes of volatile organic compounds. Ground Water, 31 (4), 654-663.

PANNETON, C., RAMSAY, J., BERTRAND, J.-L., MAYER, R. ET CHAVARIE, C. (1995). Biodegradation Potential of a Pentachlorophenol-Degrading Microbial Consortium in Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium. San Diego, California, 205-211.

PEACE, J., DANIEL, D., NIRMALAKHANDAN, N. ET EGEMEN, E. (1997). Predicting Microbial Toxicity of Nonuniform Multicomponent Mixtures of Organis Chemicals. Journal of Environmetal Engineering, 123 (4), 329-334.

PEDERSON, K., HOLMSTRÖM, C., OLSSON, A.-K. ET PEDERSON, A. (1986). Statistic evaluation of the influence of species variation, culture conditions, surface wettability and fluid shear on attachment and biofilm development of marine bacteria. Arch microbio, 145 1-8.

PERCIVAL, S.L., KNAPP, J.S., WALES, D.S. ET EDYVEAN, R.G.J. (1999). The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 22 152-159.

PEYTON, B.M. ET CHARACKLIS, W.G. (1993). A Statistical Analysis of the Effect of Substrate Utilization and Shear Stress on the Kinetics of Biofilm Detachment. Biotechnology and Bioengineering, 41 728-735.

PITTER, P. ET CHUDOBA, J. (1990). Biodegradability of Organic Substances in the Aquatic Environment. CRC Press, Inc., Boca Raton, 305.

POWER, M., VAN DER MEER, J.R., TCHELET, R., EGLI, T. ET EGGEN, R. (1998). Molecular-based methods can contribute to assessment of toxicological risks and bioremediation strategies. Journal of Microbiological Methods, 32 107-119.

POWER, M.E., ARAUJO, J.C., VAN DER MEER, J.R., HARMS, H. ET WANNER, O. (1999). Monitoring sulfate-reducing bacteria in heterotrophic biofilms. Water Science and Technology, 39 (7), 49-56.

PRESCOTT, HARLEY ET KLEIN (1995). Microbiologie. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles, 1014.

QUILLARDET, P., DE BELLECOMBE, C. ET HOFNUNG, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. Mutation Research, 147 79-85.

RALPH, D.E. ET STEVENSON, J.M. (1995). The role of bacteria in well clogging. Water Research, 29 (1), 365-369.

RAMSAY, J.A., COOPER, D.G. ET NEUFELD, R.J. (1989). Effects of Oil Reservoir Conditions on the Production of Water-Insoluble Levan by *Bacillus lichenformis*. Geomicrobiology Journal, 7 155-165.

RAO, K.R. (1978). Pentachlorophenol - Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology. 12, Plenum Press, New York, 402.

REAKA-KUDLA, M.L., WILSON, D.E. ET WILSON, E.O. (1997). Biodiversity II - Understanding and protecting our biological resources. Joseph Henry Press, Washington, D.C., 551.

RENOUX, A.Y.(1996). Évaluation de bioprocédés d'assainissement en phase solide/liquide par l'utilisation de biotests écotoxicologiques. Institut national de la recherche scientifique (INRS-Eau), Sainte-Foy.

REYNOLDS, C.M., PIDGEON, C.S., PERRY, L.B., KOENEN, B.A., PELTON, D.K., NICHOLS, H.L. ET WOLF, D.C. (1999). Using microbial community structure changes to evaluate phytoremediation in In Situ and On-Site Bioremediation - The Fifth International Symposium. San Diego, California, 33-38.

RHEINHEIMER, G. (1991). Aquatic microbiology. John Wiley and Sons, Inc., Toronto, 363.

RICE, E.W., RODGERS, M.R., WESLEY, I.V., JOHNSON, C.H. ET TANNER, S.A. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. Letters in Applied Microbiology, 28 (1), 31-35.

RIJNAARTS, H.H.M., NORDE, W., BOUWER, E.J., LYKLEMA, J. ET ZEHNDER, A.J.B. (1996). Bacterial Deposition in Porous Media: Effects of Cell-Coating, Substratum Hydrophobicity, and Electrolyte Concentration. Environmental Science and Technology, 30 2877-2883.

RITTMANN, B.E. ET MANEN, J.A. (1992). Development and Experimental Evaluation of a Steady-State, Multispecies Biofilms Model. Biotechnology and Bioengineering, 39 914-922.

ROBERTS, C.M., FETT, W.F., OSMAN, S.F., WIJEY, C., O'CONNOR, J.V. ET HOOVER, D.G. (1995). Exopolyssacharide Production by *Bifidobacterium longum* BB-79. Journal of Applied Bacteriology, 78 463-468.

RODGERS, D.W., SCHRODER, J. ET VEREECKEN SHEEHAN, L. (1996). Comparison of *Daphnia magna*, Rainbow Trout and Bacterial-based Toxicity Tests of Ontario Hydro Aquatic Effluents. Water, Air, and Soil Pollution, 90 105-112.

ROSADO, A.S., DUARTE, G.F., SELDIN, L. ET VAN ELSAS, J.D. (1998). Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in *Paenibacillus azotofixans* Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments. Applied and Environmental Microbiology, 64 (8), 2770-2779.

ROSS, N., DESCHENES, L., BUREAU, J., CLÉMENT, B., COMEAU, Y. ET SAMSON, R. (1998). Ecotoxicological Assessment and Effects of Physicochemical

Factors on Biofilm Development in Groundwater Conditions. Environmental Science and Technology, 32 (8), 1105-1111.

ROSS, N., VILLEMUR, R., MARCANDELLA, É. ET DESCHÊNES, L. (1999). Ultramicrobacteria isolated from groundwater and stimulated to form a biofilm: Assessment of changes in the biodiversity by combining genetic and functional methods. Soumis à Applied and Environmental Microbiology, Juillet 1998.,

ROSSELLO-MORA, R.A., WAGNER, M., AMANN, R. ET SCHLEIFER, K.H. (1995). The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants. Applied and Environmental Microbiology, 61 702-707.

ROSZAK, D.B. ET COLWELL, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiological Reviews, 51 (3), 365-379.

ROUXHET, P.G. ET MOZES, N. (1990). Physical Chemistry of the Interface between Attached Micro-organisms and their Support. Water Science and Technology, 22 (1/2), 1-16.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. ET MANIATIS, T. (1989). Molecular Biology, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor,

SANCHEZ DE LOZADA, D., VANDEVIVERE, P., BAVEYE, P. ET ZINDER, S. (1994). Decrease of the hydraulic conductivity of sand columns by *Methanosarcina barkeri*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 10 325-333.

SANDAA, R.-A., ENGER, O. ET TORSVIK, V. (1999). Abundance and diversity of *Archaea* in heavy-metal-contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology, 65 (8), 3293-3297.

SANGER, F., NICKLEN, S. ET COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibotors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 1408-1412.

SANTINI, K.(1998). Évaluation du danger écotoxicologique associé à l'utilisation du champignon *Phanerochaete chrysosporium* pour la biorestauration des sols contaminés aux HAP. Mémoire, École Polytechnique de Montréal, Montréal.

SCHIENER, P., NACHAIYASIT, S. ET STUCKEY, D.C. (1998). Production of soluble microbial products (SMP) in an anaerobic baffled reactor: composition, biodegradability, and the effect of process parameters. Environmental Technology, 19 391-400.

SCHLIMME, W., MARCHIANI, M., HANSELMANN, K. ET JENNI, B. (1999). BACTOX, a rapid bioassay that uses protozoa to assess the toxicity of bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 65 (6), 2754-2757.

SCHMIDT, L.M., DELFINO, J.J., PRESTON III, J.F. ET ST-LAURENT III, G. (1999). Biodegradation of low aqueous concentration pentachlorophenol (PCP) contaminated groundwater. Chemosphere, 38 (12), 2897-2912.

SCHMITT, J. ET FLEMMING, H.-C. (1999). Water binding in biofilms. Water Science and Technology, 39 (7), 77-82.

SCHULTZ, M.P. ET SWAIN, G.W. (1999). The effect of biofilms on turbulent boundary layers. Journal of Fluids Enginerring, 121 44-51.

SCHUT, F., GOTTSCHAL, J.C. ET PRINS, R.A. (1997). Isolation and Characterization of the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. FEMS Microbiology Reviews, 20 363-369.

SEYMOUR, D.T., VERBEEK, A.G., HRUDEY, S.E. ET FEDORAK, P.M. (1997). Acute Toxicity and Aqueous Solubility of Some Condensed Thiophenes and their Microbial Metabolites. Environmental Toxicology and Chemistry, 16 (4), 658-665.

SHARP, R.R., CUNNINGHAM, A.B., KOMLOS, J. ET BILLMAYER, J. (1999). Observation of thick biofilm accumulation and structure in porous media and

corresponding hydrodynamic and mass transfert effects. Water Science and Technology, 39 (7), 195-201.

SHARP, R.R., GERLACH, R. ET CUNNINGHAM, A. (1999). Bacterial Transport Issues Related to Subsurface Biobarriers in In Situ and On-Site Bioremediation The Fifth International Symposium. San Diego, California,

SHAW, J.C., BRAMHILL, B., WARDLAW, N.C. ET COSTERTON, J.W. (1985). Bacterial Fouling in a model core system. Applied and Environmental Microbiology, 49 (3), 693-701.

SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., NAKAMURA, L.K. ET KOMAGATA, K. (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus, Bacillus chondroitinus, Bacillus curdlanolyticus, Bacillus glucanolyticus, Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 47 289-298.

SICILIANO, S.D. ET GERMIDA, J.J. (1998). Biolog Analysis and Fatty Acid Methyl Ester Profiles Indicate that Pseudomonad Inoculants that Promote Phytoremediation Alter the Root-Associated Microbial Community of *Bromus Biebersteinii*. Soil Biology and Biochemistry, 30 (13), 1717-1723.

SIXT, S., ALTSCHUH, J. ET BRÜGGEMANN, R. (1995). Quantitative structure-toxicity relationships for 80 chlorinated compounds using quantum chemical descriptors. Chemosphere, 30 (12), 2397-2414.

SLOTERDIJK, H., CHAMPOUX, L., JARRY, V., COUILLARD, Y. ET ROSS, P. (1989). Bioassay responses of micro-organisms to sediment elutriates from the St. Lawrence River (Lake St. Louis). Hydrobiologia, 188/189 317-335.

SMALLA, K., WACHTENDORF, U., HEUER, H., LIU, W.-T. ET FORNEY, L. (1998). Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 64 (4),

SNAIR, J., AMANN, R., HUBER, I., W., L. ET SCHLEIFER, K.H. (1997). Phylogenic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. Applied and Environmental Microbiology, 63 2884-2896.

STARR, R.C. ET CHERRY, J.A. (1994). In Situ Remediation of Contaminated Ground Water: The Funnel-and-Gate System. Ground Water, 32 (3), 465-476.

STENSTROM, T.A. (1989). Bacterial hydrophobocity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particle. Applied and Environmental Microbiology, 55 142-147.

STOCKER, J.G. (1968). The Ecology of a Diatom Community in a Thermal Stream. British Phycology Bulletin, 3 501-514.

STOTZKY, G., BRODER, M.W. ET DOYLE, J.D. (1993). Selected methods for the detection and assessment of ecological effects resulting from the release of genetically engineered micro-organisms to the terrestrial environment. Advances in Applied Mivrobiology, 38, Neidleman, S.L. and Laskin, A.I., Academic Press, New York, 1-98.

TALPSEP, E., HEINARU, E., TRUU, J., LAHT, T., HEINARU, A., WAND, H. ET STOTTMEISTER, U. (1997). Functional dynamics of microbial populations in waters contaminated with phenolic leachate. Oil Shale, 14 (4), 435-453.

TASHIRO, H., NUMAKURA, T., NISHIKAWA, S. ET MIYAJI, Y. (1991). Penetration of Biocides into Biofilm. Water Science and Technology, 23 1395-1403.

THELLEN, C., CHASSÉ, R. ET MARTEL, L. (1995). Écotoxicologie: de la mesure à l'évaluation in 20e Congrès de l'association des biologistes du Québec. Québec, Canada,

TODD, D.K. (1980). Groundwater Hydrology. John Wiley & Sons, New York, 535.

TRAUNSPURGER, W. ET DREWS, C. (1996). Toxicity Analysis of Freshwater and Marine Sediments with Meio- and Macrobenthic Organisms: a Review. Hydrobiologia, 328 215-261.

TREFRY, M.G., RAYNER, J.L. ET JOHNSTON, C.D. (1998). Hydrological measured of success for a pilot bioclogging study at Largs Noth, South Australia, Centre for Groundwater Studies.

TRULEAR, M.G. ET CHARACKLIS, W.G. (1982). Dynamics of biofilm process. Journal WPCF, 54 (9), 1288-1301.

TUNLID, A. (1999). Molecular biology: a linkage between microbial ecology, general ecology and organismal biology. Oikos, 85 177-189.

TURNER, J.P. (1995). Biofilm Barriers: A New Concept for Waste Management in Proceedings of the National Conference on Innovative Technologies on Site Remediation and Hazard Waste Management. 101-109.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997). Point to consider in the preparation of TSCA biotechnology submissions for microorganisms, Office of Pollution Prevention and Toxics. Washington, D.C.

USEPA (1992). Framework for Ecological Risk Assessment,

VAN DER WENDE, E., CHARACKLIS, W.G. ET SMITH, D.B. (1989). Biofilms and Bacterial Drinking Water Quality. Water Research, 23 (10), 1313-1322.

VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.F., ROSADO, A.S. ET SMALLA, K. (1998). Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. Journal of Microbiological Methods, 32 133-154.

VANDAMME, E.J. ET SOETAERT, W. (1995). Biotechnical modification of carbohydrates. FEMS Microbiology Reviews, 16 163-186.

VANDEMARK, P.J. ET BATZING, B.L. (1987). The Microbes - An Introduction to their Nature and Importance. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 991.

VANDEVIVERE, P. ET BAVEYE, P. (1992). Effect of Bacterial Extracellular Polymers on the Saturated Hydraulic Conductivity of Sand Columns. Applied and Environmental Microbiology, 58 (5), 1690-1698.

VANDEVIVERE, P. ET BAVEYE, P. (1992). Relationship between Transport of Bacteria and Their Clogging Efficiency in Sand Columns. Applied and Environmental Microbiology, 58 (8), 2523-2530.

VANDEVIVERE, P. ET BAVEYE, P. (1992). Saturated Hydraulic Conductivity Reduction Caused by Aerobic Bacteria in Sand Columns. Soil Science Society of America Journal, 56 (1), 1-13.

VANDEVIVERE, P., BAVEYE, P. ET SANCHEZ DE LOZADA, D. (1995). Microbial clogging of saturated soils and aquifer material: Evaluation of mathematical models. Water Resources Research, 31 (9), 2173-2180.

VERSCHUERE, L., FIEVEZ, V., VAN VOOREN, L. ET VERSTRAETE, W. (1997). The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities. FEMS Microbiology Ecology, 24 353-362.

VOLMER, J., KÖRDEL, W. ET KLEIN, W. (1988). A concept for environmental risk assessment of new chemicals in Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen, Danemark, 411-416.

WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. ET PEAKALL, D.B. (1996). Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis Inc., Bristol, 321.

WANNER, O., CUNNINGHAM, A.B. ET LUNDMAN, R. (1995). Modeling Biofilm Accumulation and Mass Transport in a Porous Media Under High Substrate Loading. Biotechnology and Bioengineering, 47 703-712.

WHITE, D., C., FLEMMING, C.A., LEUNG, K.T. ET MACNAUGHTON, S.J. (1998). In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. Journal of Microbiological Methods, 32 93-105.

WHITE, M.L. ET DORION, G.H. (1961). Journal of Polymer Science, 55 731.

WUNSCHE, L., BRUGGEMANN, L. ET BABEL, W. (1995). Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess polulation changes after hydrocarbon pollution. FEMS Microbiology Ecology, 17 295-306.

ZAK, J.C., WILLIG, M.R., MOORHEAD, D.L. ET WILDMAN, H.G. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biology and Biochemistry, 26 (9), 1101-1108.

ZHANG, L. ET SUN, X. (1995). The Use of Biological and Chemical Parameters to Determine the Toxicity and Bioaccumulation of Wastewaters. Water Quality Research J. Canada, 30 (1), 69-79.

ZIMMERMAN, R.W. ET BODVARSSON, G.S. (1996). Hydraulic conductivity of rock fractures. Transport in Porous Media, 23 1-30.

ZIMMIE, T.F. ET RIGGS, C.O. (1979). Permeability and groundwater contaminant transport. Amrican Society for testing and Materials, Philadelphia.

Annexe 1 Protocoles expérimentaux

- P12 – A: Énumération directe des bactéries viables et totales d'un échantillon d'eau souterraine par microscopie à épifluorescence
- P12 – B: Préservation et conservation de la diversité microbienne d'un échantillon d'eau souterraine
- P12 – C: Mesure de l'hydrophobicité de surface d'une population microbienne indigène des eaux souterraines
- P12 – D: Profil physiologique d'une population indigène des eaux souterraines via le système de microplaques Biolog™
- P12 – E: Mesure de l'épaisseur d'un biofilm par microscopie optique
- P12 – F: Détermination par poids sec de la concentration d'exopolysaccharides en suspension
- P12 – G: Détermination de la concentration en glucides par colorimétrie

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: P12 - A	Pages: 3
Version. 1	Date Début : 08/10/97
	Date fin :

Auteurs: Nathalie Ross
Approuvé par:

- Élise Marcandella
- Benoit Barbeau, associé de recherche, Chaire en eau potable, département de génie civil, École Polytechnique de Montréal

Signatures:

Date: 22/10/97

Titre: Énumération directe des bactéries viables et totales d'un échantillon d'eau souterraine par microscopie à épifluorescence

Mots clés: énumération directe, bactéries viables et totales, épifluorescence, BacLight™, eaux souterraines

1. OBJECTIF(S)

La méthode permet de dénombrer directement par épifluorescence le nombre de bactéries totales et viables d'un échantillon d'eau souterraine. Le dénombrement est simple, rapide et fiable.

2. MATERIEL

- échantillon d'eau souterraine
- Réactif A: colorant SYTO® 9 dilué dans du dimethylsulfoxyde (DMSO) anhydre
- Réactif B: iodure de propidium dilué dans du DMSO anhydre
- huile à immersion BacLight™
- solution saline (0.085% NaCl) stérilisée et filtrée sur 0.2µm
- eau distillée stérile
- tubes à microcentrifuger
- support à filtre en acier inoxydable 25mm
- filtres noirs en polycarbonate Nucleopore 0.2 µm, 25 mm (numéro de catalogue Poretics 10532)
- filtre cellulose 0.8µm, 25 mm (numéro de catalogue Poretics 87481)
- microscope à épifluorescence
- lames et lamelles
- tige en verre stérile

3. METHODOLOGIE

3.1 Entreposage, manutention et sécurité

Les réactifs A et B doivent être conservés à -20°C à la noirceur. Avant l'ouverture des vials contenant les réactifs, laisser décongeler le contenu et centrifuger quelque temps. L'huile pour l'immersion peut être conservée à température ambiante. Lorsque conservées adéquatement, ces solutions peuvent durer 1 an.

Les réactifs A et B se fixent aux acides nucléiques. La capacité mutagène de l'iodure de propidium est reconnue. Par contre, aucune donnée n'est disponible sur la toxicité ou la capacité mutagène du réactif SYTO® 9. Le DMSO facilite la pénétration des molécules organiques dans les tissus. **Le port de deux paires de gants est fortement recommandé pour la manutention des réactifs dans le DMSO.** Les solutions contenant les colorants doivent être filtrées sur du charbon activé après usage. Les grains de charbon devront être incinérés.

3.2. Filtration de l'échantillon

Le volume d'eau à filtrer dépend de la densité microbienne de l'échantillon. À titre d'exemples, des expériences ont montré que les volumes suivants étaient adéquats : 1 ml pour une eau de rivière, 5 à 10 ml pour une eau de réseau de distribution et jusqu'à 20 ml pour une eau souterraine de très bonne qualité. Pour l'eau souterraine, un volume de 10 ml est suggéré. Le filtre en cellulose, placé en premier sur le support, est utilisé pour assurer une distribution uniforme des bactéries sur la surface du filtre de polycarbonate. Ajouter le filtre en polycarbonate sur le filtre en cellulose. La filtration sous vide s'effectue sous un faible gradient de pression.

3.3. Coloration des bactéries immobilisées sur une membrane

Mélanger un volume égal des réactifs A et B dans un tube à centrifuger et agiter vigoureusement. Ajouter 1 ml d'eau saline stérilisée et 3 µl du mélange A et B directement sur les filtres montés sur le support. Agiter délicatement avec une tige de verre stérilisée et laisser incuber 15 minutes à la température ambiante et à la noirceur.

Mettre 4 µl d'eau stérile sur une lame à microscope. Retirer les filtres du support en les drainant, c'est-à-dire en les laissant se dégorger d'eau, et les placer sur la goutte en conservant le côté du filtre où les bactéries sont vers le haut. Ajouter 6 - 10 µl d'huile à immersion BacLight sur le dessus du filtre. Placer une lamelle de 22 mm sur l'huile à immersion et appliquer une légère pression pour disperser l'huile dans tout le filtre. Sceller le montage avec de la paraffine ou un autre scellant.

3.4 Dénombrement

Observer la lame avec le microscope à épifluorescence. Les bactéries vertes ont les membranes intactes, tandis que les bactéries rouges ont les membranes altérées.

L'annexe provenant de la compagnie Molecular Probes fournie des informations supplémentaires quant à la sélection des filtres optiques, d'autres protocoles de coloration, la liste des produits disponibles et leur prix, des références et des coordonnées pour une assistance technique.

REFERENCES

Boulos, L. (1995). Influence de l'état physiologique des coliformes sur leur résistance a la désinfection. Génie civil. Montréal. Université de Montréal: 124.

Taghi-Kilani, R., Gyurek, L. L., Millard, P. J. (1996). Nucleic Acid Stains as Indicators of Giardia muris Viability Following Cyst Inactivation. International Journal for Parasitology 26., 6: 637-646.

RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

Le groupe de la Chaire en eau potable, au département de génie civil, possède un microscope à épifluorescence Dans cette équipe de recherche, la méthode a été utilisée notamment par M. Benoit Barbeau et Mme Jacinthe Mailly

ANNEXES: MODIFICATIONS

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: P20 P12 B	Pages: 3
Version: 1	Date Début: 23 mai 1997
	Date fin

Auteure: Nathalie Ross
Approuvé par: Elise MARCANDELLA

Signatures: Nathalie Ross
Date: 16 JUIN 1997

Titre: Préservation et conservation de la diversité microbienne d'un échantillon d'eau souterraine

Mots clés: population microbienne indigène de l'eau souterraine, ultramicrobactéries (UMB), conservation à long terme, filtration, congélation

1. OBJECTIF(S)

La méthode vise à conserver la diversité d'une population microbienne indigène des eaux souterraines sur une période pouvant s'étaler jusqu'à 1 an. La méthode de filtration en série permet de récupérer les bactéries dormantes, c'est-à-dire de diamètre < 0.3 µm.

2. MATERIEL

- récipients en verre ambré
- échantillon d'eau souterraine
- montage de filtration Millipore en verre (D = 47mm)
- filtres membranes «Isopore Polycarbonate» 0.1, 0.2 et 0.4µm de Millipore
- eau saline stérile (0.85% NaCl)
- Erlenmeyer 250ml
- tubes en polypropylène «Eppendorf» 1.5ml
- glycérol liquide
- azote liquide
- congélateur à -85°C

3. METHODOLOGIE

3.1. CONCENTRATION DE LA BIOMASSE

Un volume de 10L d'eau souterraine (prélevée depuis moins de 30 heures et conservée à 4°C) est filtré sous vide en conditions stériles (sous la hotte microbiologique et le brûleur allumé) sur des filtres membranes «Isopore

Polycarbonate» de Millipore monté sur un montage à filtration en verre. Une série de 3 filtrations permettra de récupérer différentes fractions de la population microbienne (FIGURE 1).

La pression exercée par le vide doit être légère (environ ¼ tour du robinet de vide). De même, le vide est arrêté avant l'assèchement complet du filtre. À l'aide de pinces Millipore stérilisées, le filtre est délicatement retiré et placé sur une paroi de l'Erlenmeyer 250ml. Le filtre est rincé avec 50 ml d'eau saline pour le détachement de la biomasse. Les différentes fractions microbiennes peuvent être mélangées pour obtenir un portrait global de la population microbienne ou encore, être congelées séparément.

3.2. CONGÉLATION DU CONCENTRAT

Le concentrat est agité délicatement pour ensuite être séparé dans les tubes «Eppendorf» en échantillons de 1ml dans lesquels un volume de 150µl de glycérol (stérilisé à l'autoclave : 20 minutes à 121°C et 103.4kPa) a été préalablement ajouté (concentration finale 15% (v/v)). Quelques inversions des tubes suffiront pour mélanger le concentrat et le glycérol. Les tubes sont ensuite trempés dans l'azote liquide jusqu'à évaporation de l'azote. Promptement, les tubes sont placés au congélateur à -85°C.

4. REFERENCES

1 Kemp, P. F., Sherr, B. F., Sherr, E. B. and Cole, J. J. 1993. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers, Boca Raton, 777p.

2 Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. 1997. Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington D.C., 894p.

3 AWWA 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th Edition

5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

La méthode de congélation d'une population microbienne, tout comme celle de lyophilisation, entraîne assurément un taux de mortalité microbienne. Des décomptes microbiens permettraient d'évaluer ce taux. Toutefois, en raison du faible taux de microorganismes cultivables (moins de 5%), surtout dans un milieu oligotrophe comme les eaux souterraines, les résultats des décomptes ne révèlent qu'une fraction de la flore.

6. ANNEXES: MODIFICATIONS

Notes :

- Protocole expérimental lu et approuvé par M. Richard Villemur, Professeur au département de microbiologie appliquée de l'Institut Armand-Frappier

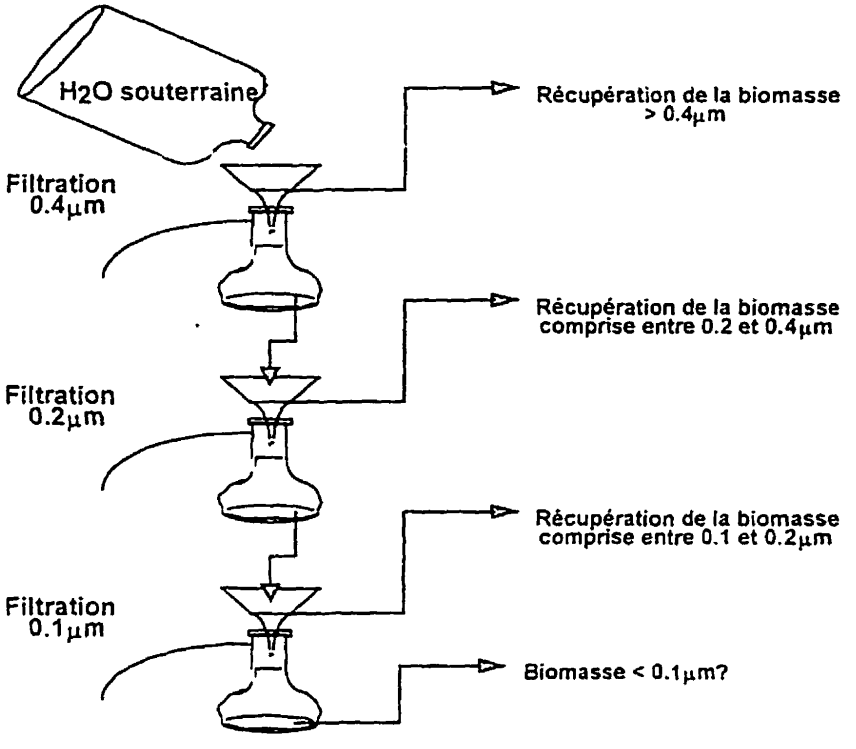


FIGURE 1 - Filtration en série pour la récupération des fractions d'une population indigène des eaux souterraines

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: P12 C	Pages:
Version: 1	Date Début: 14 octobre 1997
	Date fin

Auteurs: Nathalie Ross Approuvé par:	Signatures:
Marie-Claire Aly Hassan	
Élise Marcandella	Date: 22/10/97

Titre: Mesure de l'hydrophobicité de surface d'une population microbienne indigène des eaux souterraines

Mots clés: hydrophobicité, adhérence des cellules à l'hexadécane, population microbienne indigène des eaux souterraines

1. Objectif(s)

L'hydrophobicité des cellules est un paramètre chimique important dans les phénomènes de fixation des cellules aux interfaces solide/liquide, liquide/liquide et liquide/gaz. La méthode d'adhérence de la population microbienne à un hydrocarbure aliphatique, l'hexadécane, donne une mesure simple de l'hydrophobicité de surface des cellules.

2. Matériels

- échantillon d'eau souterraine
- solution tampon (PUM) (pH 7.1): 22.2 g $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$, 7.26 g KH_2PO_4, 1.8 g urée, 0.2g $MgSO_4 7H_2O$ et amener à 1000 ml avec de l'eau distillée
- tubes à essais (diamètre 12 x 75 mm)
- n-hexadécane
- mélangeur "Vortex"
- pipettes Pasteur
- cuvettes à spectrophotométrie 1.5 ml (Fisher Semicro Cuvets, polystyrene)
- spectrophotomètre

3. Méthodologie

3.1. Préparation de la suspension microbienne

L'échantillon d'eau souterraine est centrifugé à 7500 rpm pendant 20 minutes et les microorganismes sont resuspendus dans le tampon PUM. La centrifugation et la resuspension sont effectuées deux fois. Prévoir un volume suffisant pour le témoin, i.e. la suspension microbienne sans ajout d'hexadécane, ainsi que pour effectuer les analyses en triplicata.

3.2. Préparation de l'émulsion

Les tubes à essais doivent être préalablement lavés à l'acide chlorhydrique (1%). Un volume de 1.2 ml de la suspension microbienne est mis dans un tube à essai avec différents volumes d'hexadécane, compris entre 0 et 0.3 ml. En fait, le volume optimal d'hexadécane doit être défini, c'est-à-dire le volume à partir duquel l'absorbance mesurée est stable, à partir duquel la quantité d'hexadécane permet le maximum d'adsorption des cellules.

Les tubes sont ensuite agités pendant 120 secondes à l'aide du mélangeur. Une attente de 15 minutes permet la séparation de la phase aqueuse et de l'émulsion. Avec précaution, une pipette Pasteur est introduite dans la phase aqueuse et le volume est transféré dans une cuvette à spectrophotométrie de 1.5 ml

3.3. Lecture et détermination de l'hydrophobicité

La cuvette est introduite dans le spectrophotomètre et l'absorbance est mesurée à 400 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution de la turbidité en comparaison avec le témoin dans lequel l'hexadécane est absent :

$$\% \text{ cellules adsorbées sur l'hexadécane} = (1 - A/A_0) \times 100$$

où A : absorbance à 400 nm
A_0 : absorbance de la suspension avant l'ajout de l'hexadécane

Les analyses sont effectuées en triplicata.

4. Références

Dillon, J. K., Fuerst, J. A., Hayward, A. C. (1986). A comparision of five methods for assaying bacterial hydrophobicity. Journal of Microbiological Methods 6., : 13-19.

Doyle, R J., Nedjat-Haiem, F. et Singh, J. S (1984). Hydrophobic Characteristics of *Bacillus* Spores Current Microbiology 10., : 329-332.

Rosenberg, M. (1984). Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiology Letters 22., : 289-295.

Rosenberg, M., Gutnick, D. et Rosenberg, E. (1980). Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity. FEMS Microbiology Letters 9., : 29-33.

Rosenberg, M., Judes, H. et Weiss, E. (1983). Cell Surface Hydrophobicity of Dental Plaque Microorganisms In Situ. Infection and Immunity 42., 2: 831-834.

van der Mei, H. C., Weerkamp, A. H. et Busscher, H. J. (1987). A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of streptococcal cell surfaces. Journal of Microbiological Methods 6., : 277-287.

5. Résultats et recommandations

6. Annexes: Modifications

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: P12 D	Pages: 7
Version: 1	Date Début: 20 novembre 1997
	Date fin

Auteurs: Nathalie Ross Approuvé par:	Signatures: Date: ___/___/___

Titre: Profil physiologique d'une population indigène des eaux souterraines via le système de microplaques BIOLOG

Mots clés: diversité fonctionnelle, population microbienne mixte, Biolog

1. OBJECTIF(S)

La diversité microbienne peut se diviser en trois catégories : génétique, fonctionnelle et taxinomique. La majorité des recherches sur la biodiversité ont été de nature taxinomique. Cependant dans les écosystèmes, la connaissance des changements d'activités fonctionnelles bactériennes s'avère primordiale. Le système de microplaques Biolog, conçu pour l'identification microbienne, est utilisé de plus en plus pour l'établissement de profil d'utilisation de différents substrats par des populations microbiennes mixtes. L'objectif de la méthode est de mesurer la diversité fonctionnelle de la population indigène d'une eau souterraine lors de la formation d'un biofilm en conditions de laboratoire reproduisant un milieu fracturé.

2. MATÉRIEL

- échantillon d'eau souterraine
- eau saline stérilisée (NaCl 0.85%)
- centrifugeuse
- spectrophotomètre (DO 590 nm)
- chambre froide à 10 °C
- pipettes Pasteur stérilisées
- plat de Pétri
- plaques Biolog
- multipipette à huit conduits (8 × 1ml)
- embouts à multipipette incolores stérilisés
- lecteur optique pour plaques (590 nm, MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA)

3. MÉTHODOLOGIE

3.1. Préparation des échantillons

Toutes les manipulations sont effectuées stérilement. La densité optique des échantillons d'eau souterraine doit être ajustée entre les longueurs d'ondes des standards fournis par Biolog, c'est-à-dire entre 0.270 et 0.331A. Suivant le cas, les échantillons devront être dilués ou concentrés. La dilution est réalisée avec de l'eau saline stérilisée. La concentration s'effectue en centrifugeant l'eau souterraine (7500 rpm pendant 20 minutes) et en resuspendant le culot dans un volume permettant la concentration nécessaire.

3.2. Inoculation des plaques, incubation et lecture de la densité optique

Un volume de 20 ml est versé dans un plat de Pétri pour faciliter le pipettage. Les puits des microplaques sont remplis avec la multipipette 2 x 75 µl. Les plaques sont incubées à 10 °C. La densité optique est lue sur le lecteur automatique toutes les huit heures pendant une semaine. Le temps d'incubation de la microplaque est sujet à ajustements en fonction du temps de réponse, c'est-à-dire de l'apparition de la coloration pourpre (voir résultats).

3.3. Présentation des résultats

Le test Biolog a été développé pour l'identification bactérienne en travaillant avec des souches pures. Son utilisation avec des populations mixtes et en conditions indigènes laisse place à de multiples interprétations des résultats de diversité fonctionnelle.

1- La cinétique de développement de la couleur peut être déterminée. Des auteurs ont obtenu une courbe suivant un modèle logistique à trois paramètres (Lee, Russell et al. 1995).

2- La sommation du nombre de substrats utilisés et des patrons d'utilisation de substrats en fonction du temps d'incubation ont été étudiés par Zak, Willig et al. (1994).

3- Une méthode statistique utilisant les deux premiers facteurs de l'analyse principale des composantes permet de comparer l'ensemble des résultats d'une microplaques avec ceux des autres échantillons d'eau (O'Connell, Lehman et al. 1997).

REFERENCES

- Lee, C., N. J. Russell, et al. (1995). "Rapid screening for bacterial phenotypes capable of biodegrading anionic surfactants: development and validation of a microtitre plate method." Microbiology 141: 2801-2810.
- O'Connell, S. P., R. M. Lehman, et al. (1997). Microbiological Monitoring of Contaminants in a Fractured Basalt Aquifer. In Situ and On-Site Bioremediation, New Orleans, Battelle Press.
- Zak, J. C., M. R. Willig, et al. (1994). "Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach." Soil Biology and Biochemistry 26(9): 1101-1108.

RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Les résultats ci-dessous montrent le pourcentage d'utilisation des 95 substrats par une microflore indigène des eaux souterraines de Montréal ainsi que d'un biofilm formé à 10°C. Les 95 substrats ont été regroupés en 11 types (Table 1). La Figure 1 montre les profils de diversité fonctionnelle de la microflore de l'eau souterraine

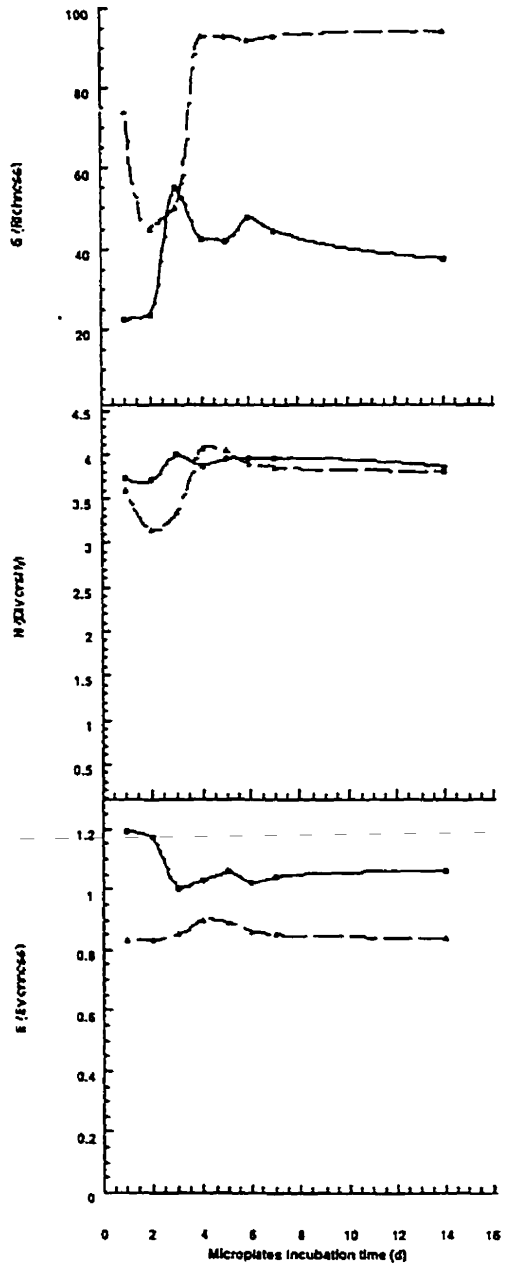
et du biofilm: *substrate richness (S), substrate diversity (H) et substrate eveness (E).* La méthodologie utilisée pour cette étude est décrite dans l'article : « Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater and Stimulated to Form a Biofilm : Assessment of Changes in the Biodiversity by Combining Genetic and Functional Methods », soumis à la revue « Applied and Environmental Microbiology » le 28 juillet 1999.

Afin d'optimiser la présentation des résultats provenant du profil physiologique par une microplaque BIOLOG, il est recommandé de bien cibler l'information recherchée. Par exemple, les résultats d'une comparaison de plusieurs échantillons provenant de sols, entourant une source de contamination, ne seront pas présentés de la même façon que ceux d'une comparaison de changement de diversité fonctionnelle lors d'un biotraitement. Il serait également important de consulter un spécialiste en statistique afin d'établir le meilleur traitement des données. Une source additionnelle d'information sur le sujet est ajoutée à l'Encadré 1.

Table I. Substrate-guild analysis of UMBs isolated from groundwater and the resulting biofilm community following 7 days of incubation of the Bioog GN microplates at 10 °C in darkness. Substrate utilization in guilds with the same exponent was not significantly different ($\alpha = 95$ %).

	% Utilization within guild	
Substrate guild	Groundwater	Biofilm
Polymers [a]	60.0	100.0
Carbohydrates [a, b]	51.8	98.2
Phosphorylated Chemicals [a, c]	50.0	100.0
Esters [a, d]	50.0	100.0
Carboxylic Acids [a, e]	47.9	100.0
Amino Acids [a, f]	42.5	95.0
Alcohols [a, f]	25.0	100.0
Amides [a, f]	16.7	100.0
Amines [a, f]	16.7	100.0
Brominated Chemicals [b, c, d, e, f]	0.0	100.0
Aromatic Chemicals [f]	0.0	87.5

Figure 1. Community-level physiological profiles of UMBs isolated from groundwater (O), and the resulting biofilm (Δ): substrate richness (*S*), substrate diversity (*H*), and substrate evenness (*E*). The Biolog GN microplates were incubated at 10 °C in darkness.


100
80
60
40
20
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Microplates incubation time (d)

Encadré 1. Extrait du bulletin Éco-Radar, novembre 1998

Titre: Monitorage microbiologique d'un biotraitement par l'établissement d'un profil d'utilisation de substrats (systeme Biolog®)

Veilleurs: Nathalie Ross & Réjean Samson

Analyse: Ce texte présente une méthode simple, rapide et économique de déterminer des différences spatiale et temporelle de populations microbiennes dans l'environnement. Les utilisations pertinentes pour un biotraitement de site contaminé sont également discutées.

L'utilisation du système de micro-plaques Biolog®, lequel contient 95 substrats, permet de déterminer des différences de diversité fonctionnelle, ou métabolique, d'une population microbienne mixte en établissant un profil d'utilisation de substrats. Ce système a été développé à l'origine pour l'identification de bactéries isolées mais son utilisation s'est étendue aux populations mixtes suite aux travaux de Garland and Mills (1991). Le principe de la méthode repose sur le développement d'une coloration pourpre suite à l'oxydation des substrats permettant la réduction du tetrazolium violet formant un complexe pourpre irréversible. L'intensité du développement de la coloration pourpre est mesurée par spectrophotométrie et les résultats sont analysés statistiquement permettant de comparer la diversité fonctionnelle des populations microbiennes d'échantillons différents ou de mêmes échantillons dont les conditions physico-chimiques ont été modifiées (Strong-Gunderson and Palumbo 1994).

Pour les biotraitements des sites contaminés, cinq applications du système Biolog® sont documentées: 1- le monitorage microbiologique pendant un biotraitement, 2- les effets ponctuels d'une contamination sur une population microbienne, 3- la détermination de la capacité de dégradation microbienne d'un échantillon, 4- l'utilisation comme outil d'évaluation du risque et 5- l'établissement des limites d'une contamination sur un site. Le monitorage microbiologique avec le système Biolog® a permis de constater le changement de population microbienne (community shift) lors de la dégradation d'hydrocarbures et d'un pesticide (Herbogil) dans les sols (Wunsche et al. 1995; Engelen et al. 1998). Les résultats ont été corroborés avec des analyses biomoléculaires. Une étude de Campbell et al. (1995) a montré les effets significatifs des métaux lourds Cu, Ni et Zn sur le profil d'utilisation de substrats par les micro-organismes d'un sol et un effet spécifique du Cu sur l'étendue de la diversité microbienne. La classification d'échantillons de différents sites en fonction de leur capacité de biodégradation de lixiviats riches en phénol a été réalisée par le système Biolog® montrant une étroite relation entre le profil d'utilisation de substrats et l'exposition des échantillons à la source de contamination (Talpsep et al. 1997). De

même. O'Connell et al. (1997) ont utilisé la technique pour l'établissement des zones limites d'une contamination au trichloroéthylène dans l'eau souterraine et soutiennent que le système Biolog® pourraient servir d'outil d'analyse de risque.

Commentaires: L'intérêt de l'utilisation des micro-plaques Biolog® réside dans la simplicité de son application, la rapidité d'obtention des résultats et le faible investissement financier en comparaison avec les techniques biomoléculaires. Par contre, deux défauts majeurs peuvent être attribués à cette technique. Premièrement, l'information obtenue reflète une tendance de la population microbienne par rapport à un profil d'utilisation de substrats mais ne détermine pas la biodiversité génétique, restreignant son utilisation à des comparaisons entre échantillons. Deuxièmement, les analyses nécessaires pour le dégagement des tendances issues des profils d'utilisation de substrats demandent des connaissances élaborées des outils statistiques. En considérant l'importance du suivi des populations microbiennes dans l'application d'un biotraitement, cette technique possède définitivement une niche d'applications qui, couplées avec des analyses physico-chimiques et microbiologiques, permettront le succès des opérations.

Sources:

Campbell, C.D., Van Gelder, J., Davidson, M.S. et Cameron, C.M. (1995). Use of Sole Carbon Source Utilization Patterns to Detect Changes in Soil Microbial Communities Affected by Cu, Ni and Zn. International Conference on Heavy Metals in the Environment.

Engelen, B., Meinken, K., von Wintzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H.-P. et Backhaus, H. (1998). Monitoring Impact of a Pesticide Treatment on Bacterial Soil Communities by Metabolic and Genetic Fingerprinting in Addition to Conventional Testing Procedures. Applied and Environmental Microbiology 64(8): 2814-2821.

Garland, J.L. et Mills, A.L. (1991). Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon -Source Utilization. Applied and Environmental Microbiology 57(8): 2351-2359.

O'Connell, S.P., Lehman, R.M., Colwell, F.S. et Watwood, M.E. (1997). Microbiological Monitoring of Contaminants in a Fractured Basalt Aquifer. In Situ and On-Site Bioremediation, New Orleans, Battelle Press.

Strong-Gunderson, J.M. et Palumbo, A.V. (1994). Alternative method for rapidly screening microbial isolates for their potential to degrade volatile contaminants. Journal of Industrial Microbiology 13: 361-366.

Talpsep, E., Heinaru, E., Truu, J., Laht, T., Heinaru, A., Wand, H., *et al.* (1997). Functional dynamics of microbial populations in waters contaminated with phenolic leachate. Oil Shale 14(4): 435-453.

Wunsche, L., Bruggemann, L. et Babel, W. (1995). Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess polulation changes after hydrocarbon pollution. FEMS Microbiology Ecology 17: 295-306.

ANNEXES : MODIFICATIONS

ORIGINAL

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: P12 E	Pages: 3
Version: 1	Date Début: 10 février 1998
	Date fin

Auteurs: Nathalie Ross Approuvé par: Elise Marcandella	Signatures: Nathalie Ross Date: 26/02/1998

Titre: Mesure de l'épaisseur d'un biofilm par microscopie optique

Mots clés: biofilm, épaisseur, microscopie optique

1. OBJECTIF(S)

La mesure directe de l'épaisseur du biofilm permet de suivre le développement de ce dernier et d'établir des relations avec des variables expérimentales chimiques, physiques et biologiques.

2. MATERIEL

- Microscope optique
- lampe pour éclairer le support solide si celui-ci est opaque
- biofilm formé sur un support

3. METHODOLOGIE

3.1. Mesure par microscopie

Le support avec le biofilm est installé sous le microscope. L'objectif 10 X (grossissement total : 100 X) est utilisé et mis au point sur la surface du biofilm (Figure 1). Puis, la position de la vis de mise au point fine est notée (Figure 2). L'objectif est ensuite descendu pour effectuer une mise au point sur le support. Encore une fois, la position de la vis de mise au point fine est notée.

3.2. Calcul de l'épaisseur

L'épaisseur, E (µm), se calcule comme suit :

$$E = (P_2 - P_1) * F_c * F_r$$

où

P_2 = position de la vis de mise au point fine sur le support ;

P_1 = position de la vis de mise au point fine sur le biofilm ;

F_c = facteur de conversion de la graduation de la vis vs la distance parcouru par l'objectif (µm) ;

F_r = facteur de correction pour l'indice de réfraction du biofilm mouillé.

Pour le microscope Alphaphot 2 de Nikon, la vis de mise au point fine à une graduation de 1 à 200. Une rotation de cette vis équivaut à une distance parcourue par l'objectif de 200 µm. Dans ce cas, F_c = 1 µm. Le facteur de correction pour l'indice de réfraction, F_r, est de l'ordre de 1.3. L'écart type de la méthode, incluant les irrégularités du biofilm, est d'environ 10 - 12 µm.

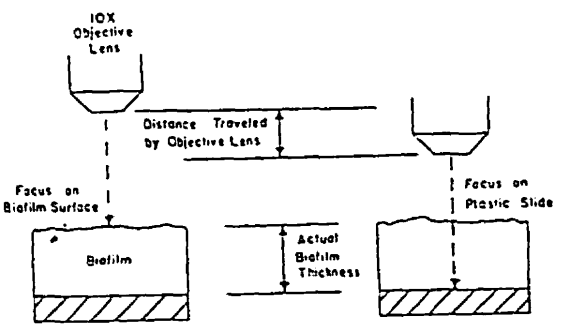


Figure 1 - Méthode des mises au point du microscope optique

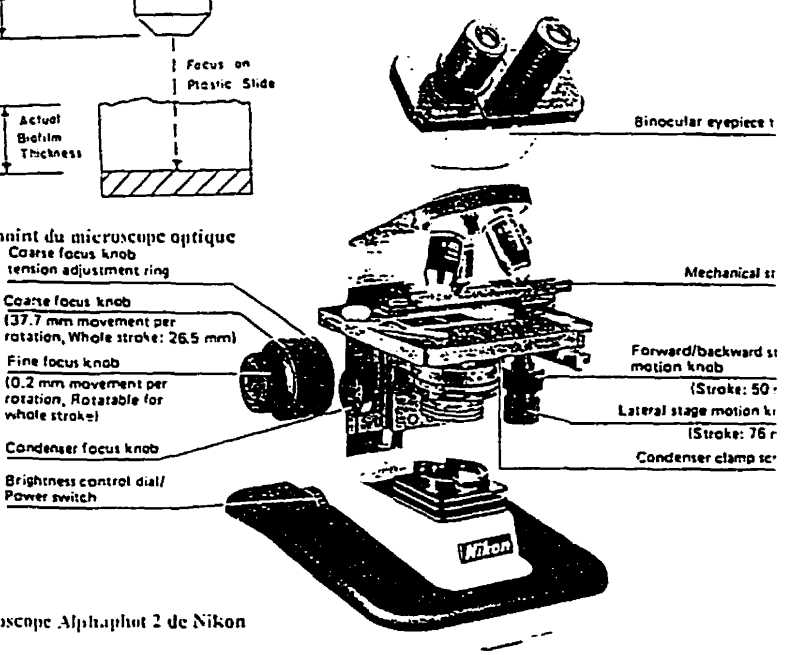


Figure 2 - Nomenclature du microscope Alphaphot 2 de Nikon

4. REFERENCES

- Characklis, W. G. et Marshall, K. C. (1990). Biofilms. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Ross, N., Deschenes, L., Bureau, J. (accepté). Ecotoxicological Assessment and Effects of Physico-Chemical Factors on Biofilm Development in Groundwater Conditions. Environmental Science and Technology..
- Trulear, M. G. et Characklis, W. G. (1982). Dynamics of biofilm process. Journal WPCF 54., 9: 1288-1301.

5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

5.1. Exemple

L'épaisseur d'un biofilm développé sur une céramique dans des conditions d'eau souterraine ont varié de moins de 10 µm à plus de 250 µm sur une période de 192 heures sous différents facteurs physico-chimiques (Figure 3).

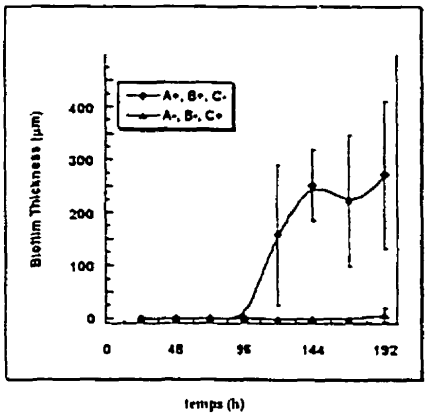


Figure 3 - Développement d'un biofilm sur une céramique dans une eau souterraine synthétique maintenu à 10°C et à la noirceur. Les deux courbes montrent les effets significatifs des facteurs A, B et C sur l'épaisseur du biofilm en fonction du temps. A : taux d'alimentation en source de carbone dans le réacteur semi-continu (- : 2mg/m^2.min, + : 20mg/m^2.min), B : type d'aération du réacteur (- : agitation à 200 rpm, + : barbotage à 4.2 cm^3/s) et C : type de source de carbone (- : saccharose, + : mélasse).

5.2. Recommandations

La méthode de mesure directe de l'épaisseur du biofilm est simple. La fiabilité des résultats sera d'autant plus présente que la mesure sera effectuée par le même expérimentateur ou expérimentatrice.

ANNEXES: MODIFICATIONS

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: P12 F	Pages: 3
Version: 1	Date Début: 12 février 1998
	Date fin

Auteurs: Nathalie Ross
Approuvé par: Élise Marcandella

Signatures:

Nathalie Ross

Date: 02/03/98

Titre: Détermination par poids sec de la concentration d'exopolysaccharides en suspension

Mots clés: EPS en suspension

1. OBJECTIF(S)

Sous certaines conditions, il existe des bactéries produisant des exopolysaccharides (EPS) leur permettant notamment de se fixer sur un support solide. Des EPS se retrouvent également en suspension. Cette méthode permet de séparer les bactéries des EPS et de quantifier ces derniers.

2. MATERIEL

- filtres Whatman GF/A
- support à filtration stérilisé
- cupules en aluminium
- culture bactérienne
- four à 105°C
- dessiccateur
- balance
- tubes à centrifuger stérilisés (40ml)
- centrifugeuse

3. METHODOLOGIE

3.1. Séparation de la biomasse et des EPS et précipitation des EPS

De la culture bactérienne, prélever 20 ml stérilement et mettre dans un tube à centrifuger. Ajouter 400 µl de NaCl (5 M), 400 µl de EDTA (0.5 M) et laisser reposer 10 minutes. Centrifuger pendant 20 minutes à 7500 rpm (étape de séparation). Prendre 10 ml du surnageant et ajouter 30 ml d'éthanol dénaturé (85 % éthanol).

Laisser reposer 10 minutes (étape de précipitation)

3.2. Filtration et détermination du poids sec des EPS

Peser les filtres Whatman ayant eu un traitement préalable de dessiccation pendant 24 heures. Filtrer la solution sous un vide relativement faible (soit environ ¼ tour du robinet de vide) et mettre le filtre à sécher dans le four à 105 °C pendant 24 heures. Laisser refroidir le filtre dans le dessiccateur et le peser. La concentration d'EPS en suspension est obtenue en soustrayant le poids du filtre avant filtration de celui avec le précipité (mg/L).

4. REFERENCES

- Characklis, W. G. et Marshall, K. C. (1990). Biofilms. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Hacking, A. J., Taylor, I. W. F., Jarman, T. R. (1983). Alginate Biosynthesis by *Pseudomonas mendocina*. Journal of General Microbiology 129., : 3473-3480.
- Ross, N., Deschenes, L., Bureau, J., Clément, B., Comeau, Y., and Samson, R. (accepté). Ecotoxicological Assessment and Effects of Physico-Chemical Factors on Biofilm Development in Groundwater Conditions. Environmental Science and Technology .

5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

5.1. Résultats

Dans un dispositif expérimental sur le développement d'un biofilm en conditions d'eau souterraine avec une flore indigène, la production d'EPS en suspension s'est avérée dépendante du taux d'alimentation en source de carbone (Figure 1)

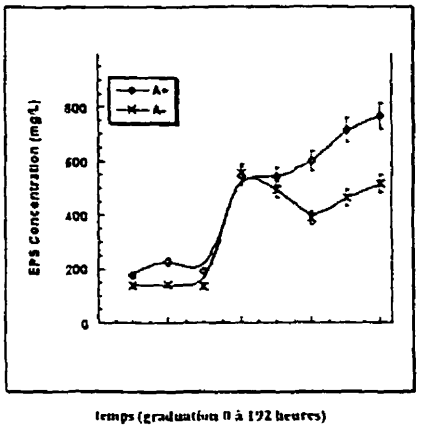


Figure 1 - Production d'EPS dans une eau souterraine synthétique avec une flore indigène maintenue à 10°C et à la noirceur. Les deux courbes montrent l'effet significatif du facteur A : le taux d'alimentation en source de carbone (- : 2 mg/m².min, + : 20 mg/m².min).

5.2. Recommandations

Après la centrifugation, manipuler les tubes avec soin pour éviter une remise en suspension des bactéries du culot.

6. ANNEXES: MODIFICATIONS

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: P12 G	Pages: 3
Version: 1	Date Début: 22 juin 1998
	Date fin

Auteurs: Nathalie Ross
Approuvé par:

Signatures:

Date: ___ / ___ / ___

Titre: Détermination de la concentration en glucides par colorimétrie

Mots clés: glucides, colorimétrie, méthode phénol - acide sulfurique, méthode de Dubois

1. OBJECTIF(S)

La méthode permet de déterminer la concentration en glucides en solution de l'ordre du milligramme. Le principe est le développement d'une coloration jaune à orange des sucres simples, oligosaccharides, polysaccharides ainsi que leurs dérivés suite à l'ajout de phénol et d'acide sulfurique concentré. Une courbe étalon d'absorbance du glucose ou du glucide étudié permet de déduire la concentration.

2. MATÉRIEL

- Vortex
- tubes à essais de 15 ml
- hotte chimique
- solution phénol 80 % (p/p)
- acide sulfurique concentré (qualité réactif 95%)
- spectrophotomètre
- bain-marie à 30°C
- pipette dont le volume (5 ml) peut être évacuée rapidement
- micropipettes
- cuvettes de plastique

3. MÉTHODOLOGIE

3.1. Courbe étalon

Une série de concentrations entre 10 et 100 mg/L est sélectionnée (ex. 10, 20, 40, 80 mg/L). La lecture de densité doit être entre 0.1 et 1.0 nm. Suivre la procédure énumérée à la section 3.3. Les essais sont réalisées en triplicata

3.2. Analyses des échantillons

La concentration en glucides doit se situer entre 10 et 100 mg/L (Dubois, Gilles et al. 1956). Effectuer les dilutions nécessaires avec de l'eau distillée. Suivre la procédure décrite à la section 3.3. Les mesures sont réalisées en triplicata.

3.3. Procédure

Un volume d'échantillon de 2 ml est pipetté dans les tubes à essai. Sous la hotte chimique, ajouter 50 µl de phénol 80 %. Directement sur la solution et non sur les parois des tubes, 5 ml d'acide sulfurique est ajouté rapidement pour permettre un bon mélange (attention aux éclaboussures ! ! !). Laisser reposer 10 minutes, vortexer et mettre les tubes 10 à 20 minutes dans le bain-marie maintenu à 30°C. La couleur développée est stable pour plusieurs heures. Une lecture de densité optique est effectuée à 490 nm pour les hexoses et 480 nm pour les pentoses et acides uroniques (Dubois, Gilles et al. 1956).

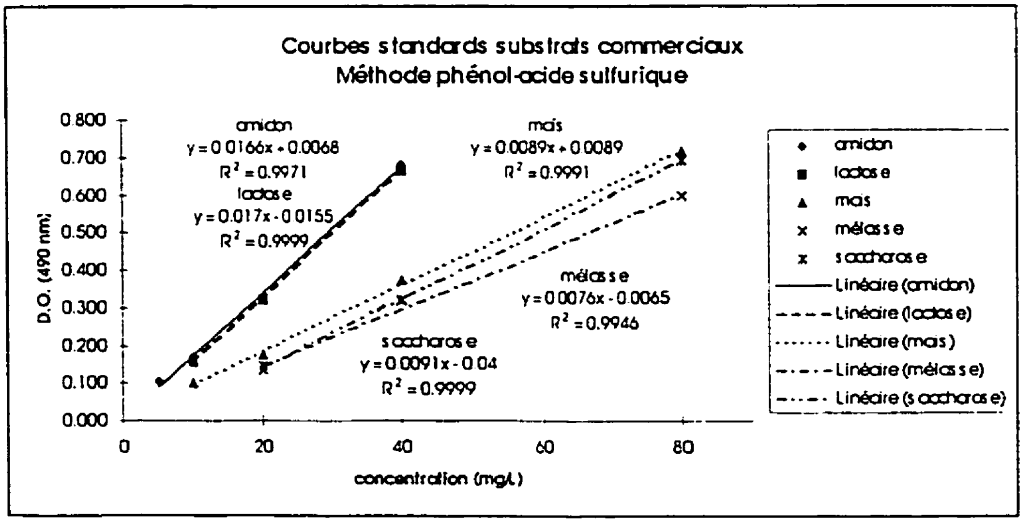
4. RÉFÉRENCES

Dubois, M., K. A. Gilles, et al. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." Analytical Chemistry 28(3): 350-353.

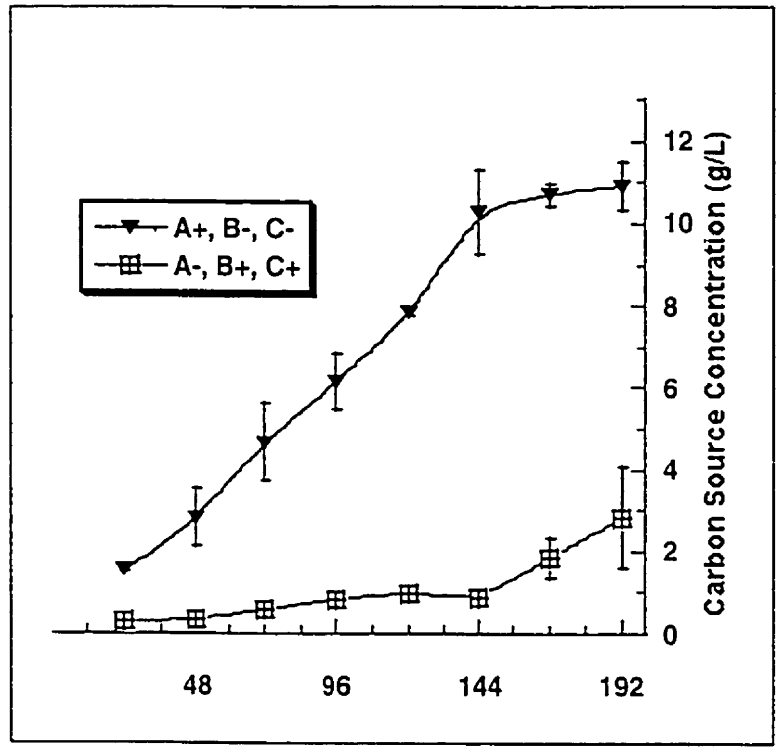
Ross, N., L. Deschenes, et al. (1998). "Ecotoxicological Assessment and Effects of Physicochemical Factors on Biofilm Development in Groundwater Conditions." Environmental Science and Technology 32(8): 1105-1111.

5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

5.1. Résultats de courbes étalon effectuées sur différents substrats commerciaux



5.2. Suivi de la concentration en source de carbone dans un réservoir de 1L lors du développement d'un biofilm (Ross, Deschenes et al. 1998).



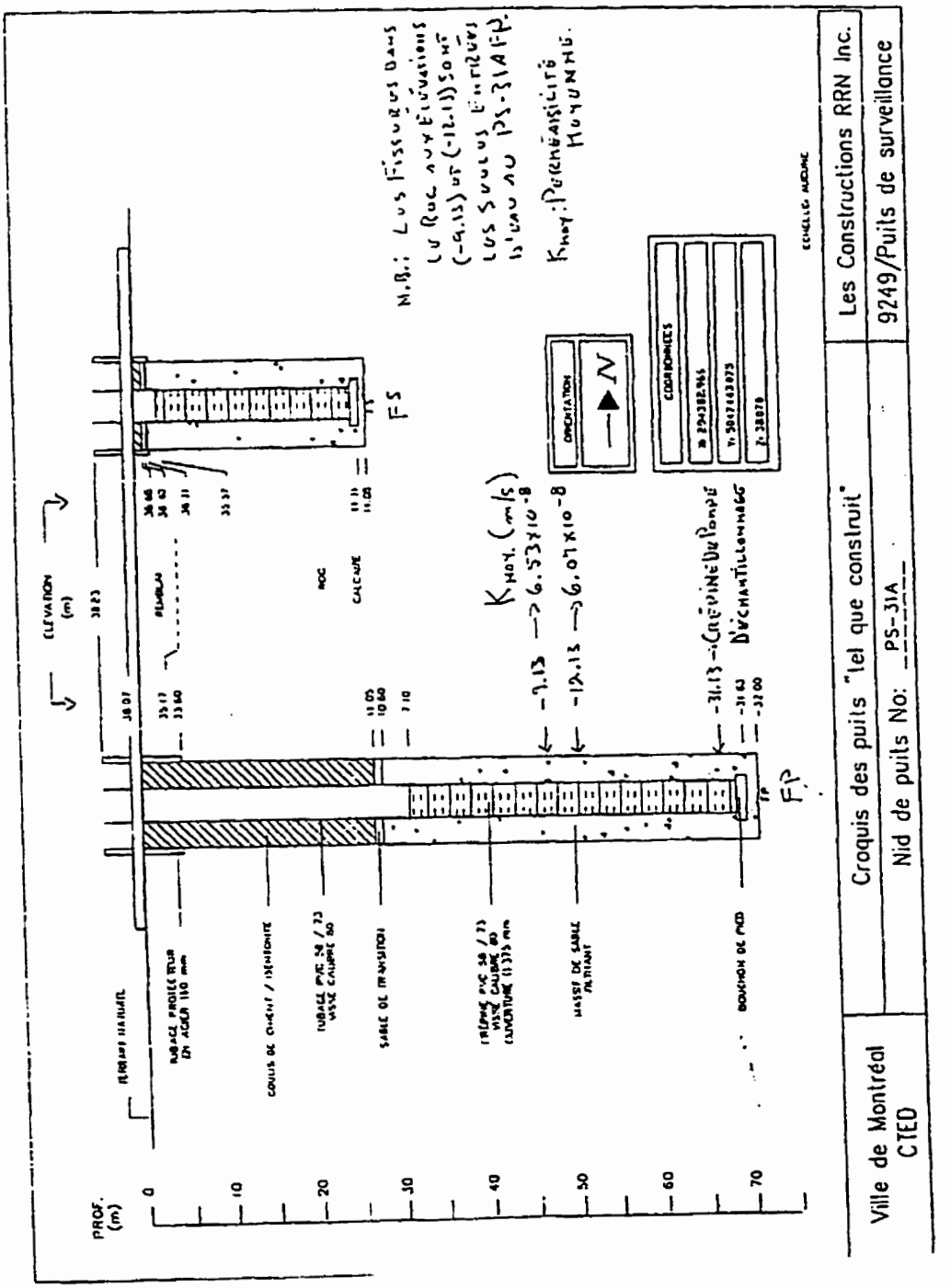
où A : taux d'alimentation en source de carbone avec - : 2 mg m^{-2} min. $^{-1}$ et + : 20 mg m^{-2} min. $^{-1}$, B : type d'aération avec - : agitation à 200rpm et + : barbotage à 4.2 cm^3 s^{-1} et C : source de carbone avec - : saccharose et + : mélasse.

6. ANNEXES: MODIFICATIONS

Annexe 2 Caractérisation physico-chimique et microbiologique des échantillons d'eau souterraine de Montréal

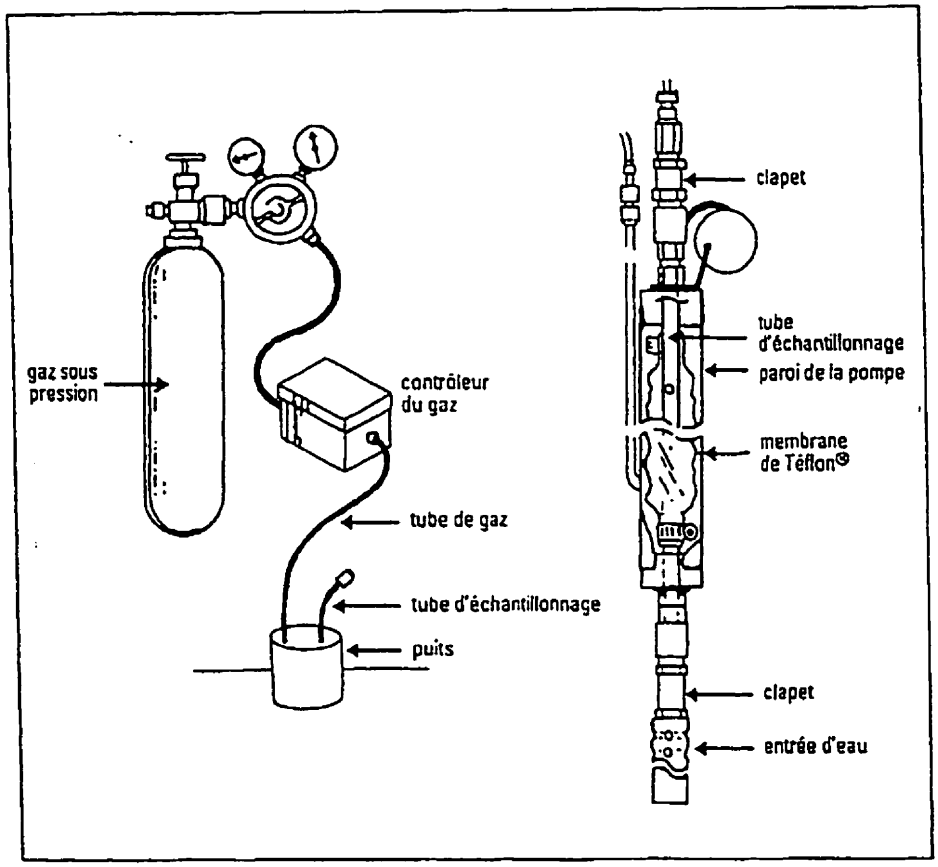
- Croquis du puits de pompage
- Appareillage d'échantillonnage
- Analyses des principaux composés chimiques
- Courbe de croissance des bactéries hétérotrophes totales
- Photo de microscopie par épifluorescence montrant les cellules vivables et non-viables

- Croquis du puits de pompage



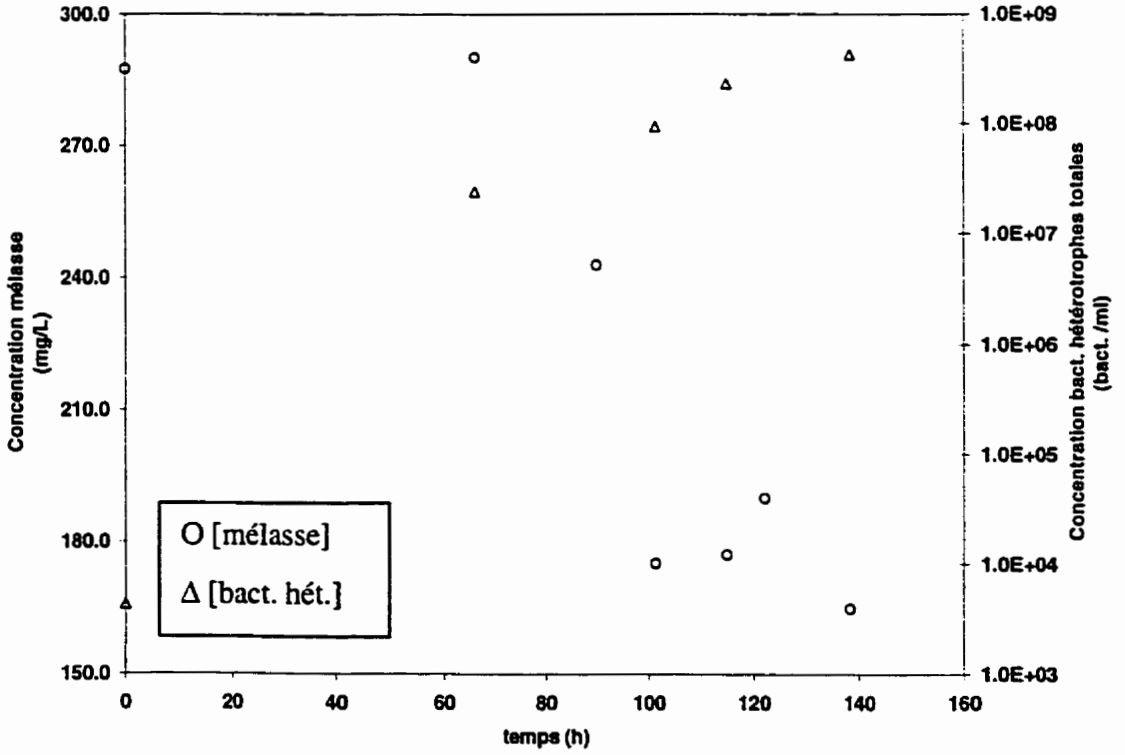
- Appareillage d'échantillonnage

Méthode d'échantillonnage par déplacement positif – membre flexible



- Analyses des principaux composés chimiques

paramètre	concentration (mg/L)
Ca	6.0
Fe	0.4
K	7.2
Cl^-	3.8
Mg	375
SO_4^{-2}	5483
NO_3^-	3.75
COT	2.95
Ntotal	0.61
Ptotal	0.01

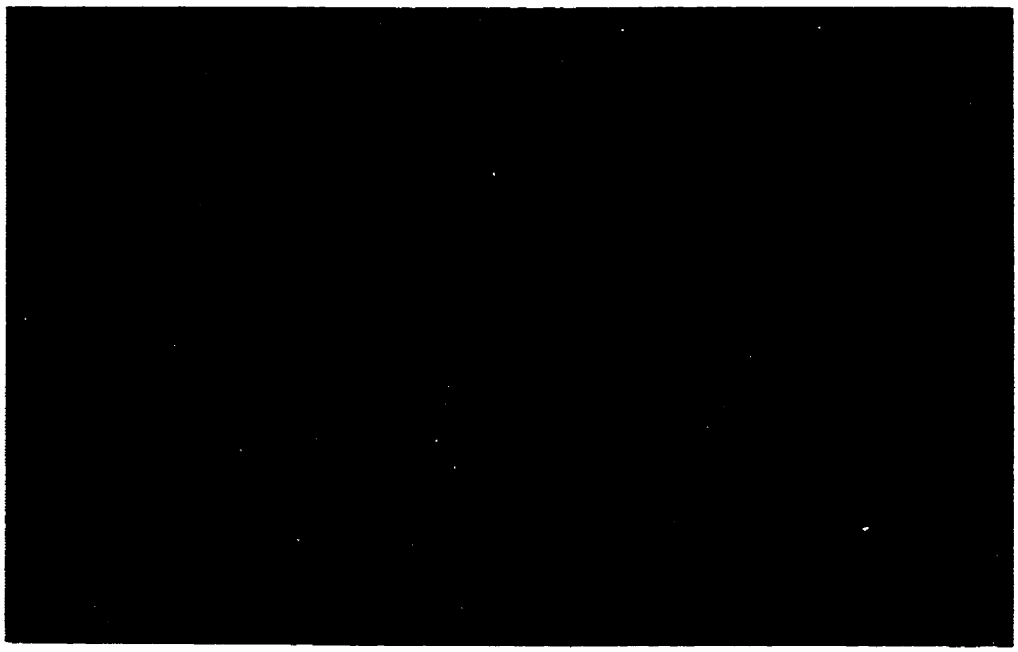


Culture de la microflore indigène de l'eau souterraine de Montréal

- Conditions de croissance:
  - Culture en cuvée: 500 ml H_2O souterraine dans un erlenmeyer (2 L), agitation 200 rpm;
  - 2.5 ml mélasse (50 g/L), 500 µl milieu salin minimal (MSM*);

*Composition MSM:

solution (1M)	concentration dans le milieu (ml sol./L MSM)
$Na_2H_2PO_4$	6.4
$NaNO_3$	11.79
K_2HPO_4	12.99
$(NH_4)_2SO_4$	8.33
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0.39
métaux traces	1.0



- Photo de microscopie par épifluorescence montrant les cellules viables et non-viables

Annexe 3 Caractérisation des sources de carbone pour la stimulation de micro-organismes indigènes des eaux souterraines

- Analyses pour le calcul du ratio C :N :P

sources de carbone	COT (mg C/g)	Ntotal (mg N/g)	Ptotal (mg P/g)
amidon	505.5	0.636	0.529
lactose	486.5	0.003	0.282
mélasse	365.5	0.605	5.136
saccharose	330.0	< 0.001	0.005
sirop de maïs	324.5	0.559	0.220

Les courbes de dosage des glucides sont présentées en Annexe 1

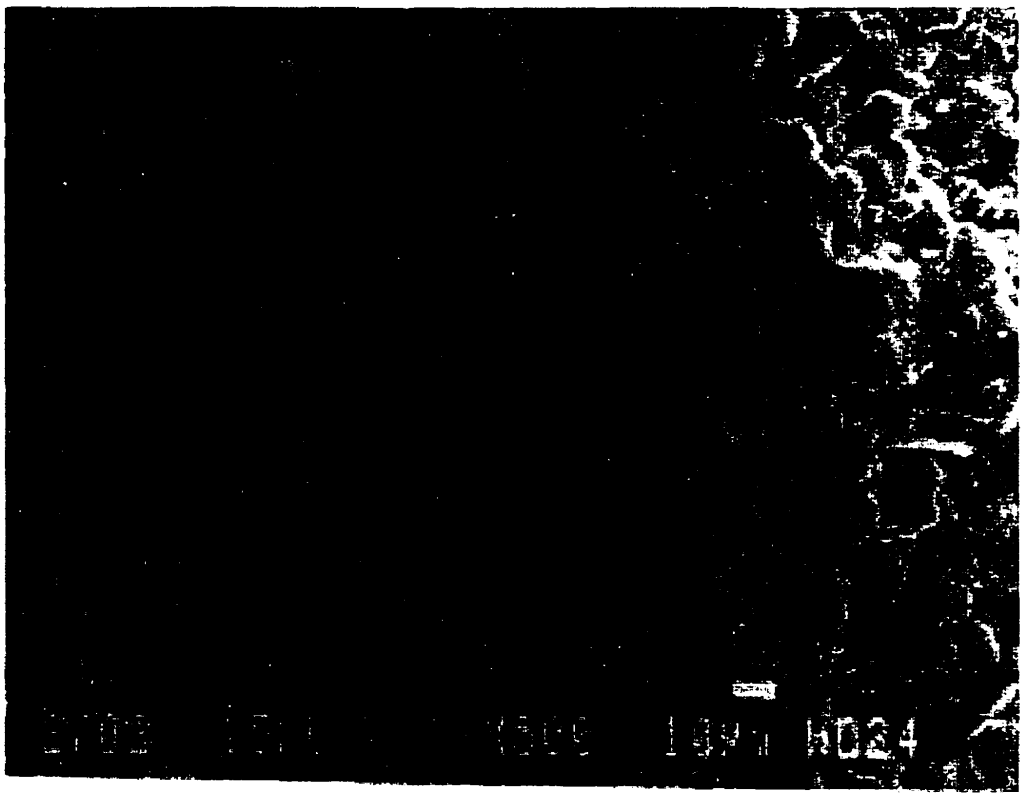
Annexe 4 Caractérisation de la céramique et du calcaire

- Composition minéralogique
- Photos de microscopie électronique

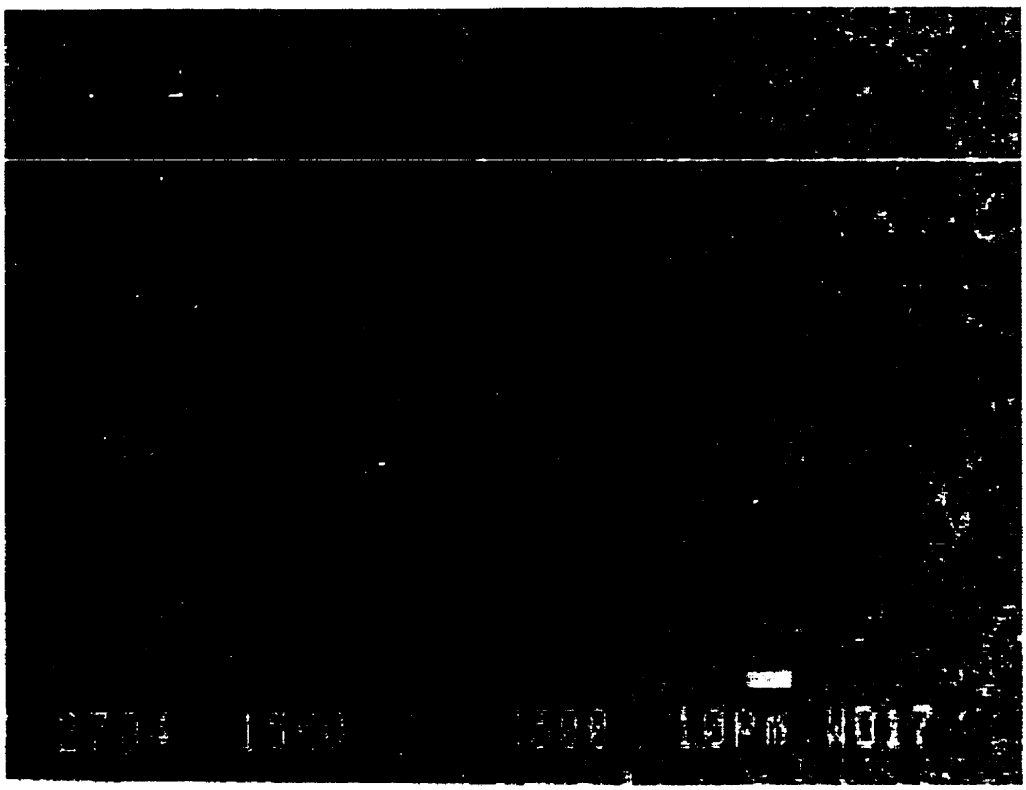
- Composition minéralogique

	proportion (%)	
paramètre	céramique	calcaire
SiO_2	62.6	9.30
TiO_2	0.68	0.02
Al_2O_3	18.9	2.56
CaO	1.29	27.35
MgO	2.9	17.40
Na_2O	1.95	0.05
K_2O	3.98	1.86
Fe_2O_3	7.02	0.93
perte au feu	0.18	39.85

Analyses réalisées par M. Christian Dallaire, Département des génies civil géologique et des mines, École Polytechnique de Montréal



- Microscopie électronique de la surface de la céramique



- Microscopie électronique de la surface du calcaire

Annexe 5 Analyses supplémentaires du biofilm et de l'évaluation écotoxicologique

- Analyses des biofilms prélevés lors de l'étude présentée au Chapitre IV
- Informations complémentaires aux analyses écotoxicologiques discutées au Chapitre IV

Analyses des biofilms prélevés lors de l'étude présentée au Chapitre IV

Essais*	COT (mg/L)	Ntotal (mg/L)	Ca^{2+} (mg/L)	bact. hétérotrophes tot. (NPP/ml)
1	1,46 ± 1,14	1,15 ± 0,45	0,34 ± 0,08	$3,0 \times 10^{4}$
2	2,72 ± 2,30	0,25 ± 0,05	0,52 ± 0,04	$1,1 \times 10^{10}$
3	3,32 ± 2,14	0,35 ± 0,15	0,54 ± 0,09	$2,5 \times 10^{5}$
4	1,68 ± 0,27	0,25 ± 0,05	0,20 ± 0,01	$7,5 \times 10^{5}$
5	1,78 ± 1,37	0,50 ± 0,00	0,65 ± 0,10	$2,4 \times 10^{8}$
6	4,12 ± 3,63	0,25 ± 0,15	0,37 ± 0,13	$1,1 \times 10^{9}$
7	1,98 ± 0,51	0,85 ± 0,65	0,37 ± 0,05	$2,4 \times 10^{8}$
8	1,22 ± 0,52	0,20 ± 0,00	0,42 ± 0,06	$4,3 \times 10^{6}$
i.	5,53 ± 3,52	1,52 ± 0,72	2,33 ± 0,92	$2,3 \times 10^{6}$
ii	3,54 ± 0,70	2,76 ± 1,16	0,33 ± 0,01	$4,6 \times 10^{8}$
iii	6,13 ± 5,08	4,68 ± 1,48	1,18 ± 0,88	$2,4 \times 10^{8}$
iv	4,50 ± 2,80	2,82 ± 0,82	1,38 ± 0,08	$2,3 \times 10^{5}$
v	4,32 ± 1,84	5,88 ± 1,68	0,61 ± 0,04	$2,4 \times 10^{8}$
vi	3,05 ± 0,06	6,26 ± 1,86	0,86 ± 0,28	$2,4 \times 10^{8}$
vii	4,64 ± 1,80	4,22 ± 2,22	0,62 ± 0,04	$2,1 \times 10^{7}$
viii	2,78 ± 0,02	3,52 ± 1,52	1,05 ± 0,70	$1,5 \times 10^{6}$

* : ref. Tableau 4.2

L'ensemble de ces résultats était non significativement différent (COT : $p = 0,82$; Ntotal : $p = 0,27$; Ca^{2+} : $p = 0,86$ et bact. hétérotrophes tot. : $p = 0,30$; avec $\alpha = 95\%$). Leurs moyennes sont : COT = 3,30 ± 1,44 mg/L, Ntotal = 2,21 ± 2,06 mg/L, Ca^{2+} = 0,74 ± 0,52 et bact. hétérotrophes tot. = $8,6 \times 10^{8} \pm 2,6 \times 10^{9}$ NPP/mL.

- Information complémentaire aux analyses écotoxicologiques discutés au Chapitre IV

Échantillons : T1 = eau souterraine synthétique, T2 = eau sout. synt. et mélasse (3.2 mg/L); I1 = idem suite à l'inoculation t = 0 j; I2 = idem après 8 jours de biostimulation; H1 = eau sout. synt., mélasse et PCP (10 mg/L), t = 0 j; H2 = eau sout. synt., mélasse et PCP après 8 jours de biostimulation, B1 et B2 sont des échantillons de biofilms formés dans les réservoirs avec et sans PCP respectivement.

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(CI_{50}, 5 et 15 min. avec Microtox)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (GénieChimique)
Centre de Recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal, (Québec), H3C 3A7

Certificat: TE-1494-96 (1 de 2)
No. dossier: AM1189
Bon de commande: BC012296-GC

No.laboratoire:	16409.1	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv.:	école polytechnique	Mode de conservation:	4°C
Prélevé par:	Client	Date de prélèv.:	25/11/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	10
Apparence de l'échantillon:	incolore
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Presence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	10.2
Temperature (°C):	20
Conductivité (µmhos/cm):	3500
pH:	8.9

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	aucun
Oxygène dissous (mg/L):	N/A
Température (°C):	N/A
Conductivité (µmhos/cm):	N/A
pH:	N/A

RÉSULTATS

No. éch. client	Date réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI_{50}-5 min (%, v/v)	CI_{50}-15min (%, v/v)	CI_{20}-5 min (%, v/v)	CI_{20}-15min (%, v/v)
T1	25/11/96 (10h00)	25/11/96 (13h10)	*Vibrio fisheri*	> 49.5	> 49.5	> 49.5	> 49.5

Référence : BNQ, 1987. Eaux - détermination de de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente Vibrio fisheri. NQ 3600-205/87-11-30.
CI_{50}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 50%.
CI_{20}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 20%.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
N.D.: Non déterminé
N.A.: Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

DATE: Le 12 decembre 1996

A moins de demande explicite du client les echantillons seront entreposes jusqu'au delai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation ecrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tél.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel: (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(CI_{50}, 5 et 15 min. avec Microtox)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (GénieChimique)
Centre de Recherche Biopro. Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal, (Québec), H3C 3A7

Certificat: TE-1493-96 (1 de 2)
No. dossier: AM1189
Bon de commande: BC012296-GC

No.laboratoire:	16410.1	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv.:	école polytechnique	Mode de conservation:	4°C
Prelevé par:	Client	Date de prélèv.:	25/11/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	10
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	9.0
Température (°C):	20
Conductivité (µmhos/cm):	4500
pH:	8.1

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	aucun
Oxygène dissous (mg/L):	N/A
Température (°C):	N/A
Conductivité (µmhos/cm):	N/A
pH:	N/A

RÉSULTATS

No. éch. client	Date réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI_{50}-5 min (%, v/v)	CI_{50}-15min (%, v/v)	CI_{20}-5 min (%, v/v)	CI_{20}-15min (%, v/v)
T2	25/11/96 (10h00)	25/11/96 (13h40)	*Vibrio fisheri*	> 49.5	> 49.5	47.4 (46.8-48.1)	45.1 (34.7-58.5)

Référence : BNQ. 1987. Eaux - détermination de de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente Vibrio fisheri. NQ 3600-205/87-11-30.
CI_{50}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 50%.
CI_{20}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 20%.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
N.D.: Non déterminé
N.A.: Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

DATE: Le 12 décembre 1996

F-100 Ed/rev 1.2

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel: (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(CI_{50}, 5 et 15 min. avec Microtox)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (GénieChimique)
Centre de Recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal, (Québec), J4G 1G6

Certificat: TE-1491-96 (1 de 2)
No. dossier: AM1189
Bon de commande: BC012296-GC

No.laboratoire:	16411.1	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv.:	école polytechnique	Mode de conservation:	4°C
Prélevé par:	Client	Date de prélèv.:	25/11/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	10
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	9.1
Température (°C):	20
Conductivité (µmhos/cm):	4500
pH:	8.1

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	aucun
Oxygène dissous (mg/L):	N/A
Température (°C):	N/A
Conductivité (µmhos/cm):	N/A
pH.	N/A

RÉSULTATS

No. éch. client	Date réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI_{50}-5 min (%, v/v)	CI_{50}-15min (%, v/v)	CI_{20}-5 min (%, v/v)	CI_{20}-15min (%, v/v)
11	25/11/96 (10h00)	25/11/96 (14h05)	*Vibrio fisheri*	> 49.5	> 49.5	45.3 (30.5-67.4)	41.8 (40.3-43.4)

Référence : BNQ, 1987. Eaux - détermination de de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente Vibrio fisheri. NQ 3600-205/87-11-30.
CI_{50}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 50%.
CI_{20}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 20%.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
N.D.: Non déterminé
N.A.: Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard
Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: JBureau
Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

DATE: Le 12 décembre 1996

F-100 Edition 1/2

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montée St-Aubin, Laval (Québec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Québec) Canada H7S 2H6 Tel: (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(CI_{50}, 5 et 15 min. avec Microtox)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (GénieChimique)
Centre de Recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal, (Québec), H3C 3A7

Certificat: TE-1492-96 (1 de 2)
No. dossier: AM1189
Bon de commande: BC012296-GC

No.laboratoire:	16412.1	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv.:	école polytechnique	Mode de conservation:	4°C
Prélevé par:	Client	Date de prélèv.:	25/11/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	10
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	9.3
Température (°C):	20
Conductivité (µmhos/cm):	4500
pH:	8.2

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	aucun
Oxygène dissous (mg/L):	N/A
Température (°C):	N/A
Conductivité (µmhos/cm):	N/A
pH:	N/A

RÉSULTATS

No. éch. client	Date réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI_{50}-5 min (%, v/v)	CI_{50}-15min (%, v/v)	CI_{20}-5 min (%, v/v)	CI_{20}-15min (%, v/v)
12	25/11/96 (10h00)	25/11/96 (14h30)	*Vibrio fisheri*	13.3 (12.1-14.6)	8.4 (7.5-9.4)	4.5 (3.7-5.6)	2.9 (2.6-3.3)

Référence : BNQ, 1987. Eaux - détermination de de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente Vibrio fisheri. NQ 3600-205/87-11-30.
CI_{50}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 50%.
CI_{20}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 20%.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
N.D.: Non déterminé
N.A.: Non applicable

Vérifié par: _____
Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: _____
Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

DATE: Le 12 décembre 1996

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montée St-Aubin, Laval (Québec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Québec) Canada H7S 2H6 Tel: (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(CI_{50}, 5 et 15 min. avec Microtox)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (GénieChimique)
Centre de Recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal, (Québec), H3C 3A7

Certificat: TE-1495-96 (1 de 2)
No. dossier: AM1189
Bon de commande: BC012296-GC

No.laboratoire:	16429.1	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv.:	école polytechnique	Mode de conservation:	4°C
Prélevé par:	Client	Date de prélèv.:	04/12/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	9
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	2.6
Température (°C):	15
Conductivité (µmhos/cm):	9000
pH:	5.8

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	aucun
Oxygène dissous (mg/L):	N/A
Température (°C):	N/A
Conductivité (µmhos/cm):	N/A
pH:	N/A

RÉSULTATS

No. éch. client	Date réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI_{50}-5 min (%, v/v)	CI_{50}-15min (%, v/v)	CI_{20}-5 min (%, v/v)	CI_{20}-15min (%, v/v)
H-1	4/12/96 (10h00)	5/12/96 (10h00)	*Vibrio fisheri*	42.5 (38.8-46.6)	30.8 (29.4-32.3)	21.3 (19.6-23.2)	20.4 (17.7-23.5)

Référence : BNQ, 1987. Eaux - détermination de de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente Vibrio fisheri. NQ 3600-205/87-11-30.
CI_{50}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 50%.
CI_{20}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 20%.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
N.D.: Non déterminé
N.A.: Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

DATE: Le 12 décembre 1996

A moins de demande explicite du client les échantillons seront entreposés jusqu'au delà maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montée St-Aubin, Laval (Québec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard Laval (Québec) Canada H7S 2H6 Tel: (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(CI_{50}, 5 et 15 min. avec Microtox)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (GénieChimique)
Centre de Recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal, (Québec), H3C 3A7

Certificat: TE-1496-96 (1 de 2)
No. dossier: AM1189
Bon de commande: BC012296-GC

No.laboratoire:	16430.1	Méth. de prélèv.:	N.D.	*Transporteur:*	*Client*
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv.:	école polytechnique	Mode de conservation:	4°C
Prélevé par:	Client	Date de prélèv.:	04/12/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	9
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	1.5
Température (°C):	15
Conductivité (µmhos/cm):	8500
pH:	6.2

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	aucun
Oxygène dissous (mg/L):	N/A
Température (°C):	N/A
Conductivité (µmhos/cm):	N/A
pH:	N/A

RÉSULTATS

No. éch. client	Date réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI_{50}-5 min (%, v/v)	CI_{50}-15min (%, v/v)	CI_{20}-5 min (%, v/v)	CI_{20}-15min (%, v/v)
H-2	4/12/96 (10h00)	5/12/96 (13h00)	*Vibrio fisheri*	15.6 (14.4-17.0)	11.0 (9.8-12.4)	5.2 (4.5-6.0)	4.2 (3.6-5.0)

Référence : BNQ, 1987. Eaux - détermination de de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente Vibrio fisheri. NQ 3600-205/87-11-30.
CI_{50}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 50%.
CI_{20}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 20%.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
N.D.: Non déterminé
N.A.: Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

DATE: Le 12 décembre 1996

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 •Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel.: (514) 682-3240 •Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(CI_{50}, 5 et 15 min. avec Microtox)

Client: Madame Nathalie Ross
Ecole Polytechnique (GénieChimique)
Centre de Recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal, (Québec), H3C 3A7

Certificat: TE-1497-96 (1 de 2)
No. dossier: AM1189
Bon de commande: BC012296-GC

No.laboratoire:	16431.1	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv.:	école polytechnique	Mode de conservation:	4°C
Prélevé par:	Client	Date de prélèv.:	04/12/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	9
Apparence de l'échantillon:	incolore
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	9.0
Température (°C):	15
Conductivité (µmhos/cm):	13500
pH:	7.2

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	aucun
Oxygène dissous (mg/L):	N/A
Température (°C):	N/A
Conductivité (µmhos/cm):	N/A
pH:	N/A

RÉSULTATS

No. éch. client	Date réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI_{50}-5 min (%, v/v)	CI_{50}-15min (%, v/v)	CI_{20}-5 min (%, v/v)	CI_{20}-15min (%, v/v)
B-1	4/12/96 (10h00)	5/12/96 (14h30)	*Vibrio fisheri*	> 49.5	> 49.5	> 49.5	> 49.5

Référence : BNQ, 1987. Eaux - détermination de de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente Vibrio fisheri. NQ 3600-205/87-11-30.
CI_{50}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 50%.
CI_{20}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 20%.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
N.D.: Non déterminé
N.A.: Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

DATE: Le 12 décembre 1996

F-100 Ed./rev. 1/2

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Québec) Canada H7L 4E4 Tel : (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Québec) Canada H7S 2H6 Tel : (514) 682-3240 • Fax. (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(CI_{50}, 5 et 15 min. avec Microtox)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (GénieChimique)
Centre de Recherche Biopro. Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal, (Québec), H3C 3A7

Certificat: TE-1498-96 (1 de 2)
No. dossier: AM1189
Bon de commande: BC012295-GC

No.laboratoire:	16432.1	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv.:	école polytechnique	Mode de conservation:	4°C
Prélevé par:	Client	Date de prélèv.:	04/12/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	9
Apparence de l'échantillon:	incolore
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	10.0
Température (°C):	15
Conductivite (µmhos/cm):	13500
pH:	7.0

CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	aucun
Oxygène dissous (mg/L):	N/A
Température (°C):	N/A
Conductivité (µmhos/cm):	N/A
pH:	N/A

RÉSULTATS

No. éch. client	Date réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI_{50}-5 min (%, v/v)	CI_{50}-15min (%, v/v)	CI_{20}-5 min (%, v/v)	CI_{20}-15min (%, v/v)
B-2	4/12/96 (10h00)	5/12/96 (15h30)	*Vibrio fisheri*	> 49.5	> 49.5	> 49.5	> 49.5

Référence : BNQ, 1987. Eaux - détermination de de la toxicité méthode avec la bactérie bioluminescente Vibrio fisheri. NQ 3600-205/87-11-30.
CI_{50}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 50%.
CI_{20}: Concentration inhibitrice qui réduit la bioluminescence de 20%.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
N.D.: Non déterminé
N.A.: Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

DATE: Le 12 décembre 1996

F-100 Ed/rev 1/2

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au delà maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE VERTE)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (Génie chimique)
Centre de recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900, boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal (Qc), H3C 3A7

Certificat : TE-1499-96 (1 de 2)
No.Dossier. AM-1189
Bon de commande: BC012296-GC

No. Laboratoire:	16409.2	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv:	École Polytechnique	Mode de conservation:	: 4 degré C
Prélevé par:	Client	Date de prélèvement:	25/11/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	10
Apparence de l'échantillon:	incolore
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	10.2
Tempéature (°C):	20
Conductivité(µmhos/cm):	3500
pH:	8.9

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	filtrée sur membrane 0.45µm
Oxygène dissous (mg/L):	N.A.
Température (°C):	N.A.
Conductivité (µmhos/cm):	N.A.
pH:	N.A.

RESULTATS

No éch. Client	Date de réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI50-72h[1] (%,v/v (IC.95%))	CMEO[2] (%,v/v)	CSEO[2] (%, v/v)	CSE (%,v/v)
T1	25/11/96 (10h00)	25/11/96 (16h30)	*Selenastrum capricornutum*	0.95 (N.C.)	N.C.	N.C.	N.C.

Méthode de calcul: 1. ICP 2. Rang de Steel

Référence: Environnement Canada, 1992. Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Série de la Protection de l'environnement, Ottawa (Ontario). Rapport SPE1/RM/25, Novembre 1992.

CSEO: Concentration sans effet observé.
CMEO: Concentration minimale avec effet observé.
CI50 ou 25: Concentration qui inhibe 50 ou 25% du paramètre mesuré (croissance)
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
CSE: Concentration seuil d'effet.
N.D. Non disponible
N.A. Non applicable
N.C. Non calculable

Vérifié par: Sophie Picard
Sophie Picard, DEC.

Date: 17 décembre 1996

Approuvé par: J. Bureau
Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

F-100 Ed./rev. ½

modèle algue cot

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel : (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel (514) 682-3240 • Fax. (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE VERTE)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (Génie chimique)
Centre de recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900, boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal (Qc), H3C 3A7

Certificat : TE-1500-96 (1 de 2)
No.Dossier: AM-1189
Bon de commande: BC012296-GC

No. Laboratoire:	16410.2	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv:	École Polytechnique	Mode de conservation:	: 4 degré C
Prélevé par:	Client	Date de prélèvement:	25/11/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	10
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	9.0
Tempéature (°C):	20
Conductivité(µmhos/cm):	4500
pH:	8.1

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	filtrée sur membrane 0.45µm
Oxygène dissous (mg/L):	N.A.
Température (°C):	N.A.
Conductivité (µmhos/cm):	N.A.
pH:	N.A.

RESULTATS

No éch. Client	Date de réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI50-72h[1] (%,v/v (IC.95%))	CMEO[2] (%,v/v)	CSEO[2] (%, v/v)	CSE (%,v/v)
T2	25/11/96 (10h00)	25/11/96 (16h30)	*Selenastrum capricornutum*	14.69 (13.96 - 15.68)	17	9	12.4

Méthode de calcul: 1. ICP 2. Rang de Steel

Référence: Environnement Canada, 1992. Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Série de la Protection de l'environnement, Ottawa (Ontario). Rapport SPE1/RM/25, Novembre 1992.

CSEO: Concentration sans effet observé.
CMEO: Concentration minimale avec effet observé.
CI50 ou 25: Concentration qui inhibe 50 ou 25% du paramètre mesuré (croissance)
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
CSE: Concentration seuil d'effet.
N.D. Non disponible
N.A. Non applicable
N.C. Non calculable

Vérifié par: Sophie Picard
Sophie Picard, DEC.

Date: 17 décembre 1996

Approuvé par: Jacques Bureau
Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel : (514) 682-3240 • Fax (514) 682-6995
914 rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel (514) 682-3240 • Fax (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE VERTE)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (Génie chimique)
Centre de recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900, boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal (Qc), H3C 3A7

Certificat : TE-1501-96 (1 de 2)
No Dossier: AM-1189
Bon de commande: BC012296-GC

No. Laboratoire:	16411.2	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv:	École Polytechnique	Mode de conservation:	: 4 degré C
Prélevé par:	Client	Date de prélèvement:	25/11/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	10
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	9.1
Tempéature (°C):	20
Conductivité(µmhos/cm):	4500
pH:	8.1

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	filtrée sur membrane 0.45µm
Oxygène dissous (mg/L):	N.A.
Température (°C):	N.A.
Conductivité (µmhos/cm):	N.A.
pH:	N.A.

RESULTATS

No éch. Client	Date de réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI50-72h[1] (%,v/v (IC.95%))	CMEO[2] (%,v/v)	CSEO[2] (%, v/v)	CSE (%,v/v)
11	25/11/96 (10h00)	25/11/96 (16h30)	*Selenastrum capricornutum*	13.90 (13.18 - 14.58)	17	9	12.4

Méthode de calcul: 1. ICP 2. Rang de Steel

Référence: Environnement Canada, 1992. Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Série de la Protection de l'environnement, Ottawa (Ontario). Rapport SPE1/RM/25, Novembre 1992.

CSEO: Concentration sans effet observé.
CMEO: Concentration minimale avec effet observé.
CI50 ou 25: Concentration qui inhibe 50 ou 25% du paramètre mesuré (croissance)
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
CSE: Concentration seuil d'effet.
N.D. Non disponible
N.A. Non applicable
N.C. Non calculable

Vérifié par: Sophie Picard
Sophie Picard, DEC.

Date: 17 décembre 1996

Approuvé par: J. Bureau
Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

F-100 Ed/rev. ½

modele algue dot

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel : (514) 682-3240 •Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel. (514) 682-3240 •Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ (INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE VERTE)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (Génie chimique)
Centre de recherche Biopro. Succ. Centre Ville
2900, boul. Edouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal (Qc), H3C 3A7

Certificat : TE-1502-96 (1 of 2)
No.Dossier: AM-1189
Bon de commande: BC012296-GC

No. Laboratoire:	16412.2	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv:	École Polytechnique	Mode de conservation:	: 4 degré C
Prélevé par:	Client	Date de prélèvement:	25/11/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	10
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	9.3
Tempéature (°C):	20
Conductivité(µmhos/cm):	4500
pH:	8.2

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	filtrée sur membrane 0.45µm
Oxygène dissous (mg/L):	N.A.
Température (°C):	N.A.
Conductivité (µmhos/cm):	N.A.
pH:	N.A.

RESULTATS

No éch. Client	Date de réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI50-72h[1] (%,v/v (IC.95%))	CMEO[2] (%,v/v)	CSEO[2] (%, v/v)	CSE (%,v/v)
12	25/11/96 (10h00)	25/11/96 (16h30)	*Selenastrum capricornutum*	0.22 (0.08 - 0.46)	0.1	0.01	0.03

Méthode de calcul: 1. ICP 2. Rang de Steel

Référence: Environnement Canada, 1992. Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Série de la Protection de l'environnement, Ottawa (Ontario). Rapport SPE1/RM/25, Novembre 1992.

CSEO: Concentration sans effet observé.
CMEO: Concentration minimale avec effet observé.
CI50 ou 25: Concentration qui inhibe 50 ou 25% du paramètre mesuré (croissance)
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
CSE: Concentration seuil d'effet.
N.D. Non disponible
N.A. Non applicable
N.C. Non calculable

Vérifié par: Sophie Picard
Sophie Picard, DEC.

Date: 17 décembre 1996

Approuvé par: Bureau
Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

F-100 Ed./rev. 5 modele algue.dot

À moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montée St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel : (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel (514) 682-3240 • Fax. (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE VERTE)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (Genie Chimique)
Centre de Recherche Biopro. Succ. Centre Ville
2900 boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal (Québec), H3C 3A7

Certificat : TE-1514-96 (1 de 2)
No.Dossier: AM-1189
Bon de commande: BC012296-GC

No. Laboratoire:	16429.2	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv:	École Polytechnique	Mode de conservation:	: 4 degré C
Prélevé par:	Client	Date de prélèvement:	4/12/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	9
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	2.6
Tempéature (°C):	15
Conductivité(µmhos/cm):	9000
pH:	5.8

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	filtrée sur membrane 0.45µm
Oxygène dissous (mg/L):	N.A.
Température (°C):	N.A.
Conductivité (µmhos/cm):	N.A.
pH:	N.A.

RESULTATS

No éch. Client	Date de réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI50-72h[1] (%,v/v (IC.95%))	CMEO[2] (%,v/v)	CSEO[2] (%, v/v)	CSE (%,v/v)
H-1	4/12/96 (10h00)	4/12/96 (15h15)	*Selenastrum capricornutum*	40.59 (30.10 - 47.21)	9	1	3

Méthode de calcul: 1. ICP 2. Dunnett

Référence: Environnement Canada, 1992. Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Série de la Protection de l'environnement, Ottawa (Ontario). Rapport SPE1/RM/25. Novembre 1992.

CSEO: Concentration sans effet observé.
CMEO: Concentration minimale avec effet observé.
CI50: Concentration qui inhibe 50 du paramètre mesuré (croissance)
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
CSE: Concentration seuil d'effet.
N.D. Non disponible
N.A. Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard
Sophie Picard, DEC.

Date: 18 décembre 1996

Approuvé par: J. Bureau
Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

F-100 Ed./rev. *; modèle algue.dot

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Québec) Canada H7L 4E4 Tel : (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914 rue Cunard, Laval (Québec) Canada H7S 2H6 Tel (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ (INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE VERTE)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (Génie chimique)
Centre de recherche Biopro. Succ. Centre Ville
2900, boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal (Qc), H3C 3A7

Certificat : TE-1504-96 (1 de 2)
No.Dossier: AM-1189
Bon de commande: BC012296-GC

No. Laboratoire:	16430.2	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv:	École Polytechnique	Mode de conservation:	: 4 degré C
Prélevé par:	Client	Date de prélèvement:	4/12/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	9
Apparence de l'échantillon:	brun
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	1.5
Tempéature (°C):	15
Conductivité(µmhos/cm):	8500
pH:	6.2

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	filtrée sur membrane 0.45µm
Oxygène dissous (mg/L):	N.A.
Température (°C):	N.A.
Conductivité (µmhos/cm):	N.A.
pH:	N.A.

RESULTATS

No éch. Client	Date de reception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI50-72h[1] (%,v/v (IC.95%))	CMEO[2] (%,v/v)	CSEO[2] (%, v/v)	CSE (%,v/v)
H-2	4/12/96 (10h00)	4/12/96 (15h15)	*Selenastrum capricornutum*	4.65 (0.76 - 6.94)	9	1	3

Méthode de calcul: 1. ICP 2. Rang de Steel

Référence: Environnement Canada, 1992. Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Série de la Protection de l'environnement, Ottawa (Ontario). Rapport SPE1/RM/25, Novembre 1992.

CSEO: Concentration sans effet observé.
CMEO: Concentration minimale avec effet observé.
CI50: Concentration qui inhibe 50 du paramètre mesuré (croissance)
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
CSE: Concentration seuil d'effet.
N.D. Non disponible
N.A. Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard
Sophie Picard, DEC.

Date: 17 décembre 1996

Approuvé par: J. Bureau
Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite.

3025, Montée St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 •Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel: (514) 682-3240 •Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ (INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE VERTE)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (Génie chimique)
Centre de recherche Biopro. Succ. Centre Ville
2900, boul. Edouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal (Qc), H3C 3A7

Certificat : TE-1502-96 (1 de 2)
No.Dossier: AM-1189
Bon de commande: BC012296-GC

No. Laboratoire:	16431.2	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv:	École Polytechnique	Mode de conservation:	: 4 degré C
Prélevé par:	Client	Date de prélèvement:	4/12/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	9
Apparence de l'échantillon:	incolore
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	9.0
Température (°C):	15
Conductivité(µmhos/cm):	13500
pH:	7.2

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	filtrée sur membrane 0.45µm
Oxygène dissous (mg/L):	N.A.
Température (°C):	N.A.
Conductivité (µmhos/cm):	N.A.
pH:	N.A.

RESULTATS

No éch. Client	Date de réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI50-72h[1] (%,v/v (IC.95%))	CMEO[2] (%,v/v)	CSEO[2] (%, v/v)	CSE (%,v/v)
B-1	4/12/96 (10h00)	4/12/96 (15h15)	*Selenastrum capricornutum*	23.34 (21.12 - 26.55)	9	1	3

Méthode de calcul: 1. ICP 2. Dunnett
Référence: Environnement Canada, 1992. Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Série de la Protection de l'environnement, Ottawa (Ontario). Rapport SPE1/RM/25. Novembre 1992.
CSEO: Concentration sans effet observé.
CMEO: Concentration minimale avec effet observé.
CI50: Concentration qui inhibe 50 du paramètre mesuré (croissance)
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
CSE: Concentration seuil d'effet.
N.D. Non disponible
N.A. Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard, DEC.

Date: 17 décembre 1996

Approuvé par: Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

F-100 Ed./rev. '4 modèle: algue.dot

A moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montée St-Aubin, Laval (Québec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Québec) Canada H7S 2H6 Tél.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Analex Inc.

CERTIFICAT D'ESSAI DE TOXICITÉ
(INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE VERTE)

Client: Madame Nathalie Ross
École Polytechnique (Génie chimique)
Centre de recherche Biopro, Succ. Centre Ville
2900, boul. Édouard Montpetit, C.P. 6079
Montréal (Qc), H3C 3A7

Certificat: TE-1505-96 (1 de 2)
No.Dossier: AM-1189
Bon de commande: BC012296-GC

No. Laboratoire:	16432.2	Méth. de prélèv.:	N.D.	Transporteur:	Client
Produit:	eau souterraine	Endroit de prélèv:	École Polytechnique	Mode de conservation:	: 4 degré C
Prélevé par:	Client	Date de prélèvement:	4/12/96 (9h00)		

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON À LA RÉCEPTION	
Température de l'échantillon (°C):	9
Apparence de l'échantillon:	incolore
Odeur de l'échantillon:	inodore
Matières solides dans l'échantillon:	présence
Présence d'air entre le couvercle et l'échantillon:	présence

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON AVANT L'ESSAI	
Oxygène dissous (mg/L):	10.0
Tempéature (°C):	15
Conductivité(µmhos/cm):	13500
pH:	7.0

CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉCHANTILLON APRÈS TRAITEMENT	
Traitement de l'échantillon:	filtrée sur membrane 0.45µm
Oxygène dissous (mg/L):	N.A.
Température (°C):	N.A.
Conductivité (µmhos/cm):	N.A.
pH:	N.A.

RESULTATS

No éch. Client	Date de réception (heure)	Date d'analyse (heure)	Organisme d'essai	CI50-72h[1] (%,v/v (IC.95%))	CMEO[2] (%,v/v)	CSEO[2] (%, v/v)	CSE (%,v/v)
B-2	4/12/96 (10h00)	4/12/96 (15h15)	*Selenastrum capricornutum*	8.0 (7.14 - 9.82)	9	1	3

Méthode de calcul: 1. ICP 2. Rang de Steel

Référence: Environnement Canada, 1992. Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. Série de la Protection de l'environnement, Ottawa (Ontario). Rapport SPE1/RM/25, Novembre 1992.

CSEO: Concentration sans effet observé.
CMEO: Concentration minimale avec effet observé.
CI50: Concentration qui inhibe 50 du paramètre mesuré (croissance)
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
CSE: Concentration seuil d'effet.
N.D. Non disponible
N.A. Non applicable

Vérifié par: Sophie Picard, DEC.

Approuvé par: Jacques Bureau, M.Sc. DEA.

Date: 17 décembre 1996

F-100 Ed./rev. 5 modèle algue dot

À moins de demande explicite du client, les échantillons seront entreposés jusqu'au délai maximal de conservation analytique ou pour un maximum de 30 jours. Toute reproduction totale ou partielle est interdite sans autorisation écrite

3025, Montee St-Aubin, Laval (Quebec) Canada H7L 4E4 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 682-6995
914, rue Cunard, Laval (Quebec) Canada H7S 2H6 Tel.: (514) 682-3240 • Fax: (514) 669-7544

Annexe 6 Comparaison des fractions microbiennes du filtrat et du rétentat, issues d'une filtration sur une membrane de diamètre de pores 0,4 µm, effectuée lors de l'expérimentation sur les UMB (Chapitre V)

- Énumération des bactéries hétérotrophes et hydrophobicité de surface
- Comparaison de viabilité initiale et pendant la biostimulation en réservoir de 1 L
- Comparaison de la concentration d'EPS en suspension
- Épaisseur du biofilm développé sur la céramique
- Développement de coloration d'une plaque Biolog GN inoculée avec les fractions microbiennes de l'eau et les biofilms développés sur la céramique: A: nombre de puits positifs et B: "Average Well Color Development" (AWCD, mesuré au jour 7)

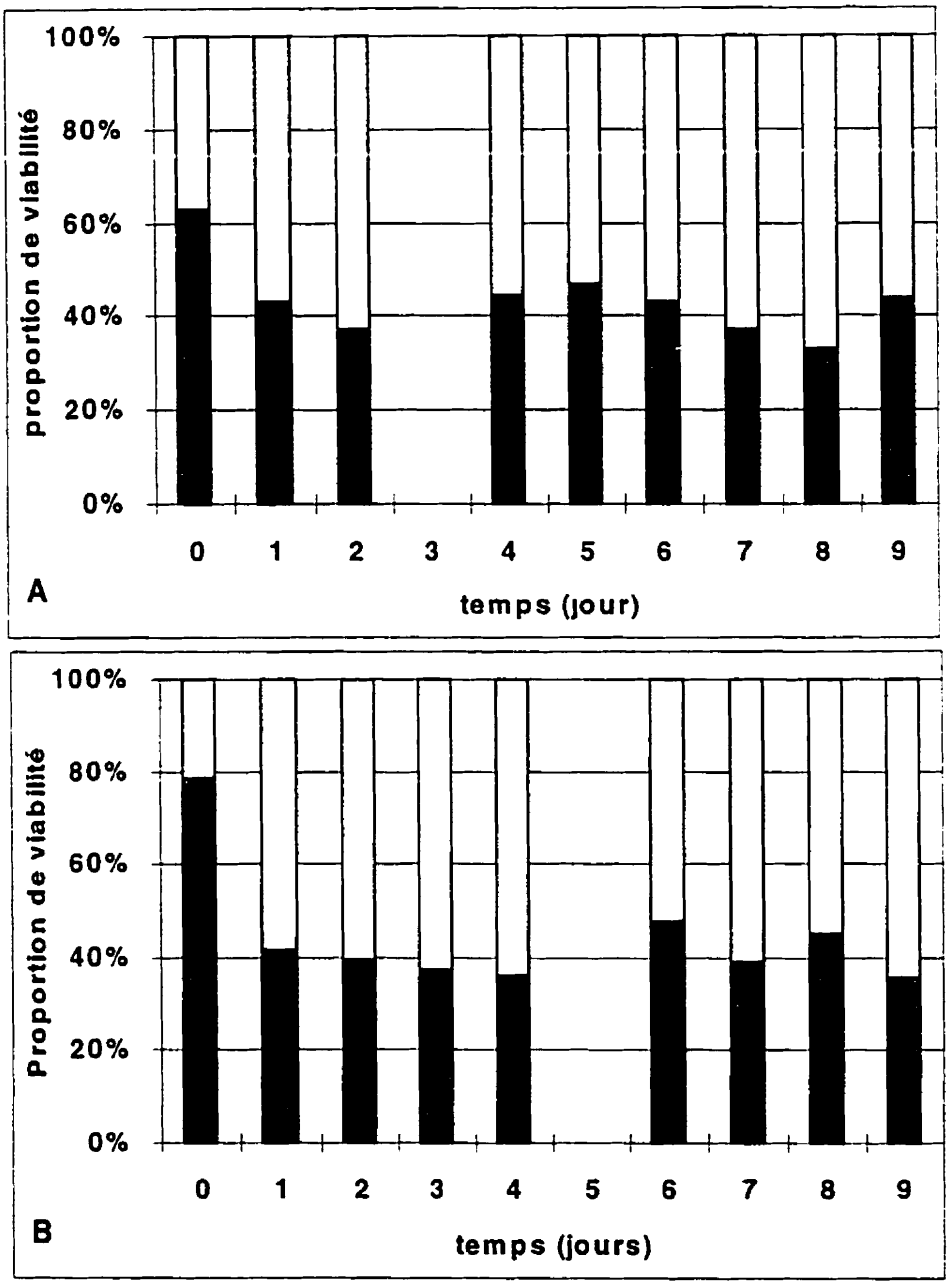
- Énumération des bactéries hétérotrophes et hydrophobicité de surface dans l'eau souterraine initialement

analyse	UMB	bact. du filtrat
• hétérotrophes totales (NPP/100 ml)	$1{,}65 \times 10^{2}$	$2{,}01 \times 10^{4}$
	$(0{,}32 \times 10^{2} - 4{,}5 \times 10^{2})^{a}$	$(0{,}33 \times 10^{4} - 4{,}6 \times 10^{4})$
• énumération directe (bact.tot / ml)	$2{,}4 \times 10^{5} \pm 2{,}9 \times 10^{4}$[b]	$1{,}6 \times 10^{-5} \pm 5{,}4 \times 10^{4}$
• hydrophobicité de surface (% bact. adhérantes sur l'hexadécane)	$14{,}3 \pm 1{,}9$	$19{,}4 \pm 2{,}5$

[a]: erreur standard provenant de la méthode du NPP (Annexe 1 p.199), [b]: écart-type provenant des duplicats.

Le dénombrement des bactéries hétérotrophes montre une proportion d'UMB de 0.8%. En réalisant un dénombrement direct avec la méthode BacLight™ (Annexe 1 p.199), la proportion de UMB s'avère de 60 %. Tel que rapporté dans la littérature, ce résultat montre que les UMB provenant de milieux naturels sont difficilement cultivables mais aussi, que leur proportion peut être supérieure aux bactéries de taille «normale» (Amy et Morita, 1983; Decamp *et al.*, 1997).

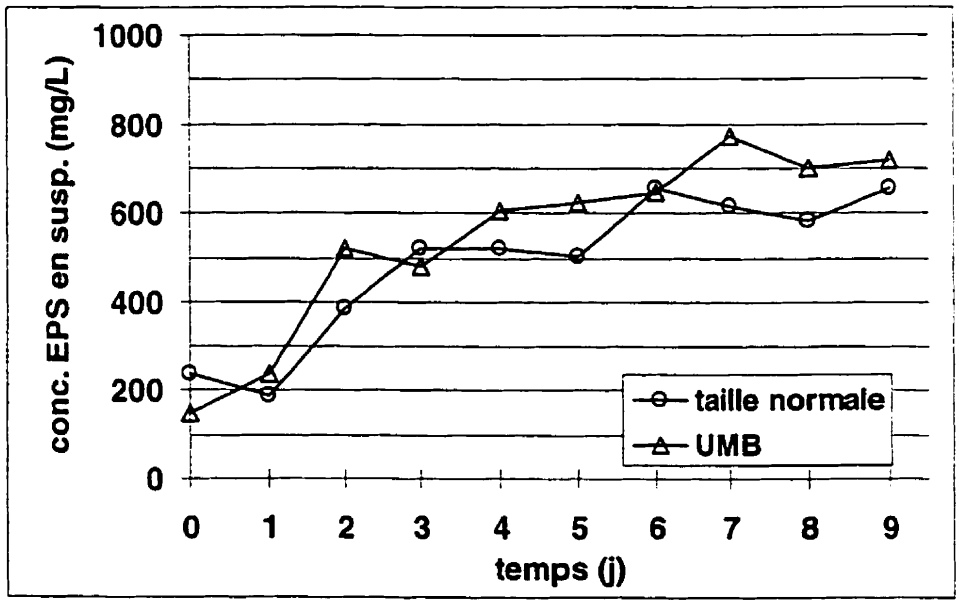
- Comparaison de la viabilité



Viabilité des bactéries de taille «normale» (A) et des ultramicrobactéries (B) mesurée pendant une biostimulation: barres grises = proportion de cellules viables, barres blanches = proportion de cellules non-viables.

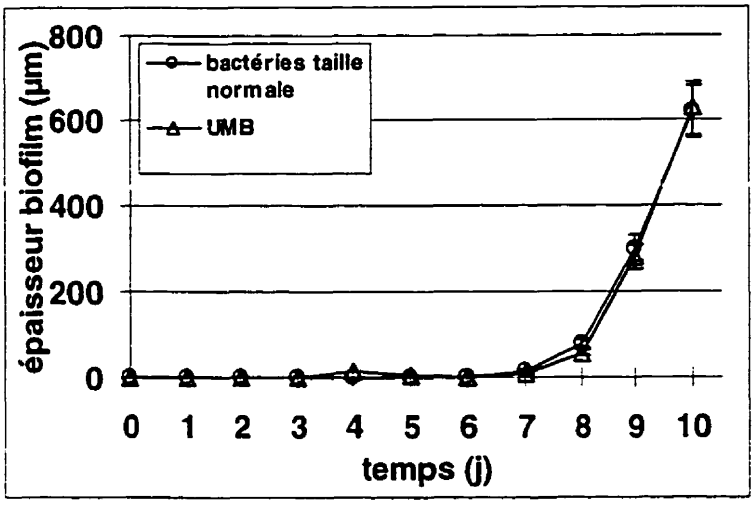
L'analyses statistique de ces résultats a révélé un effet significatif du temps (p = 0,0000) alors que le type de bactéries n'a pas démontré de différence significative (p = 0,17). Néanmoins, une étude attentive du graphique montre que la viabilité des UMB lors de l'inoculation (t = 0 j) était élevée, soit environ 80 % représentant 1.1×10^5 bactéries viables/ml et 2.8×10^4 bactéries non-viables/ml. Cette différence pourrait indiquer une modification de la membrane des bactéries en dormance, une différence qui se résorberait rapidement en conditions copiotrophique.

- Comparaison de la concentration d'EPS en suspension



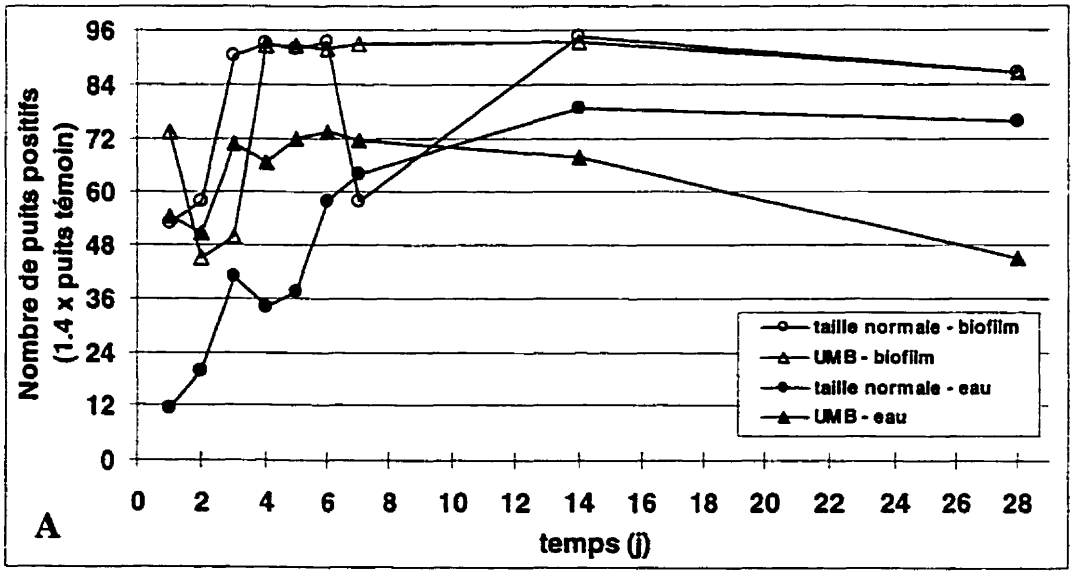
La sécrétion d'EPS par les bactéries de taille normale et UMB n'était pas significativement différente (p = 0,57). Par contre comme l'indique le graphique, le temps de biostimulation en réservoir de 1 L est un facteur significatif (p = 0,0000).

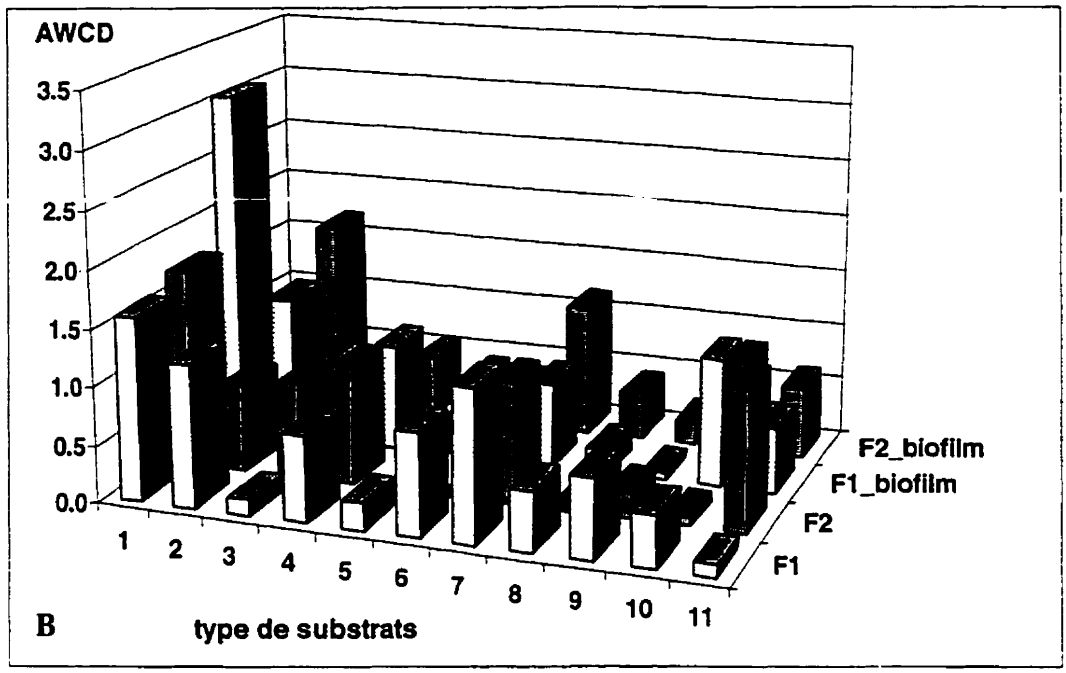
- Épaisseur du biofilm développé sur la céramique



La biostimulation a été significative pour le développement du biofilm ($p = 0,0000$). Les fractions microbiennes n'ont pas développé un biofilm d'une épaisseur significativement différente ($p = 0,29$).

- Développement d'une coloration d'une plaque Biolog GN inoculée avec les fractions microbiennes initiales et les biofilms développés sur la céramique: A: nombre de puits positifs et B:Average Well Color Development (AWCD, mesuré au jour 7)



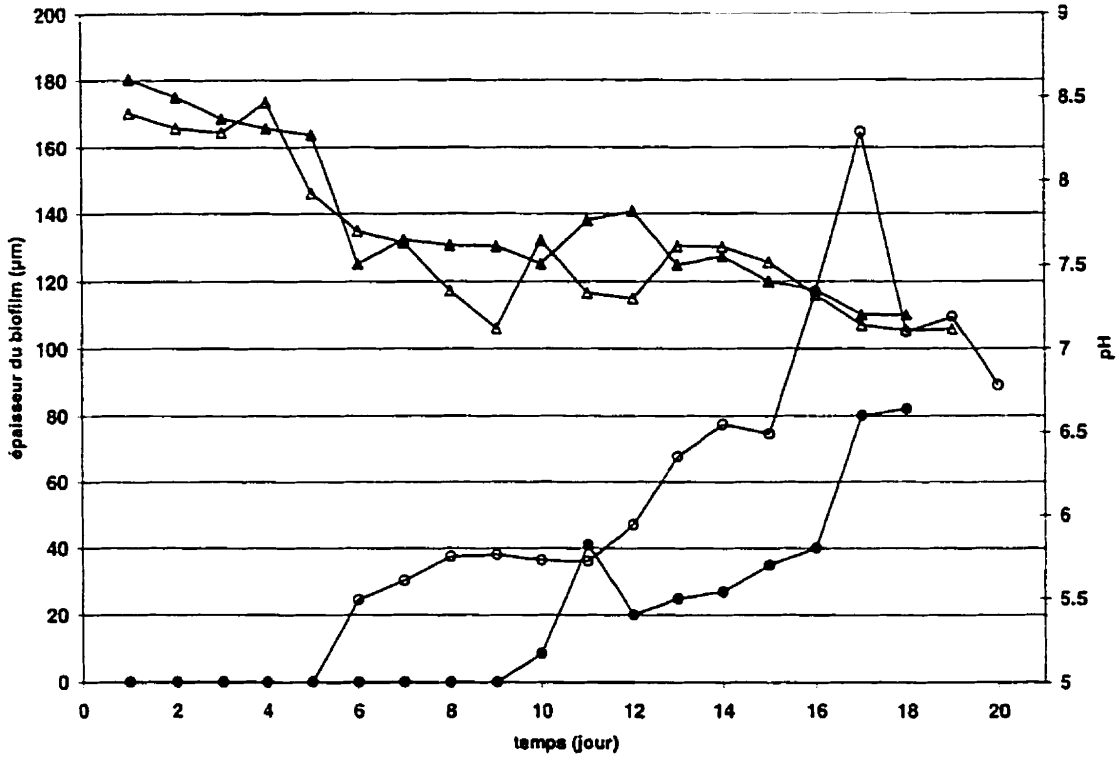


Le nombre de puits positifs (A) (absorbance = 1.4 x le puits témoin) était significativement différent entre les échantillons d'eau et de biofilm (p = 0,04). Par contre les types de bactéries, tant dans l'eau initialement que dans le biofilm, n'ont pas oxydés un nombre significativement différents de substrats de la microplaque Biolog (p = 0,39). Une différence significative entre l'oxydation des 11 types de substrats a été mesurée (B) (p = 0,0000).

Annexe 7 Biostimulation de microflores isolées de différentes eaux souterraines: suivi du pH et de l'épaisseur du biofilm développé sur la céramique

- Développement de biofilms sur la céramique en réservoirs de 1 L

Des microflores indigènes isolées d'eaux souterraines de Trois-Rivières et de Ville de Mirabel ont été stimulées pour le développement de biofilms sur une céramique (description de l'eau souterraine de Trois-Rivières: projet de Maîtrise de (Martineau, 1999)).



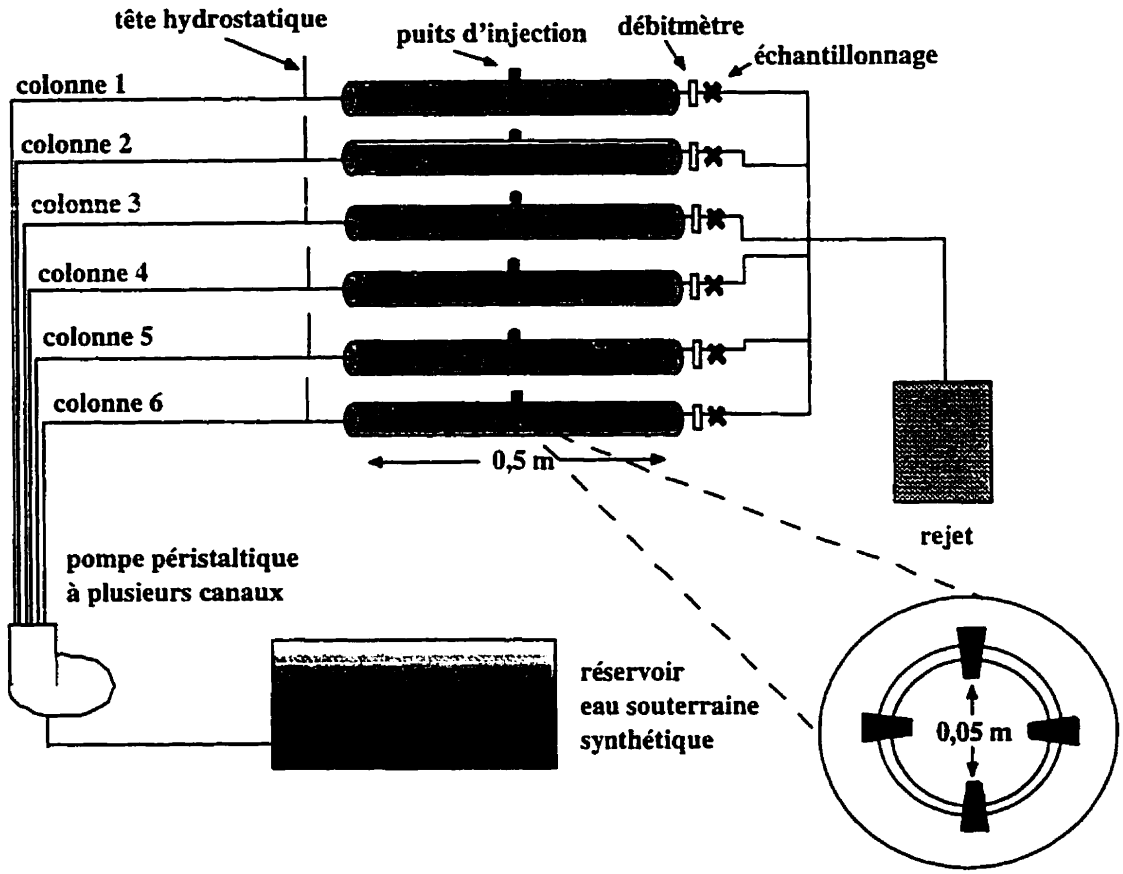
- Développement de biofilms sur la céramique en réservoirs de 1 L: épaisseur du biofilm (○) et pH (Δ) de la microflore de Trois-Rivières; épaisseur du biofilm (●) et pH (▲) de la microflore de Ville de Mirabel.

Ces deux microflores ont été isolées d'eaux souterraines contaminées. La présence de contaminants peut expliquer le développement d'un biofilm d'épaisseur inférieure à ceux mesurés avec la microflore de Montréal (Chapitres IV et V). En observant la figure précédente, on peut constater que la microflore provenant de la région de Trois-Rivières a formé un biofilm plus épais que la microflore de « Mirabel ». La présence d'hydroxydes

de fer dans l'eau souterraine de Trois-Rivières peut avoir contribué à l'augmentation de l'épaisseur du biofilm sur la céramique.

Annexe 8 Essais préliminaires de colmatage utilisant une colonne de sable

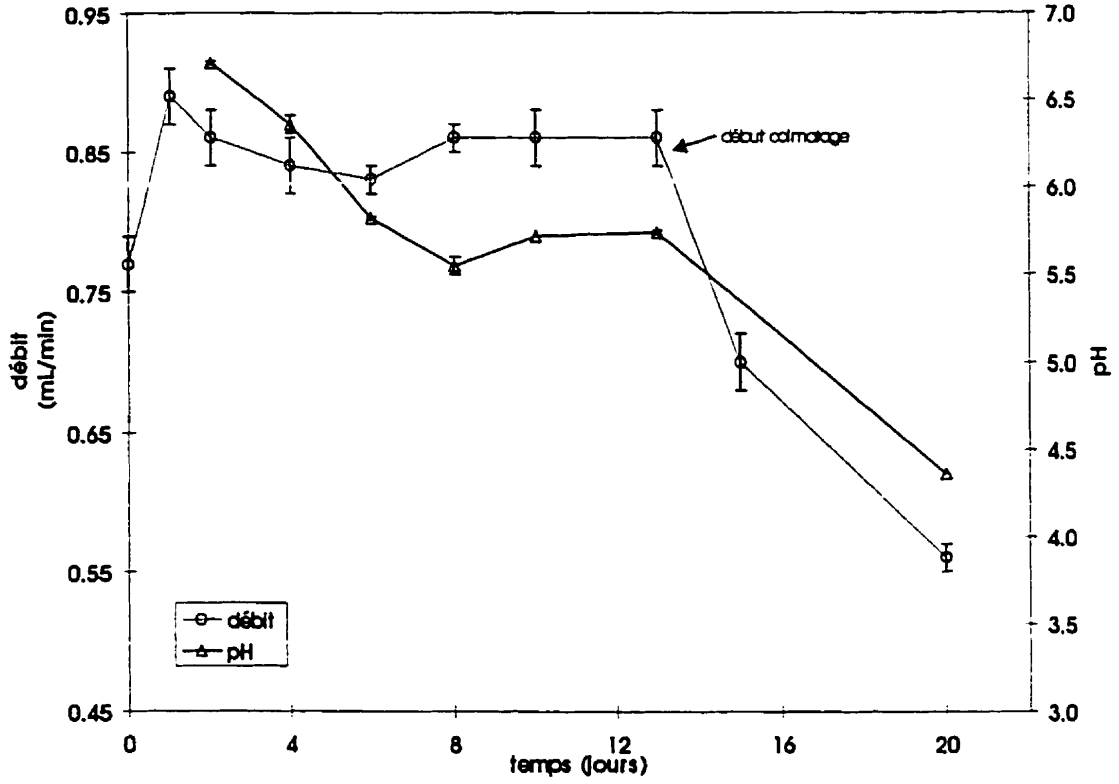
- Montage de colonnes de sable pour l'étude du biocolmatage
- Colmatage des pores d'une colonne de sable



- Montage de colonnes de sable pour l'étude du biocolmatage

- Conditions d'opération de l'essai préliminaire sur une colonne:

- sable de granulométrie : 0.5 mm
- eau souterraine synthétique
- température : 10 °C
- colonne de plexiglass : diamètre 5 cm, longueur 50 cm
- solution nutritive : 20 mg/L glucose et C :N :P = 146 :4 :1, balancée avec de l'urée et phosphate de potassium
- inoculation de la colonne avec de l'eau souterraine préalablement incubée à 30 °C pendant 24 hrs avec du sable



- Colmatage des pores d'une colonne de sable

Annexe 9 Extrait du Règlement modifiant le *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (LCPE)

- Annexe XV : renseignements exigés à l'égard des micro-organismes
- Annexe XVI : renseignements exigés à l'égard des micro-organismes non destinés à être introduits à l'extérieur d'une installation étanche ou destinés uniquement à l'exportation
- Annexe XVII : renseignements exigés à l'égard des micro-organismes destinés à être introduits dans le cadre d'une étude expérimentale sur le terrain
- Annexe VIII : renseignements exigés à l'égard des micro-organismes destinés à être introduits dans le site auquel ils ont été isolés

ANNEXE XV

(article 29.11, alinéas 29.12a) et 29.13a) et paragraphes 29.14(1) et (2))

RENSEIGNEMENTS EXIGÉS À L'ÉGARD DES MICRO-ORGANISMES

1. Les renseignements suivants concernant le micro-organisme :

a) l'identification et les renseignements à l'appui;

b) les synonymes ainsi que les noms communs et périmés;
c) l'historique de la souche;
d) la description des modifications apportées au micro-organisme, indiquant notamment :

(i) le but des modifications,
(ii) les méthodes et le processus suivis pour les effectuer,
(iii) les modifications phénotypiques et génotypiques qui ont découlé du processus visé au sous-alinéa (ii),
(iv) la stabilité des modifications visées au sous-alinéa (iii),
(v) la nature, la source et la fonction de tout matériel génétique inséré;

e) la description des méthodes pouvant servir à différencier et à détecter le micro-organisme;
f) la description des caractéristiques biologiques et écologiques du micro-organisme, indiquant notamment

(i) son cycle de vie,
(ii) son infectiosité, sa pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, sa toxicité et sa toxigénicité,
(iii) sa résistance aux antibiotiques et sa tolérance aux métaux et aux pesticides,
(iv) son rôle dans les cycles biogéochimiques,
(v) les conditions nécessaires à sa survie, à sa croissance et à sa réplication et les conditions qui limitent ces processus,
(vi) les mécanismes de dispersion du micro-organisme et les modes d'interaction avec les agents de dispersion;

g) la description de son mode d'action par rapport à l'utilisation à laquelle il est destiné;
h) l'identification de tout brevet ou demande de brevet, selon le cas;
i) la dispersion par transfert de gènes de ses caractéristiques de pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, de toxigénicité et de résistance aux antibiotiques, notamment une description :

(i) des bases génétiques de sa pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, de sa toxigénicité et de sa résistance aux antibiotiques,
(ii) de sa capacité de transférer des gènes,
(iii) des conditions qui pourraient entraîner la dispersion de ses caractéristiques de pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, de toxigénicité et de résistance aux antibiotiques, et le fait que ces conditions risquent d'exister ou non aux lieux d'introduction ou dans l'aire de dispersion du micro-organisme;

j) la description de sa répartition géographique.

2. Les renseignements suivants concernant la fabrication et l'importation du micro-organisme :
a) ses noms commerciaux et le nom des fabricants, importateurs et vendeurs;
b) l'identification des lieux de fabrication au Canada;
c) l'état physique de la préparation;
d) la concentration du micro-organisme dans la préparation;
e) l'identification et la concentration des autres ingrédients et des contaminants présents dans la préparation;
f) la viabilité du micro-organisme dans la préparation;
g) la description des méthodes recommandées pour son entreposage et son élimination;
h) une estimation de la quantité du micro-organisme qui a été ou sera importée ou fabriquée au Canada, selon le cas.

i) la description de l'équipement et des méthodes de fabrication ainsi que des méthodes visant le contrôle de la qualité et l'assurance de la qualité;
j) la description de l'emplacement des installations de fabrication au Canada;
k) la description de la nature des rejets potentiels du micro-organisme en provenance des installations de fabrication au Canada ou des installations où il a été ou sera importé, selon le cas, ainsi que les procédures de contrôle des rejets;
l) la description des procedés de traitement et d'élimination des déchets contenant le micro-organisme qui proviennent des installations de fabrication au Canada.

3 Les renseignements suivants concernant l'introduction du micro-organisme :
a) l'utilisation à laquelle il est destiné et celle à laquelle il pourrait être destiné;
b) l'historique de son utilisation;
c) une comparaison entre l'habitat naturel du micro-organisme et l'habitat dans les lieux d'introduction potentiels, ainsi que la nature de la sélection qui peut s'opérer sur le micro-organisme dans ces lieux potentiels;
d) la description du procédé d'introduction, indiquant notamment :

(i) la méthode d'application,
(ii) la quantité, la fréquence et la durée de l'application,
(iii) les activités relatives à l'introduction;

e) la description des plans d'urgence en cas de rejet accidentel;
f) la description des méthodes recommandées pour mettre fin à l'introduction du micro-organisme.

4 Les renseignements suivants concernant le devenir du micro-organisme dans l'environnement :
a) l'identification des espèces de plantes et d'animaux susceptibles d'être exposées au micro-organisme et, lorsque l'infectiosité, la pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, la toxicité et la toxigénicité ont été précisées conformément au sous-alinéa 1*f*)(ii), l'identification des espèces réceptrices susceptibles d'y être exposées;
b) la description des habitats dans lesquels le micro-organisme peut persister ou proliférer;
c) les quantités estimatives du micro-organisme dans l'air, l'eau et le sol aux points d'introduction, ainsi qu'une estimation des tendances de population;
d) tout autre renseignement sur le devenir du micro-organisme dans l'environnement.

5 Les renseignements suivants concernant les effets écologiques du micro-organisme :
a) les données des essais servant à déterminer les effets du micro-organisme sur :

(i) les espèces aquatiques de plantes, d'invertébrés et de vertébrés susceptibles d'y être exposées,
(ii) les espèces terrestres de plantes, d'invertébrés et de vertébrés susceptibles d'y être exposées;

b) le rôle du micro-organisme quant aux effets écologiques nocifs;
c) le risque, associé au micro-organisme, d'impacts environnementaux défavorables qui pourraient influer sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique.

6 Les renseignements suivants concernant les effets du micro-organisme sur la santé humaine :
a) toute documentation relative au rôle du micro-organisme quant aux effets nocifs sur la santé humaine et la description des caractéristiques qui le distinguent des agents pathogènes connus;
b) les données des essais de sensibilité aux antibiotiques;
c) les données des essais de pathogénicité valables pour des micro-organismes apparentés de nature anthropopathogène;
d) le risque de réactions immunologiques nocives chez les personnes exposées au micro-organisme;

e) le nombre estimatif de personnes susceptibles d'être exposées au micro-organisme et le degré d'exposition.

7. Tout autre renseignement et toute donnée d'essai à l'égard du micro-organisme qui permettent de déterminer les dangers que celui-ci présente pour la santé humaine et l'environnement et dont dispose la personne ou auxquels elle devrait normalement avoir accès.

8. Le nom des autres organismes gouvernementaux, à l'étranger ou au Canada, qui ont été avisés par la personne de la fabrication ou de l'importation du micro-organisme, et l'objet d'un tel avis.

9. La description ou la notice des procédures d'essai suivies pour l'obtention des données d'essai, y compris les méthodes d'essai, les substances de référence ainsi que les méthodes visant le contrôle de la qualité et l'assurance de la qualité.

ANNEXE XVI
(paragraphe 29.11(4), alinéas 29.12b) et 29.13b) et paragraphe 29.14(4))

RENSEIGNEMENTS EXIGÉS À L'ÉGARD DES MICRO-ORGANISMES NON DESTINÉS À ÊTRE INTRODUITS À L'EXTÉRIEUR D'UNE INSTALLATION ÉTANCHE OU DESTINÉS UNIQUEMENT À L'EXPORTATION

1. Les renseignements suivants concernant le micro-organisme :
a) l'identification et les renseignements à l'appui;
b) les synonymes ainsi que les noms communs et périmés;
c) l'historique de la souche;
d) la description des modifications apportées au micro-organisme, indiquant notamment :

(i) le but des modifications,
(ii) les méthodes et le processus suivis pour les effectuer,
(iii) les modifications phénotypiques et génotypiques qui ont découlé du processus visé au sous-alinéa (ii),
(iv) la stabilité des modifications visées au sous-alinéa (iii),
(v) la nature, la source et la fonction de tout matériel génétique inséré;

e) la description des méthodes pouvant servir à différencier et à détecter le micro-organisme;
f) la description des caractéristiques biologiques et écologiques du micro-organisme, indiquant notamment

(i) son infectiosité, sa pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, sa toxicité et sa toxigénicité,

(ii) les conditions nécessaires à sa survie, à sa croissance et à sa réplication et les conditions qui limitent ces processus;

g) la description de son mode d'action connu par rapport à l'utilisation à laquelle il est destiné;
h) l'identification de tout brevet ou demande de brevet, selon le cas.

2. Les renseignements suivants concernant la fabrication et l'importation du micro-organisme :
a) ses noms commerciaux et le nom des fabricants, importateurs et vendeurs;
b) l'identification des lieux de fabrication au Canada;
c) le niveau de confinement de chaque installation de fabrication au Canada ou de chaque installation où le micro-organisme a été ou sera importé, selon le cas, établi en conformité avec les exigences physiques et

opérationnelles énoncées, selon le cas, dans les Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire ou à l'appendice K du document intitulé *Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules (NIH Guidelines) June 1994*, publié le 5 juillet 1994 par le Department of Health and Human Services des États-Unis dans le *Federal Register* (États-Unis), volume 59, n° 127, compte tenu de leurs modifications successives;

d) une estimation de la quantité du micro-organisme qui a été ou sera importée ou fabriquée au Canada, selon le cas;

e) la description de l'équipement et des méthodes de fabrication ainsi que des méthodes visant le contrôle de la qualité et l'assurance de la qualité;

f) la description des méthodes recommandées pour son entreposage.

3. Les renseignements suivants concernant l'introduction du micro-organisme :

a) l'utilisation à laquelle il est destiné et celle à laquelle il pourrait être destiné;

b) l'historique de son utilisation.

4. Les renseignements suivants concernant les effets du micro-organisme sur la santé humaine :

a) toute documentation relative au rôle du micro-organisme quant aux effets nocifs sur la santé humaine et la description des caractéristiques qui le distinguent des agents pathogènes connus;

b) les données des essais de sensibilité aux antibiotiques.

5. Tout autre renseignement et toute donnée d'essai à l'égard du micro-organisme qui permettent de déterminer les dangers que celui-ci présente pour la santé humaine et l'environnement et dont dispose la personne ou auxquels elle devrait normalement avoir accès.

6. Le nom des autres organismes gouvernementaux, à l'étranger ou au Canada, qui ont été avisés par la personne de la fabrication ou de l'importation du micro-organisme, et l'objet d'un tel avis.

7. La description ou la notice des procédures d'essai suivies pour l'obtention des données d'essai, y compris les méthodes d'essai, les substances de référence ainsi que les méthodes visant le contrôle de la qualité et l'assurance de la qualité.

ANNEXE XVII

(paragraphe 29.11(5), alinéas 29.12c) et 29.13c) et paragraphe 29.14(5))

RENSEIGNEMENTS EXIGÉS À L'ÉGARD DES MICRO-ORGANISMES DESTINÉS À ÊTRE INTRODUITS DANS LE CADRE D'UNE ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE TERRAIN

1. Les renseignements suivants concernant le micro-organisme :

a) l'identification et les renseignements à l'appui;

b) les synonymes ainsi que les noms communs et périmés;

c) l'historique de la souche;

d) la description des modifications apportées au micro-organisme, indiquant notamment :

(i) le but des modifications,

(ii) les méthodes et le processus suivis pour les effectuer,

(iii) les modifications phénotypiques et génotypiques qui ont découlé du processus visé au sous-alinéa (ii),

(iv) la stabilité des modifications visées au sous-alinéa (iii),

(v) la nature, la source et la fonction de tout matériel génétique inséré;

e) la description des méthodes pouvant servir à différencier et à détecter le micro-organisme;

f) la description des caractéristiques biologiques et écologiques du micro-organisme, indiquant notamment

(i) son infectiosité, sa pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, sa toxicité et sa toxigénicité,

(ii) les conditions nécessaires à sa survie, à sa croissance et à sa réplication et les conditions qui limitent ces processus,
(iii) son cycle de vie, si le micro-organisme n'est pas indigène,
(iv) sa résistance aux antibiotiques et sa tolérance aux métaux et aux pesticides, si le micro-organisme n'est pas indigène,
(v) son rôle dans les cycles biogéochimiques, si le micro-organisme n'est pas indigène,
(vi) les mécanismes de dispersion du micro-organisme et les modes d'interaction avec les agents de dispersion;

g) la description de son mode d'action connu par rapport à l'objectif de l'étude expérimentale sur le terrain;
h) l'identification de tout brevet ou demande de brevet, selon le cas;
i) si le micro-organisme n'est pas indigène, la dispersion par transfert de gènes de ses caractéristiques de pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, de toxigénicité et de résistance aux antibiotiques, notamment une description :

(i) des bases génétiques de sa pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, de sa toxigénicité et de sa résistance aux antibiotiques,
(ii) de sa capacité de transférer des gènes,
(iii) des conditions qui pourraient entraîner la dispersion de ses caractéristiques de pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, de toxigénicité et de résistance aux antibiotiques, et le fait que ces conditions risquent d'exister ou non au site de l'étude ou dans l'aire de dispersion du micro-organisme;

j) la description de sa répartition géographique.

2. Les renseignements suivants concernant la fabrication et l'importation du micro-organisme :
a) ses noms commerciaux et le nom des fabricants, importateurs et vendeurs;
b) l'état physique de la préparation,
c) la concentration du micro-organisme dans la préparation,
d) l'identification et la concentration des autres ingrédients et des contaminants présents dans la préparation;
e) la viabilité du micro-organisme dans la préparation;
f) la description des méthodes recommandées pour son entreposage et son élimination;
g) une estimation de la quantité du micro-organisme qui a été ou sera importée ou fabriquée au Canada, selon le cas,
h) la description de l'équipement et des méthodes de fabrication ainsi que des méthodes visant le contrôle de la qualité et l'assurance de la qualité;
i) la description de l'emplacement des installations de fabrication au Canada;
j) la description de la nature des rejets potentiels du micro-organisme en provenance des installations de fabrication au Canada ou des installations où il a été ou sera importé, selon le cas, ainsi que les procédures de contrôle des rejets;
k) la description des procédés de traitement et d'élimination des déchets contenant le micro-organisme qui proviennent des installations de fabrication au Canada.

3. Les renseignements suivants concernant le site de l'étude expérimentale sur le terrain :
a) son emplacement et une carte géographique le situant;

b) sa taille;
c) la distance par rapport aux zones habitées;
d) la distance par rapport aux zones protégées;
e) la description du paysage géologique sur le site et dans les environs;
f) la description de la diversité biologique existant sur le site et dans les environs, indiquant notamment :

(i) l'identification des espèces menacées ou en voie d'extinction,
(ii) lorsque l'infectiosité, la pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, la toxicité et la toxigénicité ont été précisées conformément au sous-alinéa 1*f*)(i), l'identification des espèces réceptrices;

g) une comparaison entre l'habitat naturel du micro-organisme et l'habitat sur le site de l'étude, ainsi que la nature de la sélection qui peut s'opérer sur le micro-organisme à ce site;
h) si le micro-organisme est indigène, les données qui le démontrent.

4. Les renseignements suivants concernant l'étude expérimentale sur le terrain :
a) les objectifs de l'étude;
b) l'historique de l'utilisation du micro-organisme;
c) la date de début et la durée;
d) la description des méthodes de transport du micro-organisme à destination et en provenance du site de l'étude,
e) la description des procédures et des plans de l'étude, indiquant notamment :

(i) la méthode d'application du micro-organisme,
(ii) la quantité, la fréquence et la durée de l'application du micro-organisme,
(iii) les activités relatives à l'étude;

f) la description des procédures de surveillance du micro-organisme et de ses effets écologiques sur le site de l'étude, pendant et après celle-ci;
g) la description des mesures de sécurité sur le site de l'étude;
h) la description des plans d'urgence en cas de rejet accidentel;
i) la description des méthodes recommandées pour mettre fin à l'étude;
j) la description des méthodes de confinement et des conditions de biosécurité à l'égard du micro-organisme au site de l'étude, ainsi qu'une description de leur efficacité.

5. Les renseignements suivants concernant le devenir du micro-organisme dans l'environnement :
a) la description des habitats dans lesquels le micro-organisme peut persister ou proliférer;
b) les quantités estimatives du micro-organisme dans l'air, l'eau et le sol aux points d'introduction, ainsi qu'une estimation des tendances de population;
c) tout autre renseignement sur le devenir du micro-organisme dans l'environnement.

6. Les renseignements suivants concernant les effets écologiques du micro-organisme :
a) le rôle du micro-organisme quant aux effets écologiques nocifs;
b) le risque, associé au micro-organisme, d'impacts environnementaux défavorables qui pourraient influer sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique.

7. Les renseignements suivants concernant les effets du micro-organisme sur la santé humaine :
a) toute documentation relative au rôle du micro-organisme quant aux effets nocifs sur la santé humaine et la description des caractéristiques qui le distinguent des agents pathogènes connus;
b) les données des essais de sensibilité aux antibiotiques;
c) le nombre estimatif de personnes susceptibles d'être exposées au micro-organisme et le degré

d'exposition.

8. Tout autre renseignement et toute donnée d'essai à l'égard du micro-organisme qui permettent de déterminer les dangers que celui-ci présente pour la santé humaine et l'environnement et dont dispose la personne ou auxquels elle devrait normalement avoir accès.

9. Le nom des autres organismes gouvernementaux, à l'étranger ou au Canada, qui ont été avisés par la personne de la fabrication ou de l'importation du micro-organisme, et l'objet d'un tel avis.

10. La description ou la notice des procédures d'essai suivies pour l'obtention des données d'essai, y compris les méthodes d'essai, les substances de référence ainsi que les méthodes visant le contrôle de la qualité et l'assurance de la qualité.

ANNEXE XVIII
(paragraphe 29.11(6), alinéas 29.12b) et 29.13b) et paragraphe 29.14(6))

RENSEIGNEMENTS EXIGÉS À L'ÉGARD DES MICRO-ORGANISMES DESTINÉS À ÊTRE INTRODUITS DANS LE SITE DUQUEL ILS ONT ÉTÉ ISOLÉS

1. Les renseignements suivants concernant le micro-organisme :
a) l'identification et les renseignements à l'appui;
b) son infectiosité, sa pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, sa toxicité et sa toxigénicité;
c) la description des sous-produits qui résulteront vraisemblablement de l'introduction du micro-organisme.

2. Les renseignements suivants concernant la fabrication du micro-organisme :
a) les données démontrant que le micro-organisme a été isolé du site d'introduction;
b) la viabilité du micro-organisme dans la préparation;
c) une estimation de la quantité du micro-organisme qui a été ou sera fabriquée, selon le cas;
d) la description de l'équipement et des méthodes de fabrication ainsi que des méthodes visant le contrôle de la qualité et l'assurance de la qualité,
e) la description des procédés de traitement et d'élimination des déchets contenant le micro-organisme.

3. L'emplacement du site d'introduction et une carte géographique le situant.

4. Les renseignements suivants concernant l'introduction du micro-organisme :
a) l'utilisation à laquelle il est destiné;
b) la date de début et la durée;
c) la description du procédé d'introduction, indiquant notamment :

(i) la méthode d'application,
(ii) la quantité, la fréquence et la durée de l'application,
(iii) les activités relatives à l'introduction;

d) la description des méthodes de confinement et des conditions de biosécurité à l'égard du micro-organisme au site d'introduction, ainsi qu'une description de leur efficacité.

5. Les renseignements suivants concernant les effets du micro-organisme sur la santé humaine :
a) toute documentation relative au rôle du micro-organisme quant aux effets nocifs sur la santé humaine et la description des caractéristiques qui le distinguent des agents pathogènes connus;
b) le nombre estimatif de personnes susceptibles d'être exposées au micro-organisme et le degré d'exposition.

6. Tout autre renseignement et toute donnée d'essai à l'égard du micro-organisme qui permettent de déterminer les dangers que celui-ci présente pour la santé humaine et l'environnement et dont dispose la personne ou auxquels elle devrait normalement avoir accès.

7. Le nom des autres organismes gouvernementaux, à l'étranger ou au Canada, qui ont été avisés par la personne de la fabrication ou de l'importation du micro-organisme, et l'objet d'un tel avis.

8. La description ou la notice des procédures d'essai suivies pour l'obtention des données d'essai, y compris les méthodes d'essai, les substances de référence ainsi que les méthodes visant le contrôle de la qualité et l'assurance de la qualité.