



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

PIERRE JUTEAU

ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DU PENTACHLOROPHÉNOL  
EN CONDITIONS MÉTHANIQUES

AOÛT 1993

---

# TABLE DES MATIÈRES

|   |     |
|---|-----|
| TABLE DES MATIÈRES.....   | iii |
| LISTE DES TABLEAUX.....   | vi  |
| LISTE DES FIGURES.....  | vii |
| SOMMAIRE.....   | ix  |
| INTRODUCTION.....   | 1   |
| REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....  | 4   |
| 1. DESCRIPTION ET UTILISATION DU PCP.....                           | 5   |
| 1.1 Description du PCP.....   | 5   |
| 1.2 Nomenclature et abréviations.....                               | 5   |
| 1.3 Utilisation du PCP.....   | 5   |
| 1.4 Le PCP dans l'environnement.....                                | 9   |
| 1.4.1 Niveaux de contamination.....                                 | 9   |
| 1.4.2 Distribution et transport.....                                | 10  |
| 1.4.2.1 Volatilisation.....   | 10  |
| 1.4.2.2 Adsorption.....   | 11  |
| 1.4.2.3 Bioaccumulation.....  | 11  |
| 2. TOXICITÉ DU PCP.....   | 12  |
| 2.1 Toxicité des impuretés du PCP.....                              | 12  |
| 2.2 Toxicité aiguë du PCP.....                                      | 13  |
| 2.3 Toxicité à court, moyen et long terme.....                      | 13  |
| 2.4 Mécanismes de la toxicité.....                                  | 14  |
| 3. DÉGRADATION ABIOTIQUE DU PCP.....                                | 15  |
| 3.1 Photolyse.....  | 15  |
| 3.2 Destruction thermique.....                                      | 15  |
| 4. BIODÉGRADATION DU PCP PAR DES MICROORGANISMES<br>AÉROBIES.....   | 15  |
| 4.1 Procaryotes.....  | 16  |
| 4.2 Eucaryotes.....   | 19  |
| 5. BIODÉGRADATION DU PCP PAR DES MICROORGANISMES<br>ANAÉROBIES..... | 20  |
| 5.1 Dégradation par des consortiums bactériens.....                 | 20  |
| 5.2 Performances des bioréacteurs anaérobies.....                   | 21  |
| 5.3 Devenir du PCP en conditions méthaniques.....                   | 23  |
| 5.4 Considérations thermodynamiques.....                            | 25  |
| 5.4.1 La fermentation méthanique.....                               | 25  |
| 5.4.2 La déchloration réductive.....                                | 26  |
| 5.5 Isolement de souches.....                                       | 28  |
| 5.5.1 Isolement de <i>Desulfomonile tiedjei</i> .....               | 29  |

|                             |  |    |
|-----------------------------|--|----|
| 5.5.2                       | Isolement de la souche DCB-2 .....                       | 30 |
| 5.5.3                       | Autres tentatives d'isollements.....                     | 32 |
| 5.6                         | Autres accepteurs d'électrons.....                       | 32 |
| 5.7                         | Mécanismes de la déchloration .....                      | 33 |
| 6.                          | APPLICATIONS .....                                       | 35 |
| 6.1                         | Traitement <i>in situ</i> .....                          | 35 |
| 6.2                         | Traitement d'effluents liquides.....                     | 36 |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES ..... |  | 38 |
| 1.                          | PROVENANCE DU CONSORTIUM.....                            | 39 |
| 2.                          | MILIEU DE CULTURE.....                                   | 39 |
| 3.                          | QUANTIFICATION ET IDENTIFICATION DES CHLOROPHÉNOLS ..... | 40 |
| 3.1                         | Analyses par HPLC.....                                   | 40 |
| 3.2                         | Analyses par chromatographie en phase gazeuse .....      | 41 |
| 3.2.1                       | Acétylation et extraction.....                           | 41 |
| 3.2.2                       | Séparation et quantification .....                       | 42 |
| 3.3                         | Spectrométrie de masse .....                             | 42 |
| 4.                          | DÉTECTION DE LA PRÉSENCE DE MÉTHANE.....                 | 42 |
| 5.                          | MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE.....                 | 43 |
| 6.                          | BIORÉACTEURS .....                                       | 44 |
| 6.1                         | Bioréacteurs à alimentation semi-continue .....          | 44 |
| 6.1.1                       | Bioréacteur A1 .....                                     | 44 |
| 6.2                         | Bioréacteurs à alimentation continue.....                | 44 |
| 6.2.1                       | Réacteur B1.....   | 48 |
| 6.2.2                       | Réacteur B2.....   | 48 |
| 6.2.3                       | Réacteur B3.....   | 48 |
| 6.3                         | Bioréacteurs à surfaces fixes .....                      | 49 |
| 6.3.1                       | Bioréacteur C1 et C2.....                                | 49 |
| 6.3.2                       | Bioréacteur C3.....                                      | 50 |
| 7.                          | ESSAIS DANS DES BOUTEILLES À SÉRUM.....                  | 50 |
| 8.                          | CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM BACTÉRIEN.....             | 51 |
| 8.1                         | Détermination de la voie biochimique.....                | 51 |
| 8.2                         | Effet de l'addition d'un co-substrat.....                | 51 |
| 8.3                         | Dégradation des monochlorophénols .....                  | 52 |
| 8.4                         | Effet de la température.....                             | 52 |
| 8.5                         | Rôle des bactéries sporulées.....                        | 52 |
| 8.6                         | Accepteurs d'électrons.....                              | 53 |
| 8.6.1                       | Dépendance face à la méthanogénèse .....                 | 53 |
| 8.6.2                       | Incubation aérobie .....                                 | 53 |
| 8.6.3                       | Sulfate et nitrate.....                                  | 54 |
| 8.7                         | Effet d'un support favorisant l'agrégation .....         | 54 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>RÉSULTATS</b> .....  | <b>55</b>  |
| <b>1. BIORÉACTEURS</b> .....                                  | <b>56</b>  |
| 1.1 Bioréacteur à alimentation semi-continue .....            | 56         |
| 1.2 Bioréacteurs à alimentation continue.....                 | 56         |
| 1.3 Bioréacteurs à surfaces fixes .....                       | 60         |
| 1.3.1 Performances .....                                      | 60         |
| 1.3.2 Biofilm .....   | 64         |
| <b>2. VOIES BIOCHIMIQUES</b> .....                            | <b>73</b>  |
| <b>3. EFFET DE L'ADDITION D'UN CO-SUBSTRAT</b> .....          | <b>80</b>  |
| <b>4. DÉGRADATION DES MONOCHLOROPHÉNOLS</b> .....             | <b>80</b>  |
| <b>5. EFFET DE LA TEMPÉRATURE</b> .....                       | <b>80</b>  |
| <b>6. RÔLE DES BACTÉRIES SPORULÉES</b> .....                  | <b>84</b>  |
| <b>7. RÔLE DE DIFFÉRENTS ACCEPTEURS D'ÉLECTRONS</b> .....     | <b>84</b>  |
| <b>8. EFFET D'UN SUPPORT FAVORISANT L'AGRÉGATION</b> .....    | <b>89</b>  |
| <b>DISCUSSION</b> .....                                       | <b>91</b>  |
| <b>1. BIORÉACTEURS</b> .....                                  | <b>92</b>  |
| 1.1 Évidence de l'activité biologique.....                    | 92         |
| 1.2 Performances .....  | 92         |
| 1.3 La déchloration du <i>m</i> -MCP, l'étape limitante ..... | 94         |
| 1.4 Biofilm .....   | 95         |
| 1.5 Surfaces fixes VS boues granulaires .....                 | 97         |
| 1.6 Recommandations .....                                     | 99         |
| <b>2. VOIES BIOCHIMIQUES</b> .....                            | <b>100</b> |
| <b>3. DÉGRADATION DES MONOCHLOROPHÉNOLS</b> .....             | <b>102</b> |
| <b>4. EFFET DE L'ADDITION DE CO-SUBSTRATS</b> .....           | <b>102</b> |
| <b>5. EFFET DE LA TEMPÉRATURE</b> .....                       | <b>103</b> |
| <b>6. RÔLE DES BACTÉRIES SPORULÉES</b> .....                  | <b>104</b> |
| <b>7. ACCEPTEURS D'ÉLECTRONS</b> .....                        | <b>106</b> |
| <b>8. EFFET D'UN SUPPORT FAVORISANT L'AGRÉGATION</b> .....    | <b>107</b> |
| <b>CONCLUSION</b> .....                                       | <b>110</b> |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....                                    | <b>112</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....                                    | <b>114</b> |

## LISTE DES TABLEAUX

|                     |   |           |
|---------------------|---|-----------|
| <b>TABLEAU I:</b>   | <b>Quelques propriétés physiques du PCP et de son sel de sodium</b>                     | <b>6</b>  |
| <b>TABLEAU II:</b>  | <b>Principales utilisations du pentachlorophénol enregistrées aux États-Unis</b>        | <b>8</b>  |
| <b>TABLEAU III:</b> | <b>Listes de bactéries aérobies capables de dégrader le pentachlorophénol</b>           | <b>17</b> |
| <b>TABLEAU IV:</b>  | <b>Performance de différents bioréacteurs anaérobies dégradant le pentachlorophénol</b> | <b>22</b> |
| <b>TABLEAU V:</b>   | <b>Performances des bioréacteurs à alimentation continue (réacteurs B1, B2 et B3).</b>  | <b>58</b> |
| <b>TABLEAU VI:</b>  | <b>Performances des réacteurs à surfaces fixes (réacteur C2)</b>                        | <b>59</b> |

---

## LISTE DES FIGURES

|            |   |    |
|------------|---|----|
| FIGURE 1:  | Dégradation du PCP par des bactéries aérobies.  | 18 |
| FIGURE 2:  | Dégradation du PCP par des bactéries anaérobies.  | 24 |
| FIGURE 3:  | Bactéries impliquées dans la méthanogénèse.   | 27 |
| FIGURE 4:  | Relations syntrophiques dans un consortium bactérien défini métabolisant l'acide 3-chlorobenzoïque. | 31 |
| FIGURE 5:  | Schéma du bioréacteur à alimentation semi-continue (réacteur A1).                                   | 45 |
| FIGURE 6:  | Schéma des bioréacteurs à alimentation continue (réacteurs B1, B2 et B3).                           | 46 |
| FIGURE 7:  | Schéma des bioréacteurs à surfaces fixes (bioréacteur C1 et C2).                                    | 47 |
| FIGURE 8:  | Suivi du réacteur à alimentation semi-continue (réacteur A1).                                       | 57 |
| FIGURE 9:  | Témoin abiotique (réacteur C1).   | 61 |
| FIGURE 10: | Suivi des chlorophénols à différentes hauteurs dans le réacteur à surfaces fixes (réacteur C2).     | 63 |
| FIGURE 11: | Biofilm au bas du réacteur C2 — vue d'ensemble.   | 65 |
| FIGURE 12: | Biofilm au bas du réacteur C2 — couche profonde et couche de surface.                               | 67 |
| FIGURE 13: | Biofilm au bas du réacteur C2 — microorganismes apparentés à des levures.                           | 69 |
| FIGURE 14: | Biofilm au haut du réacteur C2.   | 71 |
| FIGURE 15: | Spectres de masses des intermédiaires de dégradation du PCP — PCP et 2,3,4,6-TeCP.                  | 74 |
| FIGURE 16: | Spectres de masses des intermédiaires de dégradation du PCP — 2,3,5,6-TeCP et 2,3,5-TCP.            | 75 |
| FIGURE 17: | Spectres de masses des intermédiaires de dégradation du PCP — 3,4-DCP et 3,5-DCP.                   | 76 |
| FIGURE 18: | Spectres de masses des intermédiaires de dégradation du PCP — <i>m</i> -MCP.                        | 77 |
| FIGURE 19: | Spectres de masses des intermédiaires de dégradation du PCP — Phénol.                               | 78 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| FIGURE 20: | Voies biochimiques proposées pour la dégradation du PCP par le consortium bactérien. | 79 |
| FIGURE 21: | Effet de différents co-substrats sur la dégradation du PCP.                          | 81 |
| FIGURE 22: | Dégradation des monochlorophénols.   | 82 |
| FIGURE 23: | Effet de la température sur la dégradation du PCP.                                   | 83 |
| FIGURE 24: | Rôle des bactéries sporulées dans la dégradation du 2,3,4-TCP.                       | 85 |
| FIGURE 25: | Rôle des bactéries sporulées dans la dégradation du 2,3,5-TCP.                       | 86 |
| FIGURE 26: | Rôle des bactéries sporulées dans la dégradation du PCP.                             | 87 |
| FIGURE 27: | Rôle de différents accepteurs d'électrons.   | 88 |
| FIGURE 28: | Effet d'un support favorisant l'agrégation.  | 90 |

# S O M M A I R E

---

Le pentachlorophénol (PCP) est un biocide très utilisé pour la préservation des poteaux servant au transport de lignes électriques et téléphoniques, des poutres de chemin de fer et autres bois destinés à être utilisés à l'extérieur. Sa grande toxicité et son accumulation dans certains écosystèmes en font un problème environnemental majeur.

Un consortium méthanique, isolé et enrichi à partir de sols contaminés et de boues de digesteur anaérobie, a permis de dégrader le PCP dans différents types de bioréacteurs ainsi que dans des essais en bouteilles. Il y a tout d'abord déchloration complète du PCP. Le phénol ainsi produit peut être transformé en  $\text{CO}_2$  et  $\text{CH}_4$ . Une charge de  $60 \mu\text{moles de PCP} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$  a pu être traitée dans un bioréacteur à surfaces fixes, ce qui est supérieur aux performances obtenues avec des bioréacteurs à alimentation semi-continue ou continue mais sans surfaces fixes. Les analyses ont montré que seule une partie du réacteur à surfaces fixes était active, ce qui indique que le traitement est bien en-dessous de sa capacité maximale. Des observations par microscopie électronique à balayage ont permis de déterminer que le biofilm est formé d'au moins 2 couches de bactéries distinctes. La couche profonde est surtout composée de bactéries filamenteuses et de longs bâtonnets dont un bon nombre ont une physionomie apparentée au genre *Methanosaeta*. La couche de surface est plutôt constituée de bactéries en forme de cocci et de bâtonnets courts.

La dégradation du PCP par le consortium passe par le *meta*-monochlorophénol (*m*-MCP) et la déchloration de ce dernier est l'étape limitante. Le consortium est également capable de déchlorer les deux autres monochlorophénols, dans l'ordre de préférence suivant: *ortho* > *meta* > *para*. La déchloration du PCP nécessite l'addition d'un co-substrat qui peut être le glucose, le formiate, le lactate ou l'extrait de levures, mais pas l'acétate. La température optimale est de  $37^\circ\text{C}$ . Les bactéries impliquées dans la transformation du PCP en *m*-MCP résistent à un traitement à la chaleur de  $80^\circ\text{C}$  pendant 1 heure, ce qui suggère qu'elles forment des spores. Les bactéries responsables de la déchloration ne semblent pas dépendre du transfert d'hydrogène associé à la méthanogénèse. En présence d'air, le consortium ne dégrade pas le PCP. En présence de sulfate, la déchloration est incomplète.

Les résultats obtenus par un essai en bouteilles où un support favorisant l'agrégation a été ajouté suggèrent que de tels agrégats sont nécessaires, sinon utiles à l'activité de déchloration.

# I N T R O D U C T I O N

---

Le pentachlorophénol est un biocide peu coûteux à produire, et sa solubilité dans l'huile ou dans l'eau (sous forme de sel) en fait un produit très versatile. Mais cette substance est aussi très toxique, même pour l'humain, et s'accumule dans certains écosystèmes. Bien que son utilisation ait été sévèrement réglementée dans les années 80, le PCP reste un produit privilégié pour la conservation du bois destiné à une utilisation extérieure, tel les poteaux servant au transport de lignes électriques et téléphoniques. Il représente un grave problème environnemental, et plusieurs chercheurs se sont penchés sur sa biodégradation.

Des souches bactériennes aérobies, capables de minéraliser le PCP en  $\text{CO}_2$ , ont été isolées. Afin de mettre au point des biotraitements moins coûteux, des équipes se sont aussi intéressées à la dégradation du PCP en conditions méthaniques. Dans de tels environnements, la biodégradation se fait par des consortiums bactériens regroupant plusieurs souches. Les premières déchlorent complètement la molécule de PCP en phénol suite à quoi d'autres bactéries ouvrent le noyau aromatique et transforment les sous-produits en  $\text{CO}_2$  et  $\text{CH}_4$ . Mais aucune bactérie capable de déchlorer le PCP n'a été isolée en culture pure. En fait, seulement 2 souches bactériennes ayant la capacité d'enlever des atomes de chlore sur un composé aromatique en anaérobiose ont été isolées à ce jour. Il s'agit de *Desulfomonile tiedje* et de la souche DCB-2, qui déchlorent respectivement le 3-chlorobenzoate et des trichlorophénols.

Quelques équipes ont mis au point des bioréacteurs anaérobies capables de minéraliser le PCP. Bien que ces technologies s'améliorent, les performances restent inférieures aux procédés aérobies. Ceci s'explique en partie par le fait que le fonctionnement de ces consortiums bactériens est peu connu et donc difficile à contrôler.

Les pages qui suivent présentent les résultats d'une étude portant sur la biodégradation du pentachlorophénol par un consortium méthanique. Le premier objectif était d'étudier et de comparer cette dégradation dans 3 types de bioréacteurs anaérobies (alimentation semi-continue et continue sans surfaces fixes, alimentation continue avec sur-

faces fixes). Le deuxième objectif était de déterminer différents paramètres qui caractérisent le consortium bactérien (rôle des bactéries sporulées, des accepteurs d'électrons, des co-substrats, etc.) afin de mieux comprendre son fonctionnement.

**R E V U E**  
**B I B L I O G R A P H I Q U E**

---

## **1. DESCRIPTION ET UTILISATION DU PCP**

### **1.1 DESCRIPTION DU PCP**

Le pentachlorophénol (PCP,  $C_6HCl_5O$ ) est composé d'un cycle aromatique, d'un groupement hydroxyle et de cinq atomes de chlore. Divers dérivés ont également été développés dont le plus important est le sel de sodium ( $C_6Cl_5ONa$  ou PCP-Na). Le sel de potassium du PCP est également disponible ( $C_6Cl_5OK$  ou PCP-K). Les autres dérivés sont regroupés sous le nom de pentachlorophényl laurate (PCP-L) et sont décrits par la formule chimique  $C_6Cl_5OCOR$ , où R est un acide gras pouvant contenir de 6 à 20 carbones, l'acide à 12 carbones étant le plus commun (Cirelli, 1978).

Le sel de potassium et les esters d'acides gras ne représentent qu'une faible fraction de la production de PCP (OMS, 1987). Par exemple, sur 781 produits contenant du pentachlorophénol et enregistrés à l'Environmental Protection Agency des États-Unis, la répartition était la suivante: 578 possédaient du PCP sous sa forme d'origine, 196 contenaient du PCP-Na, 5 du PCP-K et 2 du PCP-L (Cirelli, 1978). Le tableau I présente quelques propriétés des deux formes les plus fréquentes, le PCP et son sel de sodium.

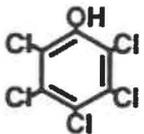
### **1.2 NOMENCLATURE ET ABRÉVIATIONS**

Afin d'alléger la lecture du texte, les abréviations suivantes seront utilisées: PCP pour pentachlorophénol ou son sel de sodium; TeCP pour tétrachlorophénol; TCP pour trichlorophénol; DCP pour dichlorophénol; MCP pour monochlorophénol.

### **1.3 UTILISATION DU PCP**

Face aux préoccupations grandissantes vis-à-vis le pentachlorophénol, plusieurs revues bibliographiques faisant le point sur l'utilisation du PCP, sur sa toxicité ainsi que sur son impact environnemental ont été publiées dans les 15 dernières années (Crosby *et al.*, 1981; Jones, 1981; Jones, 1984; CNRC, 1982; Rao, 1978; US EPA, 1979). Le rapport de

**TABLEAU I: Quelques propriétés physiques du PCP et de son sel de sodium**

| Propriétés                       | PCP  | PCP-Na   |
|----------------------------------|--|--|
|                                  |  |  |
| Masse moléculaire                | 266,4  | 288,3<br>306,3 (monohydrate)   |
| pKa                              | 4,7  |  |
| Température de fusion            | 191°C  |  |
| Température d'ébullition         | 300°C  |  |
| Solubilité dans l'eau (20°C)     | 0,014 g/L  | 22,4 g/L   |
| Partition n-octanol/eau (pH 7,2) | log P = 3,32   |  |

tiré de Crosby, 1981 et de OMS, 1987

l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1987) mérite d'être particulièrement souligné; il est le fruit d'un groupe de travail international qui a couvert, de façon exhaustive et critique, 169 études et revues bibliographiques dans le but de dégager des recommandations.

Le PCP est un biocide à large spectre d'activité, peu coûteux et très versatile. Grâce aux différences de solubilité de la forme originale et du sel de sodium, il peut être dissous dans une huile ou dans l'eau. Il peut ainsi être appliqué sur différents matériaux (Cirelli, 1978). Le tableau II donne une liste des principales utilisations du pentachlorophénol aux États-Unis. Mais de tous ces usages, c'est la préservation du bois qui est au premier rang; en 1981, elle représentait 95% de l'utilisation du PCP au Canada (Jones, 1981). Plus précisément, il s'agit de la conservation de bois situé à l'extérieur des bâtiments, tels les poteaux de transport d'électricité et de lignes téléphoniques ainsi que les poutres de voies ferrées.

Bien qu'aucune comptabilité exacte ne soit disponible, les quantités de PCP produites annuellement sont énormes. L'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1987) rapporte différents chiffres: une étude de l'Organisation des Nations Unies estimait en 1983 que la production annuelle était de 90 000 tonnes; une autre étude de la Communauté économique européenne l'évaluait entre 50 000 et 60 000 tonnes par an. Jones (1984) situe à 1 770 tonnes/an la quantité annuellement synthétisée au Canada. Les chiffres concernant le bois traité donnent également une bonne idée de l'importance de ce produit. Selon Hoos (1978), 150 millions de poutres de chemins de fer sont en service et 3 millions sont remplacées annuellement. Concernant les poteaux, la compagnie Hydro-Québec en possède à elle seule 1,5 millions, et il s'en ajoute 80 000 nouveaux à chaque année (Hydro-Québec, communication personnelle).

Comme nous le constaterons dans les sections qui suivent, le PCP est un produit toxique qui pose des problèmes environnementaux. En conséquence, depuis le début des

**TABLEAU II: Principales utilisations du pentachlorophénoI enregistrées aux États-Unis**

| Utilisation   | Forme       |
|---|-------------|
| Herbicide et dessiccant pour la récolte de fourrage         | PCP         |
| Insecticides pour les ruches et pour l'utilisation en serre | PCP         |
| Agent biostatique pour les eaux de refroidissement          | PCP-Na      |
| Lavage des fruits après récolte                             | PCP-Na      |
| Microbiocide pour burlap, toile, coton, corde et ficelle    | PCP         |
| Microbiocide pour cuir                                      | PCP-K, PCP  |
| Microbiocide et insecticide pour le traitement du bois      | PCP, PCP-Na |
| Additif à la peinture                                       | PCP         |
| Préservation des pâtes et papiers                           | PCP         |
| Microbiocide pour l'eau utilisée dans les forages           | PCP         |
| Fumigation de l'intérieur des camions d'expédition          | PCP         |
| Préservation des panneaux d'aggloméré                       | PCP         |
| Herbicide pour le contrôle de la végétation non-agricole    | PCP         |

tiré de Crosby *et al.*, 1981

années 80, l'usage de ce produit a été sévèrement restreint par les réglementations de plusieurs pays. Au Canada, il est interdit d'utiliser le PCP pour la culture des champignons, comme agent de préservation du bois destiné à la construction intérieure, pour la protection du bois situé à l'intérieur de bâtiments de fermes, ainsi que comme herbicide ou stérilisant de sols (Jones, 1984). Aussi, au Canada, en ex-République fédérale d'Allemagne et en Suède, le PCP ne peut plus être utilisé dans les pâtes et papiers. En fait, dans le cas de la Suède, toutes les utilisations du pentachlorophénol ont été interdites en 1977 (Ahlborg et Thunberg, 1980; Jones, 1981). Ceci dit, le PCP sera probablement encore longtemps utilisé pour la protection du bois qui n'est pas destiné à la construction intérieure, puisque ni l'Organisation mondiale de la santé, ni l'Environmental Protection Agency des États-Unis ne recommandent un tel bannissement (OMS, 1987). Ces deux organismes proposent cependant l'élimination de la plupart des autres usages (herbicide et stérilisant de sols, molluscide, bois de construction intérieure, etc.).

## **1.4 LE PCP DANS L'ENVIRONNEMENT**

### **1.4.1 Niveaux de contamination**

Parallèlement aux énormes quantités produites et utilisées à travers le monde, le PCP se retrouve un peu partout dans l'environnement. Plusieurs études ont montré que les précipitations de pluie et de neige contiennent des concentrations de PCP variant de 0,002 à 0,8 µg/L (Bevenue *et al.*, 1972; Jones, 1981; Paasivirta *et al.*, 1985). L'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1987) a recensé 7 études qui montrent que les concentrations de PCP des effluents municipaux et industriels varient de 0,1 à 75 000 µg/L, les pires étant des effluents non-traités provenant des industries de préservation du bois. Pour ce qui est des eaux de surface, le même rapport cite 13 études où les concentrations se situent généralement entre 1 et 10 µg/L avec des exceptions où les niveaux peuvent atteindre 10 500 µg/L dans des zones fortement polluées par des industries. En Finlande, des concentrations de chlorophénols totaux variant de 56 000 à 190 000 µg/L ont été détectées dans des

eaux de surface d'une localité, alors que les doses contenues dans l'eau de consommation se situaient entre 70 et 140  $\mu\text{g/L}$  (Lampi *et al.*, 1992). Dans ce cas, il a été clairement démontré que ces chlorophénols provenaient d'une ancienne scierie. D'autres chercheurs ont trouvé des maxima de 0,474  $\mu\text{g}$  de PCP/L dans l'eau de consommation d'une petite ville de Croatie (Fingler *et al.*, 1992).

Plusieurs sols, généralement reliés à des industries qui produisent et/ou utilisent le PCP ou le bois traité au PCP, sont aussi fortement contaminés. Basé sur des études de six groupes différents, le rapport de l'OMS mentionne que ces sols contiennent de 25 à 45 600  $\mu\text{g}$  de PCP/Kg de sol. Kitunen *et al.* (1987) ont observé des concentrations beaucoup plus élevées, atteignant jusqu'à 1,9 g de PCP/Kg de sol. Une concentration de PCP de 658 000  $\mu\text{g/Kg}$  de sol à 2,5 cm d'un poteau a également été signalée (OMS, 1987).

Les effluents d'industries papetières qui utilisent le chlore dans les procédés de blanchiment de la pâte contiennent un grand nombre de composés organochlorés, dont le PCP. Ceci dit, ce dernier s'y retrouve en faible proportion en comparaison aux chlorocatéchols. Par exemple, Lee *et al.* (1989) ont mesuré des teneurs en PCP variant de 0,6 à 3,1  $\mu\text{g/L}$  dans différents effluents de ce type, alors que les valeurs des chlorocatéchols pouvaient atteindre 77,4  $\mu\text{g/L}$  pour certains isomères.

#### 1.4.2 Distribution et transport

Le devenir du PCP dans l'environnement est fonction des mécanismes de transport (volatilisation, adsorption, bioaccumulation) et de transformation (biotiques et abiotiques). Ces derniers seront discutés dans les sections suivantes.

##### 1.4.2.1 Volatilisation

Le PCP peut être sujet à une certaine volatilisation. Par exemple, le bois de conifère traité peut perdre entre 20 et 80% de son PCP, dépendant du type de traitement qu'il a

subi (OMS, 1987). Ceci dit, ce processus n'est pas considéré comme important dans le devenir du PCP (US EPA, 1979).

#### 1.4.2.2 Adsorption

Choi et Aomine (1974) ont montré que le pH était la variable la plus importante influençant l'adsorption du PCP sur le sol. Ceci s'explique par la différence de comportement entre les formes ionisée et non-ionisée du PCP, la première étant plus hydrophile que la seconde. Ainsi, tel que le pKa de 4,7 le laissait prévoir, l'adsorption du PCP sur le sol, qui est forte en condition très acide, devient mineure à pH modérément acide et nulle lorsqu'on se rapproche de la neutralité. Les résultats de ces mêmes chercheurs ont révélé que le contenu en matière organique augmentait de façon significative l'adsorption du PCP au sol. Ces observations sont en accord avec d'autres travaux (Kaufmann, 1976; OMS, 1987). Ainsi, un faible pH et un fort contenu en matière organique sont des conditions favorisant l'adsorption et devrait se traduire par une diminution de la biodisponibilité et une augmentation de la persistance du PCP dans cet environnement (OMS, 1987). Ceci a été confirmé par Pierce et Victor (1978) qui ont étudié deux déversements accidentels de PCP dans un lac du Mississippi. Les sédiments renaient fortement le pentachlorophénol et devenaient une source de pollution à long terme pour le milieu aquatique. De plus, Fox et Joshi (1984) ont observé que, dans les sédiments d'une baie du lac Ontario, contaminés depuis les années 40 par une industrie de préservation du bois, presque aucune dégradation du PCP n'a eu lieu. Lampi *et al.* (1992) ont également trouvé des sédiments contaminés par le PCP depuis le début des années 70. Pour ce qui est des sols, le PCP y est généralement mobile (Jackson et Bisson, 1990; Kitunen *et al.*, 1987).

#### 1.4.2.3 Bioaccumulation

Le coefficient de partition octanol/eau du PCP (voir tableau I) suggère qu'une bioaccumulation pourrait se produire (US EPA, 1979). Cette prévision est confirmée par plu-

sieurs études qui ont montré que, chez certains organismes vivants, les concentrations en PCP étaient plus élevées dans les tissus biologiques que dans leur environnement. L'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1987) rapporte 20 études réalisées chez des organismes benthiques, aquatiques et terrestres où les facteurs de bioconcentration varient de 4 à 1 250, selon l'espèce, le tissu analysé et le contenu en lipides. Haimi *et al.* (1992) ont récemment observé ce phénomène chez les vers de terre. Parmi ces travaux, deux ont mis en évidence que la bioaccumulation provenait non seulement du contact direct avec un milieu contaminé mais également via la chaîne alimentaire (OMS, 1987). Plusieurs de ces études ont montré que les poissons contaminés remis dans un milieu sans PCP l'éliminait plus ou moins rapidement, avec une concentration résiduelle persistante dans certains cas.

## **2. TOXICITÉ DU PCP**

Sauf indication, cette section se base sur l'exhaustive revue bibliographique réalisée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1987).

### **2.1 TOXICITÉ DES IMPURETÉS DU PCP**

Il est important de mentionner que le PCP de qualité technique, soit celui qui est utilisé à l'échelle commerciale, contient un bon nombre d'autres substances. Outre les chlorophénols, ces impuretés, dont la quantité varie selon le procédé de fabrication utilisé, incluent des polychlorodibenzodioxines, des polychlorodibenzofurannes, des polychlorobiphényles, des cyclohexenones et cyclohexadienones chlorés, ainsi que l'hexachlorobenzène (Crosby *et al.*, 1981; Jiang *et al.*, 1992; OMS, 1987). Plusieurs de ces substances sont très toxiques, ce qui est un obstacle à l'interprétation d'études toxicologiques qui concernent des expositions à du PCP non-purifié (OMS, 1987).

## 2.2 TOXICITÉ AIGUË DU PCP

Le PCP est un produit très toxique: l'Organisation mondiale de la santé le classe dans la catégorie 1b, soit très dangereux ("highly hazardous") (OMS, 1987). Parmi les 14 études de toxicité aiguë faites sur des animaux de laboratoire et rapportées par l'OMS, les doses provoquant la mortalité de 50% des spécimens varient entre 27 et 320 mg/Kg de poids corporel, selon l'espèce et la voie d'administration (OMS, 1987). Les symptômes observés avant la mort étaient une augmentation du rythme respiratoire et de la température corporelle, des tremblements et des convulsions, des spasmes d'asphyxie, un arrêt de la respiration et finalement l'arrêt cardiaque. Chez l'humain, la dose létale minimale par voie orale a été estimée à 29 mg de PCP/Kg de poids corporel (Ahlborg et Thunberg, 1980). Tant pour l'humain que pour les rats, le PCP est 5 fois plus toxique que le phénol. L'Organisation mondiale de la santé conclue que la toxicité aiguë du PCP est due à la molécule de PCP elle-même et non aux microcontaminants contenus dans les préparations de qualité technique (OMS, 1987).

## 2.3 TOXICITÉ À COURT, MOYEN ET LONG TERME

Les études sur les animaux de laboratoires ont montré différents effets selon la durée de l'exposition, les doses utilisées et les espèces choisies. Des études comparatives (PCP technique versus PCP purifié) ont mis en évidence que le PCP lui-même provoquait des retards de croissance, l'augmentation de la grosseur du foie, des inclusions cytoplasmiques, une perturbation du métabolisme des porphyrines, une diminution de certaines hormones thyroïdiennes, etc. D'autres études de laboratoire ont montré que le PCP est foetotoxique; il ne semble cependant pas être tératogène. Chez l'humain, les effets dus au PCP sont plus difficiles à distinguer de ceux attribuables aux microcontaminants, car les données proviennent d'études cliniques ou épidémiologiques portant sur des personnes ayant été en contact avec du PCP commercial, donc de qualité technique. On rapporte néanmoins que l'exposition au PCP entraîne des problèmes aux niveaux cutané, respiratoire, neurologique ainsi que des symptômes du genre migraines, nausées et faiblesses.

Selon l'Organisation mondiale de la santé, aucune étude n'a réussi à mettre en lumière des effets biochimiques statistiquement significatifs sur les principaux organes, les tissus nerveux, les éléments sanguins, le système immunitaire ou la capacité de reproduction. Quant aux aspects mutagène et carcinogène, les données sont insuffisantes pour affirmer ou infirmer l'une ou l'autre de ces possibilités, et ce, tant dans les expérimentations de laboratoire que dans les études épidémiologiques chez les populations humaines (OMS, 1987). Cette problématique continue de faire l'objet de recherches; une étude récente portant sur les dossiers médicaux de près de 19 000 travailleurs conclut à une augmentation du risque de certains cancers après exposition prolongée à du PCP de qualité technique (Kogevinas *et al.*, 1992). L'Organisation mondiale de la santé considère que, contrairement à la toxicité aiguë, les effets à court, moyen et long terme généralement observés après une exposition au PCP de qualité technique sont dus pour la plupart aux microcontaminants de types dioxines et furannes (OMS, 1987).

#### **2.4 MÉCANISMES DE LA TOXICITÉ**

Tous les chlorophénols, et particulièrement le PCP, sont des agents découplant de la phosphorylation oxydative. Les mécanismes moléculaires de cette action ne sont cependant pas élucidés (CNRC, 1981). Le PCP inhiberait également les ATPases. Ainsi, tant la formation d'ATP et le relargage d'énergie provenant du clivage de l'ATP en ADP sont bloqués par le PCP. Ce composé inhiberait également d'autres enzymes cellulaires (OMS, 1987). Dans la série des chlorophénols, plusieurs auteurs ont établi un lien entre l'augmentation du nombre d'atomes de chlore, de l'hydrophobicité et de la toxicité de la molécule; ainsi, parmi ces composés, c'est le PCP qui est le plus toxique (OMS, 1987; Kovacs *et al.*, 1993). Cette relation est particulièrement vraie pour les bactéries méthanogènes qui sont d'ailleurs extrêmement sensibles au PCP (Patel *et al.*, 1991; Sierra-Alvarez et Lettinga, 1991). Ruckdeschel *et al.* (1987) ont cependant montré que certaines bactéries, autres que méthanogènes, ne se conformaient pas à cette règle.

### **3. DÉGRADATION ABIOTIQUE DU PCP**

#### **3.1 PHOTOLYSE**

Le PCP peut être dégradé rapidement lorsqu'il est soumis à une irradiation solaire. Crosby *et al.* (1981) ont revu de nombreuses études sur le sujet. Il en ressort que le PCP irradié peut suivre principalement trois grandes voies: 1) des dihydrobenzènes chlorés, formés par hydroxylation du PCP, peuvent à leur tour être complètement dégradés en CO<sub>2</sub> et en HCl via des fragments non-aromatiques dont surtout l'acide dichloromaleique; 2) il peut y avoir réduction du PCP en chlorophénols moins chlorés; 3) il peut également y avoir formation de dibenzo-*p*-dioxines polychlorées. Ces auteurs concluent que le PCP ne devrait pas persister longtemps dans un environnement ouvert, exposé au rayonnement solaire. Ceci concorde bien avec les résultats de plusieurs autres études, revues par l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1987), qui ont observé la disparition du PCP dans des rizières, dans des étangs, etc.

#### **3.2 DESTRUCTION THERMIQUE**

Le PCP peut être détruit de manière thermique en autant que les températures soient suffisantes pour éviter la formation de sous-produits. Des matériaux contenant du PCP et chauffés à 290 et 310°C ont en effet généré des dibenzodioxines et des dibenzofurannes lors d'un test. Un essai d'incinération réalisé entre 916 et 1032°C s'est avéré efficace, le taux de destruction étant de 99,99% du PCP sans traces de dibenzodioxines ou de dibenzofurannes (OMS, 1987).

### **4. BIODÉGRADATION DU PCP PAR DES MICROORGANISMES AÉROBES**

Dans le but de trouver des solutions biotechnologiques aux problèmes engendrés par les xénobiotiques, un grand nombre de recherches ont été réalisées pour comprendre et isoler des microorganismes capables de dégrader ces molécules. En ce qui concerne les

composés aromatiques halogénés, et plus particulièrement ceux possédant un seul cycle, d'excellentes revues bibliographiques ont récemment été publiées (Chaudry et Chapalamadugu, 1991; Ghosal *et al.*, 1985; Häggblom, 1990; Hardman, 1991; Neilson, 1990; Mohn et Tiedje, 1992; Reineke et Knackmuss, 1988; Sahasrabudhe et Modi, 1987; van der Meer *et al.*, 1992).

#### 4.1 PROCARYOTES

Des bactéries aérobies capables de minéraliser complètement le PCP ont été observées dans les sols, dans l'eau, dans des bioréacteurs et dans des communautés bactériennes mixtes; plusieurs souches ont également pu être isolées en cultures pures (Häggblom, 1990). Le tableau III en dresse une liste. Ces isollements de bactéries ont été possibles grâce au fait que celles-ci utilisaient le PCP comme seule source de carbone et d'énergie. Ces isolats ont ouvert la voie à une croissance rapide des connaissances reliées à ces microorganismes, tant sur les plans physiologique et taxonomique que sur les aspects enzymologique et génétique (van der Meer *et al.*, 1992). Malgré cela, les premières réactions impliquées dans la dégradation du PCP sont connues que pour un petit nombre de ces microorganismes. Il s'agit de deux types de déchloration: les atomes de chlore sont soit remplacés par un hydrogène (déchloration réductive), soit par un groupement hydroxyle (déchloration hydrolytique) (Häggblom, 1990; Mohn et Tiedje, 1992). La figure 1 montre les deux voies de dégradation du PCP qui ont été rapportées jusqu'à ce jour pour des bactéries aérobies. Dans les deux cas, la première réaction est de type hydrolytique et il y a formation du tétrachloro-*para*-hydroquinone. Dans le cas de *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 et de *Rhodococcus* sp. souche CP-2, la *para*-hydroxylation est suivie par la substitution d'un atome de chlore par un autre groupement hydroxyle pour former le trichlorohydroquinone. Ce dernier est entièrement déchloré de manière réductive avant qu'il y ait ouverture du cycle. Dans le cas de *Flavobacterium* sp. et de la bactérie coryneforme KC-3, le tétrachloro-*para*-hydroquinone subit immédiatement deux déchlorations réductives. Les étapes subséquentes n'ont pas été élucidées.

**TABLEAU III: Listes de bactéries aérobies capables de dégrader le pentachlorophénol**

| Souches                                   | Références                   |
|---|------------------------------|
| <i>Rhodococcus chlorophenolicus</i> PCP-1 | Apajalahti (1987)            |
| <i>Rhodococcus</i> sp. CP-2               | Hägglom <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Rhodococcus</i> sp. CG-1               | Hägglom <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Mycobacterium</i> sp. CG-2             | Hägglom <i>et al.</i> (1988) |
| ( <i>Arthrobacter</i> ) Souche KC-3       | Chu et Kirsch (1972, 1973)   |
| <i>Flavobacterium</i> sp.                 | Saber et Crawford (1985)     |
| <i>Arthrobacter</i> ATCC 33790            | Stanlake et Finn (1982)      |
| <i>Pseudomonas</i> sp. <sup>a</sup>       | Radehaus et Schmidt (1992)   |

tiré de Hägglom, 1990, sauf <sup>a</sup>

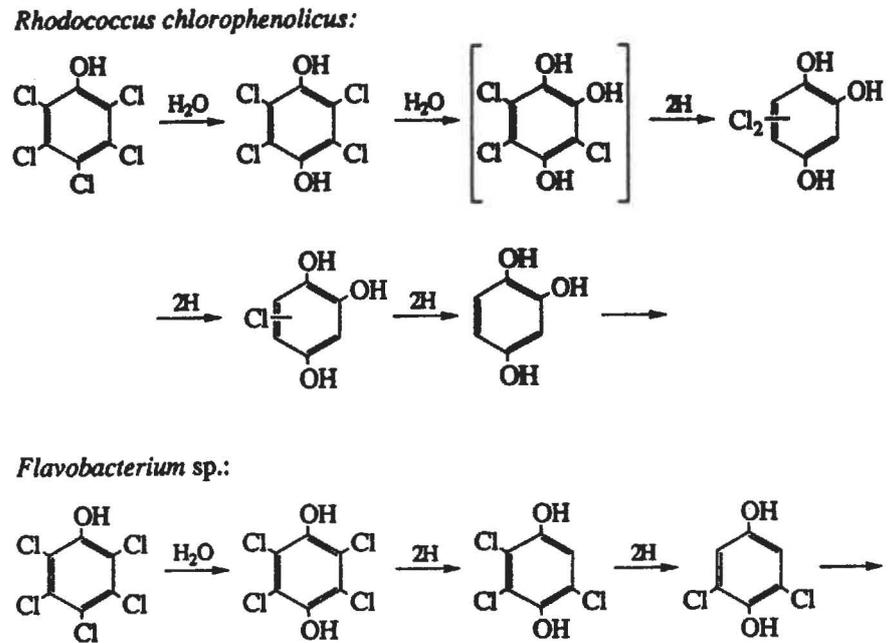


FIGURE 1: **Dégradation du PCP par des bactéries aérobies.** Tiré de Mohn et Tiedje, 1992.

Un autre mécanisme de détoxification a également été observé chez des souches de *Rhodococcus* et de *Mycobacterium*. Il s'agit d'une O-méthylation qui survient sur le groupe hydroxyle du PCP ou sur ceux du tétrachloro-*p*-hydroquinone. Dans les deux cas cependant, les produits formés ne sont pas dégradés (Hardman, 1991).

Il est important de noter que ces voies de dégradation du PCP sont très différentes de celles des mono- et dichlorophénols. Dans ces cas, il y a formation de chlorocatéchols dont les cycles aromatiques sont ouverts en position *ortho* (entre les deux groupements hydroxyles) avant d'être déchlorés (Hägglöm, 1990; Hardman, 1991; Neilson, 1990).

## 4.2 EUCARYOTES

Bien qu'elles ne soient que très peu prises en compte dans les revues bibliographiques précédemment citées, un bon nombre de levures et de moisissures, capables de dégrader le PCP, ont été isolées. En fait, la liste des microorganismes eucaryotes pouvant transformer le PCP est particulièrement longue car les enzymes impliquées sont non spécifiques: il s'agit de tyrosinases, de laccases et de ligninases (Seigle-Murandi *et al.*, 1991). Certaines études ont d'ailleurs utilisé ce type d'enzymes plus ou moins purifiées pour dégrader le PCP (Venkatadri *et al.*, 1992; Roy-Arcand et Archibald, 1991). Cependant, bien qu'il y ait minéralisation complète d'une partie du PCP traité, ce type d'enzyme forme également des sous-produits qui ne sont pas complètement éliminés, tels le 2,3,5,6-tétrachloro-2,5-cyclohexadiène-1,4-dione (Mileski *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1990), le pentachloroanisole (Lamar *et al.*, 1990) ou des polymères (Roy-Arcand et Archibald, 1991). Öberg et Rappe (1992) ont même mis en évidence que des peroxidases peuvent former des dibenzo-*p*-dioxines et des dibenzofurannes polychlorés à partir de chlorophénols dont le PCP. Dans une étude portant sur le traitement de PCP extrait de vieux poteaux, McBain *et al.* (1993) ont écarté la possibilité d'utiliser la moisissure *Phanerochaete chrysosporium* puisqu'elle transformait 80% du PCP en pentachloroanisole après 8 semaines, un composé qui n'est pas acceptable du point de vue environnemental.

## **5. BIODÉGRADATION DU PCP PAR DES MICROORGANISMES ANAÉROBES**

Plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur le phénomène de la biodégradation anaérobie du PCP. Au moins trois raisons sont régulièrement avancées pour justifier ces recherches: 1) dans l'environnement, les zones anaérobies (eaux, sols, sédiments) sont nombreuses et jouent donc un rôle important dans le devenir des xénobiotiques (Neilson, 1990); 2) en comparaison avec les procédés aérobies, l'utilisation de traitements anaérobies efficaces contre le PCP éliminerait les coûts élevés d'opération reliés à l'aération et diminuerait la quantité de boue produite (Samson *et al.*, 1991); 3) sur le plan fondamental, la déchloration réductive représente un phénomène nouveau et semble être une forme inusitée de respiration anaérobie où le composé chloré sert d'accepteur final d'électrons (DeWeerd *et al.*, 1991; Mohn et Tiedje, 1992; Suffita *et al.*, 1982).

### **5.1 DÉGRADATION PAR DES CONSORTIUMS BACTÉRIENS**

La déchloration du pentachlorophénol en conditions méthaniques a été observée dans plusieurs environnements naturels tels les sols ou les sédiments (Ide *et al.*, 1972; Larsen *et al.*, 1991; Murthy *et al.*, 1979) ainsi que dans des boues de digesteurs anaérobies, acclimatées ou non (Guthrie *et al.*, 1984; Krumme et Boyd, 1988; Madsen et Aamand, 1991; Mikesell et Boyd, 1985; Mikesell et Boyd, 1986; Nicholson *et al.*, 1992). Dans tous ces cas, ce sont des consortiums bactériens qui sont responsables de la biodégradation du PCP. Ceci signifie que plusieurs types de bactéries sont nécessaires pour minéraliser complètement le PCP. La première étape consiste toujours en une déchloration réductive complète de la molécule, c'est à dire au remplacement de chaque atome de chlore par un atome d'hydrogène et un électron (Mohn et Tiedje, 1992). Le phénol qui résulte de ce processus est ensuite facilement dégradé en conditions anaérobies (Zhang *et al.*, 1990). Ceci est donc différent de la déchloration par des microorganismes aérobies où la réaction peut être de type hydrolytique ou réductive. Il est à noter que la déshalogénéation réductive

semble être une première étape obligatoire à la dégradation anaérobie de tous les composés aromatiques halogénés (Mohn et Tiedje, 1992).

Seuls deux microorganismes anaérobies capables de déshalogéner de telles molécules ont été isolés en culture pure (voir section 5.5); il s'agit cependant de bactéries qui agissent sur des composés autre que le PCP, l'affinité de leur activité déshalogénase vis-à-vis ce dernier étant très faible (Mohn et Kennedy, 1992b; Madsen et Licht, 1992).

## 5.2 PERFORMANCES DES BIORÉACTEURS ANAÉROBES

Parmi les études de biodégradation du PCP en conditions méthaniques, plusieurs ont été réalisées strictement en fioles (Bryant *et al.*, 1991; Ide *et al.*, 1972; Larsen *et al.*, 1991; Madsen et Aamand, 1991; Mikesell et Boyd, 1986; Mikesell et Boyd, 1985). D'autres équipes ont mis leurs efforts dans la conception de bioréacteurs anaérobies pouvant éliminer efficacement le PCP. Ces bioréacteurs étaient de type à cuves agitées (Guthrie *et al.*, 1984), à boues granulaires (Hendriksen *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1993), à flux ascendant (Krumme et Boyd, 1988) ou à film fixe (Hendriksen *et al.*, 1991). Ces systèmes étaient à alimentation continue, à l'exception des bioréacteurs de Guthrie *et al.* (1984) où le milieu liquide était remplacé de manière semi-continue. Les meilleures performances observées à ce jour dans de tels bioréacteurs sont celles rapportées par Wu *et al.* (1993) qui ont atteint une charge volumique de 88 à 97 mg de PCP par litre de réacteur et par jour. Le tableau IV fait la comparaison des performances en termes de doses traitées, de temps de résidence hydraulique, de charge volumique, de pourcentage d'enlèvement du PCP et de la présence ou non de certains intermédiaires de dégradation du PCP. Il est cependant à noter que ces performances sont toutes inférieures à ce qui peut être obtenu avec des microorganismes aérobies: Stinson *et al.* (1992), par exemple, ont obtenu la dégradation de charge atteignant 360 mg de PCP·L<sup>-1</sup>·jour<sup>-1</sup> dans un bioréacteur aérobie à film fixe.

La déchloration du PCP peut être obtenue par un consortium méthanogène sans qu'aucune autre source de carbone et d'énergie ne soit ajoutée (Bryant *et al.*, 1991; Krumme

**TABLEAU IV: Performance de différents bioréacteurs anaérobies dégradant le pentachlorophénoi**

| Types de bioréacteur        | Doses traitées (µM) | Temps de résidence hydraulique (jours) | Charges volumiques (µM de PCP·L <sup>-1</sup> ·J <sup>-1</sup> ) | Enlèvement du PCP (%) | Chlorophénols autres que PCP à la sortie (% du PCP entrant) | Références                      |
|-----------------------------|---------------------|--|--|-----------------------|---|---------------------------------|
| Boues granulaires           | 150 à 225           | 0,5 à 0,6                              | 330 à 364  | 99                    | aucun   | Wu <i>et al.</i> (1993)         |
| Boues granulaires           | 11 à 17             | 1,0                                    | 8  | 99                    | 6% de DCP   | Hendriksen <i>et al.</i> (1992) |
| Films fixes                 | 4 à 8               | 2,9                                    | 3  | 98                    | 28 % de DCP   | Hendriksen <i>et al.</i> (1991) |
| Lit fixe                    | non mentionné       | 2 à 5                                  | 2  | 35                    | non mentionné   | Krumme et Boyd (1988)           |
| Milieu agité <sup>(a)</sup> | 17                  | 10 à 40                                | 0,4  | 99                    | non mentionné   | Guthrie <i>et al.</i> (1984)    |

<sup>a</sup> alimentation semi-continue

et Boyd, 1988; Mikesell et Boyd, 1986). Dans le cas des travaux de Krumme et Boyd (1988), où le consortium a été enrichi par des repiquages périodiques, c'est clairement le PCP et ses produits de dégradation qui fournissent ces éléments. Mais sans un tel enrichissement, des substrats récalcitrants contenus dans le matériel de départ (sédiments, boues, etc.) peuvent en être la source (Mohn et Tiedje, 1992). Cependant, des travaux ont clairement montré que l'ajout d'un substrat facilement assimilable, tel le glucose, améliore de beaucoup les rendements (Hendriksen et Ahring, 1992; Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen *et al.*, 1992). Par exemple, des cinq systèmes présentés au tableau IV, celui qui n'utilise pas d'autre substrat que le PCP, soit celui de Krumme et Boyd (1988), est également celui où le pourcentage de PCP enlevé est le moindre. Les autres ajoutent, en plus du PCP, soit du glucose (Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen *et al.*, 1992), soit un mélange d'acétate, de propionate, de butyrate et de méthanol (Wu *et al.*, 1993), soit des boues (Guthrie *et al.*, 1984). Il faut noter que ces substrats, en plus d'être des sources de carbone et d'énergie, peuvent être des donneurs potentiels d'électrons (Mohn et Tiedje, 1992).

### 5.3 DEVENIR DU PCP EN CONDITIONS MÉTHANIQUES

Nicholson *et al.* (1992) ont résumé toutes les voies de déchloration du PCP et des autres polychlorophénols qui ont été observées à ce jour (figure 2). Il faut ajouter aux informations de ce schéma que la réduction des trois monochlorophénols en phénol a également été rapportée (Boyd *et al.*, 1983; Boyd et Shelton, 1984; Bryant *et al.*, 1991; Dietrich et Winter, 1990; Zhang et Wiegel, 1990). La minéralisation complète du PCP en CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub> a également été clairement démontrée grâce à l'utilisation de molécules marquées au <sup>14</sup>C (Mikesell et Boyd, 1986; Wu *et al.*, 1993).

Bien que certains auteurs ont obtenu une disparition complète du PCP sans accumulation d'intermédiaires phénoliques (Mikesell et Boyd, 1986; Wu *et al.*, 1993), la plupart des études ont noté qu'une partie du pentachlorophénol se retrouvait sous forme de chlorophénols moins chlorés (Bryant *et al.*, 1991; Hendriksen *et al.*, 1992; Hendriksen *et al.*,

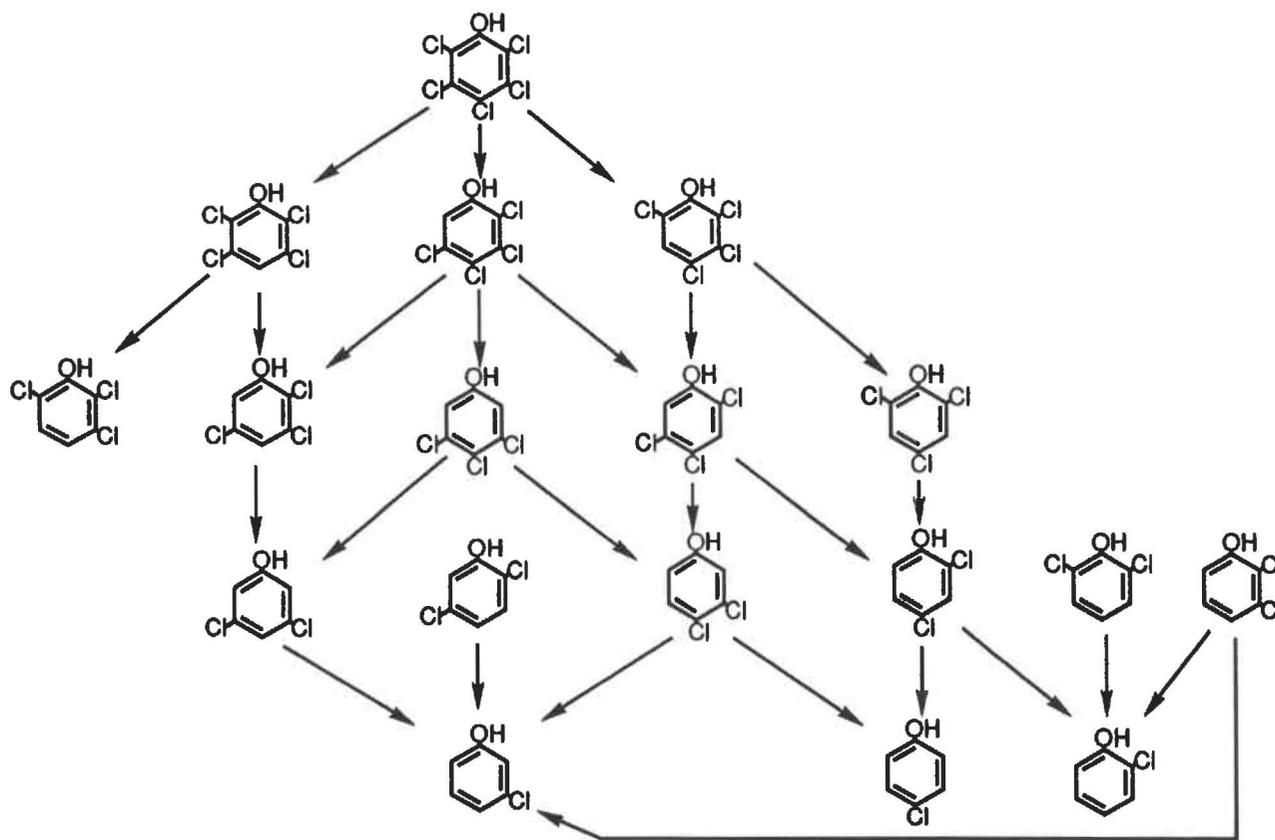


FIGURE 2: Dégradation du PCP par des bactéries anaérobies. Adapté de Nicholson *et al.*, 1992

1991; Larsen *et al.*, 1991). Plusieurs auteurs ont tenté de déterminer si, en fonction de leur position, certains atomes de chlore du PCP étaient plus faciles que d'autres à réduire. Les résultats sont passablement variables selon le consortium bactérien utilisé. Ceci dit la position *meta* est celle qui est la plus souvent identifiée comme étant persistante, entraînant souvent des accumulations de 3,5-DCP et/ou de 3-MCP (Bryant *et al.*, 1991; Hendriksen *et al.*, 1992; Ide *et al.*, 1972; Larsen *et al.*, 1991; Mikesell et Boyd, 1986; Mohn et Kennedy, 1992a; Nicholson *et al.*, 1992). Des travaux ont montré que, dans certains cas, la position *para* pouvait être tout aussi récalcitrante, sinon plus (Boyd *et al.*, 1983; Boyd et Shelton, 1984; Mikesell et Boyd, 1985; Nicholson *et al.*, 1992). Il n'y a pas unanimité non plus en ce qui a trait à la position la plus facile à déchlorer. Ce sont les atomes de chlore situés en *ortho* qui sont les plus fréquemment mentionnés (Boyd *et al.*, 1983; Boyd et Shelton, 1984; Ide *et al.*, 1972; Mikesell et Boyd, 1985; Mikesell et Boyd, 1986; Nicholson *et al.*, 1992; Mohn et Kennedy, 1992a). Mais Bryant *et al.* (1991) ainsi que Hendriksen *et al.* (1992) ont plutôt observé une déchloration préférentielle en position *para*. Larsen *et al.* (1991) ont observé les deux, *ortho* et *para*, selon la provenance du consortium.

## 5.4 CONSIDÉRATIONS THERMODYNAMIQUES

### 5.4.1 La fermentation méthanique

Pour bien comprendre les phénomènes de biodégradation en conditions méthaniques, il est important de s'attarder à la thermodynamique des réactions. La formation de méthane à partir de substrats organiques est un processus dit de fermentation, c'est-à-dire qu'il y a utilisation de la source d'énergie sans qu'il y ait un accepteur externe d'électrons (Brock et Madigan, 1991). Par conséquent, le substrat est à la fois donneur et accepteur d'électrons, et l'équilibre oxydation/réduction est maintenu. Il y a donc non seulement formation de méthane, la forme la plus réduite du carbone, mais il y a également production de dioxyde de carbone, la forme la plus oxydée du carbone. Ceci dit, pour passer du substrat à ces produits finaux, il y a plusieurs étapes dans lesquelles différents microorganismes

sont impliqués (figure 3). Or, une de ces étapes est problématique: la formation d'acétate et d'hydrogène par les bactéries acétogènes n'est pas favorable du point de vue thermodynamique, le  $\Delta G^{\circ}$  étant positif. Cette réaction ne peut avoir lieu que si elle est couplée à une autre dont le  $\Delta G^{\circ}$  est négatif. Ce rôle est joué par les bactéries méthanogènes qui utilisent l'hydrogène et le dioxyde de carbone pour former du méthane. La réaction globale, acétogénèse et méthanogénèse, libère de l'énergie ( $\Delta G^{\circ}$  négatif), ce qui la rend favorable. Ainsi, la thermodynamique de ces réactions entraîne un phénomène de syntrophie entre bactéries acétogènes et méthanogènes, où le transfert d'hydrogène entre espèces joue un rôle clé. Des études récentes ont d'ailleurs montré que des limites physiques à ce transfert d'hydrogène pouvaient être un facteur limitant dans la méthanogénèse (Dolfing, 1992; Pauss *et al.*, 1990). D'autres travaux ont mis en évidence que l'acide formique, plutôt que l'hydrogène, pouvait servir d'équivalents réducteurs entre bactéries acétogènes et méthanogènes, l'avantage étant un coefficient de diffusion trois fois plus élevé pour le formate que pour l'hydrogène (Boone *et al.*, 1989; Dolfing, 1992; Thiele et Zeikus, 1988).

#### 5.4.2 La déchloration réductive

Dolfing et Harrison (1992) ont calculé, pour différents composés organochlorés, l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G^{\circ}$ ) qui devrait théoriquement être associée à la déchloration réductive qui utiliserait l'hydrogène comme donneur d'électrons. Pour le PCP, cette valeur se situe entre -131 et -142 kJ/réaction selon la position de l'atome de chlore enlevé (ceci tient compte d'une atmosphère contenant entre 10 et 100 ppm d'hydrogène); pour les 18 autres chlorophénols, le  $\Delta G^{\circ}$  varie entre -105 et -140 kJ/réaction. Ces transformations sont donc favorables du point de vue thermodynamique et ne devraient pas dépendre du couplage à une autre réaction (tel l'acétogénèse et la méthanogénèse). En fait, toutes les réactions de déchloration calculées par ces auteurs ont un  $\Delta G^{\circ}$  négatifs. Mohn et Tiedje (1990, 1991) ont effectivement montré que *Desulfomonile tiedje*, qui déchlorure l'acide 3-chlorobenzoïque, conserve l'énergie de cette réaction en formant de l'ATP. Ceci les a amenés à proposer un modèle respiratoire où la déchloration est couplée à la formation d'ATP par une

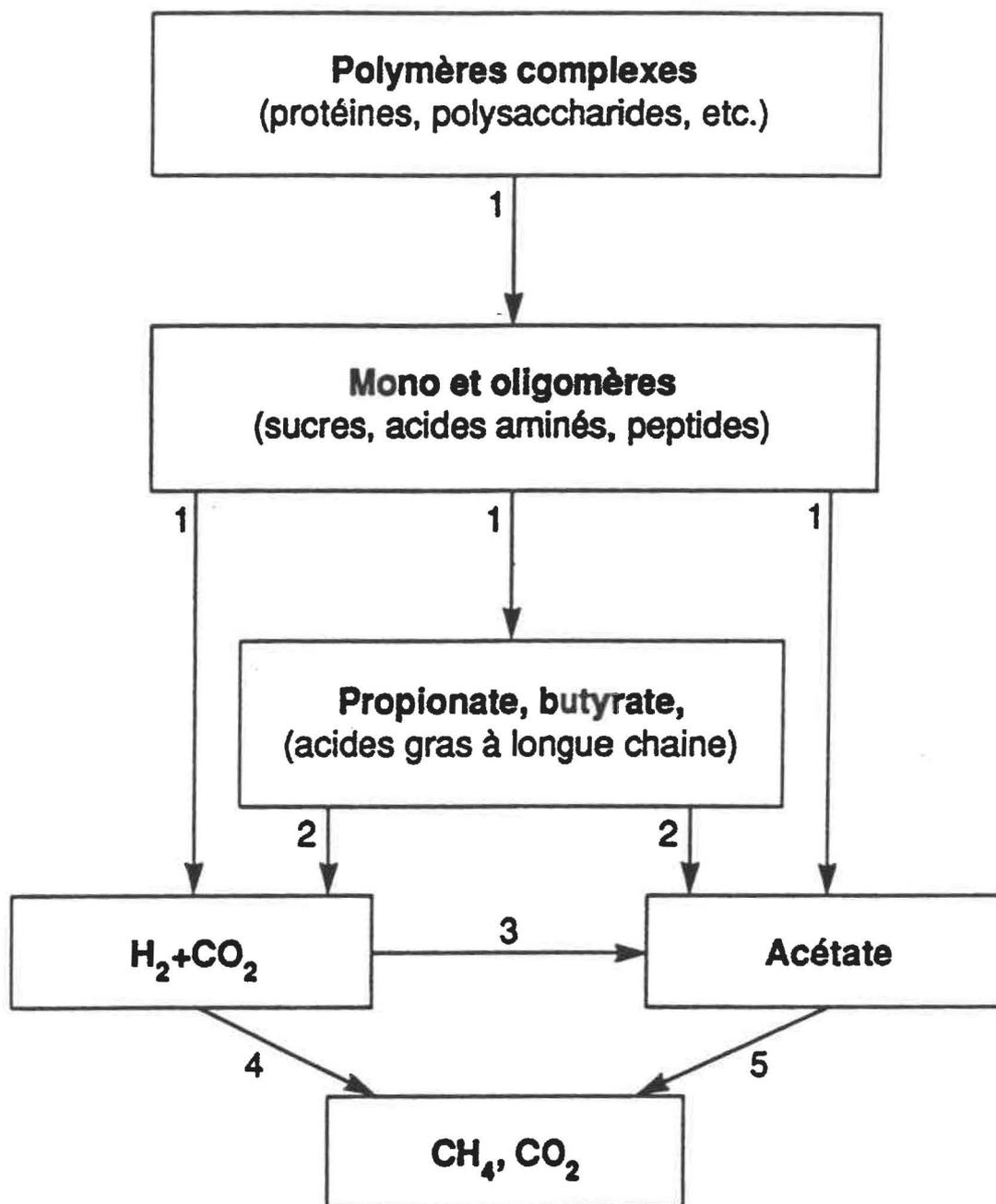


FIGURE 3: **Bactéries Impliquées dans la méthanogénèse.** Tiré de Zinder, 1984.

1) bactéries fermentaires; 2) acétogènes productrices d'hydrogène;  
 3) acétogènes consommatrices d'hydrogène; 4) méthanogènes  
 consommatrices d'hydrogène; 5) méthanogènes acétoclastiques.

ATPase à gradient de protons ("proton driven ATPase"). Ceci suggère qu'il devrait être éventuellement possible d'isoler en culture pure les microorganismes responsables des différentes étapes de la déchloration du PCP.

Malgré ces prédictions, des chercheurs ont noté que la présence d'inhibiteurs de la méthanogénèse, tels l'acide bromoéthane sulfonique (BESA) ou des atmosphères d'hydrogène pur, inhibaient la déchloration du PCP (Hendriksen et Ahring, 1992) et de certains monochlorophénols (Genthner *et al.*, 1989; Zhang et Wiegel, 1990). Dans ce dernier cas, Zhang et Wiegel (1990) ont observé qu'une atmosphère d'hydrogène pur stimulait la déchloration du 2,4-DCP mais bloquait complètement celle du 4-MCP, qui accumulait alors dans le milieu. Mohn et Kennedy (1992a), en étudiant l'effet de la température sur des boues granulaires capables de dégrader des trichlorophénols, ont observé un profil similaire pour les taux de méthanogénèse et de déchloration. Aucune conclusion ne peut cependant être tirée de leur essai avec le BESA car la quantité qu'ils ont utilisée n'a réduit la méthanogénèse que de 12%.

Ceci suggère que, malgré une thermodynamique théoriquement favorable, la méthanogénèse pourrait être requise pour certaines déchlorations. Mohn et Tiedje (1992) avancent deux hypothèses pour expliquer ce phénomène: 1) les bactéries méthanogènes métaboliseraient le xénobiotique en même temps que d'autres substrats naturels; 2) les microorganismes responsables de l'enlèvement des atomes de chlore dépendent des bactéries méthanogènes. La première hypothèse ne semble pas avoir été reprise par d'autres auteurs. Par contre, pour la seconde, nous verrons à la section 5.5.1 que la déchloration de l'acide 3-chlorobenzoïque par *Desulfomonile tiedje* est effectivement sous la dépendance des autres microorganismes du consortium méthanogène.

## 5.5 ISOLEMENT DE SOUCHES

Le manque de cultures pures de bactéries anaérobies capables de faire des

déchloration réductives est un obstacle majeur à l'acquisition de connaissances pouvant mener à la conception de traitements de bioremédiation plus efficaces en conditions méthaniques (Mohn et Tiedje, 1992). À ce jour, seuls deux microorganismes de ce genre ont été isolés. Le premier s'appelle *Desulfomonile tiedje*, précédemment nommé souche DCB-1, et il déchlorure l'acide 3-chlorobenzoïque (Shelton et Tiedje, 1984). Cette bactérie a évidemment fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Le second microorganisme isolé se nomme souche DCB-2 et agit particulièrement sur des tri- et des dichlorophénols (Madsen et Licht, 1992). Cet isolement étant tout récent, peu de choses sont connues sur DCB-2.

Il est à noter que *Desulfomonile tiedje* et DCB-2 ont toutes deux une légère activité de déchloration sur le pentachlorophénol. Dans le cas de *Desulfomonile tiedje*, il s'agit d'une réaction fortuite, c'est-à-dire que l'acide 3-chlorobenzoïque doit être présent pour induire la synthèse de la déshalogénase qui ensuite peut déchlorer le PCP en position *meta* (Mohn et Kennedy, 1992b). Quant à la souche DCB-2, elle est capable de déchlorer le PCP en position *ortho*, mais à une vitesse très lente comparativement à son activité face au 2,4,6-TCP (Madsen et Licht, 1992). Nous pouvons donc conclure que, à ce jour, aucune bactérie capable de déchlorer efficacement le PCP n'a été isolée en culture pure. Il est cependant pertinent de s'attarder à ce qui a permis l'isolement de *Desulfomonile tiedje* et DCB-2.

#### 5.5.1 Isolement de *Desulfomonile tiedje*.

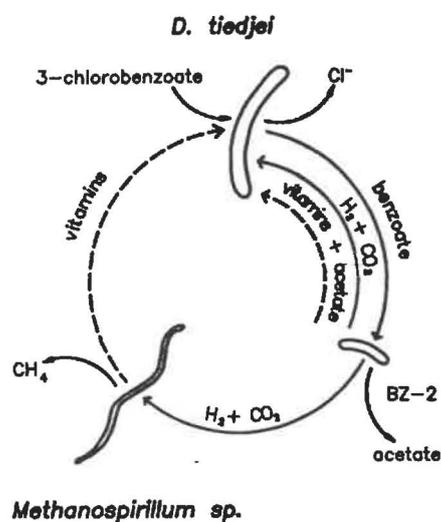
Pour arriver à isoler ce microorganisme, Shelton et Tiedje (1984) ont utilisé des techniques classiques d'enrichissement par repiquages, de dilutions et de cultures sur milieux solides. L'élément clé cependant a été l'utilisation de liquide de rumen à ces différentes étapes. Celui-ci contenait une vitamine nécessaire à *Desulfomonile tiedje* pour enlever l'atome de chlore sur l'acide 3-chlorobenzoïque. Plus tard, l'équipe de recherche a pu montrer que le composé en question était de type quinoïde et pouvait être remplacé par le 1,4-naphtoquinone ou le 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (Mohn et Tiedje, 1992). Ce dernier

est aussi connu sous le nom de vitamine K<sub>3</sub> et peut servir de transporteur d'électrons (Brock et Madigan, 1991). De plus, bien que seul l'acide 3-chlorobenzoïque était ajouté au milieu, les chercheurs ont compris plus tard que *Desulfomonile tiedje* a été isolé sur un autre substrat, présent dans le milieu de culture non-défini (Mohn et Tiedje, 1992).

Ces connaissances ont permis à l'équipe du Dr Tiedje d'élucider les liens syntrophiques qui unissaient les microorganismes d'un consortium stable capable d'utiliser l'acide 3-chlorobenzoïque comme seule source d'énergie et de carbone (figure 4). Tout d'abord, une relation de type producteur d'hydrogène/consommateur d'hydrogène unit les microorganismes acétogènes et méthanogènes, ce qui est en accord avec la théorie de la méthanogénèse (voir section 5.3.1). De plus, au moins une de ces deux bactéries produit la vitamine nécessaire à *Desulfomonile tiedje* pour déchlorer l'acide 3-chlorobenzoïque.

#### 5.5.2 Isolement de la souche DCB-2

Dans le cas de la souche DCB-2, la première étape a consisté à l'élaboration d'un consortium stable capable de déchlorer certains trichlorophénols et composé de bactéries sporulées. Pour ce faire, ils ont pris un consortium dégradant le PCP et ils l'ont chauffé à 80°C pendant une heure (Madsen et Aamand, 1992). Dans un deuxième temps, ce consortium de bactéries sporulées a subi des dilutions en milieux liquides et des repiquages sur milieux solides (Madsen et Licht, 1992). Lors de chacune de ces étapes, un milieu de culture complexe, contenant de l'extrait de levures, a été utilisé. Fait important à noter, les auteurs ont aussi ajouté à ce milieu le 1,4-naphtoquinone, vitamine permettant chez *Desulfomonile tiedje* de déchlorer l'acide 3-chlorobenzoïque. Cependant, en aucun moment les auteurs n'ont évalué la nécessité de cette vitamine pour DCB-2, ou même n'ont avancé une quelconque hypothèse à ce sujet; ils ne font que mentionner cet ajout dans les sections "Matériels et méthodes" de leurs articles.



**FIGURE 4: Relations syntrophiques dans un consortium bactérien défini métabolisant l'acide 3-chlorobenzoïque.** Les flèches pleines montrent les échanges de nutriments. Les flèches pointillées montrent des échanges hypothétiques de nutriments. Tirée de Mohn et Tiedje, 1992.

### 5.5.3 Autres tentatives d'isolements

Le peu d'isolement en culture pure de microorganismes responsables de réactions de déchloration n'est pas dû à une absence d'efforts pour y parvenir. Plusieurs chercheurs ont en effet rapporté l'échec de certaines tentatives d'isolement. Zhang et Wiegel (1990) et Dalton et Wiegel (1990) n'ont pas réussi à isoler l'organisme déchlorant le 2,4-DCP en 4-MCP dans leur consortium hautement enrichi. Tout au plus, leurs travaux suggèrent que la bactérie en question est un bâtonnet formant des spores, probablement du genre *Clostridium*. Dietrich et Winter (1990) supposent qu'un microorganisme, dont la forme suggère qu'il appartient au genre *Spirochaete*, serait responsable de la déchloration en position *ortho* du 2-MCP, du 2,6-DCP, du 2,4-DCP ainsi que du 2-bromophénol. Genthner *et al.* (1991), pour leur part, déduisent de leurs résultats qu'un bâtonnet courbé, gram-positif, serait responsable de la déchloration de l'acide 3-chlorobenzoïque. Un élément produit par un second organisme et présent dans le milieu de culture serait nécessaire à la bactérie déchlorante.

## 5.6 AUTRES ACCEPTEURS D'ÉLECTRONS

Jusqu'à présent, il n'a été question que de déchloration en conditions de fermentation méthanique. Bien que la majorité des efforts de recherche ont porté sur ce type d'environnement, certaines études se sont attardées à l'effet d'autres accepteurs d'électrons, soit essentiellement le nitrate et le sulfate. La plupart ont observé que ces deux composés inhibaient la déchloration des chlorophénols (Gibson et Suflita, 1986; Hale *et al.*, 1991; Kohring *et al.*, 1989; Madsen et Aamand, 1991; Genthner *et al.*, 1989; Hendriksen et Ahring, 1992; Mohn et Kennedy, 1992a; Mohn et Tiedje, 1992). Il y a cependant de notables exceptions. Häggblom *et al.* (1993) ont observé la dégradation des trois monochlorophénols en conditions de réduction de sulfate ainsi que celle du 3-MCP dans des cultures dénitrifiantes. Bien qu'ils aient noté surtout des inhibitions, Genthner *et al.* (1989) ont rapporté que la déchloration du 4-MCP dans une de leurs cultures était stimulée par la présence de sulfate. Dans un consortium non-adapté aux chlorophénols, Kohring *et al.*

(1989) ont montré que le nitrate inhibait complètement la dégradation du 2,4-DCP alors que l'addition de sulfate ne faisait que ralentir le temps d'adaptation ainsi que le taux de déchloration en position *ortho*. Lorsque ce consortium était préalablement adapté au 4-MCP en conditions méthaniques, l'addition de sulfate n'avait pas d'effet. Toujours en présence de sulfate, Häggblom et Young (1990) ont obtenu la dégradation des trois monochlorophénols et du 2,4-DCP à l'aide de sédiments de rivière. De plus, l'ajout de molybdate, un inhibiteur de la réduction du sulfate, bloquait la déchloration de ces composés. Il est à noter que la spécificité de la déchloration était différente de celles rapportées en conditions méthaniques (voir section 5.3): la préférence était *para* > *meta* > *ortho*. Liu et Pacepavicius (1990) ont également observé cet ordre de préférence dans une étude où du nitrate et du sulfate étaient à la fois présents.

Pour ce qui est spécifiquement du PCP, peu d'études ont vérifié l'effet des accepteurs d'électron. Madsen et Aamand (1991) ont observé que, d'une part, le sulfate inhibait la déchloration du PCP et que, d'autre part, cette inhibition est due à une compétition pour l'hydrogène entre la réduction du sulfate et la déchloration. Ceci est différent de Hendriksen et Ahring (1992) qui n'ont obtenu qu'une légère inhibition de la déchloration en présence de glucose et de sulfate et aucun effet si le sulfate était ajouté sans glucose (mais les performances étaient de toute façon moins bonnes sans glucose). Par ailleurs, la présence de nitrate se traduisait par une forte inhibition. Abrahamson et Klick (1991) ont rapporté la dégradation du PCP avec des sédiments marins, un milieu réputé pour être riche en sulfate. Cependant, les auteurs ne mentionnent pas dans leur article la vérification de ce paramètre.

## 5.7 MÉCANISMES DE LA DÉCHLORATION

La plupart des études portant sur la déchloration du PCP ainsi que sur celle d'autres composés aromatiques chlorés ont montré que la stérilisation par la chaleur, par irradiation ou par différentes substances chimiques entraînait une inhibition de la déchloration (Mohn et Tiedje, 1992). Il est donc clair que cette activité est dépendante de phénomènes

biologiques. Il n'est pas certain pour autant que la déchloration s'effectue via une catalyse enzymatique. Par exemple, la stérilisation pourrait éliminer une source biologique d'agent réducteur, nécessaire à la déchloration. Ceci dit, un bon nombre de phénomènes fréquemment observés appuient l'hypothèse de la catalyse enzymatique. Mohn et Tiedje (1992), citant plusieurs études, remarquent que les températures où il y a déchloration de composés aromatiques sont cohérentes avec la possibilité d'une telle catalyse. Ceci contraste avec les porphyrines, des molécules qui pourraient être impliquées dans des déchloration réductives non enzymatiques et qui sont stables jusqu'à 200 ou 300°C (Hasan *et al.*, 1992). Aussi, contrairement aux composés aliphatiques halogénés, la déchloration des substances haloaromatiques est très spécifique au substrat et à des positions précises sur le noyau aromatique (voir section 5.3). D'ailleurs ces activités se conforment tellement bien aux phénomènes enzymatiques que Hendriksen et Ahring (1992) ont pu calculer une constante de demi-saturation ( $K_s$ ) apparente de 2,2  $\mu\text{M}$ , suggérant que le consortium a une forte affinité pour ce substrat. Suflita *et al.* (1983) avaient également pu calculer un  $K_s$  de 67  $\mu\text{M}$  pour un consortium dégradant l'acide 3-chlorobenzoïque, consortium à partir duquel *Desulfomonile tiedje* allait être isolé. Après cinq ans de transferts et de repiquages de cette bactérie, le  $K_s$  a été estimé à moins de 1  $\mu\text{M}$  (DeWeerd *et al.*, 1986). Chez ce dernier microorganisme, aucune déshalogénase n'a encore été purifiée (Mohn et Tiedje, 1992). Mais encore une fois, de nombreuses observations supportent l'hypothèse qu'une telle enzyme existe, tel le caractère inductible de l'activité déshalogénase (Cole et Tiedje, 1990; DeWeerd et Suflita, 1990; Mohn et Kennedy, 1992b) ou la conservation d'énergie et la production d'ATP à partir de la déchloration de l'acide 3-chlorobenzoïque (Dolfing, 1990; Mohn et Tiedje, 1990; Mohn et Tiedje, 1991). C'est d'ailleurs ceci qui a amené la suggestion du mécanisme déjà mentionné à la section 5.4.2, c'est-à-dire une déshalogénase membranaire associée à une déshydrogénase de l'acide formique et à une ATPase à gradient de protons (Mohn et Tiedje, 1992).

Plusieurs études ont montré que des complexes de métaux de transition ("transition metal complexe"), tel les porphyrines de fer, de cobalt et de nickel, sont impliquées dans la déchloration de composés aliphatiques (Mohn et Tiedje, 1992). Elles peuvent catalyser ces réactions de manière abiotique. Pour les composés aromatiques cependant, l'activité abiotique de tels complexes est faible et incomplète (Assaf-Anid *et al.*, 1992; Gantzer et Wackett, 1991). Il reste cependant possible que de tels composés jouent un rôle de co-enzyme dans la déchloration réductive faite par des bactéries anaérobies (Mohn et Tiedje, 1992).

## 6. APPLICATIONS

Le but ultime de ces recherches est la mise au point de biotraitements pour éliminer le PCP présent dans des sols contaminés, dans des effluents, dans les vieux poteaux ayant dépassé leur vie utile, etc. Ce sont évidemment les microorganismes aérobies qui sont jusqu'à présent les plus utilisés pour de telles applications.

### 6.1 TRAITEMENT *IN SITU*.

De façon générale, l'addition de bactéries aérobies capables de minéraliser le PCP à des sols contaminés donne de bons résultats. Par exemple, 210 jours après avoir inoculé *Flavobacterium* dans un sol, Seech *et al.* (1991) ont obtenu 97% d'enlèvement des 175 mg de PCP/Kg de sol, dont 67% se retrouvaient sous forme de CO<sub>2</sub>. Avec plusieurs additions de ce même microorganisme, Crawford et Mohn (1985) ont traité des sols contenant 300 mg de PCP/Kg avec un rendement de plus de 80% en 100 jours. Edgehill et Finn (1983) ont atteint des résultats similaires avec *Arthrobacter*. Avec *Rhodococcus chlorophenolicus*, souche PCP-1, Middeldorp *et al.* (1990) ont traité des doses de PCP de 600 mg/Kg, mais avec des rendements de moins de 50% après 4 mois. À l'opposé, des traitements aérobies sans addition de bactéries compétentes se sont avérés inefficaces face au PCP (Mueller *et al.*, 1991a).

Du côté anaérobie, Mikesell et Boyd (1988) ont induit la dégradation de tout le PCP contenu dans un sol par bioaugmentation avec des boues anaérobies acclimatées au PCP. Les doses traitées étaient cependant faibles (10 à 30 mg de PCP/Kg de sol) et 63 % de ce PCP était transformé en tri-, di- ou monochlorophénols.

Certains essais ont également été faits avec des microorganismes eucaryotes ou avec des enzymes extraites de ceux-ci (Lamar et Dietrich, 1990; Bollag, 1992). Cependant, tel que mentionné à la section 4.2, ces systèmes enzymatiques non-spécifiques produisent des pentachloroanisoles ou des polymérisations qui ne sont pas souhaitables en tant que traitement définitif du PCP.

## 6.2 TRAITEMENT D'EFFLUENTS LIQUIDES

Les bioréacteurs peuvent servir à assainir des effluents industriels contenant du PCP ainsi que des eaux contaminées provenant de l'extraction en phase aqueuse du PCP contenu dans des sols ou dans du bois traité. Les bactéries aérobies ont également fait leurs preuves dans ce domaine. Par exemple, Stinson *et al.* (1992) ont réussi à traiter avec *Flavobacterium* le PCP extrait de sols contaminés. Encore une fois, un traitement aérobie sans bactéries compétentes a échoué (Mueller *et al.*, 1991b). Travaillant sur du PCP contenu dans de la sciure de bois traité, McBain *et al.* (1993) ont diminué la concentration de 15 000 à 7 mg de PCP/Kg de bois. Ils ont noté cependant que les chlorodioxines provenant du PCP de qualité technique (voir section 2.1) n'étaient pas éliminés par cette méthode. Les mêmes auteurs avaient préalablement écarté *Phanerochaete chlorophenolicus* comme candidat potentiel pour un biotraitement puisque, dans des essais préliminaires, 80% d'une quantité de 500 ppm de PCP avaient été transformés en pentachloroanisole.

En comparaison, les biotraitements anaérobies dont il a été question à la section 5.2 n'ont pas été testés avec des effluents réels. Il faut noter cependant une exception où un réacteur anaérobie à lit fluidisé couplé à un filtre aérobie a été utilisé pour traiter l'effluent d'une industrie papetière (Hakulinen et Salkinoja-Salonen, 1982; Salkinoja-Salonen *et al.*,

1984). Bien que l'ensemble du montage pouvait traiter 0,2 mM de PCP, le rôle joué par le réacteur anaérobie dans ces performances n'est pas claire.

**M A T É R I E L S**  
**E T**  
**M É T H O D E S**

---

## 1. PROVENANCE DU CONSORTIUM

Les microorganismes dégradant le PCP ont été obtenus en mélangeant, au départ, des sols contaminés au PCP provenant de 2 sites différents à des boues de digesteur anaérobie. Un des échantillons de sol provenait d'un terrain d'entreposage de poteaux (compagnie Hydro-Québec) alors que l'autre a été prélevé sur le site d'une usine de traitement du bois (compagnie Domtar). Les boues utilisées sont celles du digesteur anaérobie de l'usine d'épuration de la municipalité de Deux-Montagnes (Québec). L'enrichissement des bactéries du consortium a été réalisé dans des bioréacteurs à alimentation semi-continue.

## 2. MILIEU DE CULTURE

Le milieu de culture utilisé est une modification de celui de Boyd *et al.* (1983). Il contenait, par litre:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,27 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,53 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,10 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,073 g;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,020 g; solution de minéraux, 10 mL; résazurine, 0,001 g; solution de vitamines, 10 mL;  $\text{Na}_2\text{S}$ , 0,005 g. Le pH était ajusté entre 7,2 et 7,4 avec du  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . La solution de vitamines, le  $\text{Na}_2\text{S}$ , les chlorophénols, le  $\text{NaOH}$  (pour l'ajustement final du pH) et la source additionnelle de carbone ont été stérilisés par filtration (filtre AcroDisk de porosité de 0,2  $\mu\text{m}$ , Gelman Sciences, Ann Arbor, États-Unis) et ajoutés au milieu après le passage à l'autoclave. La solution de minéraux était composée des éléments suivants, par litre (Wolin *et al.*, 1963):  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mg;  $\text{ZnCl}_2$ , 0,1 mg;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mg;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,1 mg;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mg. La solution de vitamines contenait, par litre: biotine, 2 mg; acide folique, 2 mg; hydrochlorure de pyridoxine, 10 mg; riboflavine, 5 mg; thiamine, 5 mg; acide nicotinique, 5 mg; acide panthoténique, 5 mg; vitamine  $\text{B}_{12}$ , 0,1 mg; acide *p*-aminobenzoïque, 5 mg; acide thioctique, 5 mg. Lorsque mentionné, le PCP-Na (Aldrich, Milwaukee, États-Unis), les monochlorophénols (Aldrich) et les différentes sources de carbone testées ont été ajoutés au milieu à partir de solutions aqueuses anaérobies de concentrations variables, selon les besoins.

Lorsque le milieu a été préparé dans le but d'être distribué dans des petites bouteilles, il a tout d'abord été chauffé jusqu'à ébullition en présence d'une colonne réfrigérante et maintenu ainsi pendant un minimum de 15 minutes. Il a ensuite été transféré dans des bouteilles à sérum en verre (Canlab, Pointe-Claire). Le milieu bouillant a été barbotté 5 minutes par un mélange de gaz contenant 10% de H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> et 80% de N<sub>2</sub> (Medigas, Ville Saint-Laurent). Les bouteilles ont été hermétiquement fermées avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, États-Unis) et elles ont été autoclavées pendant 15 minutes à 121°C. Lorsque le milieu était plutôt destiné à l'alimentation des bioréacteurs, il a été préparé dans des bouteilles de verre de 4 ou 9 litres (Fisher, Montréal). Le milieu pouvait soit être bouilli avant d'être stérilisé durant 1 heure à 121°C, soit être placé dans l'autoclave pendant 2 heures sans être préalablement chauffé. Les bouteilles ont été fermées par un bouchon de butyle traversé de différentes tubulures.

### **3. QUANTIFICATION ET IDENTIFICATION DES CHLOROPHÉNOLS**

#### **3.1 Analyses par HPLC**

Les analyses de routine ont été faites par chromatographie liquide de haute performance (HPLC). Un volume de 0,66 mL d'échantillon a été mélangé à 0,33 mL d'acétonitrile (qualité HPLC, BDH, Ville Saint-Laurent) contenant 0,33% d'acide acétique. L'équipement utilisé était de marque Waters (Mississauga, Ontario), soit deux pompes (modèle 510), un spectrophotomètre (Lambda-Max, modèle 481) et une colonne hydrophobe NovaPak C<sub>18</sub> (3.9 mm X 150 mm, en acier). Le système était contrôlé par le logiciel Waters Expert, version 4.0, fonctionnant sur un ordinateur Professional 350 (Digital Equipment, Ville Saint-Laurent). Le programme utilisé pour séparer les différents chlorophénols durait 12 minutes et avait recours à 2 phases mobiles. La première (A) était composée d'eau, d'acétonitrile et d'acide acétique dans le rapport 70:30:0,1 et la deuxième (B) contenait les mêmes éléments dans les proportions 50:50:0,1. La colonne était tout d'abord équilibrée pendant un minimum de 5 minutes dans la phase mobile A à un débit de 2 mL/minute. Après injection de

l'échantillon à analyser, un gradient linéaire de la phase mobile A à la phase mobile B était appliqué pendant 5 minutes. Le débit de 2 mL/minute était finalement maintenu pendant 3 minutes avec la phase mobile B. Les lectures d'absorbance ont été effectuées à 220 nm. À l'exception des TeCP, la résolution des congénères de chlorophénol était adéquate pour fin d'identification et de quantification. La présence de TeCP a pu être notée, mais l'identification des isomères et leur quantification n'a pas été possible par HPLC. La courbe d'étalonnage utilisée pour le PCP a été faite à partir de différents échantillons-étalons de PCP-Na. La quantité minimale ainsi détectée était de 0,4  $\mu\text{M}$ . Des courbes d'étalonnage ont également été réalisées pour les chlorophénols suivants: *o*-MCP, *m*-MCP, *p*-MCP, 3,4-DCP, 3,5-DCP, 2,3,4-TCP, 2,3,5-TCP. Les sensibilités variaient, selon les congénères, de 0,6 à 2,7  $\mu\text{M}$ .

### **3.2 ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE**

La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour confirmer l'identité des intermédiaires de dégradation du PCP ainsi que pour doser les TeCP. La présente méthode est une modification de celle de Nicholson *et al.*, 1992.

#### **3.2.1 Acétylation et extraction**

Dans un tube de verre à bouchon vissable contenant un échantillon de 2 mL, on a ajouté 20  $\mu\text{L}$  de standard interne (*m*-crésol, 1,8 mg/L), 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,7 g/mL) et 200  $\mu\text{L}$  d'anhydride acétique (Mallinkrodt, Mississauga, Ontario). Le mélange a été agité pendant 2 minutes et laissé au repos pendant 20 minutes. Ensuite 1 mL d'hexane (Anachemia, Montréal) a été ajouté et le tube a été agité pendant 2 minutes. On a laissé reposer le temps que les deux phases se séparent bien. La phase organique a été recueillie et mise dans une petite fiole conique de 2 mL. L'extraction a été recommencée avec deux autres volumes de 0,5 mL d'hexane. Les trois phases organiques ont été placées dans la même fiole conique. On a concentré le tout par évaporation sous jet d'azote jusqu'à un volume final de 0,1 mL environ. De ce volume, 2  $\mu\text{L}$  ont été injectés dans le chromatographe.

### **3.2.2 Séparation et quantification**

L'appareil utilisé était un chromatographe de marque Hewlett Packard, modèle 5890 A, muni d'une colonne capillaire de type DB5 (5% phényle, 95% méthyle de silicone) de 25 mètres de longueur et de 0,2 mm de diamètre interne. L'azote a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 2 mL/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme (FID) étaient respectivement 250 et 340°C. Les échantillons ont été injectés en mode de séparation (mode "split"). Le four a été programmé pour que la température s'élève de la façon suivante: de 70 à 130°C à raison de 15°C/minute; de 130 à 215 °C à un taux de 5°C/minute; le four était maintenu à 215°C pendant 2 minutes; de 215 à 260°C à raison de 20°C/minute; finalement, la température était maintenue à 260°C pendant 5 minutes. Les temps de rétention ont été déterminés et des courbes d'étalonnage ont été faites pour le phénol et la plupart des chlorophénols (Aldrich, sauf pour les TeCP; Supelco, Oakville, Ontario, pour les TeCP; sensibilité minimale de 1 µM).

### **3.3 SPECTROMÉTRIE DE MASSE**

La spectrométrie de masse (MS) a été utilisée pour confirmer l'identité des intermédiaires de dégradation du PCP. Les chlorophénols ont tout d'abord été séparés avec le programme décrit à la section 3.2.2. Le chromatographe utilisé (Varian, modèle 3500) était couplé à un spectromètre de masse de type à trappe ionique (Finnigan Mat, modèle 700). L'hélium a servi de gaz porteur, à un débit de 1,8 mL/minute. La colonne capillaire était de type DB5 et mesurait 30 mètres. Les échantillons ont été injectés en mode de séparation (mode "split"). Les spectres ont été obtenus par des balayages (1 par seconde) pour les masses comprises entre 70 et 350 daltons.

## **4. DÉTECTION DE LA PRÉSENCE DE MÉTHANE**

Des analyses qualitatives visant à vérifier la présence de méthane dans les bioréacteurs ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse. Le même équipement que mentionné à la section 3.2.2 a été utilisé. La température du four était de 50°C au

départ et a été maintenue ainsi pendant 1 minute. Elle a ensuite été élevée jusqu'à 200°C à raison de 21°C par minute. La température de l'injecteur était de 250°C et celle du détecteur de 340°C. Un gaz standard de méthane (Medigas) a servi de référence. Le mélange de gaz (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) servant à la préparation du milieu de culture a également été analysé en tant que témoin négatif. Les échantillons ont été préparés de la façon suivante: à l'aide d'une seringue de 10 mL, un vide partiel a été créé dans une bouteille à GC de 1,5 mL hermétiquement fermée. Toujours avec une seringue de 10 mL, un échantillon de l'atmosphère de chaque réacteur a été prélevé et injecté dans la bouteille à GC. Les seringues et les bouteilles à GC ont préalablement été rincées à l'azote.

## **5. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE**

La microscopie électronique à balayage a été utilisée pour analyser le biofilm sur les roches contenues dans le bioréacteur à surfaces fixes B2. Des roches prélevées à différentes hauteurs dans la colonne ont été préparées par la méthode de Hayat (1974). Immédiatement après leur prélèvement, les roches ont été fixées avec une solution de glutaraldéhyde 2,5% (p/v) pendant 30 minutes. Elles ont ensuite été lavées 3 fois dans un tampon cacodylate 0,1 M, contenant 3% de sucrose, avant d'être fixées avec du tétroxyde d'osmium 1,33% (p/v). Après cela, le biofilm a été déshydraté dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (25, 50, 75, 95 et 100% v/v) suivi de trempage dans des solutions de fréon (25, 50, 75, 95 et 100%). Ainsi traitée, chaque roche a été séchée à l'air et collée sur un porte-échantillon. En dernière étape, une couche d'or et de palladium a été appliquée sur chaque échantillon. Le microscope utilisé pour l'observation était le modèle S2300 de la compagnie Hitachi (Mito, Japon) et appartenait à l'Université du Québec à Montréal.

## **6. BIORÉACTEURS**

### **6.1 BIORÉACTEURS À ALIMENTATION SEMI-CONTINUE**

Les 2 premiers bioréacteurs étudiés étaient de type à cuves fixes à alimentation semi-continue. Ils ont tous les deux été incubés dans une chambre étuve maintenue à 29°C.

#### **6.1.1 Bioréacteur A1**

Ce bioréacteur était constitué d'une bouteille de verre de 4 litres contenant 1,7 litre de milieu liquide. Le bouchon était en butyle et était traversé de tubes de borosilicate ou d'acier. Une de ces conduites était reliée à une série de 2 bouteilles permettant l'évacuation du gaz produit sans risque de reflux (voir figure 5). Des ajouts de 17  $\mu\text{M}$  de PCP ont été faits lorsque les analyses sur HPLC indiquaient que la dose précédente avait complètement disparu. Également, à différents intervalles, une partie du milieu du réacteur a été retirée et remplacée par du milieu frais contenant 1,0 g de glucose/litre. Occasionnellement, lorsque l'activité de dégradation du PCP a été perdue, des boues de digesteur anaérobie (usine d'épuration de la municipalité de Deux-Montagnes, Québec) ont été ajoutées. Le pH de la culture a été ajusté au besoin entre 7,0 et 7,5 par additions manuelles de  $\text{NaHCO}_3$  ou de  $\text{NaOH}$ . Le bioréacteur A1 a été maintenu en alimentation semi-continue pendant 272 jours.

### **6.2 BIORÉACTEURS À ALIMENTATION CONTINUE**

La deuxième série de bioréacteurs étudiée était de type à cuve (fixe ou agitée) à alimentation continue. À l'exception du réacteur B2, qui a été placé à la température de la pièce (environ 23°C) après 418 jours, les 3 bioréacteurs ont été opérés à 29°C. Les montages étaient similaires aux précédents mais chaque réacteur avait en plus une pompe péristaltique (LKB modèle 2132, Pharmacia, Uppsala, Suède, ou Masterflex L/S, Cole-Parmer, Chicago, États-Unis) qui l'alimentait continuellement en milieu frais, en PCP et en sources additionnelles de carbone (figure 6). Comme pour les réacteurs à alimentation semi-

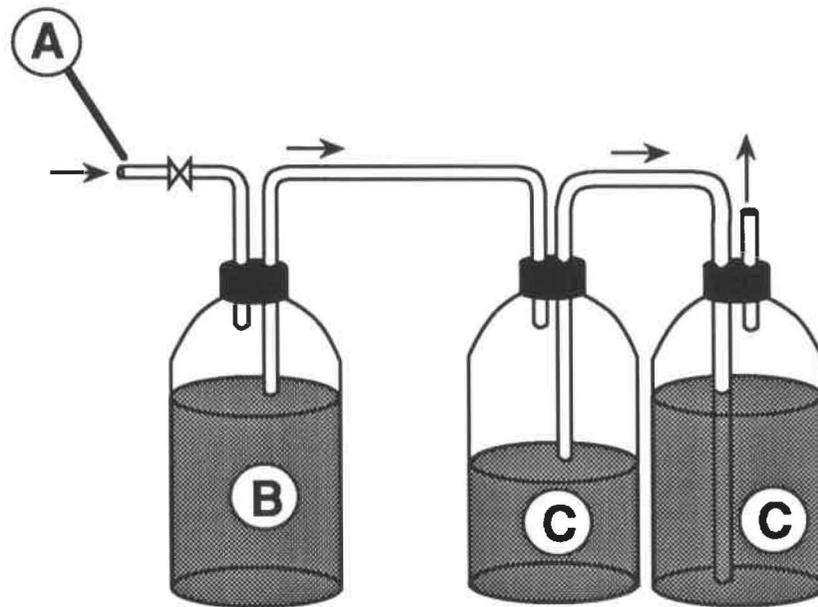


FIGURE 5: **Schéma du bioréacteur à alimentation semi-continue (réacteur A1).** A) Conduite permettant l'ajout et le prélèvement de milieu; B) bioréacteur; C) bouteilles anti-reflux.

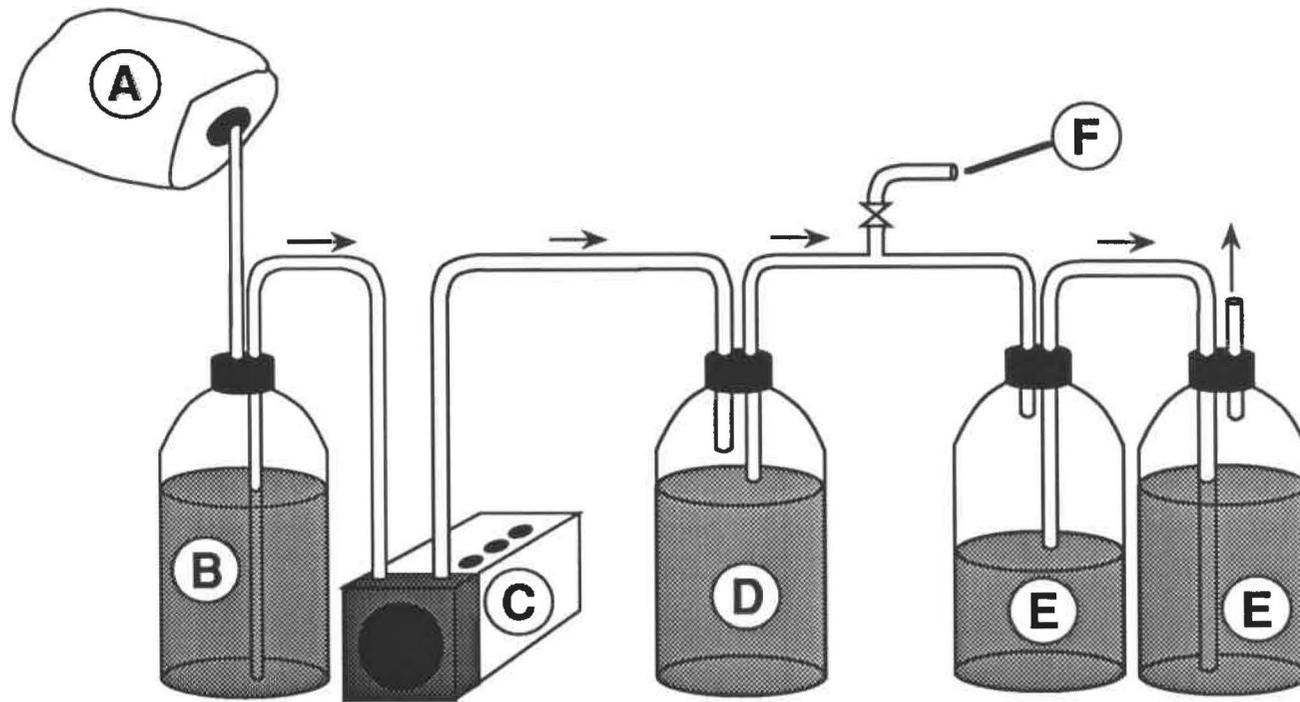


FIGURE 6: Schéma des bioréacteurs à alimentation continue (réacteurs B1, B2 et B3). A) Sac de gaz sans oxygène; B) réservoir d'alimentation; C) pompe d'alimentation; D) bioréacteur; E) bouteilles anti-reflux; F) port d'échantillonnage.

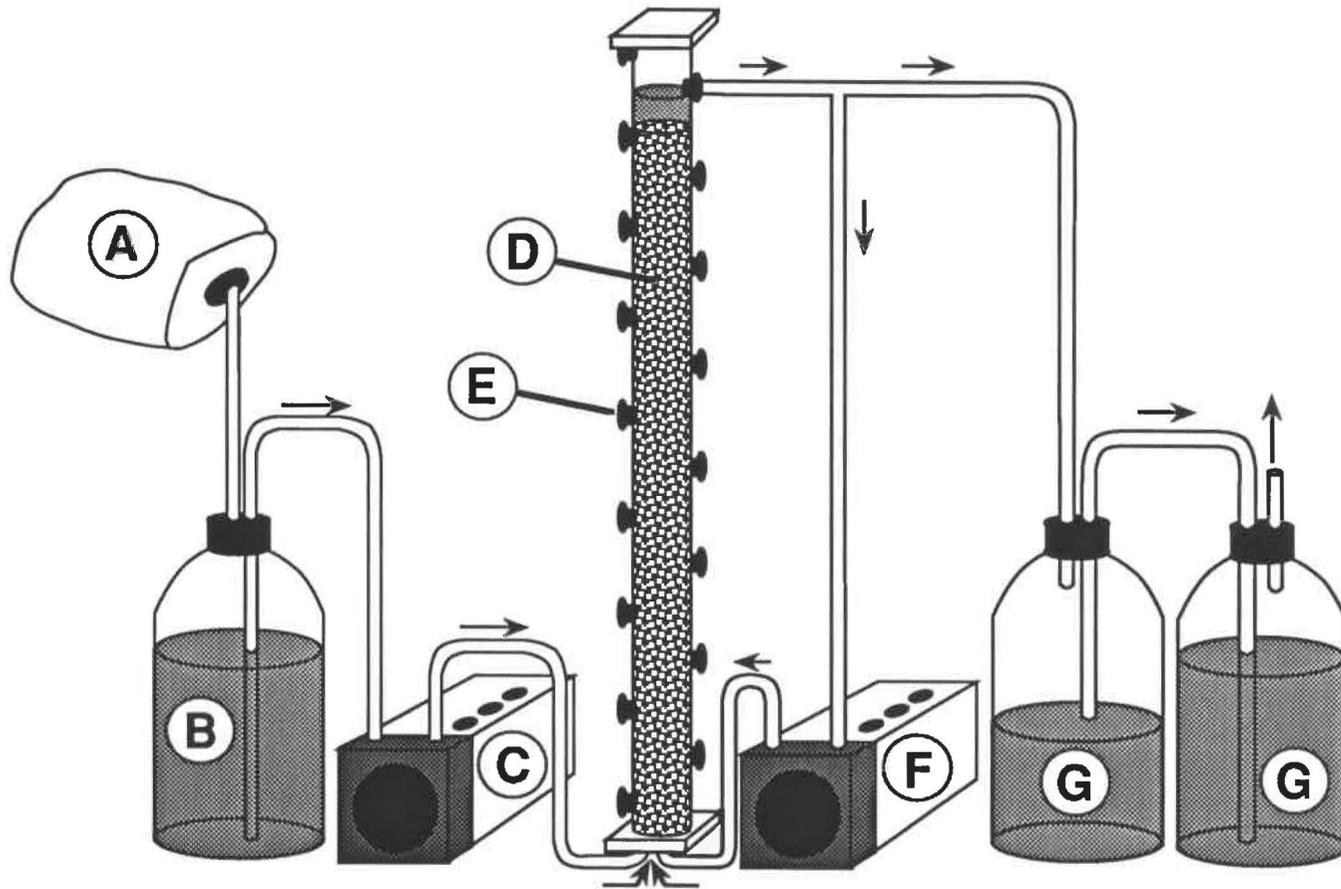


FIGURE 7: Schéma des bioréacteurs à surfaces fixes (bioréacteur C1 et C2). A) Sac de gaz sans oxygène; B) réservoir d'alimentation; C) pompe d'alimentation; D) bioréacteur; E) port d'échantillonnage; F) pompe de recirculation; G) bouteilles anti-reflux.

continue, des ajouts de  $\text{NaHCO}_3$  ou de  $\text{NaOH}$  ont parfois été nécessaires pour maintenir le pH de la culture entre 7,0 et 7,5.

### **6.2.1 Réacteur B1**

Il s'agissait en fait du réacteur A1 qui a été mis en mode continu après 272 jour d'alimentation semi-continue. Le volume du réacteur était de 4 litres (1,7 litre de milieu liquide). Parmi les 3 bioréacteurs à alimentation continue, le B1 a été le seul à être agité continuellement. La principale variable qui a été modifiée est le temps de résidence hydraulique, passant de 30 à 8,5 jours. Pendant les 484 jours d'opération, l'affluent de ce réacteur a contenu  $35 \mu\text{M}$  de PCP. Au début il a reçu du glucose à raison de 1 g/L comme source de carbone additionnelle. Après 290 jours, ceci a été remplacé par un mélange glucose/formiate de sodium à des concentrations de 0,5 g/L et 1,1 g/L respectivement. Au jour 423, ces concentrations ont été doublées.

### **6.2.2 Réacteur B2**

Le volume de ce réacteur était de 600 mL (500 mL de milieu liquide). Il a fonctionné pendant 684 jours. La principale variable testée sur ce réacteur a été la température: après 418 jours, il est passé de 29 à 23°C (température de la pièce). Les doses de PCP dans l'affluent ont varié de 17 à 69  $\mu\text{M}$ . Les temps de résidence hydraulique ont été relativement stables, variant de 7,7 à 3,5 jours. Le passage du glucose (1g/L) comme seule source additionnelle de carbone au mélange glucose/formiate de sodium (0,5 et 1,1 g/L) s'est fait au jour 415.

### **6.2.3 Réacteur B3**

Ce réacteur de 600 mL (500 mL de milieu liquide) a fonctionné pendant 495 jours en mode continu. Le temps de résidence hydraulique a été conservé entre 5,8 à 8,1 jours. Les doses de PCP à l'affluent ont cependant varié de 20 à 243  $\mu\text{M}$ . Le passage du glucose

(1g/L) comme seule source additionnelle de carbone au mélange glucose/formiate (0,5 et 1,1 g/L) s'est fait au jour 301. Les concentrations ont été doublées au jour 431.

### **6.3 BIORÉACTEURS À SURFACES FIXES**

Les surfaces fixes utilisées dans ces bioréacteurs étaient composées de pierres concassées, tamisées pour ne retenir que les grosseurs comprises entre 5 et 10 mm. Une pompe péristaltique à tête multiple (Masterflex L/S) a assuré l'alimentation continue en milieu frais. Tous ces réacteurs ont été opérés à 29°C.

#### **6.3.1 Bioréacteur C1 et C2**

Ces 2 bioréacteurs étaient de longues colonnes étroites, fabriquées en plexiglass, de 47 cm de haut par 3,8 cm de diamètre (figure 7). Le volume du lit filtrant était de 310 mL alors que le milieu liquide n'occupait que 150 mL. Outre leur architecture très étroite, la particularité de ces bioréacteurs résidait dans les 17 ports d'échantillonnages tout le long de chaque colonne. Il s'agissait de trous de 13 mm fermés avec des bouchons de butyle. Ces orifices ont permis d'échantillonner le milieu liquide (à l'aide d'une seringue) et de prélever des roches (en retirant les bouchons dans une chambre anaérobie).

Au démarrage, 30 mL de milieu frais contenant du glucose (0,5 g/L), du formiate (1,1 g/L) et du PCP (35  $\mu$ M) ont été introduits dans chacun des réacteurs. Le volume a été complété avec du milieu prélevé dans le réacteur B1. Le milieu a ensuite été recirculé pendant 2 heures à un débit de 1,8L/heure, après quoi les réacteurs ont été laissés au repos pendant 3 jours avant d'être mis en alimentation continue.

Après 44 jours d'opération, de l'azoture de sodium (2 g/L) a été ajouté au réservoir d'alimentation du réacteur C1 afin de s'assurer que la disparition du PCP était bien due à une biodégradation et non à des phénomènes abiotiques tel l'adsorption. Le réacteur C1 a été opéré pendant 61 jours alors que le C2 a fonctionné durant 238 jours. Sur le réacteur C2, une pompe (LKB modèle 2132) de recirculation a été installée au jour 177. Les taux de

recirculation ont varié de 0 à 3:1 (débit de recirculation:débit d'alimentation). Les doses de PCP à l'affluent ont passé de 4,5 à 90  $\mu\text{M}$ , avec des temps de résidence hydraulique de 2,1 à 0,7 jours (50,4 à 16,8 heures). Le mélange glucose/formiate de sodium (0,5 et 1,1 g/L) a servi de source additionnelle de carbone. Les concentrations ont été doublées au jour 177.

### **6.3.2 Bioréacteur C3**

Ce bioréacteur était fait d'une bouteille de verre de 4 litres, remplie partiellement de pierres concassées et contenant 850 mL de milieu liquide. Le temps de résidence hydraulique a été maintenu à environ 2 jours et la dose de PCP à l'affluent a toujours été de 35  $\mu\text{M}$ . Le démarrage a été réalisé de manière similaire aux réacteurs C1 et C2. Le bioréacteur C3 a essentiellement servi de source de bactéries pour des essais en bouteilles (voir section 6). Il a fonctionné pendant 139 jours. Le mélange glucose/formiate de sodium (0,5 et 1,1 g/L) a servi de source additionnelle de carbone. Les concentrations ont été doublées au jour 78.

## **7. ESSAIS DANS DES BOUTEILLES À SÉRUM**

Pour être en mesure de déterminer l'effet de plusieurs paramètres sur le consortium bactérien, il a été nécessaire de travailler avec des bouteilles à sérum. Ceci dit, des essais préliminaires ont démontré qu'il n'était pas possible de diluer le consortium ou de le centrifuger et de le resuspendre dans du milieu frais. Ainsi, la procédure suivante a été adoptée. À partir d'un bioréacteur actif, 20 mL de milieu ont été transférés dans des bouteilles à sérum de 70 mL. Ceci a été fait sous jet d'un mélange gazeux sans oxygène (10% de  $\text{H}_2$ , 10% de  $\text{CO}_2$  et 80% de  $\text{N}_2$ ) ou dans une chambre anaérobie. Le PCP, les trichlorophénols ou les monochlorophénols ont été ajoutés en même temps que les sources additionnelles de carbone, soit (à l'exception de l'essai sur les co-substrats) le glucose (0,5 g/L) et le formiate de sodium (1,1 g/L). Les essais portant sur les co-substrats, sur la dégradation des monochlorophénols ainsi que sur le rôle des bactéries sporulées dans la dégradation de trichlorophénols ont été réalisés dans des milieux liquides extraits du réacteur B1. Les autres

tests en bouteilles ont été effectués sur le surageant du réacteur à surfaces fixes C3, qui était légèrement agité avant le prélèvement de milieu afin de détacher une partie du biofilm. Tous ces essais ont été faits en triplicata.

## **8. CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM BACTÉRIEN**

### **8.1 DÉTERMINATION DE LA VOIE BIOCHIMIQUE**

La détermination des voies biochimiques de dégradation du PCP a été faite à l'aide du bioréacteur B3. Lorsque la dose de PCP à l'affluent de ce réacteur a atteint 243  $\mu\text{M}$ , plusieurs pics sont apparus sur le chromatogramme des analyses par HPLC, signifiant que des chlorophénols moins chlorés accumulaient dans le milieu. Des échantillons pris à ce moment ont alors été analysés par GC-FID et GC-MS.

### **8.2 EFFET DE L'ADDITION D'UN CO-SUBSTRAT**

L'effet d'une source additionnelle de carbone a été déterminé dans des bouteilles à partir de milieu prélevé du réacteur B1. Cependant puisque, d'une part, le réacteur B1 était alimenté en glucose et que, d'autre part, des essais préliminaires ont montré qu'il n'était pas possible de centrifuger le consortium et de le resuspendre dans du milieu frais, une procédure d'alimentation semi-continue des bouteilles a été utilisée. Au jour zéro, 16  $\mu\text{M}$  de PCP ainsi que le co-substrat ont été ajoutés à 20 mL du consortium. À chaque 4 jours, 20% du volume des cultures a été remplacé par du milieu frais contenant le co-substrat. Le PCP était aussi réajusté à 16  $\mu\text{M}$ . À chaque 2 jours, des échantillons ont été pris pour analyse sur HPLC. Avec ce protocole, 6 conditions ont été testées: aucun co-substrat, addition de glucose (1 g/L), addition d'acétate de sodium (1,37 g/L), addition de formiate de sodium (2,27 g/L), addition de lactate de sodium (1,24 g/L) et addition d'extrait de levures (1 g/L). À l'exception de l'extrait de levures, les quantités de co-substrat ont été déterminées pour représenter une quantité de carbone identique, soit 0,4 g/L. La quantité d'extrait de levures

a été fixée arbitrairement à 1 g/L, son contenu en carbone n'étant pas connu. Cet essai a duré 24 jours.

### **8.3 DÉGRADATION DES MONOCHLOROPHÉNOLS**

L'activité du consortium face aux 3 monochlorophénols a été testée dans des bouteilles à serum. En plus du mélange glucose/formiate de sodium, 39  $\mu\text{M}$  de chacun des 3 monochlorophénols ont été ajoutés dans 6 bouteilles contenant 20 mL de milieu prélevés dans le réacteur B1. De ces 6 bouteilles, 3 ont été stérilisées par la chaleur (121°C, 15 minutes). Le devenir des monochlorophénols a été suivi par des analyses sur HPLC pendant 84 jours.

### **8.4 EFFET DE LA TEMPÉRATURE**

Des échantillons de 20 mL du réacteur C3 ont été incubés à 4, 15, 29, 37 et 45 °C. Des témoins stériles, chauffés à 121°C pendant 15 minutes, ont aussi été incubés à 29 °C. Chaque bouteille contenant le consortium a été préincubée à sa température d'essai 2 heures avant l'addition de 20  $\mu\text{M}$  de PCP et du mélange glucose/formiate de sodium (0,5 g/L et 1,1 g/L). Le devenir du PCP et de ses intermédiaires de dégradation ont été suivi par des analyses sur HPLC. Le suivi s'est fait à des intervalles courts (1 fois par heure lorsque l'activité était rapide) pendant 52 heures. Des mesures ont également été faites après 9 jours.

### **8.5 RÔLE DES BACTÉRIES SPORULÉES**

Le protocole utilisé ici est inspiré de celui de Ye *et al.*, 1992. Des bouteilles à serum contenant 20 mL de surnageant du réacteur C3 (pour les essais avec le PCP) ou 20 mL du réacteur C1 (pour les essais avec les trichlorophénols) ont été incubées à 80°C pendant 1 heure. Après refroidissement, le 2,3,4-TCP (48  $\mu\text{M}$ ), le 2,3,5-TCP (48  $\mu\text{M}$ ) ou le PCP (20  $\mu\text{M}$ ) ont été ajoutés en même temps que le mélange glucose/formiate de sodium (0,5 g/L et

1,1 g/L). De plus 10 µg/L de 1,4-naphthoquinone et de 2-méthyl-1,4-naphthoquinone ont été additionnés. Il s'agit de vitamines qui, chez *Desulfomonile tiedje*, sont nécessaires à la déchloration de l'acide 3-chlorobenzoïque (Mohn et Tiedje, 1992). C'est le seul essai où ces vitamines ont été utilisées. Des témoins positifs (non-chauffés) et négatifs (chauffés à 121°C pendant 15 minutes) ont aussi été suivis. Les analyses ont été faites par HPLC. Dans le cas de l'essai avec le 2,3,4-TCP, un intermédiaire de dégradation a été identifié par GC-FID.

## **8.6 ACCEPTEURS D'ÉLECTRONS**

### **8.6.1 Dépendance face à la méthanogénèse**

Dans cet essai, la méthanogénèse a été bloquée de façon à déterminer si la déchloration du PCP était sous la dépendance de celle-ci. Une première série de 3 bouteilles contenant 20 mL de surnageant du réacteur B3 a reçu 5 mM d'acide bromoéthane sulfonique (BESA), un inhibiteur de la méthanogénèse. Dans une deuxième série, les 20 mL de chaque bouteille ont été barbottés pendant 20 minutes avec de l'hydrogène pur. Des témoins positifs, barbottés pendant 20 minutes avec un mélange gazeux contenant 10% de H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> et 80% de N<sub>2</sub> ont également été suivis. Chacun a reçu au départ 20 µM de PCP et le mélange glucose/formiate de sodium (0,5 g/L et 1,1 g/L). Le suivi a été fait par analyses sur HPLC.

### **8.6.2 Incubation aérobie**

Le consortium bactérien a été testé pour déterminer s'il était capable de dégrader le PCP en présence d'oxygène. Des erlenmeyers de 50 mL contenant 20 mL de surnageant du réacteur B3 et bouchés seulement par des tampons de ouaté ont été incubés à 29°C sous agitation (200 rpm). Les erlenmeyers contenaient 20 µM de PCP ainsi que le mélange glucose/formiate de sodium (0,5 g/L et 1,1 g/L). Des témoins positifs (anaérobies) ont également été suivis en parallèle. Les analyses ont été faites par HPLC.

### **8.6.3 Sulfate et nitrate**

L'effet du sulfate et du nitrate, 2 accepteurs potentiels d'électrons, a été testé. En plus du glucose (0,5 g/L), du formiate (1,1 g/L) et du PCP (14  $\mu$ M), une première série de 3 bouteilles a reçu 10 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et la deuxième série 10 mM de  $\text{KNO}_3$ . Une troisième série témoin a été incubée en parallèle. Des analyses sur HPLC ont été réalisées après 2 et 10 jours d'incubation.

### **8.7 EFFET D'UN SUPPORT FAVORISANT L'AGRÉGATION**

Cet essai a permis de vérifier si la présence d'agrégats de bactéries favorise la déchloration du PCP. Afin de briser le plus possible les agrégats qui auraient pu être présents, 2 séries de 3 bouteilles (20 mL chaque) ont été vigoureusement agitées à la main et au vortex. À une des séries agitées, 0,5 mL de DEAE Sephacel (Pharmacia), un échangeur d'anions, a été ajouté. Un témoin sans DEAE Sephacel et n'ayant pas été agité a également été suivi. Tous ont reçu du glucose (0,5 g/L), du formiate (1,1 g/L) et du PCP (20  $\mu$ M).

# R É S U L T A T S

---

## **1. BIORÉACTEURS**

### **1.1 BIORÉACTEUR À ALIMENTATION SEMI-CONTINUE**

Le suivi du PCP dans le bioréacteur A1 ainsi que les ajouts de milieu frais et de boues de digesteur anaérobie sont illustrés à la figure 8. Durant les 272 jours d'opération, l'activité de déchloration du PCP s'est arrêtée ou a sérieusement ralenti à 4 reprises. À chaque fois, l'addition de boues non acclimatées au PCP (elles provenaient d'un digesteur anaérobie d'une usine d'épuration d'une petite municipalité) a permis de retrouver cette activité. Le pH de ce réacteur a été relativement stable: une seule fois celui-ci a descendu sous la barre de 7,0, atteignant 6,5. Ceci a coïncidé avec une perte de l'activité de déchloration du PCP. Globalement, les performances de ce réacteur sont les suivantes: temps de résidence hydraulique = 87 jours; charge volumique =  $1 \mu\text{mole de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ ; enlèvement du PCP = >98%

### **1.2 BIORÉACTEURS À ALIMENTATION CONTINUE**

Les performances des 3 réacteurs à alimentation continue sans surfaces fixes, soit les réacteurs B1, B2 et B3, sont résumées au tableau V. L'activité de déchloration du PCP y a été nettement plus stable que dans le réacteur à alimentation semi-continue. Ceci dit, le maintien du pH s'est avéré difficile tant que la source additionnelle de carbone a été le glucose seulement. Malgré une surveillance régulière et des réajustements par ajouts de NaOH ou de  $\text{NaHCO}_3$ , le pH a occasionnellement chuté sous la valeur de 7,0. Généralement, les baisses de pH en dessous de 6,7 ont entraîné une perte d'activité de déchloration qui n'a pas été rétablie par un rehaussement du pH au-delà de 7,0. Comme dans le cas du réacteur A1, l'activité a été retrouvée après addition de boues de digesteur anaérobie. Lorsque le glucose seul a été remplacé par un mélange de glucose et de formiate comme co-substrat, le pH s'est maintenu au-dessus de 7,0 et ce, sans nécessiter de

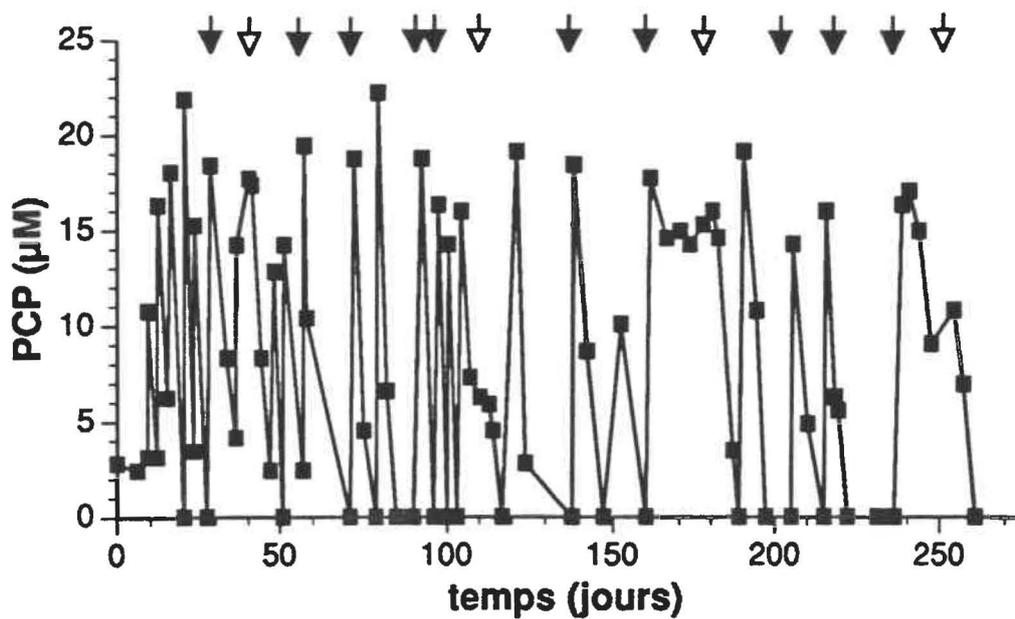


FIGURE 8: Suivi du réacteur à alimentation semi-continue (réacteur A1). Les flèches noires indiquent des remplacements d'une partie du volume du réacteur par du milieu frais. Les flèches blanches marquent des additions de boues de digesteur anaérobie.

**TABLEAU V: Performances des bioréacteurs à alimentation continue (réacteurs B1, B2 et B3).**

| Période (jours)    | Doses traitées ( $\mu\text{M}$ de PCP $\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Temps de résidence hydraulique (jours) <sup>a</sup> | Charges volumiques ( $\mu\text{moles PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ ) | Enlèvement du PCP (%) | Remarques                          |
|--------------------|--|---|--|-----------------------|------------------------------------|
| <b>Réacteur B1</b> |  |   |  |                       |                                    |
| 0 - 96             | 13 à 35  | 7,0   | 2 à 5  | >99                   |                                    |
| 96 - 308           | 35   | 18,6 à 30,8   | 1 à 3  | >99                   |                                    |
| 308 - 722          | 35   | 10,2 à 14,3   | 2 à 3  | >99                   |                                    |
| <b>Réacteur B2</b> |  |   |  |                       |                                    |
| 0 - 50             | 16 à 17  | 3,5 à $\infty$                                      | 0 à 4  | 0 à >98               |                                    |
| 50 - 92            | 16   | 70  | 1  | >99                   | alimentation semi-continue         |
| 92 - 193           | 10 à 35  | 6,9   | 1 à 5  | >99                   |                                    |
| 193 - 333          | 35 à 69  | 6,9 à $\infty$                                      | 0 à 14   | 0 à >99               |                                    |
| 333 - 417          | 35   | 6,9   | 5  | >99                   |                                    |
| 417 - 654          | 35   | 6,9   | 5  | >99                   | placé à la température de la pièce |
| <b>Réacteur B3</b> |  |   |  |                       |                                    |
| 0 - 91             | 20 à 133   | 6,9 à $\infty$                                      | 0 à 19   | 0 à >99               |                                    |
| 91 - 118           | 26 à 173   | 6,9   | 10 à 25  | >99                   |                                    |
| 118 - 231          | 0 à 243  | 6,9 à $\infty$                                      | 0 à 35   | 0 à >99               |                                    |
| 231 - 361          | 35   | 6,9   | 5  | >99                   |                                    |
| 361 - 439          | 35   | 4,6   | 8  | >99                   |                                    |
| 439 - 464          | 69   | 4,6   | 15   | >99                   |                                    |

<sup>a</sup> le symbole  $\infty$  signifie un arrêt de l'alimentation du réacteur suite à une perte de l'activité de déchloration du PCP. Ces pertes d'activités pouvaient être dues à des problèmes de pH ou des surcharges de PCP.

**TABLEAU VI: Performances des réacteurs à surfaces fixes (réacteur C2)**

| Période (jours) | Doses traitées ( $\mu\text{M}$ de $\text{PCP}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Temps de résidence hydraulique (jours) | Charges volumiques ( $\mu\text{moles PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ ) <sup>a</sup> | Enlèvement du PCP (%) | Remarque                                 |
|-----------------|--|--|---|-----------------------|--|
| 0 - 61          | 5 à 17   | 2,1                                    | 1 à 4   | >98                   |  |
| 61 - 127        | 35   | 1,1 à 0,8                              | 15 à 20   | >99                   |  |
| 127 - 135       | 35   | 0,7                                    | 23  | 79                    |  |
| 135 - 210       | 35   | 1,1                                    | 15  | >99                   |  |
| 210 - 226       | 35 à 90  | 0,9 à 0,7                              | 18 à 60   | >99                   | recirculation, ratio de 3:1 <sup>b</sup> |
| 226 - 238       | 90   | 0,7                                    | 60  | >99                   | recirculation, ratio de 3:1 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> Ces charges sont calculées en fonction du volume total (roches + liquide) du lit filtrant

<sup>b</sup> Débit de recirculation : Débit d'alimentation de la colonne

réajustement manuel. Parallèlement, l'activité de déchloration des réacteurs s'est stabilisée.

En plus de leur plus grande stabilité, ces réacteurs ont été nettement plus performants que le réacteur A1. Une charge maximale de 25  $\mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  a été atteinte avec le réacteur B3. À 35  $\mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ , il y a eu perte de l'activité de déchloration. Cependant, il faut noter qu'il y a eu une chute de pH jusqu'à une valeur de 6,4 une dizaine de jours avant cette perte d'activité.

Outre la charge traitée, le devenir du PCP est un autre critère d'évaluation de la performance. À certaines périodes, aucun intermédiaire phénolique provenant de la dégradation du PCP n'était détecté. Mais généralement, une partie du PCP traité était retrouvée sous forme de chlorophénols à 1 ou 2 atomes de chlore. Ces chlorophénols étaient, par ordre d'importance, le *m*-MCP, le 3,5-DCP et le 3,4-DCP. Les quantités retrouvées ont été relativement aléatoires, les moins bonnes performances ayant été atteintes à faibles charges. Par exemple, dans le réacteur B1, aucun chlorophénol n'a pu être détecté à certaines périodes alors qu'à d'autres, ceux-ci ont représenté jusqu'à 82% du PCP traité. Ces deux valeurs extrêmes sont cependant des exceptions. Pour le dernier mois d'opération, ces composés ont représenté en moyenne (en pourcentage du PCP traité):  $64 \pm 4 \%$  pour le B1 ( $n=8$ ),  $32 \pm 6 \%$  pour le B2 ( $n=8$ ) et  $35 \pm 11 \%$  pour le B3 ( $n=7$ ).

### **1.3 BIORÉACTEURS À SURFACES FIXES**

#### **1.3.1 Performances**

Le bioréacteur C1 a servi de contrôle abiotique afin de s'assurer que la disparition du PCP était bien due à une activité biologique. L'ajout d'azote de sodium dans le réservoir d'alimentation après 44 jours d'opération normale a provoqué l'apparition presque immédiate de PCP à la sortie du réacteur (figure 9). La quantité de PCP à la sortie représentait alors 86% de la concentration présente dans le réservoir d'alimentation du réacteur. Au

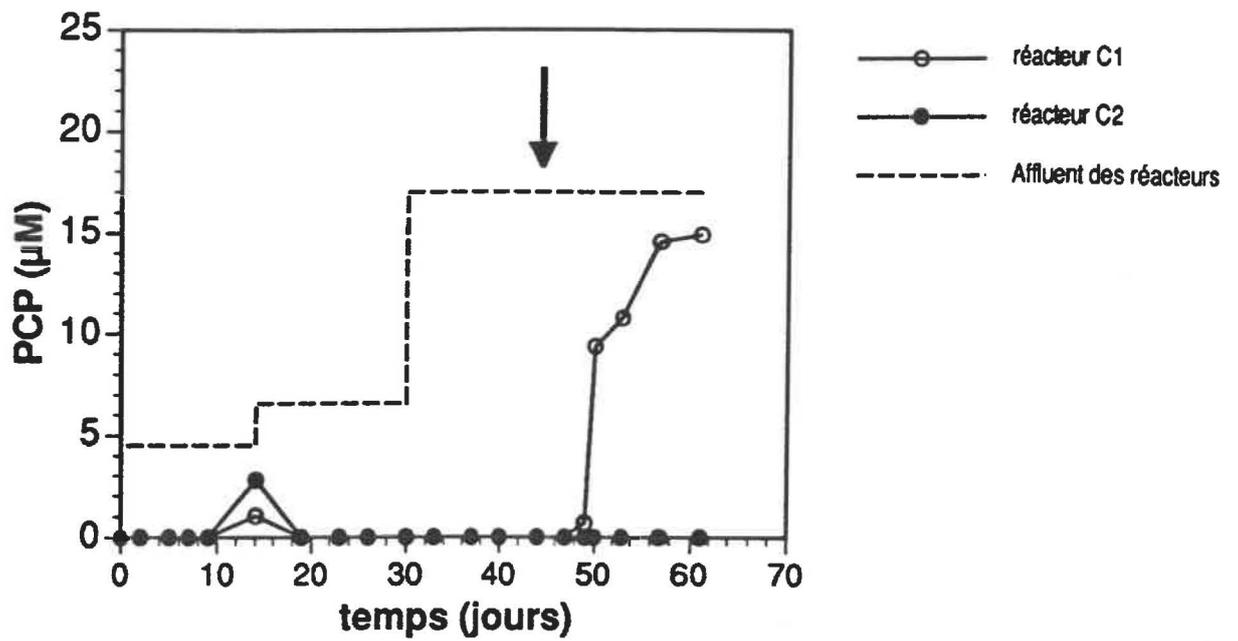


FIGURE 9: Témoin abiotique (réacteur C1). La flèche indique l'addition d'azoture de sodium (2 g/L) au réservoir d'alimentation du réacteur C1.

même moment, l'effluent du réacteur C2, qui a été opéré dans les mêmes conditions à l'exception de l'ajout d'azoture de sodium, ne contenait aucune trace de PCP ( $<0,4 \mu\text{M}$ ).

Les performances du réacteur C2 sont résumées au tableau VI. Sans recirculation, le taux maximal le PCP pouvant être éliminé à plus de 99% a été de  $20 \mu\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ . À une charge de  $23 \mu\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ , l'enlèvement du PCP n'était plus que de 79%. En utilisant une recirculation, il a été possible de traiter  $60 \mu\text{moles}$  de  $\text{PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ . La figure 10 montre le suivi des différents chlorophénols en fonction de la hauteur de la colonne et pour les deux charges maximales atteintes, avec et sans recirculation. À  $20 \mu\text{moles}$  de  $\text{PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  et sans recirculation, les valeurs obtenues à l'entrée du réacteur montrent que la déchloration était déjà avancée avant même que le PCP arrive dans la colonne. Le consortium était donc présent et actif dans le tuyau d'alimentation du réacteur (diamètre 0,8 mm, longueur 10 cm, volume =  $50 \mu\text{L}$ ). À  $60 \mu\text{moles}$  de  $\text{PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  et avec recirculation, la plus grande partie de la déchloration observée avait lieu dans les 2,5 premiers centimètres de la colonne.

Le taux de recirculation semble avoir été inférieur à celui prévu, tout au moins lors de l'échantillonnage dont la figure 10b rapporte les résultats. S'il avait été de 3:1 comme prévu, les  $90 \mu\text{M}$  de PCP contenus dans le réservoir d'alimentation auraient dû être dilués par 4 avant d'entrer dans le réacteur, soit  $23 \mu\text{M}$ . La concentration de  $52 \mu\text{M}$  qui a été détectée indique plutôt une recirculation de 0,7:1.

En ce qui concerne le devenir du PCP, des intermédiaires phénoliques à 1 ou 2 atomes de chlore ont été détectés. Contrairement aux réacteurs à alimentation continues (B1, B2 et B3) où les doses ont variées de manière relativement aléatoire, les concentrations de ces chlorophénols étaient généralement fonction des charges de PCP traitées. Ainsi, lorsque cette charge était très faible ( $1 \mu\text{mole}$  de  $\text{PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ ), les quantités de MCP et de DCP étaient sous le seuil de détection mais, à forte charge ( $60 \mu\text{moles}$  de  $\text{PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ ), elles ont atteint 47% du PCP traité (37% sous forme de MCP et

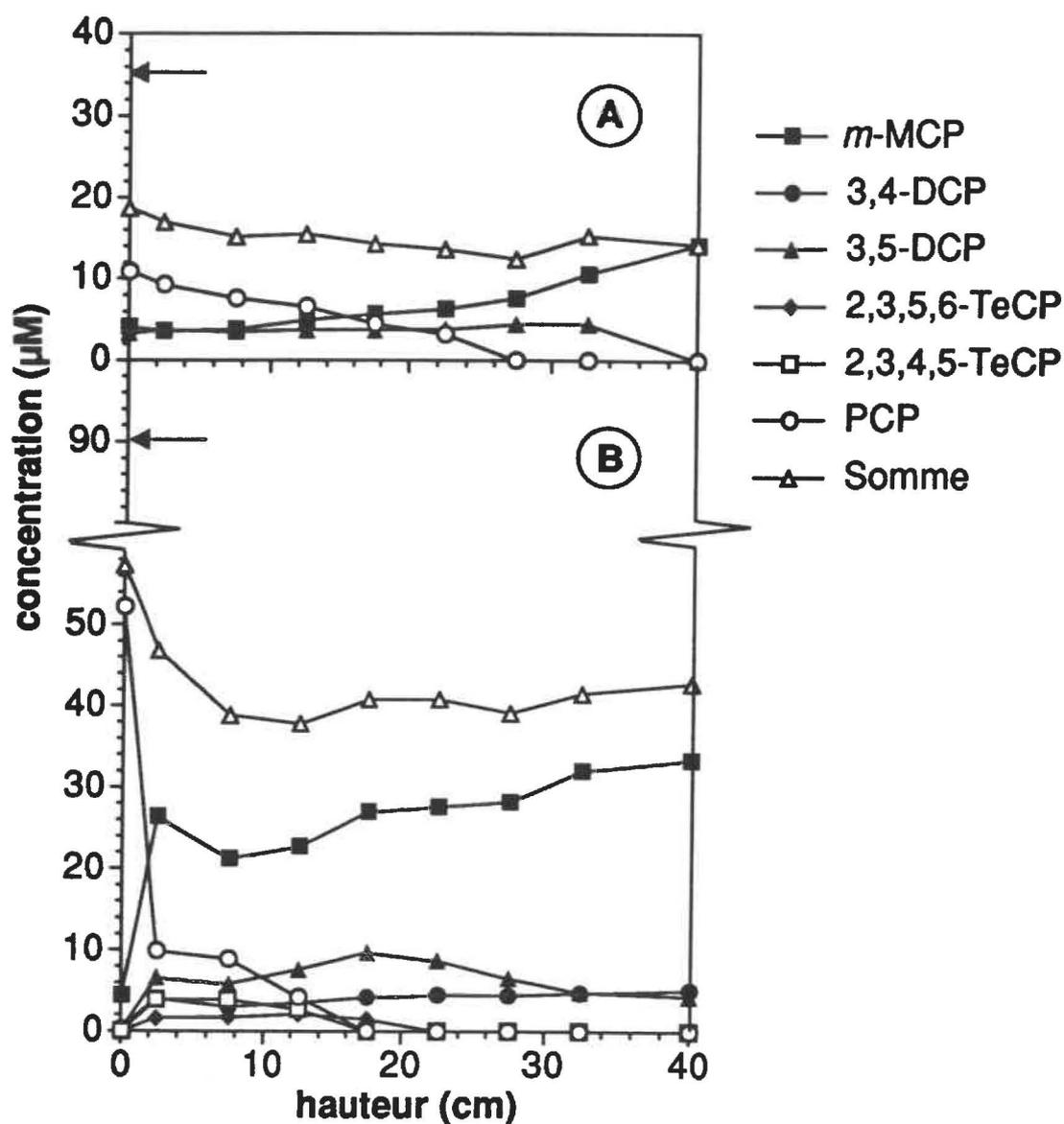


FIGURE 10: **Suivi des chlorophénols à différentes hauteurs dans le réacteur à surfaces fixes (réacteur C2).** A) Échantillons prélevés alors que le réacteur était opéré sans recirculation et que la charge était de  $20 \mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ . B) Échantillons prélevés alors que le réacteur était opéré avec recirculation et que la charge était de  $60 \mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ . Les flèches noires indiquent la quantité de PCP contenue dans le réservoir d'alimentation.

10% sous forme de DCP). Les congénères observés ont été les mêmes que ceux mentionnés pour les réacteurs à alimentation continue, soit, par ordre d'importance, le *m*-MCP, le 3,5-DCP et le 3,4-DCP.

### 1.3.2 Biofilm

Au jour 163, alors que la charge de PCP traitée était de  $15 \mu\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ , des roches ont été prélevées à différentes hauteurs dans le réacteur C2. Le biofilm à leur surface a été observé par microscopie électronique à balayage. Les figures 11 à 14 montrent différentes photographies de ce biofilm. À la figure 11, on peut voir que les roches prélevées au bas de la colonne présentaient un biofilm dense. Des fissures dans le biofilm, tel qu'on peut le voir sur cette dernière figure, ont permis d'observer les bactéries se trouvant au fond du biofilm, près de la surface de la roche. À la figure 12a, on voit que la surface du biofilm était composée de différents types de microorganismes. Les bactéries en forme de cocci ou de bâtonnets très courts (de  $1,0$  à  $1,4 \mu\text{m}$  de diamètre ou de longueur), associées en grappe, y étaient dominantes bien qu'il y avait aussi présence de bâtonnets plus longs et de filaments étroits (environ  $0,24 \mu\text{m}$  de large). Occasionnellement, des bâtonnets larges à bouts plats (de  $1,6$  à  $1,8 \mu\text{m}$  de long par  $0,6 \mu\text{m}$  de large) et formant des chaînes ont été observés. La morphologie de ces derniers s'apparente à des bactéries du genre *Methanosaeta* (anciennement nommées *Methanothrix*). La figure 12b montre que les microorganismes au fond d'une fissure étaient également variés, mais cette fois-ci, ce sont les bâtonnets longs de différents types qui dominaient. Parmi ceux-ci, on remarque un grand nombre de bâtonnets apparentés au genre *Methanosaeta*. Des bâtonnets courts, des bâtonnets recourbés, des cocci et des filaments étroits étaient également présents. Aussi, certaines sections de roches étaient colonisées par de gros microorganismes ( $2,2$  à  $3,5 \mu\text{m}$ ) à surfaces plissées (figure 13). Compte tenu de leur forme sphérique et de leur grosseur, il s'agit possiblement de petites levures. Celles-ci étaient cependant rares et situées uniquement au bas de la colonne. En haut de la colonne, les microorganismes étaient peu nombreux et étaient surtout constitués de bâtonnets apparentés au genre *Methanosaeta* (figure 14).

FIGURE 11: **Biofilm au bas du réacteur C2 — vue d'ensemble.** Des fissures dans le biofilm, tel qu'on en voit un exemple sur cette photographie, permettent de comparer les microorganismes se trouvant à la surface du biofilm et ceux se trouvant plus en profondeur.

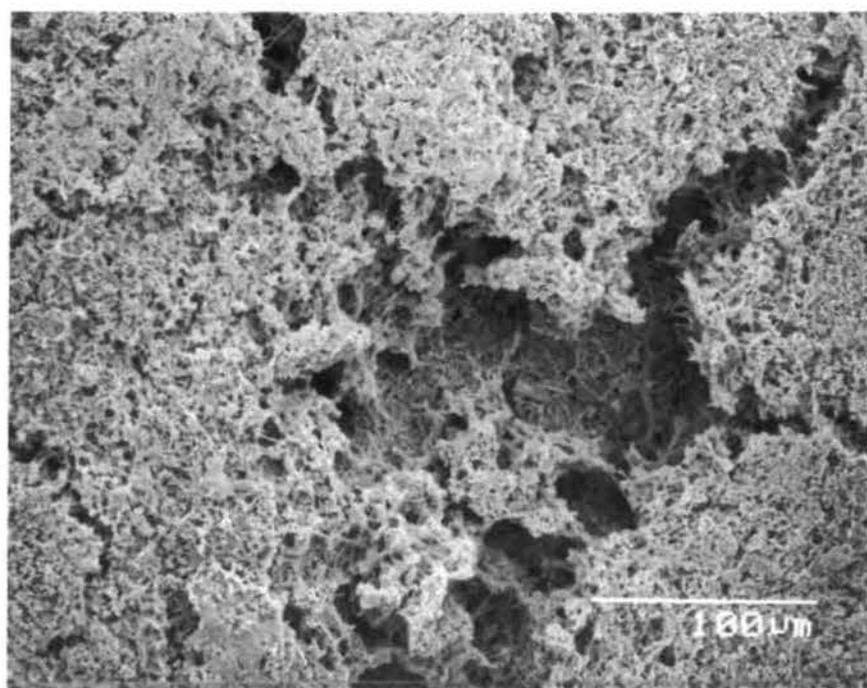
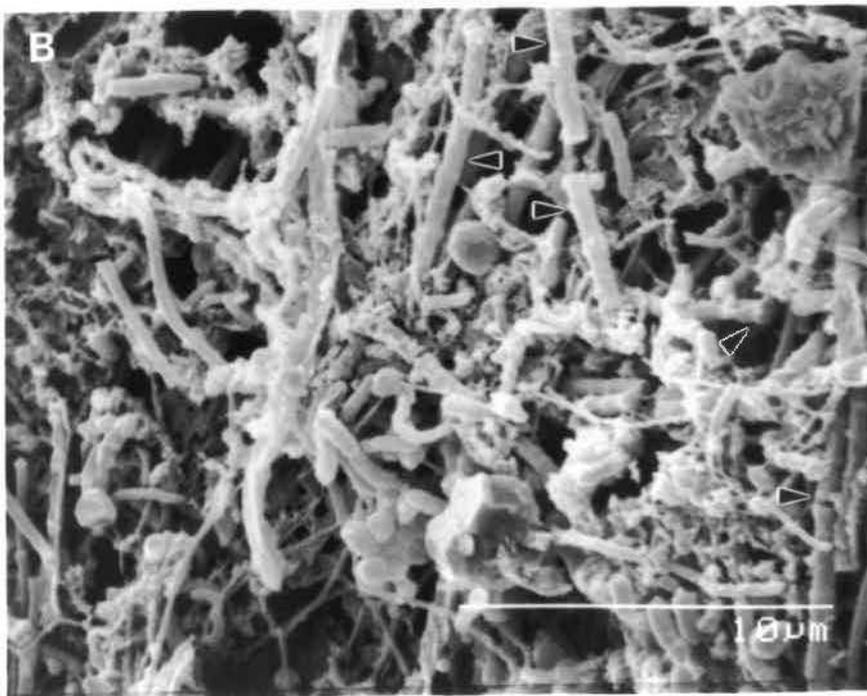
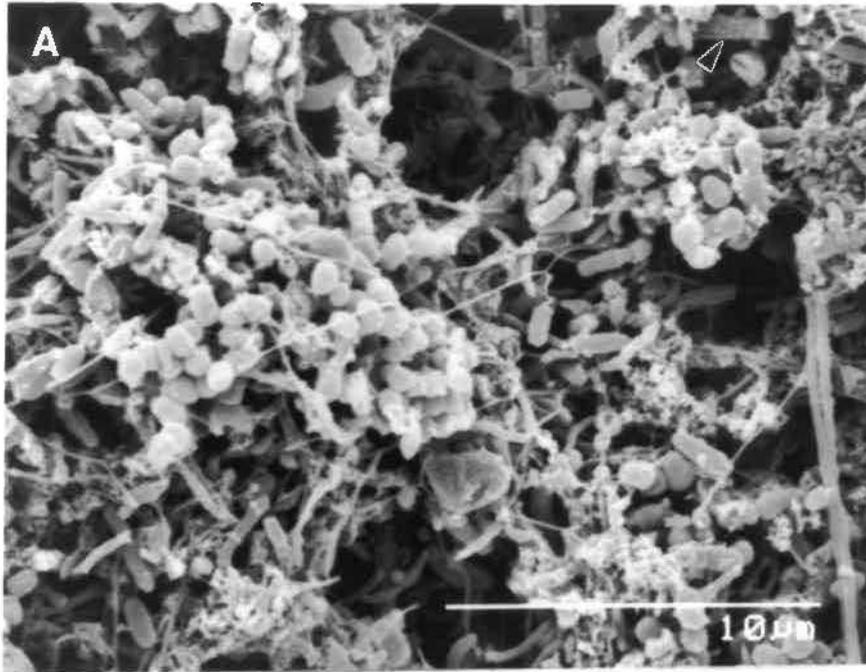


FIGURE 12: **Biofilm au bas du réacteur C2 — couche profonde et couche de surface.** A) Microorganismes se trouvant à la surface du biofilm.  
B) Microorganismes observés au fond d'une fissure du biofilm. Les pointeurs indiquent des bactéries dont la physionomie s'apparente au genre *Methanosaeta*.



**FIGURE 13: Biofilm au bas du réacteur C2 — microorganismes apparentés à des levures.**

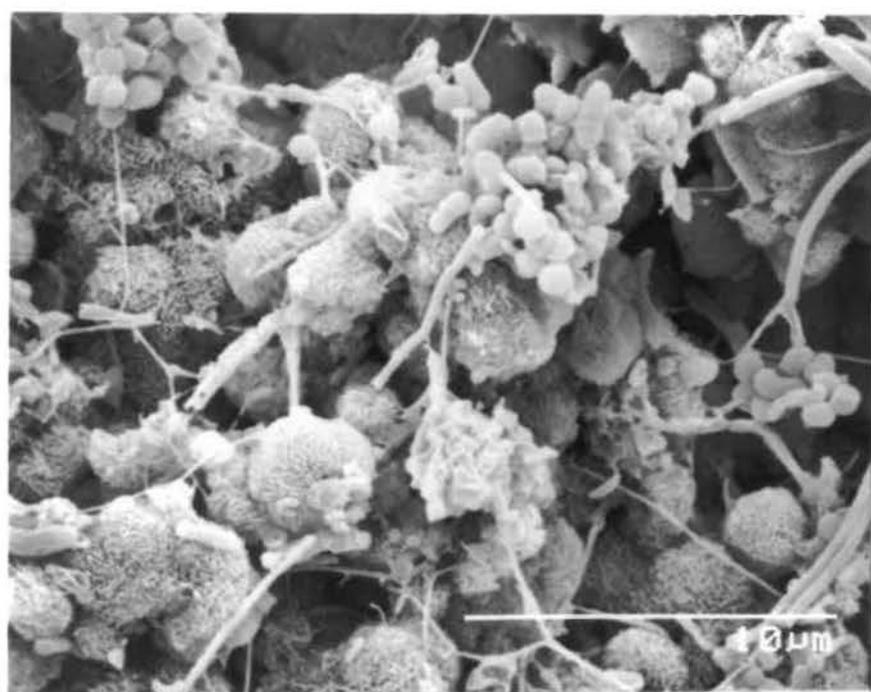
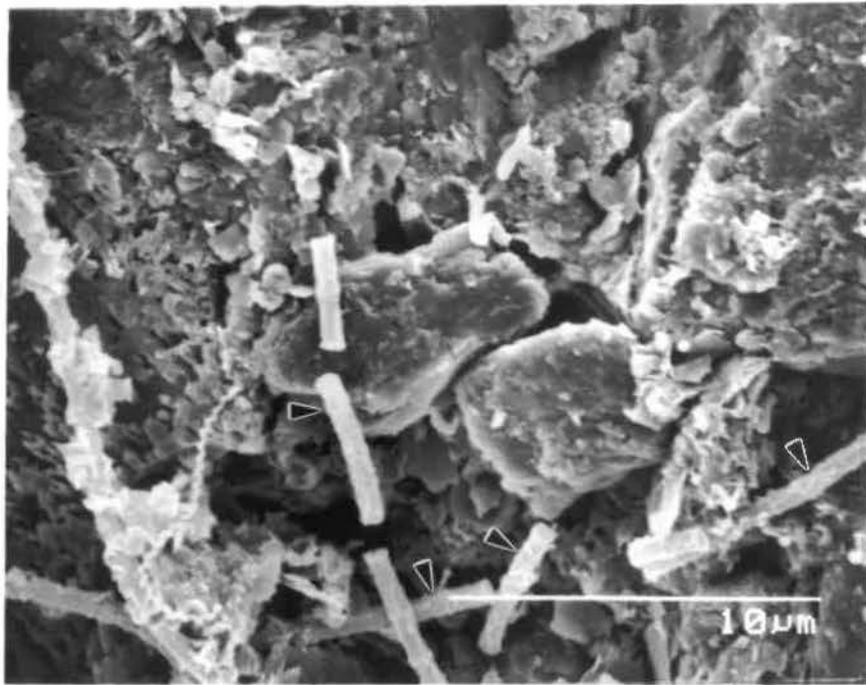


FIGURE 14: **Biofilm au haut du réacteur C2.** Les pointeurs indiquent des bactéries dont la physiologie s'apparente au genre *Methanosaeta*.



## 2. VOIES BIOCHIMIQUES

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse de l'effluent du réacteur B3 alors que la charge de PCP était de  $35 \mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  a permis d'identifier certains intermédiaires de dégradation du PCP. Les spectres de masse et les temps de rétention des pics du chromatogramme ont été comparés à ceux des produits purs correspondants. Les figures 15 à 18 montrent les résultats obtenus pour le *m*-MCP, 3,4-DCP, le 3,5-DCP, le 2,3,5-TCP, le 2,3,4,5-TeCP, 2,3,4,6-TeCP et le PCP. Du phénol a également été détecté à l'état de trace. Sur le chromatogramme correspondant à la somme des ions (figure 19a), aucun pic ne se détache clairement du bruit de fond dans la région correspondant au phénol. Cependant, les chromatogrammes correspondant aux ions 94 et 136, qui sont les principaux ions du spectre du phénol pur, montre tous les deux un pic à 4,22 minutes, soit une différence de 6 secondes par rapport au phénol pur. Les spectres sont cependant quasi identiques (figure 19b).

Il est à noter que les ions moléculaires des chlorophénols acétylés ne sont pas toujours présents sur les spectres de masses. De plus, les fragments principaux sur ces spectres ont non seulement perdu leur groupement acétyle mais ils ont subi un réarrangement de telle sorte qu'un hydrogène s'est lié à l'atome d'oxygène ionisé; ainsi, les principaux fragments ont la masse du chlorophénol d'origine, le groupement OH étant reformé.

Ces résultats nous amènent à proposer quatre voies biochimiques possibles pour la dégradation du PCP par le consortium (figure 20). Au moins un intermédiaire n'a pas été trouvé, soit celui qui doit exister entre le 2,3,4,5-TeCP et le 3,4-DCP. Bien que le 2,3,4,6-TeCP ait été détecté, il n'a pas été considéré puisque ce chlorophénol est déjà présent dans les solutions de PCP-Na utilisées, et ce, dans les mêmes proportions que ce qui a été retrouvé dans le réacteur.

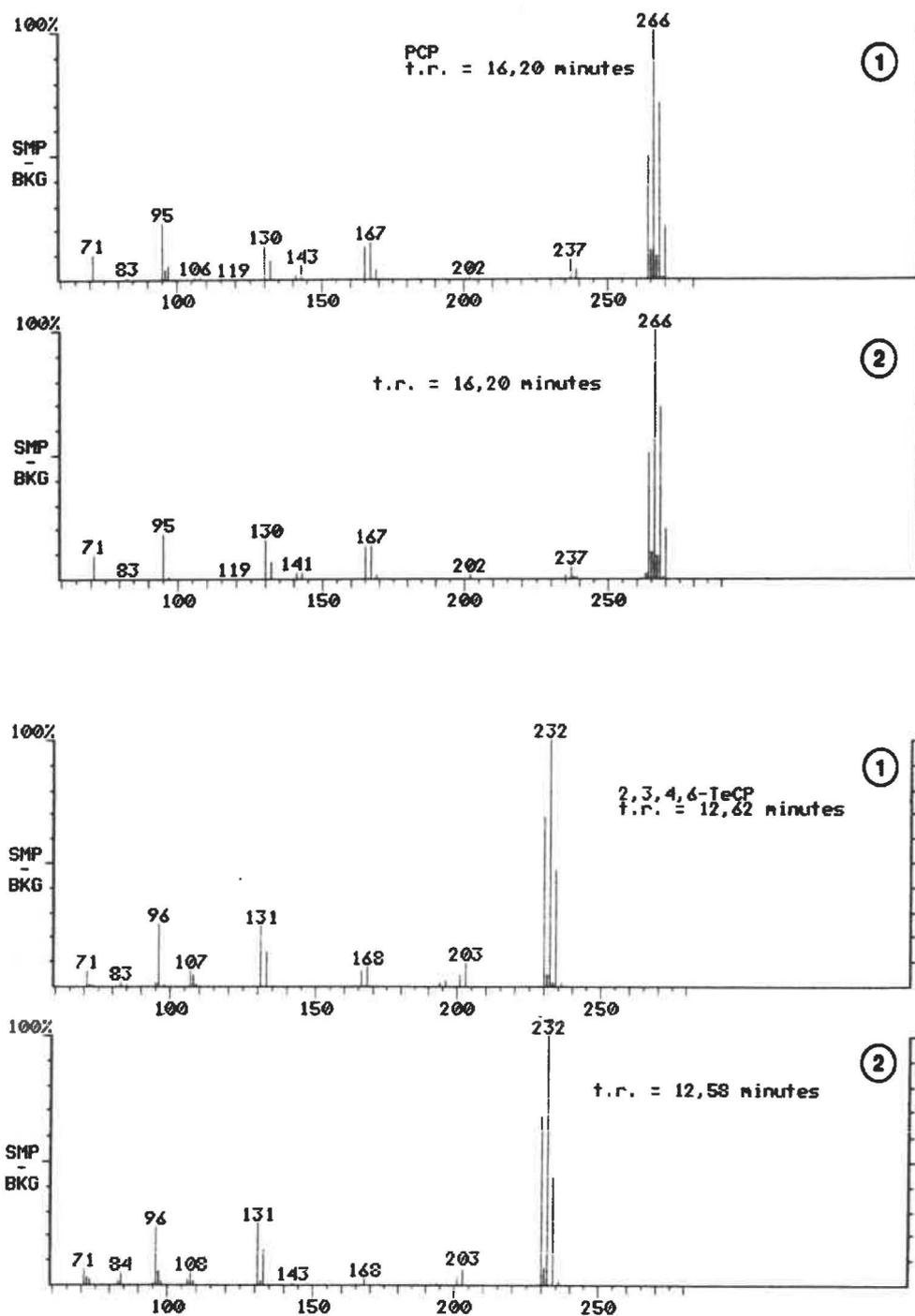


FIGURE 15: Spectres de masses des Intermédiaires de dégradation du PCP — PCP et 2,3,4,6-TeCP. 1) spectres de masses correspondant à des produits purs; 2) spectres de masses correspondant à des pics présents sur le chromatogramme de l'échantillon du réacteur B3; M<sup>+</sup>: ion moléculaire; t.r.; temps de rétention du pic.

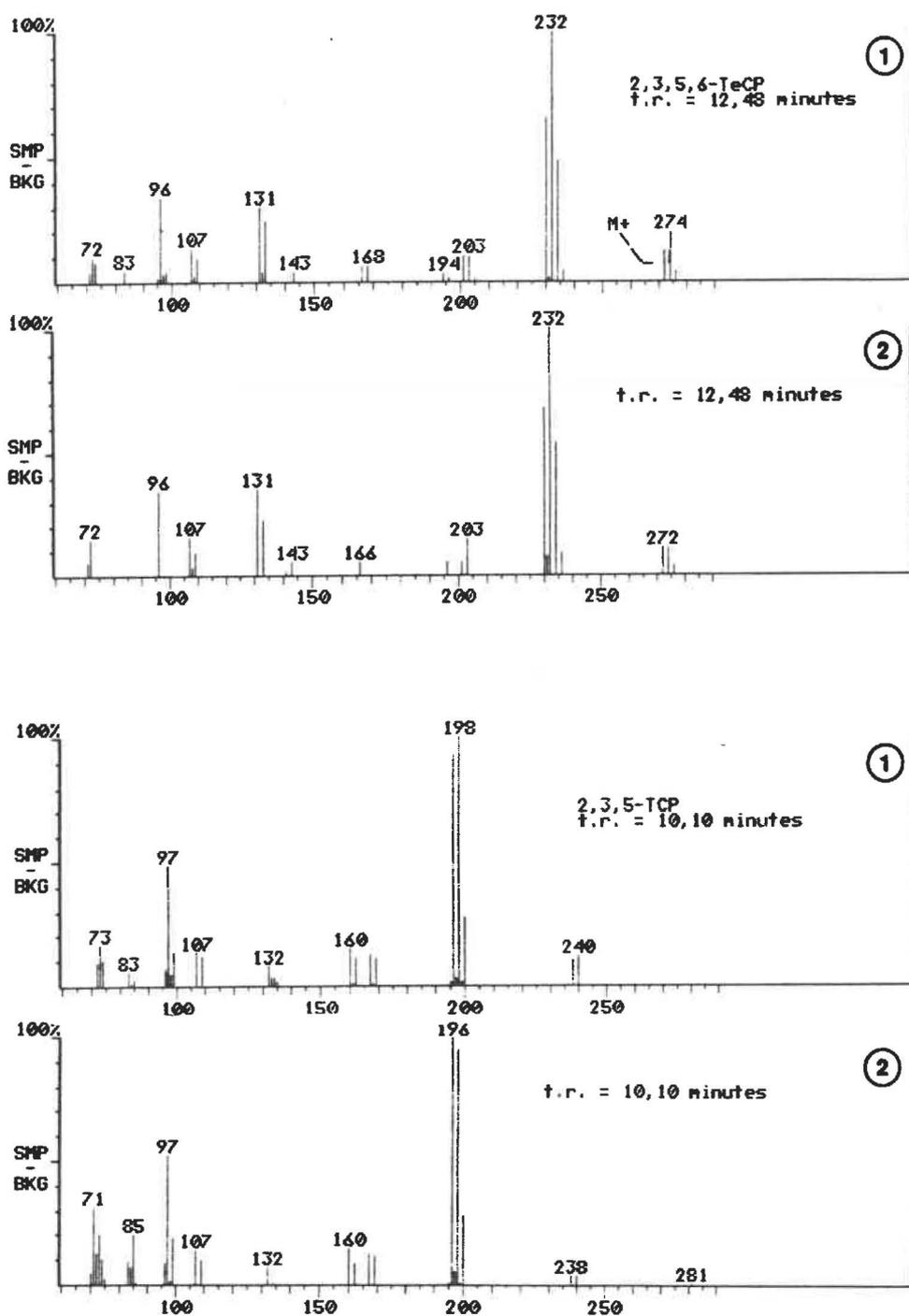


FIGURE 16: Spectres de masses des Intermédiaires de dégradation du PCP — 2,3,5,6-TeCP et 2,3,5-TCP. 1) spectres de masses correspondant à des produits purs; 2) spectres de masses correspondant à des pics présents sur le chromatogramme de l'échantillon du réacteur B3; M<sup>+</sup>: ion moléculaire; t.r.; temps de rétention du pic.

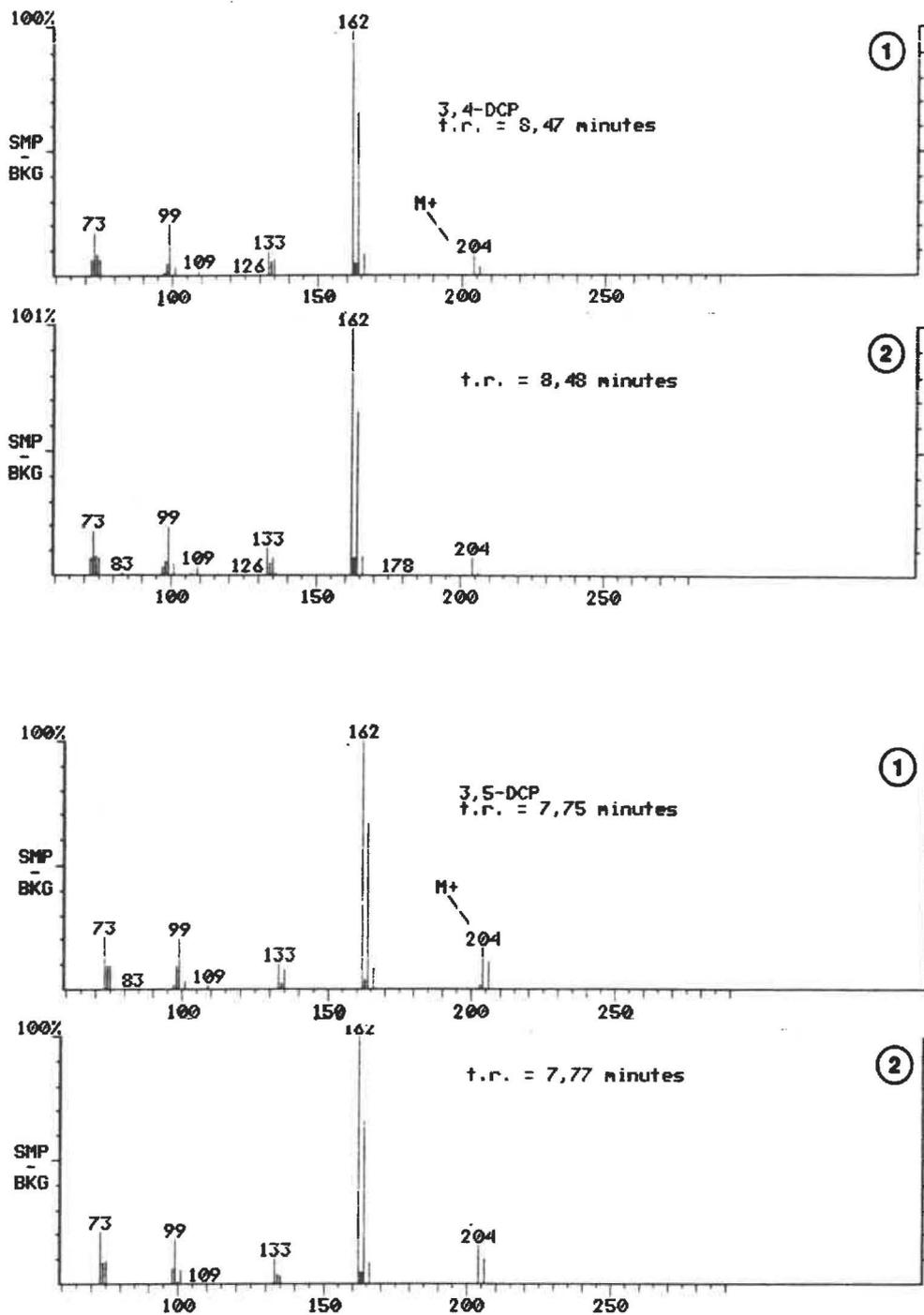


FIGURE 17: Spectres de masses des Intermédiaires de dégradation du PCP — 3,4-DCP et 3,5-DCP. 1) spectres de masses correspondant à des produits purs; 2) spectres de masses correspondant à des pics présents sur le chromatogramme de l'échantillon du réacteur B3; M<sup>+</sup>: ion moléculaire; t.r.; temps de rétention du pic.

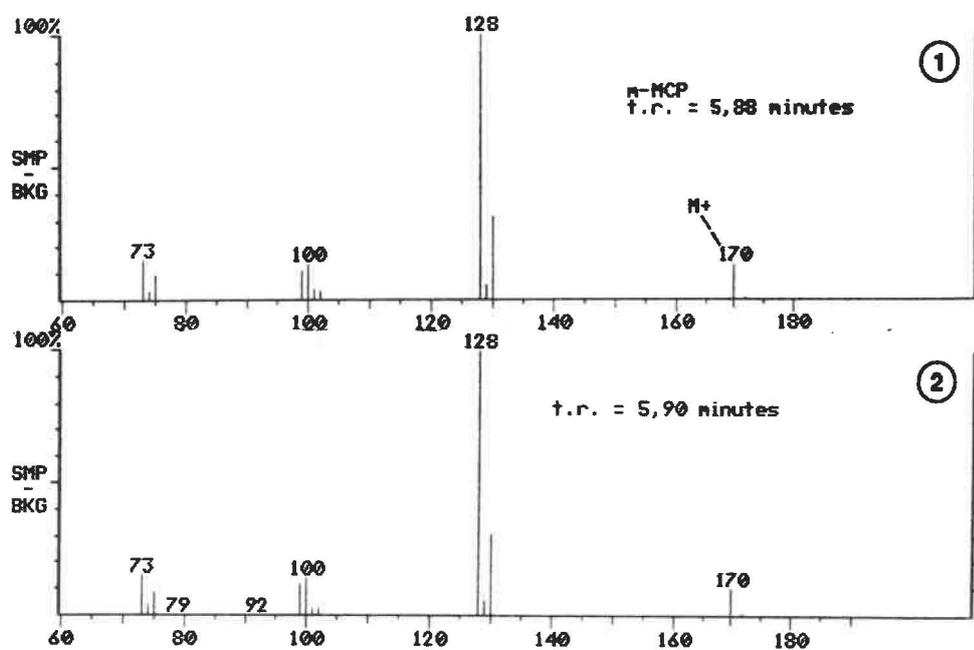
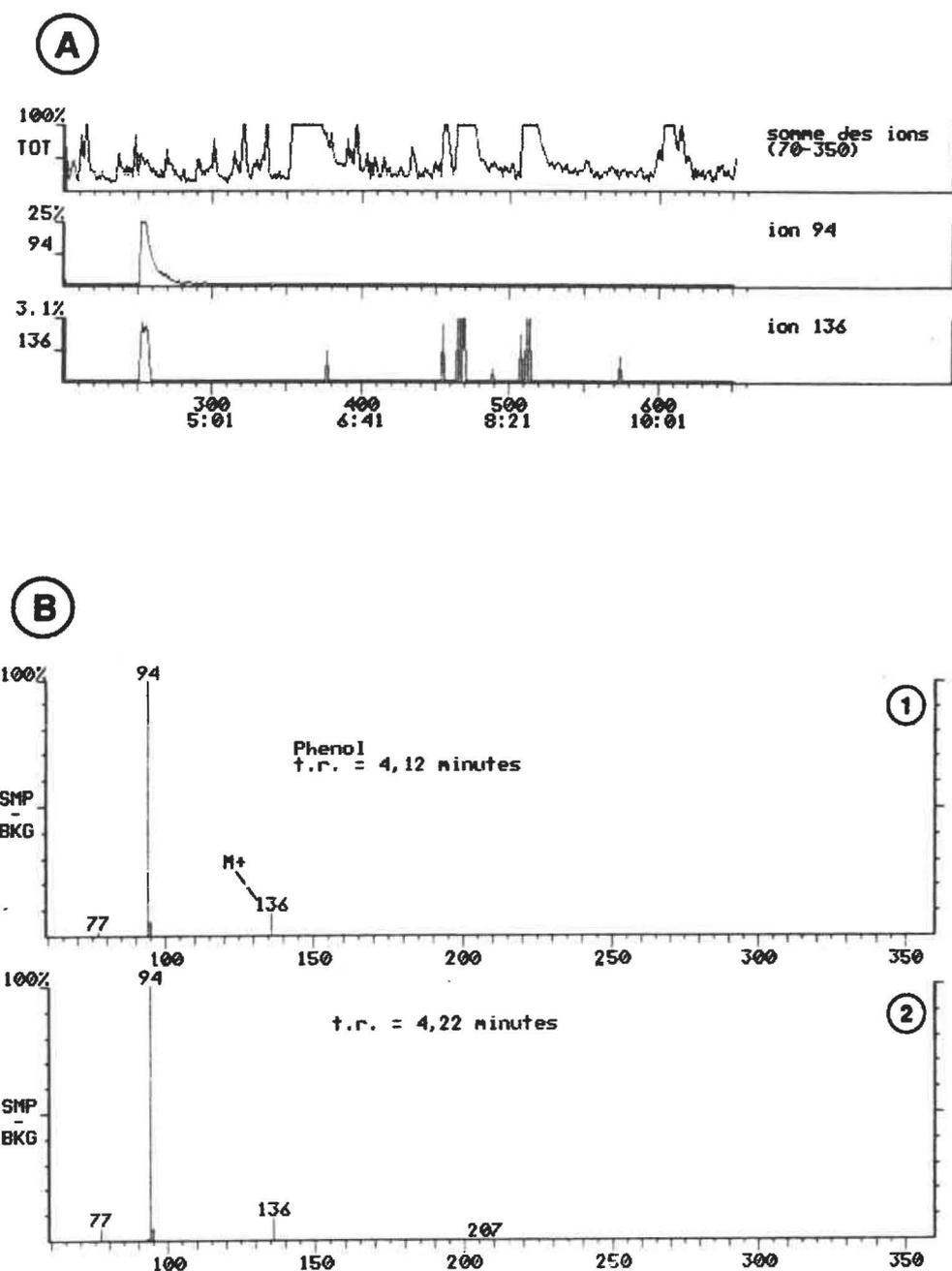


FIGURE 18: Spectres de masses des Intermédiaires de dégradation du PCP — *m*-MCP. 1) spectre de masses correspondant au produit pur; 2) spectre de masses correspondant à un pic présent sur le chromatogramme de l'échantillon du réacteur B3; M<sup>+</sup>: ion moléculaire; t.r.; temps de rétention du pic.



**FIGURE 19: Spectres de masses des Intermédiaires de dégradation du PCP — Phénol.** A) chromatogramme de l'effluent du réacteur B3; B) spectre de masse du phénol; 1) spectre de masses correspondant au produit pur; 2) spectre de masses correspondant à un pic présent sur le chromatogramme de l'échantillon du réacteur B3; M<sup>+</sup>: ion moléculaire; t.r.; temps de rétention du pic.

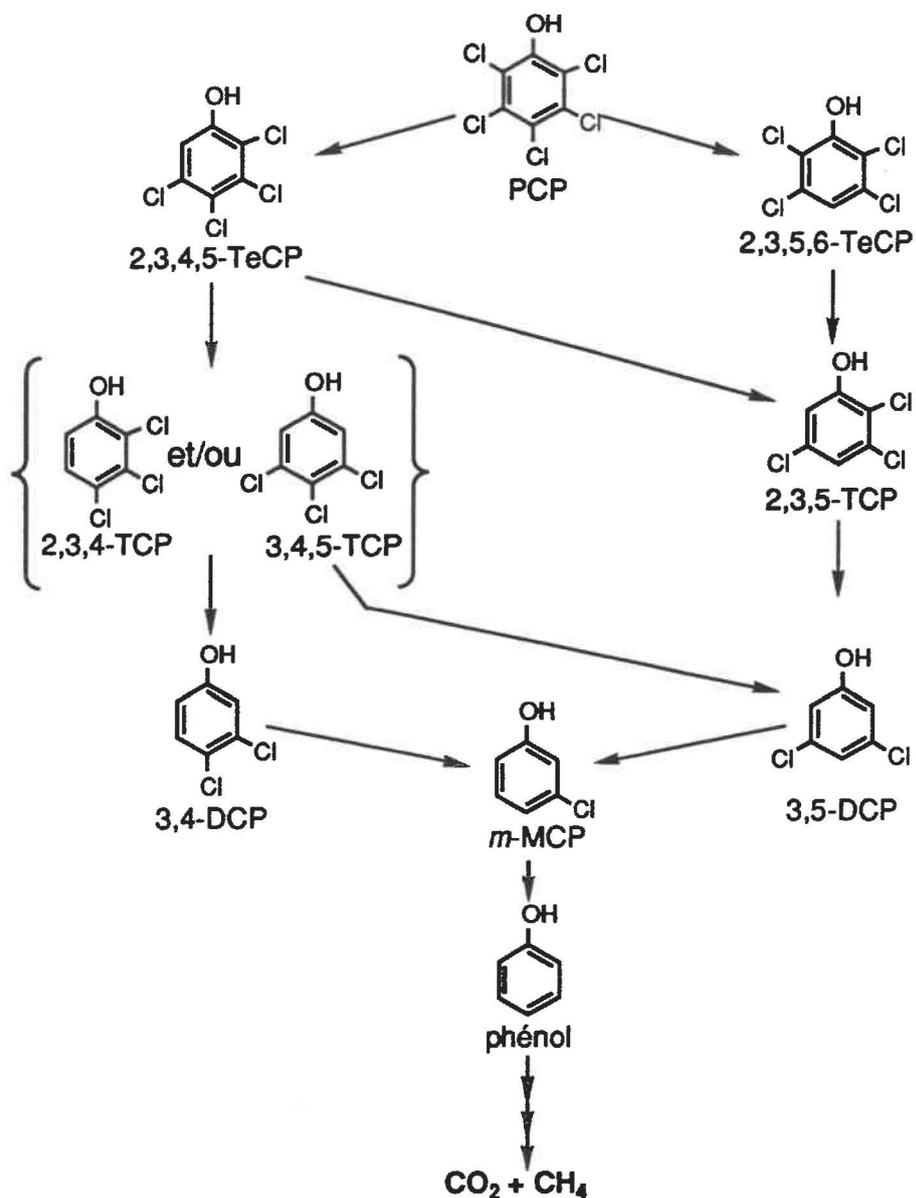


FIGURE 20: Voies biochimiques proposées pour la dégradation du PCP par le consortium bactérien. Les produits entre accolades n'ont pas été détectés.

### **3. EFFET DE L'ADDITION D'UN CO-SUBSTRAT**

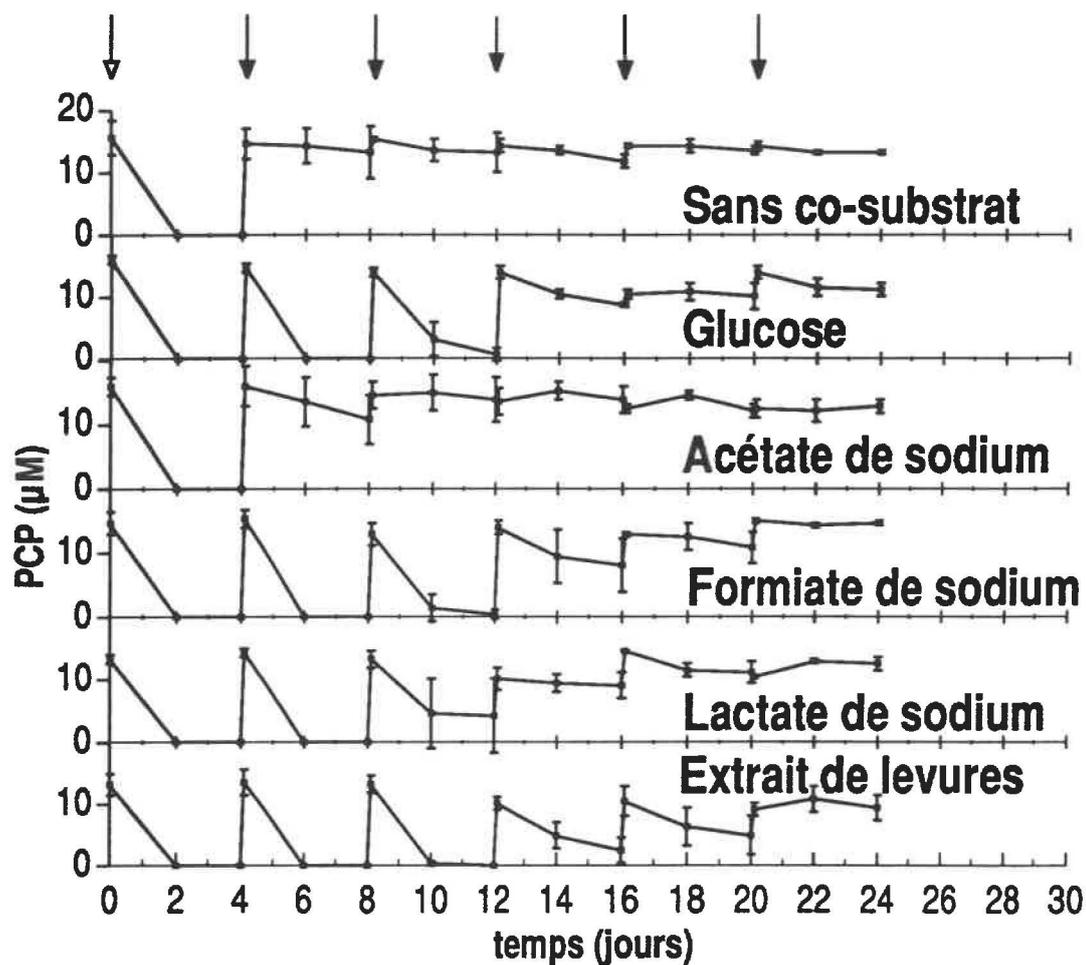
L'effet de différents co-substrats sur la déchloration du PCP a été étudié (figure 21). Sans substrat additionnel, la déchloration du PCP s'est arrêtée après la disparition de la première dose. L'addition d'acétate de sodium a donné les mêmes résultats. L'ajout de glucose, de formiate de sodium, de lactate de sodium ou d'extrait de levures a permis la déchloration de la deuxième et troisième dose de PCP. Quant à la quatrième dose, la déchloration a été partielle et variable selon le co-substrat, et il devient difficile de distinguer les meilleures performances. Ceci dit, l'extrait de levures semble avoir donné des résultats légèrement supérieurs. Il est à noter que, dans tous les cas, la sixième dose n'a pas été métabolisée.

### **4. DÉGRADATION DES MONOCHLOROPHÉNOLS**

Le consortium a été capable de dégrader les 3 monochlorophénols lors d'un essai en bouteilles (figure 22). Dès les premiers jours, la concentration de l'*o*-MCP a décliné lentement pour disparaître complètement après 21 jours. Le *m*-MCP est resté à peu près stable pendant les 14 premiers jours mais il a complètement disparu au jour 21. Quant au *p*-MCP, il a diminué de seulement 28% après 33 jours mais il n'en restait pas de trace après 84 jours. Les concentrations des chlorophénols mis en présence du consortium inactivé par autoclavage n'ont diminué que de 11% après 84 jours.

### **5. EFFET DE LA TEMPÉRATURE**

Le suivi du PCP et de ses intermédiaires de dégradation dans des bouteilles incubées à différentes températures est présenté à la figure 23. À 37 et à 45°C, le PCP a disparu complètement dans les 5 premières heures. À 29°C, le même résultat a été atteint après 7 heures. À 15 et à 4°C, une partie du PCP était encore présente après 9 jours d'incubation, soit respectivement 49 et 85% de la dose initiale. Dans les bouteilles stériles, la concentration de PCP a baissé de 5% pour la même période. Bien qu'à 37 et à 45°C les



**FIGURE 21: Effet de différents co-substrats sur la dégradation du PCP.** La flèche blanche indique l'addition de PCP. Les flèches noires indiquent l'addition de PCP ainsi que le remplacement d'une partie du volume de chaque bouteille par du milieu frais contenant le co-substrat.

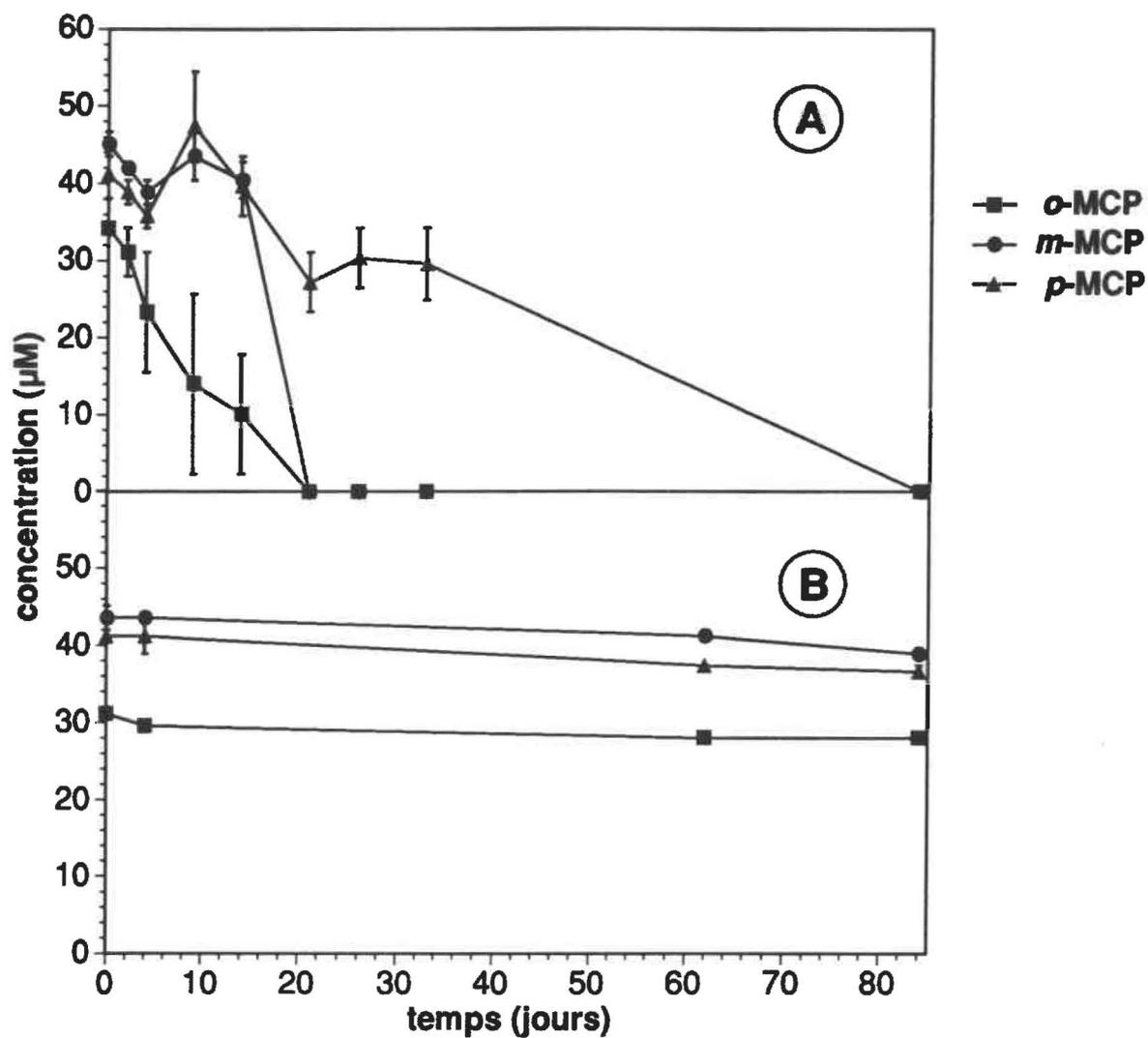


FIGURE 22: Dégradation des monochlorophénols. A) Essais avec le consortium actif. B) Témoin stérile.

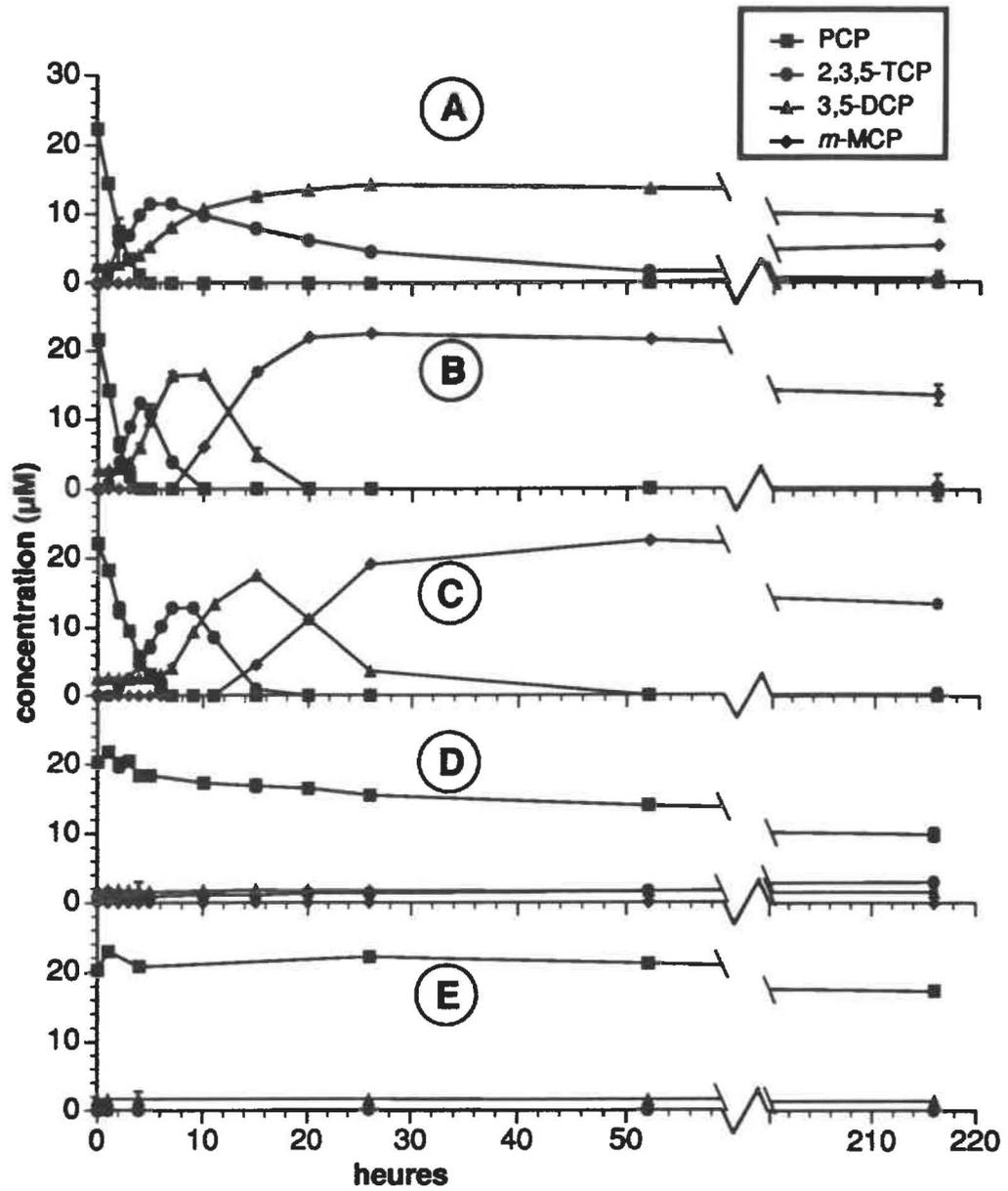


FIGURE 23: Effet de la température sur la dégradation du PCP.  
A) 45°C. B) 37°C C) 29°C. D) 15°C E) 4°C.

taux de déchloration du PCP ont été similaires, le suivi des intermédiaires de dégradation distingue clairement ces 2 températures. À 37°C, le 2,3,5-TCP et le 3,5-DCP ont apparu et disparu successivement et le tout s'est retrouvé sous forme de *m*-MCP après 20 heures. À 45°C, 2,3,5-TCP a apparu presque en même temps qu'à 37°C mais il a disparu beaucoup plus lentement. Toujours à 45°C, le 3,5-DCP a accumulé lentement dans le milieu et n'a pas été transformé en *m*-MCP après 52 heures. Au bout de 9 jours d'incubation, cette transformation était amorcée mais non complétée. À 29°C, la succession PCP → 2,3,5-TCP → 3,5-DCP → *m*-MCP a été complétée mais un peu plus lentement qu'à 37°C.

## 6. RÔLE DES BACTÉRIES SPORULÉES

Les figures 24, 25 et 26 montrent la capacité d'un consortium chauffé à 80°C pendant 1 heure de dégrader le 2,3,4-TCP, le 2,3,5-TCP et le PCP. Dans le cas du 2,3,5-TCP (figure 25), il n'y a pas eu de dégradation. Dans le cas du 2,3,4-TCP (figure 24), le consortium a retrouvé la capacité d'enlever l'atome de chlore en position *ortho* après 6 jours, alors que le consortium non chauffé a complété cette opération en 2 jours ou moins. Le 3,4-DCP qui en résulte n'a pas été transformé ni dans le consortium chauffé, ni dans le consortium non chauffé. Avec le PCP (figure 26), celui-ci a complètement disparu après 4 jours dans le cas du consortium chauffé alors que le PCP a été déchloré en 2 jours ou moins dans le consortium non chauffé. Dans le consortium chauffé, le 2,3,5-TCP et le 3,5-DCP ont apparu comme intermédiaires de dégradation du PCP. Tous deux ont complètement disparu après 6 jours. Ceci semble contradictoire avec l'essai précédent où le 2,3,5-TCP a été ajouté et n'a pas été déchloré. Tant pour le témoin non chauffé que pour le consortium chauffé, le *m*-MCP a apparu à la fin et n'a pas été métabolisé de manière significative.

## 7. RÔLE DE DIFFÉRENTS ACCEPTEURS D'ÉLECTRONS

Les résultats de différents essais ayant pour objectif de déterminer la préférence ou même la dépendance du consortium face à certains accepteurs d'électrons sont présentés à la figure 27. Basée sur la comparaison de la quantité de *m*-MCP présent après la période

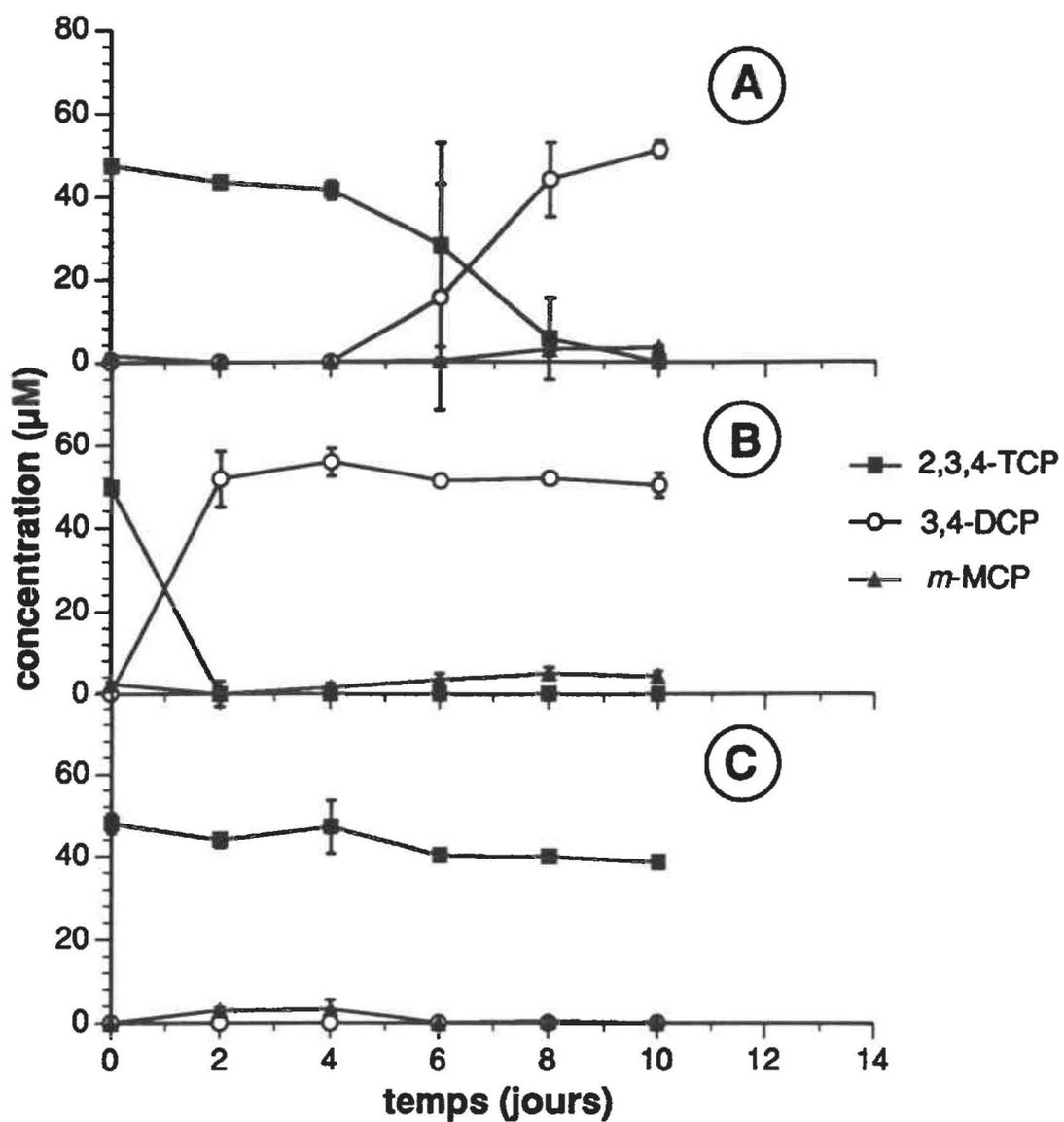


FIGURE 24: Rôle des bactéries sporulées dans la dégradation du 2,3,4-TCP.  
 A) Consortium traité à la chaleur (80°C/60 minutes). B) Témoin positif.  
 C) Témoin stérile.

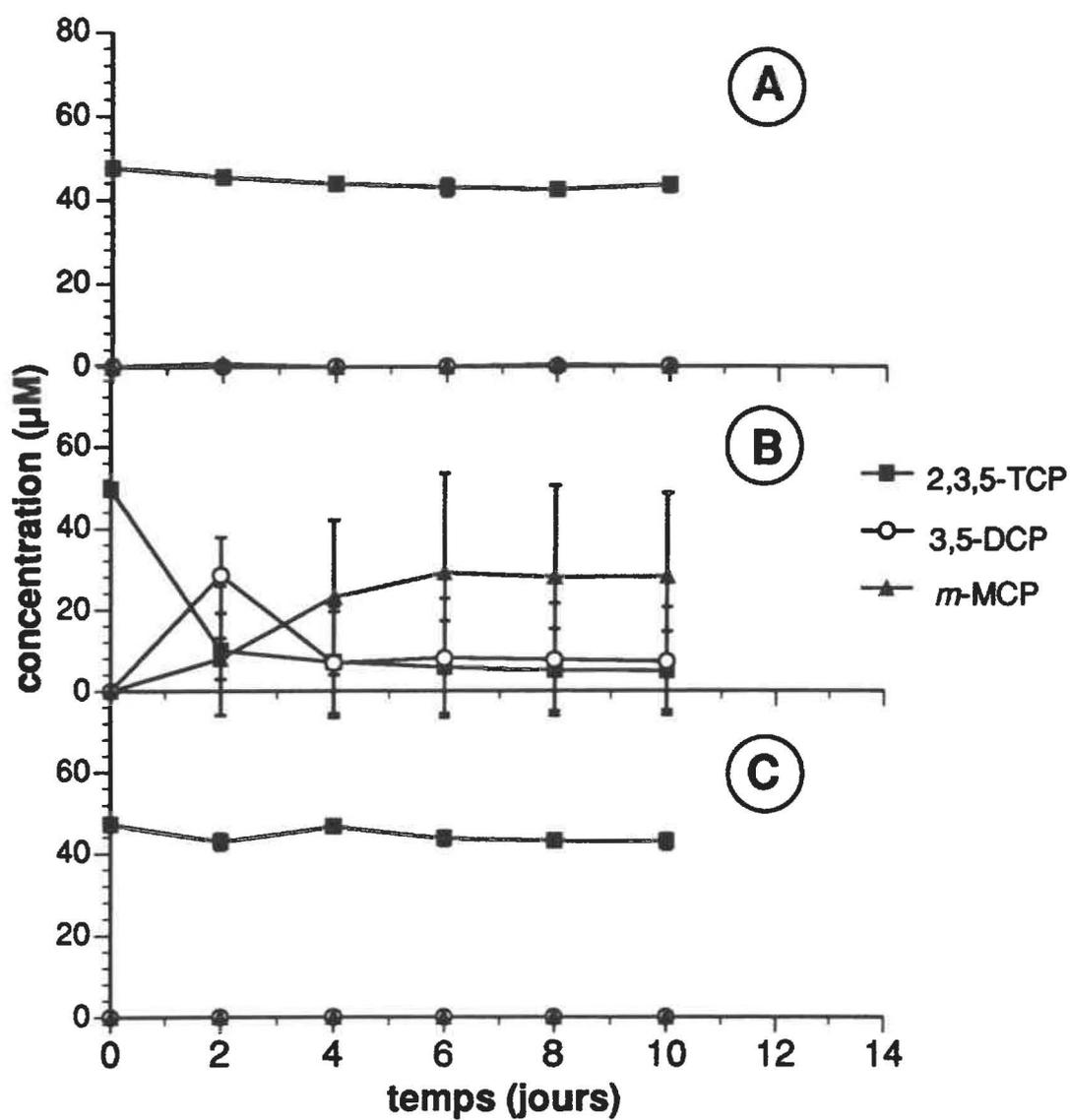


FIGURE 25: Rôle des bactéries sporulées dans la dégradation du 2,3,5-TCP.  
 A) Consortium traité à la chaleur (80°C/60 minutes). B) Témoin positif.  
 C) Témoin stérile.

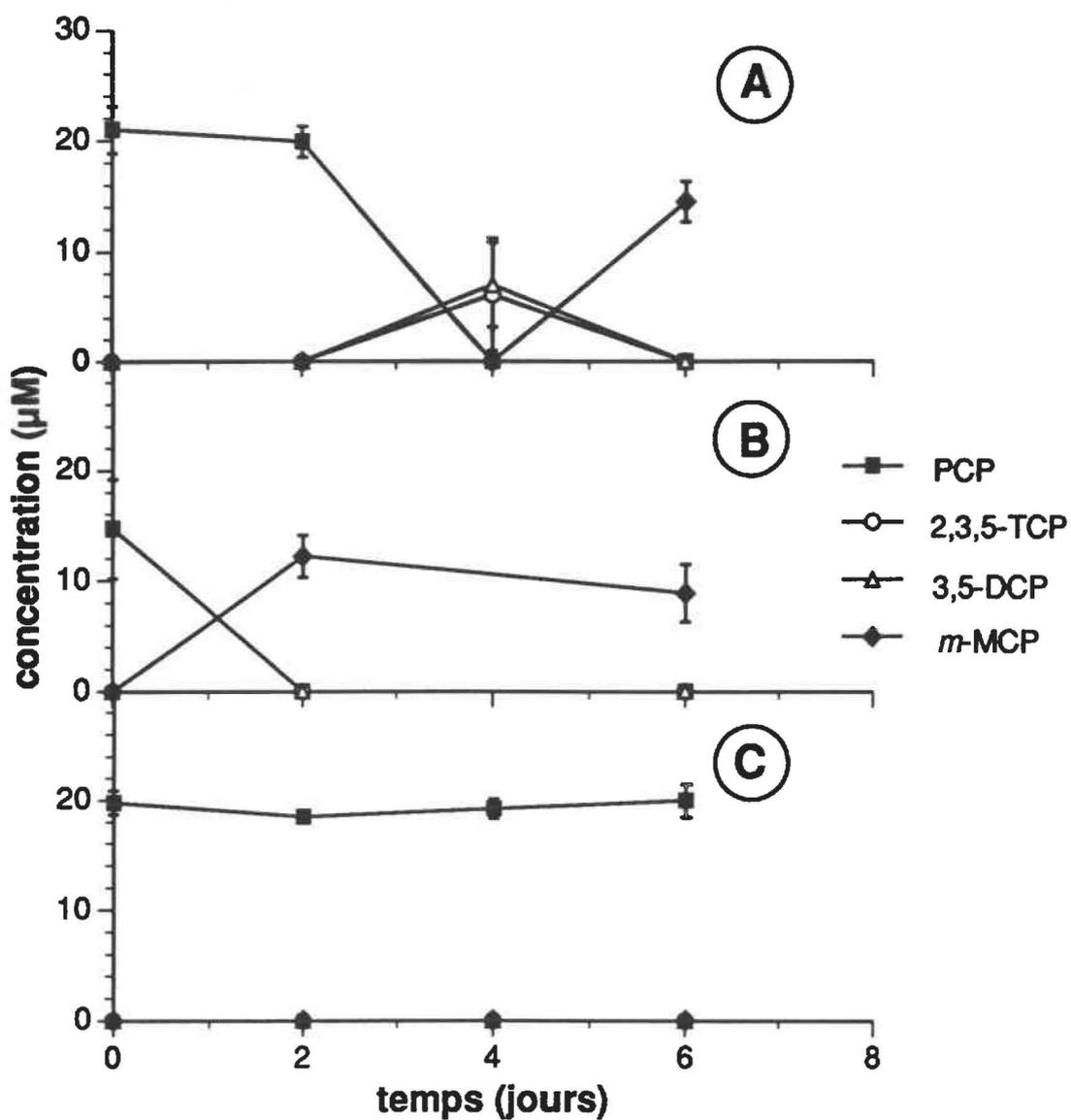
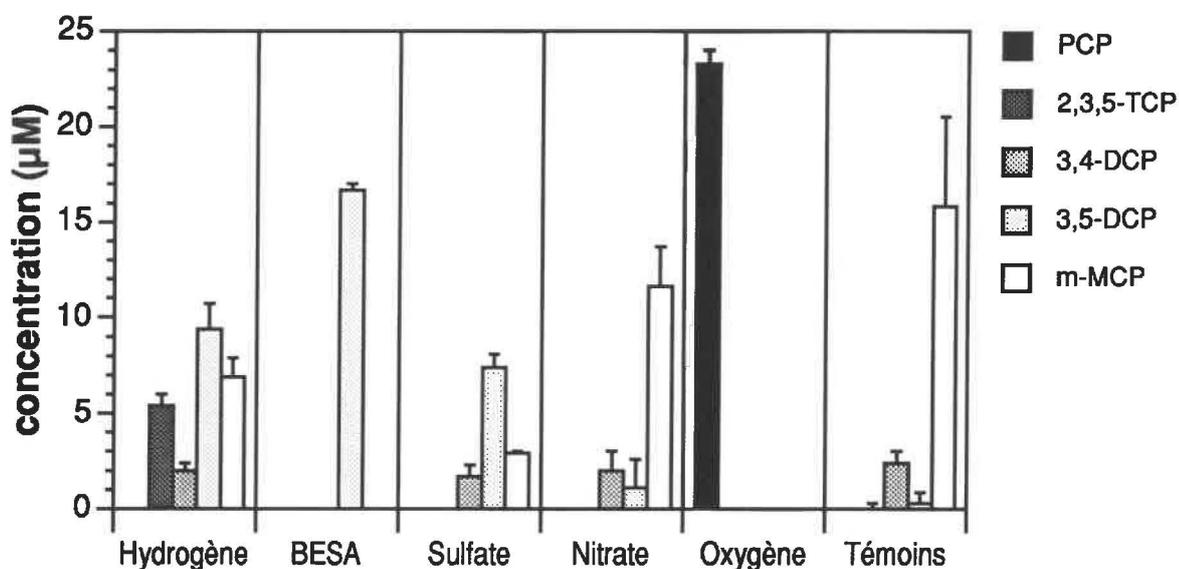


FIGURE 26: Rôle des bactéries sporulées dans la dégradation du PCP.  
 A) Consortium traité à la chaleur (80°C/60 minutes). B) Témoin positif.  
 C) Témoin stérile.



**FIGURE 27: Rôle de différents accepteurs d'électrons.** Le schéma représente la distribution des chlorophénols au terme d'une incubation (2 jours pour le BESA et l'hydrogène, 4 jours pour l'oxygène et 10 jours pour le nitrate et le sulfate). Les valeurs représentées ici pour les témoins sont les moyennes de 3 séries. Les tests statistiques ont cependant été faits en comparant chaque essai avec son témoin respectif.

d'incubation, l'analyse statistique des résultats (test *t* et test *u*) montre que seul l'addition de nitrate n'a pas eu d'effet significatif sur la déchloration du PCP. L'inhibition de la méthanogénèse par l'addition de BESA ou d'hydrogène pur, l'ajout de sulfate et l'incubation aérobie ont tous eu un effet défavorable. Le seuil de signification est 0,001 pour le test de comparaison de moyennes (test *t*) et de 0,05 (soit le maximum pour des triplicata) pour le test non-paramétrique de Mann-Whitney (test *u*).

Les 2 méthodes utilisées pour inhiber la méthanogénèse produisent des effets différents. Avec le BESA, le seul chlorophénol présent était le 2,3,5-TCP. Avec une atmosphère d'hydrogène pur, le 2,3,5-TCP, le 3,4-DCP, le 3,5-DCP et le *m*-MCP ont été détectés. Mais il est à noter que dans les deux cas, tout le PCP a disparu. Dans les bouteilles contenant du sulfate, 3 chlorophénols ont été retrouvés: le 3,4-DCP, le 3,5-DCP et le *m*-MCP. Dans le cas de l'oxygène, aucune déchloration du PCP n'a été notée après 48 heures d'incubation alors que le consortium témoin, incubé simultanément en anaérobiose, a transformé la totalité du PCP reçu en *m*-MCP en 24 heures ou moins.

## 8. EFFET D'UN SUPPORT FAVORISANT L'AGRÉGATION

Cet essai visait à déterminer si la présence d'agrégats de microorganismes était nécessaire, sinon utile, à l'activité de déchloration. Pour ce faire, la déchloration du PCP a été suivie dans 3 séries de bouteilles: 1) une série n'ayant pas subi de traitement particulier (bouteilles témoins); 2) une série ayant été vigoureusement agitée; 3) une série ayant été vigoureusement agitée et ayant reçu du DEAE Sephacel. Après 4 jours d'incubation, la série ayant reçu du DEAE Sephacel a transformé 83% du PCP en *m*-MCP alors que, dans les bouteilles témoins, seulement 4% du PCP a atteint ce niveau de déchloration (figure 28). Quant à la série agitée n'ayant pas reçu de DEAE Sephacel, elle contenait des tétrachlorophénols qui n'ont pas pu être quantifiés, les analyses ayant été faites sur HPLC. La présence de TeCP indique malgré tout que la déchloration du PCP était moins avancée que dans le cas de la série témoin.

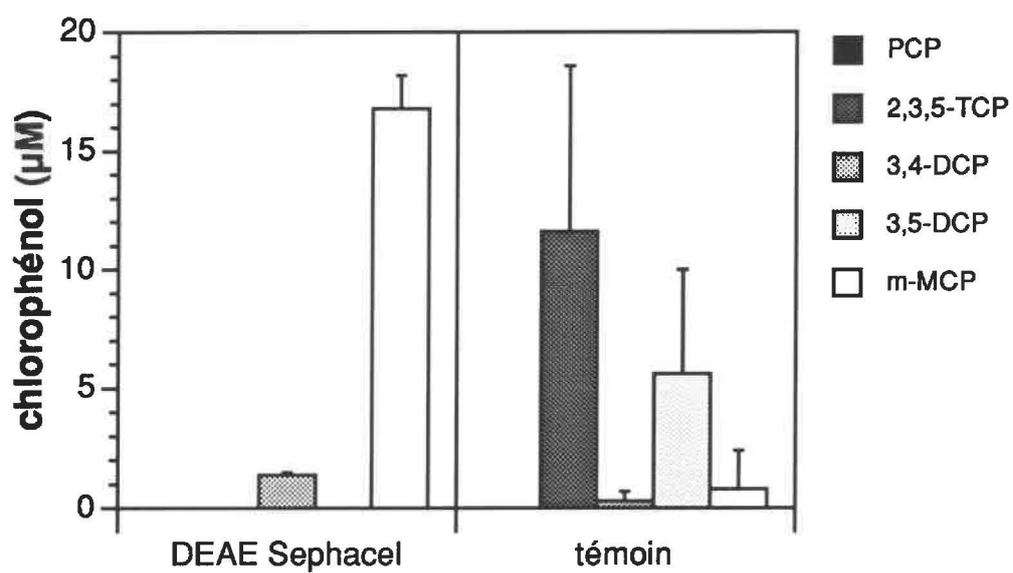


FIGURE 28: **Effet d'un support favorisant l'agrégation.** Le schéma représente la distribution des chlorophénols au terme d'une incubation de 4 jours.

# **D I S C U S S I O N**

---

## **1. BIORÉACTEURS**

### **1.1 ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE**

La disparition du PCP lors de nos différents essais est due à une activité biologique de déchloration et non à des phénomènes abiotiques. La première évidence de ceci est l'apparition de PCP à la sortie du réacteur C1 après addition d'un produit hautement toxique pour les microorganismes dans son réservoir d'alimentation, soit l'azoture de sodium (figure 9). Le 14% de PCP manquant, par rapport à la dose qui entre dans le réacteur, peut s'expliquer par une adsorption partielle ou une activité résiduelle de déchloration. Une autre preuve qu'il y a dégradation du PCP et non pas simplement une adsorption est la détection d'intermédiaires de dégradation et ce, tant dans les réacteurs que dans les essais en bouteilles. Finalement les différences d'activités obtenues à diverses températures (figure 23) sont cohérentes avec une activité biologique.

### **1.2 PERFORMANCES**

Le passage du mode d'alimentation semi-continu au mode continu a amélioré la stabilité de l'activité de déchloration. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'avec une alimentation continue, le PCP est dilué au fur et à mesure qu'il entre dans le réacteur et les bactéries méthanogènes, sensibles au PCP, ne sont jamais en contact avec des concentrations inhibitrices. Au contraire, avec une alimentation semi-continue, la concentration de PCP immédiatement après son addition atteignait quelques fois  $20 \mu\text{M}$ , ce qui peut être partiellement inhibiteur (Sierra-Alvarez et Lettinga, 1991; Wu *et al.*, 1993). Un autre fait important à mentionner est que le taux de remplacement du milieu était faible et qu'en conséquence la quantité de co-substrat fourni au consortium n'était pas très élevée non plus.

L'utilisation de surfaces fixes pour immobiliser la biomasse a permis d'atteindre des performances nettement supérieures (tableau V et VI). La présence d'un biofilm semble donc favorable à l'activité de déchloration. Les meilleures performances obtenues lors de

l'essai en bouteilles où un support favorisant l'agrégation des bactéries a été ajouté sont cohérentes avec ces résultats (voir section 8). Avec le réacteur à surfaces fixes, l'utilisation d'une recirculation a permis d'augmenter par un facteur de 3 la charge de PCP traitée ( $60 \mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  au lieu 20).

Même à  $60 \mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ , le réacteur C2 semble bien en-dessous de ses performances optimales. Dans les 2,5 premiers centimètres de la colonne (6% de la hauteur totale), près de 90% du PCP entrant est disparu, le reste étant déchloré dans les 15 centimètres suivants (figure 10). Il en va de même pour les intermédiaires de dégradation du PCP: le profil de distribution des chlorophénols obtenu à mi-hauteur de la colonne est approximativement le même qu'à la sortie. On doit donc conclure que la biomasse active est bien mal distribuée. Ce problème de distribution était encore plus aigu lorsque la charge de PCP traitée était de  $20 \mu\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  et qu'il n'y avait pas de recirculation: une bonne partie de la déchloration était faite dans la conduite d'alimentation, soit dans un volume représentant à peine 0,03% du volume actif de la colonne (figure 10).

En comparaison aux autres études portant sur la dégradation du PCP en bioréacteur anaérobie (tableau IV), notre système se situe au 2<sup>e</sup> rang en ce qui concerne la charge volumique de PCP traitée. La charge traitée par le réacteur C2 est 7,5 fois plus élevée que celle de Hendriksen *et al.* (1992) mais les boues granulaires utilisées par Wu *et al.* (1993) sont 6 fois plus performantes que notre système actuel. Cependant, tel que mentionné précédemment, notre système semble être loin de sa performance maximale.

Le bioréacteur de Wu *et al.* est également très performant en ce qui a trait au devenir du PCP puisque aucune trace de chlorophénol moins chloré n'a été détecté à l'effluent pour les doses de PCP rapportées au tableau IV. Dans le cas du réacteur C2, ceux-ci représentaient 47% de la dose de PCP traité (37% de *m*-MCP et 10% de DCP) lorsque la charge traitée était de  $60 \mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ . Quant aux bioréacteurs des autres équipes (tableau IV), la comparaison est difficile puisque leurs charges de PCP trai-

tées étaient beaucoup moindre. Pour les périodes où ces charges étaient comparables, les concentrations de chlorophénols dans l'effluent du réacteur C2 étaient environ les mêmes que les leurs. Les chlorophénols de l'effluent du réacteur C2 étaient cependant composés en majorité de *m*-MCP plutôt que de DCP comme c'était le cas pour le réacteur à boues granulaires de Hendriksen *et al.* (1992) et le réacteur à surfaces fixes de Hendriksen *et al.* (1991). Il faut aussi noter que ces résultats ont été obtenus dans les 2 premiers mois d'opération du réacteur C2, avec un biofilm qui était certainement moins important qu'après 8 mois. Donc, concernant le critère du devenir du PCP, le réacteur C2 est au moins aussi performant que ceux de Hendriksen *et al.* (1991) et de Hendriksen *et al.* (1992).

Outre les différences inhérentes au type de réacteur, il est possible que la quantité de co-substrat utilisée par Wu *et al.* (1993) puisse expliquer leurs meilleures performances. Leurs granules ont en effet été développés dans un milieu très riche contenant, en plus du PCP, un mélange de méthanol, d'acétate, de propionate et de butyrate équivalent à une DCO théorique de 10 g/L. En terme de charge, ceci représente 8 à 15 g·L<sup>-1</sup>·jour<sup>-1</sup>. C'est seulement après 200 jours de ce régime que les granules ont été testées à faible charge de DCO, soit 2,7 g·L<sup>-1</sup>·jour<sup>-1</sup>. En comparaison, la charge de DCO théorique reçu par le réacteur C2 a varié, pour les 210 premiers jours d'opération, de 0,4 à 1,5 g·L<sup>-1</sup>·jour<sup>-1</sup>. À la toute fin (jour 226 à 238), cette charge a atteint un maximum de 2,3 g·L<sup>-1</sup>·jour<sup>-1</sup>. C'est donc dire que la biomasse contenue dans le système de Wu *et al.* (1993) devait être nettement supérieure à celle du réacteur C2.

### 1.3 LA DÉCHLORATION DU *m*-MCP, L'ÉTAPE LIMITANTE

Le *m*-MCP est l'intermédiaire de dégradation du PCP qui est le plus souvent détecté tant dans les réacteurs que dans les essais en bouteilles. La déchloration du *m*-MCP est donc l'étape limitante dans la dégradation du PCP par notre consortium. Ceci dit, des bactéries capables de réaliser cette déchloration sont présentes dans le consortium: tous les réacteurs ont eu une période, généralement à faible charge de PCP, où il n'y avait

pas de *m*-MCP ni aucun autre chlorophénol qui accumulaient. Dans l'essai de dégradation des MCP en bouteilles, le *m*-MCP a aussi été dégradé mais lentement. (figure 22). Tel que noté dans la revue bibliographique, la position *meta* est la plus souvent mentionnée comme étant récalcitrante à la biodégradation en conditions méthaniques (Bryant *et al.*, 1991; Hendriksen *et al.*, 1992; Ide *et al.*, 1972; Larsen *et al.*, 1991; Mikesell et Boyd, 1986; Mohn et Kennedy, 1992a; Nicholson *et al.*, 1992). Un fait important à noter est que le consortium utilisé par Wu *et al.* (1993), qui ont obtenu les meilleures performances en bioréacteur, semble privilégier une déchloration en position *meta*. Cette différence de voie biochimique pourrait peut-être expliquer en partie leurs meilleurs résultats.

Le fait que plus de 50% du PCP disparaisse sans accumulation d'autres chlorophénols alors que *m*-MCP semble être dégradé très lentement dans la colonne nous amène à supposer que les microorganismes déchlorant le *m*-MCP sont principalement situés à l'extrémité inférieure du réacteur et n'ont pas le temps de compléter leur boulot. Une autre hypothèse pour expliquer ce phénomène serait qu'une partie du PCP est déchlorée par une autre voie que celle passant par le *m*-MCP mais à un taux tellement rapide que les intermédiaires n'auraient pas été détectés. Les essais en bouteilles ne soutiennent pas cette dernière possibilité. Par exemple, lors du test portant sur l'effet de la température (figure 23), tout le PCP dégradé à 37 et à 29 °C passe par le *m*-MCP.

#### 1.4 BIOFILM

L'observation du biofilm par microscopie à balayage a confirmé qu'à 20  $\mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  et sans recirculation, les bactéries sont concentrées dans le bas du réacteur. L'aspect le plus intéressant de ces observations est l'apparente stratification que des fissures dans le biofilm (probablement des artefacts dus à la déshydratation du biofilm lors de la préparation) ont permis de mettre en lumière (figure 11 et 12). La couche la plus profonde est composée surtout de bactéries en forme de bâtonnets allongés. Parmi ceux-ci, on observe régulièrement des structures apparentées au genre bactérien *Methanosaeta*, soit

des bactéries méthanogènes acétoclastiques (MacLeod *et al.*, 1990; Patel et Sprott, 1990). À la surface du biofilm, ce sont surtout des cocci et des bâtonnets courts qui dominent. Les bactéries ressemblant au genre *Methanosaeta* sont présentes mais rares. Outre ces dernières, qui ont une forme très caractéristique, il est difficile de tenter d'identifier les autres bactéries, leur morphologie étant moins typique.

Ces observations vont dans le même sens que celles réalisées dans des études récentes portant sur la formation de biofilms anaérobies. Cheng *et al.*(1992), qui ont travaillé sur un réacteur anaérobie à lit fluidisé, ont observé que la colonisation des surfaces fixes commençait par l'établissement d'un réseau de bactéries filamenteuses et de *Methanosaeta*. Après cette étape initiale, des bactéries en forme de cocci et de bâtonnets courts se sont incorporées au biofilm. Une telle stratification est aussi en parfait accord avec des observations réalisées sur des granules provenant d'un réacteur à boues granulaires (Guiot *et al.*, 1992; MacLeod *et al.*, 1990). Ces chercheurs ont montré que les granules étaient organisées en 3 couches très distinguées: le centre, représentant la plus grande partie du volume, est occupée presque exclusivement par le genre *Methanosaeta*; la couche externe est surtout composée de bactéries acidogènes productrice d'hydrogène mais également de méthanogènes consommatrices d'hydrogène; la couche située entre les deux est composée de bactéries acétogènes productrices d'hydrogène et de méthanogènes consommatrices d'hydrogène.

Compte tenu de leurs dimensions, les structures de forme ronde et à surface plissée (figure 13) observées dans la partie inférieure du réacteur sont probablement des levures. Celles-ci étant en très faibles nombre dans le biofilm, il est peu probable qu'elles soient impliquées dans la dégradation du PCP. Elles ont simplement été capables de résister aux doses des chlorophénols présents dans les réacteurs et elles ont survécu en utilisant le glucose.

## 1.5 SURFACES FIXES VS BOUES GRANULAIRES

Nonobstant les commentaires de la section 1.2 sur les différences de conditions d'opération, il semble pertinent, compte tenu des excellents résultats obtenus par Wu *et al.* (1993) avec des boues granulaires, de se demander si le concept de réacteur à surfaces fixes devrait être retenu pour la suite des études de laboratoire ou même pour un réacteur à l'échelle pilote.

Un réacteur à surfaces fixes possède un sérieux désavantage en comparaison à un réacteur à boues granulaires: les surfaces fixes occupent un volume mort important. Dans un réacteur à boues granulaires, la biomasse est immobilisée sur elle-même et tout le volume du réacteur est actif (Guiot *et al.*, 1992). Nous avons malgré tout choisi un réacteur à surfaces fixes car nous avons comme hypothèse de départ qu'une telle architecture pourrait éventuellement permettre une séparation des bactéries déchlorantes et des bactéries méthanogènes (nous discuterons plus loin des raisons pour lesquelles cette hypothèse n'a pas été vérifiée). Ces dernières sont à ce point sensibles au PCP qu'elles représentent le maillon faible dans la chaîne de dégradation. Si la déchloration avait lieu dans la première partie du réacteur et la méthanogénèse dans la dernière partie, les bactéries méthanogènes seraient protégées et de plus fortes charges de PCP pourraient être traitées. Un réacteur à boues granulaires ne peut pas permettre une telle séparation et la concentration de PCP dans le réacteur doit être maintenue très basse en diluant l'affluent avec l'effluent. Par exemple, les granules acclimatées au PCP de Wu *et al.* (1993) présentaient une inhibition de 73% de la méthanogénèse lorsqu'elles étaient en contact avec 19  $\mu\text{M}$  de PCP.

L'essai d'inhibition de la méthanogénèse (section 7) a démontré que l'enlèvement des 2 premiers atomes de chlore, au moins, n'est pas dépendant du transfert d'hydrogène entre espèces. Il reste la possibilité qu'un facteur soluble, produit par les bactéries situées à la fin de la chaîne de la méthanogénèse (acétogènes, méthanogènes, etc.) soit nécessaire pour les bactéries responsables de la déchloration du PCP. Tel que mentionné dans la

revue bibliographique, ce genre de dépendance a été bien décrit pour *Desulfomonile tiedje* (Mohn et Tiedje, 1992). La recirculation du milieu permettrait alors non seulement de diluer l'affluent et de mieux répartir les nutriments dans le réacteur, mais également de fournir cet éventuel facteur soluble aux bactéries responsables de la déchloration. C'est donc dire que, dans un tel réacteur, les bactéries qui ne dépendent pas du transfert d'hydrogène entre espèce seraient organisées en fonction de la hauteur du lit filtrant. Les bactéries syntrophes seraient situées dans la dernière partie du réacteur, probablement organisées en fonction de l'épaisseur du biofilm, tel que nous l'avons observé (section 1.4). S'il s'avérait nécessaire de traiter le *m*-MCP dans un deuxième réacteur aérobie (voir section 1.6), les bactéries méthanogènes du premier réacteur, qui seraient alors en contact avec ce produit, pourraient supporter des doses relativement élevées puisque la toxicité des chlorophénols est reliée au nombre d'atomes de chlore sur la molécule (Patel *et al.*, 1991; Sierra-Alvarez et Lettinga, 1991).

L'observation de bactéries méthanogènes au bas du réacteur indique que cette séparation n'a pas eu lieu lorsque la charge de PCP traitée était de 20  $\mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  et qu'il n'y avait pas de recirculation. On peut supposer qu'il en est de même à 60  $\mu\text{moles de PCP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  et avec recirculation puisque, dès les tous premiers centimètres de la colonne, le PCP tombe à 10  $\mu\text{M}$ , une dose qui n'est pas considérée comme inhibitrice (Sierra-Alvarez et Lettinga, 1991). Les doses de PCP traitées n'ont donc pas été suffisamment élevées pour permettre de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse voulant qu'il soit possible de séparer les bactéries responsables de la déchloration et les bactéries méthanogènes.

Tel qu'il a été discuté à la section 1.2, les meilleures performances du réacteur à boues granulaires de Wu *et al.* (1993) semblent surtout dues aux conditions d'opération plutôt qu'au type de réacteur utilisé. De plus la possibilité de réussir à séparer physiquement la déchloration de la méthanogénèse nous permet d'envisager l'atteinte de hautes

performances. Il apparaît donc pertinent de pousser plus loin l'expérimentation du concept de réacteur à surfaces fixes pour la déchloration du PCP.

## 1.6 RECOMMANDATIONS

À partir de la discussion qui précède, il est possible de tirer quelques recommandations dans le but d'augmenter les performances d'un réacteur à surface fixes dégradant le PCP, tel le C2.

La quantité de co-substrat devrait être haussée afin d'accroître considérablement la biomasse. Ensuite, le taux de recirculation devrait également être augmenté afin de mieux répartir les nutriments dans le bioréacteur et favoriser ainsi une meilleure distribution de la biomasse tout le long du lit filtrant. La vitesse du courant ascendant créée par cette recirculation doit être suffisante pour que la déchloration du PCP se fasse sur une bonne partie du lit filtrant. Cette recirculation ne doit cependant pas être excessive pour ne pas créer des conditions homogènes du bas au haut de la colonne, le but étant de séparer la déchloration de la méthanogénèse.

Une attention particulière devrait être portée au choix du support. Les pierres concassées utilisées ici ont permis de démontrer qu'il est possible de déchlorer des doses relativement élevées de PCP dans un réacteur à surfaces fixes. Ceci dit, il semble évident que ce n'est pas là la matrice idéale pour obtenir la meilleure quantité de biomasse pour un volume donné. Plusieurs articles relativement récents ont comparé l'effet de différents matériaux dans la formation de biofilms anaérobies. Les chercheurs ont remarqué des différences significatives selon le type de support. Ces différences étaient fonctions des charges électriques, de la porosité et de la rugosité des surfaces (Kindzierski *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 1988; Kennedy et Droste, 1985; Verrier *et al.*, 1987; Yu et Pinder, 1992).

Si ces changements n'entraînaient pas une plus grande déchloration du *m*-MCP, il faudrait alors consacrer des efforts de recherche sur cette étape limitante. À partir du

consortium actuel et/ou d'échantillons de sites contaminés au PCP, on pourrait tenter d'enrichir la population des bactéries responsables de la déchloration du *m*-MCP pour ensuite bioaugmenter les réacteurs avec celles-ci. Un tel enrichissement par des repiquages en bouteilles a été rapporté par Häggblom *et al.* (1993). Une autre possibilité consiste à trouver, à partir d'échantillons de sites contaminés, un tout nouveau consortium qui attaquerait le PCP principalement en position *meta*. C'est précisément un consortium du genre qui semble être présent dans les granules du réacteur de Wu *et al.* (1993). Une troisième solution consisterait à ajouter un traitement aérobie, capable de dégrader le *m*-MCP après le traitement anaérobie du PCP. Plusieurs études ont montré que les monochlorophénols pouvaient être rapidement dégradés en conditions aérobies (Häggblom, 1990; Hardman, 1991; Neilson, 1990). L'exposition séquentielle à des conditions anaérobies-aérobies est un choix de plus en plus fréquent pour la dégradation des composés organochlorés (Fathepure et Vogel, 1991; Hakulinen et Salkinoja-Salonen, 1982; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1984; Zitomer et Speece, 1993). En terme de performances, de tels procédés tirent avantage du fait que, généralement en anaérobiose, les composés très chlorés sont déchlorés plus rapidement que leurs congénères moins substitués, alors que l'inverse est vrai en conditions aérobies. En terme de rendement global, comparativement à un traitement aérobie, il y a une bonne économie du point de vue énergétique et des boues générées. Sur ces 2 derniers points, un traitement entièrement anaérobie reste préférable.

## 2. VOIES BIOCHIMIQUES

Les voies biochimiques de dégradation du PCP, proposées à partir de l'identification d'intermédiaires dans le milieu de culture (figure 20), est conforme à ce qui a été décrit par d'autres équipes (Nicholson *et al.*, 1992). Ceci est vrai pour autant que la transformation du 2,3,4,5-TeCP en 3,4-DCP passe bien par le 3,4,5-TCP, un composé qui n'a pas été détecté dans le milieu. Si ce TeCP était plutôt déchloré en 2,3,4-TCP, un intermédiaire possible pour atteindre le 3,4-DCP, cela représenterait une voie qui, à notre connaissance, n'a pas été encore décrite. D'ailleurs la déchloration du 2,3,4-TCP en

3,4-DCP, observée lors de l'essai portant sur le rôle des bactéries sporulées (figure 24), ne semble pas avoir été rapportée par d'autres chercheurs. Ceci ne signifie pas que le 2,3,4-TCP soit un intermédiaire de dégradation du PCP puisque la dégradation de l'autre candidat possible, le 3,4,5-TCP, n'a pas été testé, ce produit n'étant pas commercialement disponible lors de l'essai.

En se basant sur l'essai portant sur l'effet de la température (figure 23), où le suivi serré des intermédiaires de dégradation a permis de faire un bilan de masse valable, la ou les voies passant par la séquence 2,3,5-TCP → 3,5-DCP → *m*-MCP semble être nettement majoritaire comparativement aux autres possibilités. Ceci confirme ce qui a été observé dans le bioréacteur (section 1.3), soit que la position *meta* est la plus difficile à déchlorer. Les TeCP n'ayant pas été dosés lors de cet essai en bouteilles, il n'est pas possible de déterminer laquelle des deux autres positions, *ortho* ou *para*, est préférentiellement déchlorée.

Concernant le phénol, la différence de 6 secondes entre l'élution du phénol pur et le pic observé sur le chromatogramme (figure 19) peut s'expliquer par la très faible concentration du phénol dans l'effluent analysé. Une telle différence a également été remarquée pour le 2,3,5-TCP. Lors d'une analyse de l'effluent où sa concentration était très basse, le pic correspondant au 2,3,5-TCP était retardé de quelques secondes par rapport à l'élution du produit pur. En concentrant l'échantillon de l'effluent par évaporation, les temps de rétention sont devenus identiques. Le volume d'échantillon était hélas insuffisant pour continuer l'évaporation et obtenir un pic plus clair en ce qui concerne le phénol. Malgré la très faible quantité détectée, la présence de phénol est un phénomène intéressant. Parmi les auteurs consultés, seul Bryant *et al.* (1991) ont dosé du phénol comme produit de dégradation du PCP. Les autres équipes ont plutôt déduit que le phénol devait être un intermédiaire sans pour autant l'avoir détecté.

Le devenir final du PCP n'a pas été déterminé dans le cadre de cette étude. Nous avons cependant bien démontré que le consortium était en conditions méthaniques puisque du méthane a été détecté dans tous les réacteurs. Dans de telles conditions, Mikesell et Boyd (1986) et Wu *et al.* (1993) ont utilisé du PCP marqué et ils ont observé que la plus grande partie de celui-ci se retrouve sous forme de CH<sub>4</sub> et de CO<sub>2</sub>.

### 3. DÉGRADATION DES MONOCHLOROPHÉNOLS

L'ordre de préférence observé dans cet essai, soit *ortho* > *meta* > *para* est conforme à ce qui a été le plus souvent rapporté pour les monochlorophénols (Boyd *et al.*, 1983; Boyd et Shelton, 1984; Genthner *et al.*, 1989; Mikesell et Boyd, 1985). Avec des sédiments non acclimatés, Häggblom *et al.* (1993) ont observé une déchloration préférentielle en position *ortho* alors que les 2 autres positions étaient déchlorés dans des temps similaires. Par contre, après acclimatation, l'ordre de préférence était devenu *meta* > *para* > *ortho*. Compte tenu que notre consortium est constamment en contact avec le *m*-MCP, on aurait pu s'attendre à une adaptation similaire. Puisque ce n'est pas le cas, cela nous amène à croire qu'il y a peu d'espoir d'enrichir une population bactérienne efficace contre le *m*-MCP à partir du consortium actuel. Les chances seraient probablement plus grandes en utilisant de nouveaux échantillons de sols contaminés.

### 4. EFFET DE L'ADDITION DE CO-SUBSTRATS

Le premier élément qui ressort de la figure 21 est la nécessité d'ajouter un co-substrat afin de maintenir l'activité de déchloration du PCP. Ceci va dans le même sens que plusieurs études qui ont obtenu des résultats nettement supérieurs en ajoutant un substrat facilement assimilable (Hendriksen et Ahring, 1992; Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen *et al.*, 1992). Tel que mentionné à la section 1.2, le consortium méthanique le plus performant rapporté à ce jour (Wu *et al.*, 1993) utilise également un milieu contenant un riche mélange de co-substrat.

En ce qui concerne les différents co-substrats, les préférences varient selon le consortium utilisé. Concernant l'acétate, Hendriksen et Ahring (1992) rapportent des résultats similaires aux nôtres, soit que ce produit ne supporte pas l'activité de déchloration du PCP. À l'opposé, le consortium utilisé par Nicholson *et al.* (1992) a été enrichi en utilisant uniquement l'acétate comme co-substrat. Également, l'acétate représentait de 10 à 30% de la DCO des milieux de culture utilisés par Wu *et al.* (1993). Tout comme pour notre consortium, le glucose a aussi été rapporté comme étant un bon co-substrat pour la déchloration du PCP (Hendriksen et Ahring, 1992; Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen *et al.*, 1992) ou du 2,4,6-TCP (Madsen et Aamand, 1992). Dans ce dernier cas, c'est l'extrait de levures qui permettait les meilleures performances, alors que ni le lactate, ni le formiate n'avaient d'effet stimulant sur la déchloration. Pour le formiate, Hendriksen et Ahring (1992) rapporte aussi des résultats négatifs. Tant qu'il ne sera pas possible de travailler avec des cultures pures, il sera difficile de comprendre le rôle exact de ces co-substrats.

À partir de ces résultats, nous avons décidé de remplacer le glucose, qui avait été utilisé jusqu'alors comme unique co-substrat, par un mélange de glucose et de formiate de sodium. Contrairement au glucose seul, ce mélange a l'avantage de ne pas provoquer de chute de pH lorsqu'il est métabolisé. Ce mélange a été préféré à l'extrait de levures dans le but d'avoir un milieu de culture défini.

## 5. EFFET DE LA TEMPÉRATURE

Bien que le consortium ait été adapté à 29°C, c'est à 37°C que la déchloration du PCP jusqu'au *m*-MCP est la plus rapide. Ces résultats ne sont cependant que légèrement supérieurs à ceux obtenus à 29°C. Mais à 15°C, il y a une chute dramatique de la performance du consortium, ce qui est évidemment encore pire à 4°C. On ne doit cependant pas conclure trop vite en ce qui concerne les limites d'application ou la nécessité éventuelle de chauffer les effluents à traiter dont la température serait trop basse. Ces résultats doivent plutôt être interprétés en terme de tolérance du consortium actuel, adapté à 29°C. Pour trai-

ter un effluent plus froid ou plus chaud, il faudrait tenter d'adapter le consortium à une température différente.

À notre connaissance, aucune équipe n'a testé l'effet de la température sur un consortium méthanique dégradant le PCP. Généralement, les consortiums ayant fait l'objet d'articles ont été incubés entre 28 et 37°C. Des chercheurs travaillant sur la dégradation du 2,4-DCP ont observé une activité de déchloration entre 5 et 50°C avec un optimum entre 25 et 35°C. Larsen *et al.* (1991) ont rapporté la déchloration du PCP en conditions méthaniques à 50°C. Leur taux de déchloration du PCP était cependant très faible, le maximum observé étant de  $7,5 \mu\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ ; en comparaison, le PCP a été transformé à un taux de  $96 \mu\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  à 37°C lors de notre essai.

À 45°C, le PCP est déchloré aussi vite qu'à 37°C mais les autres étapes sont beaucoup plus lentes. Ceci est cohérent avec l'hypothèse que plusieurs souches bactériennes sont impliquées dans la déchloration complète du PCP. La souche responsable de l'enlèvement du premier atome de chlore sur le PCP serait aussi active sinon plus qu'à 37°C alors que ce serait l'inverse pour les bactéries impliquées dans les autres étapes de déchloration.

## 6. RÔLE DES BACTÉRIES SPORULÉES

La déchloration du PCP par un consortium chauffé à 80°C pendant 1 heure indique que ce sont fort probablement des bactéries ayant la capacité de sporuler qui sont responsables de l'enlèvement des 4 premiers atomes de chlore (figure 26). Pour ce qui est du dernier atome de chlore en position *meta*, aucune conclusion ne peut être tirée puisque les témoins non chauffés ont réagi de la même façon que les bouteilles chauffées, c'est-à-dire qu'il n'y a eu que peu ou pas de déchloration du *m*-MCP pendant la période étudiée. L'absence de déchloration dans l'essai où le 2,3,5-TCP a directement été ajouté dans le milieu semble contradictoire. Mais il est à noter que les bactéries utilisées ne provenaient pas du même réacteur. Le surnageant du réacteur C3, utilisé pour l'essai avec le PCP, s'est

généralement avéré beaucoup plus actif que la culture prélevé dans le réacteur B1, qui a été utilisée pour l'essai avec le 2,3,5-TCP. L'explication peut également résider dans les doses: dans l'essai avec le 2,3,5-TCP, 48  $\mu\text{M}$  ont été ajoutés alors que, dans l'essai avec le PCP, le maximum de 2,3,5-TCP détecté a été 11  $\mu\text{M}$ . Il faut d'ailleurs remarquer que, pour l'essai avec le 2,3,5-TCP, les écarts types des bouteilles témoins sont grands ce qui signifie que même le consortium non chauffé a eu de la difficulté à déchlorer la dose de 48  $\mu\text{M}$ . L'autre possibilité, quoique faible, est qu'il y ait eu erreur sur l'identification des intermédiaires par HPLC lors de l'essai avec le PCP puisqu'il n'y a pas eu de confirmation par analyses sur GC.

Ces essais ont également indiqué qu'une population de bactéries sporulées est capable de transformer le 2,3,4-TCP en 3,4-DCP. Bien qu'on ne sache pas si ce chlorophénol est un intermédiaire de la dégradation du PCP, ce résultat ajoute une information sur les capacités du consortium.

La capacité de ces microorganismes à former des spores présente au moins 2 avantages. Tout d'abord les bioréacteurs devraient offrir une bonne résistance à des conditions adverses; même s'il y a une perte d'activité, les bactéries devraient pouvoir reprendre leur boulot après le rétablissement d'un environnement favorable, les spores étant encore présentes. Deuxièmement, cette propriété pourra être mise à contribution en vue de l'isolement en culture pure des souches impliquées dans la déchloration du PCP puisqu'un tel traitement à la chaleur devrait éliminer une bonne partie des autres microorganismes présents dans le consortium. Ce fut d'ailleurs l'étape préliminaire à l'isolement de la souche DCB-2 qui déchloré certains tri- et dichlorophénols (Madsen et Aamand, 1992; Madsen et Licht, 1992). Des traitements à la chaleur et à l'éthanol ont aussi permis d'enrichir un consortium méthanique dégradant l'Aroclor 1242, un mélange de polychlorobiphényles (Ye *et al.*, 1992). Dalton et Wiegel (1990) ont également observé qu'une bactérie sporulée était responsable de la transformation du 2,4-DCP en 4-MCP, sans pour autant réussir à l'isoler.

## 7. ACCEPTEURS D'ÉLECTRONS

Contrairement aux résultats de Hendriksen et Ahring (1992), l'inhibition de la méthanogénèse par le BESA n'a pas empêché la déchloration du PCP mais a bloqué celle du 3,5-DCP (figure 27). L'utilisation d'une atmosphère d'hydrogène pur a significativement nui à la déchloration, mais de façon différente puisque le 2,3,5-TCP, le 3,4-DCP, le 3,5-DCP et le *m*-MCP ont tous été détectés dans le milieu de culture. Ces inhibitions sont malgré tout étonnantes puisque le traitement à la chaleur (80°C pendant 1 heure), utilisé lors de l'essai portant sur les bactéries sporulées, élimine les bactéries méthanogènes (Madsen et Aamand, 1992) ce qui n'a pas empêché le consortium chauffé de transformer le PCP en *m*-MCP (section 6). Une explication possible à ce phénomène est que le 1,4-naphtoquinone et/ou le 2-méthyle-1,4-naphtoquinone, ajoutés seulement aux consortiums traités à la chaleur, soient effectivement nécessaires pour les étapes de déchloration, comme c'est le cas pour *Desulfomonile tiedje* (Mohn et Tiedje, 1992). Ces composés remplaceraient alors une vitamine qui est normalement fournie par les bactéries méthanogènes. Les bactéries présentes lors des essais avec le BESA et avec l'hydrogène auraient alors perdu leur source naturelle de naphtoquinone (ou d'un produit équivalent) sans qu'il y ait compensation par l'ajout manuel de la vitamine au milieu de culture, ce qui a entraîné une inhibition de la déchloration. Le fait que le PCP ait été partiellement déchloré malgré tout pourrait alors s'expliquer d'au moins deux manières: 1) ce ne sont pas toutes les bactéries impliquées dans les différentes étapes de déchloration qui ont besoin de la dite vitamine; 2) il restait une quantité suffisante de cette vitamine dans le milieu pour permettre les premières étapes de déchloration du PCP. Ces hypothèses restent évidemment à vérifier. Cependant, il est clair que l'enlèvement d'au moins les 2 premiers atomes de chlore n'est pas sous la dépendance d'un phénomène de transfert d'hydrogène entre espèce. Ceci est en accord avec les calculs de Dolfing et Harrison (1992) qui ont déterminé que la déchloration réductrice est une réaction favorable du point de vue thermodynamique.

Parmi les 3 autres accepteurs d'électrons testés, seul l'oxygène a provoqué un blocage complet de la déchloration du PCP. En présence de sulfate, la déchloration du PCP a eu lieu mais le 3,5-DCP a accumulé dans le milieu alors que le nitrate n'a pas provoqué d'inhibition significative. Ceci est encore une fois différent des résultats de Hendriksen et Ahring (1992) qui ont observé une forte inhibition de la déchloration du PCP en présence de nitrate, et une légère en présence sulfate. Madsen et Aamand (1991), pour leur part, ont obtenue une inhibition de la dégradation du PCP en ajoutant du sulfate.

La prudence s'impose en ce qui concerne l'absence d'inhibition observée avec le nitrate. Ce dernier n'a pas été dosé avant et après l'incubation pour vérifier s'il était encore présent. Il reste donc possible que le nitrate soit inhibiteur mais que la déchloration ait repris après une rapide dénitrification.

## **8. EFFET D'UN SUPPORT FAVORISANT L'AGRÉGATION**

Un des plus sérieux problèmes rencontrés au cours de la présente étude a été la difficulté à travailler avec de petits volumes, dans des bouteilles à sérum. Par exemple, il a été impossible de repiquer le consortium en bouteille, c'est-à-dire de prélever un échantillon du consortium et d'inoculer une bouteille contenant du milieu frais, et ce, peu importe la grosseur de l'inoculum. Le seul protocole qui a fonctionné a été de prélever un certain volume d'un bioréacteur, de le distribuer par portion de 20 mL dans des bouteilles et de tester l'activité de déchloration sans diluer le consortium (sauf pour l'essai sur les co-substrats où les bouteilles étaient alimentées en mode semi-continu). Deux autres observations nous ont amenés à penser que l'activité de déchloration pouvait être fonction de la présence d'agrégats dans les bouteilles: 1) si le transfert ce faisait à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille fine, l'activité de déchloration était souvent nulle ou sinon très variable d'un réplicata à l'autre; 2) le surnageant du réacteur à surfaces fixes C3, prélevé après une légère agitation pour détacher une partie du biofilm, était beaucoup plus actif.

Le choix du DEAE Sephacel comme support potentiel est basé sur l'article de Kindzierski *et al.* (1992) qui ont observé une meilleure immobilisation des bactéries avec une résine échangeuse d'anions (XE-352 de la compagnie Ambergard) qu'avec du charbon activé ou une résine échangeuse de cations. Ceci dit il n'est pas évident que ce choix soit le meilleur puisque la supériorité de la résine échangeuse d'anions semblait surtout due à sa porosité plutôt qu'à sa charge. Puisque cet essai se voulait préliminaire, nous n'avons pas testé différentes résines ou différentes quantités et il n'y a pas eu d'observation microscopique pour confirmer la présence d'agrégats. Mais les résultats se sont avérés suffisamment intéressants pour être rapportés ici.

Parmi les 2 séries de bouteilles ayant été vigoureusement agitées, seule celle ayant reçu du DEAE Sephacel a permis une déchloration du PCP en *m*-MCP. Cette déchloration a même été nettement supérieure que dans les bouteilles témoins n'ayant pas été agitées (figure 28). Bien que n'ayant pas été quantifiés, la présence de TeCP dans les bouteilles agitées qui n'ont pas reçu de DEAE Sephacel indique que la déchloration était encore moins avancée que dans les bouteilles témoins, probablement en raison de la destruction des agrégats provenant du biofilm du réacteur C3. Ces résultats suggèrent que la résine a permis de recréer une agrégation des bactéries et qu'une telle proximité cellulaire est nécessaire, sinon utile, pour l'activité de déchloration.

Les bouteilles témoins de cet essai, qui se voulaient être des témoins positifs mais qui en fait ont très mal fonctionné, illustrent bien les difficultés à travailler en petites bouteilles. Le surageant du réacteur C3, qui avait pourtant produit d'excellents résultats pendant plusieurs mois, présentait à la fin une activité de déchloration de plus en plus lente, alors que l'effluent du réacteur était toujours de très bonne qualité après un temps de résidence hydraulique de 2 jours (les chlorophénols étaient sous le seuil de détection). Il est possible qu'après plusieurs prélèvements (maximum 1 par semaine, généralement 1 par 2 semaines), le biofilm n'ait pas eu le temps de se régénérer suffisamment pour fournir un inoculum de qualité.

En ce qui concerne les applications en bioréacteurs, ces résultats mettent l'accent sur l'importance des phénomènes d'immobilisation pour la stabilité et la performance de la déchloration. D'un point de vue plus fondamental, ces données suggèrent qu'il puisse être possible d'isoler des microorganismes dont l'activité de déchloration ne sera exprimée qu'en présence d'agrégats. Ces agrégats pourraient réunir soit des bactéries d'une même souche, soit des bactéries de souches différentes et dont la collaboration serait essentielle à la déchloration. L'utilisation d'un support adéquat favoriserait alors l'expression de cette activité.

Si l'hypothèse de l'agrégation s'avérait exacte, l'explication pourrait être une plus grande facilité d'échange de métabolites entre les bactéries. Mais la compréhension du phénomène reste une question ouverte qui ne sera probablement résolue que lorsque ces bactéries seront isolées en culture pure.

# C O N C L U S I O N

---

L'utilisation d'un consortium bactérien méthanique enrichi dégradant le pentachlorophénol et le choix d'un bioréacteur à surfaces fixes ont permis de traiter des doses relativement élevées de PCP, soit  $60 \mu\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ . Les analyses montrent que le bioréacteur est bien en-dessous de ses capacités maximales. Les performances pourraient probablement être augmentées en haussant les concentrations de co-substrats et en utilisant des supports plus appropriés afin d'accroître considérablement la biomasse dans le réacteur. Les bactéries responsables de la déchloration ne semblent pas dépendre du transfert d'hydrogène associé à la méthanogénèse. Il n'est cependant pas exclu que les réactions de déchloration nécessitent une vitamine ou un facteur qui serait produit par les bactéries méthanogènes. La séparation physique des bactéries déchlorantes et des bactéries méthanogènes dans un réacteur à surfaces fixes reste une hypothèse plausible en autant qu'une recirculation du milieu permette le transport de la dite vitamine. Faute de temps, une telle séparation, qui protégerait les bactéries méthanogènes sensibles au PCP, n'a pas été observée dans notre système, les doses de PCP traitées étant insuffisantes.

La déchloration du *m*-MCP est l'étape limitante du processus de dégradation du PCP par notre consortium. Ceci devra faire l'objet de recherches afin d'améliorer les performances du traitement.

La résistance à un traitement à la chaleur d'une heure à  $80^\circ\text{C}$  suggère que les bactéries impliquées dans la déchloration du PCP en *m*-MCP sont capables de former des spores. Cette propriété pourra être mise à profit pour tenter d'isoler des souches bactériennes déchlorantes. La présence d'agrégats de bactéries semble nécessaire, sinon utile, à la déchloration. Il est donc possible que des bactéries déchlorantes soit éventuellement isolées en culture pure mais que l'activité de déchloration ne soit exprimée efficacement qu'en présence d'agrégats. La formation de tels agrégats, réunissant soit des bactéries de la même souche, soit des bactéries de souches différentes, serait favorisée par l'utilisation d'un support approprié.

**R E M E R C I E M E N T S**

---

**Je tiens à remercier tout particulièrement:**

**mon directeur de maîtrise, le docteur Réjean Beaudet, pour son soutien scientifique et moral, sa disponibilité et son enthousiasme communicatif;**

**monsieur Guy McSween et madame Rita Alary, pour m'avoir fait bénéficier de leur longue expérience par leurs judicieux conseils et leur support technique;**

**le docteur François Lépine et son attaché de recherche, monsieur Sylvain Milot, pour leur précieuse collaboration dans les analyses par spectrométrie de masse;**

**messieurs Robert Alain (IAF) et Claude Danièle (UQAM), pour leur support technique en microscopie électronique;**

**le Fond pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR), pour leur appui financier pendant les 2 années de maîtrise.**

**B I B L I O G R A P H I E**

---

- ABRAHAMSSON, K. et S. KLICK. 1991. Degradation of Halogenated Phenols in Anoxic Natural Marine Sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 22(5): 227-233.
- AHLBORG, U. G. et T. M. THUNBERG. 1980. Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism, and environmental impact. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 7: 1-35.
- APAJALAHTI, J. 1987. Chlorophenol metabolism of a polychlorophenol degrader, *Rhodococcus chlorophenolicus* sp. nov. Thèse de doctorat. Helsinki, Finlande. Université de Helsinki.
- ASSAF-ANID, N., L. NIES et T. M. VOGEL. 1992. Reductive Dechlorination of a Polychlorinated Biphenyl Congener and Hexachlorobenzene by Vitamin-B<sub>12</sub>. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(3): 1057-1060.
- BEVENUE, A., J. N. OGATA et J. W. HYLIN. 1972. Organochlorine pesticides in rainwater, Oahu, Hawaii, 1971-72. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 8: 238-241.
- BOLLAG, J. M. 1992. Decontaminating Soil with Enzymes. *Environ. Sci. Technol.* 26(10): 1876-1881.
- BOONE, D. R., R. L. JOHNSON et Y. LIU. 1989. Diffusion of the interspecies electron carriers H<sub>2</sub> and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K<sub>m</sub> for H<sub>2</sub> and formate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1735-1741.
- BOYD, S. A. et D. R. SHELTON. 1984. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(2): 272-277.
- BOYD, S. A., D. R. SHELTON, D. BERRY et J. M. TIEDJE. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1): 50-54.
- BROCK, T. D. et M.T. MADIGAN. 1991. *Biology of microorganisms*. New Jersey. Prentice-Hall, inc. 874 pages.
- BRYANT, F. O., D. D. HALE et J. E. ROGERS. 1991. Regiospecific Dechlorination of Pentachlorophenol by Dichlorophenol-Adapted Microorganisms in Freshwater, Anaerobic Sediment Slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8): 2293-2301.
- CHAUDRY, R. G. et S. CHAPALAMADUGU. 1991. Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. *Microbiol. Rev.* 55(1): 59-79.
- CHENG, S.S., S.Y. HUANG, J.J. LAY, P.S. TSAI et L.T. CHO. 1992. Population Dynamics of Attached Biofilm in Anaerobic Fluidized Bed Pilot Plant. *Water Sci. Technol.* 26(3-4): 503-510.
- CHOI, J. et S. AOMINE. 1974. Adsorption of pentachlorophenol by soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 20: 371-379.
- CHU, J. P. et E. J. KIRSCH. 1972. Metabolism of pentachlorophenol by an axenic bacterial culture. *Appl. Microbiol.* 23: 1033-1035.

CHU, J. P. et E. J. KIRSCH. 1973. Utilization of halophenols by a pentachlorophenol metabolizing bacterium. *Dev. Ind. Microbiol.* 14: 264-273.

CIRELLI, D. P. 1978. "Patterns of pentachlorophenol usage in the United States of America: an overview", dans Rao, K. R.: *Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology, and environmental toxicology*. New York. Plenum Press. 13-18.

CNRC. 1981. *Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins: criteria for their effects on man and his environments*. Ottawa. Conseil national de recherche du Canada. 251 pages.

CNRC. 1982. *Chlorinated phenols: criteria for environmental quality*. Ottawa. Conseil national de recherche du Canada. 191 pages.

COLE, J. R. et J. M. TIEDJE. 1990. "Induction of anaerobic dechlorination of chlorobenzoate in strain DCB-1", dans ASM: Abstract of the 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology-1990. Washington. American Society of Microbiology. Résumé Q-43, page 295.

CRAWFORD, R. L. et W. W. MOHN. 1985. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 617-620.

CROSBY, D. G., BEYNON, K.I., GREVE, P.A., KORTE, F., STILL, G.G. et J.W. VONK. 1981. Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl. Chem.* 53: 1051-1080.

DALTON, D. et J. WIEGEL. 1990. "Characterization of a stable sediment-free, anaerobic enrichment culture dehalogenating 2,4-dichlorophenol to 4-chlorophenol", dans ASM: Abstract of the 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology-1990. Washington. American Society of Microbiology. Résumé Q-48, page 296.

DEWEERD, K. A. et J. M. SUFLITA. 1990. Anaerobic Aryl Reductive Dehalogenation of Halobenzoates by Cell Extracts of "*Desulfomonile tiedje*". *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10): 2999-3005.

DEWEERD, K. A., F. CONCANNON et J. M. SUFLITA. 1991. Relationship between Hydrogen Consumption, Dehalogenation, and the Reduction of Sulfur Oxyanions by *Desulfomonile tiedje*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(7): 1929-1934.

DEWEERD, K. A., J. M. SUFLITA, T. LINKFIELD, J. M. TIEDJE et P. H. PRITCHARD. 1986. The relationship between reductive dehalogenation and other aryl substituent removal reactions catalyzed by anaerobes. *FEMS Microb. Lett.* 38: 331-339.

DIETRICH, G. et J. WINTER. 1990. Anaerobic Degradation of Chlorophenol by an Enrichment Culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34(2): 253-258.

DOLFING, J. 1990. Reductive Dechlorination of 3-Chlorobenzoate Is Coupled to ATP Production and Growth in an Anaerobic Bacterium, Strain DCB-1. *Arch. Microbiol.* 153(3): 264-266.

DOLFING, J. 1992. The Energetic Consequences of Hydrogen Gradients in Methanogenic Ecosystems. *FEMS Microbiol. Eco.* 101(3): 183-187.

DOLFING, J. et B. K. HARRISON. 1992. Gibbs Free Energy of Formation of Halogenated Aromatic Compounds and Their Potential Role as Electron Acceptors in Anaerobic Environments. *Environ Sci. Technol.* 26(11): 2213-2218.

EDGEHILL, R. U. et R. K. FINN. 1983. Microbial treatment of soil to remove pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(3): 1122-1125.

FATHEPURE, B. Z. et T. M. VOGEL. 1991. Complete Degradation of Polychlorinated Hydrocarbons by a 2-Stage Biofilm Reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(12): 3418-3422.

FINGLER, S., V. DREVENKAR, B. TKALCEVIC et Z. SMIT. 1992. Levels of Polychlorinated Biphenyls, Organochlorine Pesticides, and Chlorophenols in the Kupa River Water and in Drinking Water from Different Areas in Croatia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25(6): 1055-1061.

FOX, M. et S. R. JOSHI. 1984. The fate of pentachlorophenol in Bay of Quinte, Lake Ontario (Canada USA). *J. Great Lake Res.* 10: 190-196.

GANTZER, C. J. et L. P. WACKETT. 1991. Reductive Dechlorination Catalyzed by Bacterial Transition-Metal Coenzymes. *Environ Sci. Technol.* 25(4): 715-722.

GENTHNER, B. R. S., G. T. TOWNSEND et D. DALTON. 1991. "Characterization of a 3-chlorobenzoate-degrading anaerobic coculture", dans *ASM: Abstract of the 91th Annual Meeting of the American Society for Microbiology-1991*. Washington. American Society of Microbiology. Résumé K-1, page 214.

GENTHNER, B. R. S., W. A. PRICE II et P. H. PRITCHARD. 1989. Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(6): 1466-1471.

GHOSAL, D., I. S. YOU, D. K. CHATTERJEE et A. M. CHAKRABARTY. 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science.* 228: 135-228.

GIBSON, S. A. et J. M. SUFLITA. 1986. Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 681-688.

GUIOT, S. R., A. PAUSS et J. W. COSTERTON. 1992. A Structured Model of the Anaerobic Granule Consortium. *Water Sci. Technol.* 25(7): 1-10.

GUTHRIE, M. A., E. J. KIRSCH, R. F. WUKASCH et C. P. L. GRADY JR. 1984. Pentachlorophenol biodegradation - II: anaerobic. *Water Res.* 18(4): 451-461.

HÄGGBLUM, M. 1990. Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. *J. Basic Microbiol.* 30(2): 115-141.

HÄGGBLUM, M. M. et L. Y. YOUNG. 1990. Chlorophenol Degradation Coupled to Sulfate Reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(11): 3255-3260.

HÄGGBLUM, M. M., L. J. NOHYNEK et M. S. SALKINOJA-SALONEN. 1988. Degradation and O-Methylation of Polychlorinated Phenolic Compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(12): 3043-3052.

HÄGGBLUM, M. M., M. D. RIVERA et L. Y. YOUNG. 1993. Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(4): 1162-1167.

HAIMI, J., J. SALMINEN, V. HUHTA, J. KNUUTINEN et H. PALM. 1992. Bioaccumulation of Organochlorine Compounds in Earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 24(12): 1699-1703.

HAKULINEN, R. et M. SALKINOJA-SALONEN. 1982. Treatment of Pulp and Paper Industry Wastewaters in an Anaerobic Fluidised Bed Reactor. *Process Biochem.* 17(2): 18-22.

HALE, D. D., J. E. ROGERS et J. WIEGEL. 1991. Environmental Factors Correlated to Dichlorophenol Dechlorination in Anoxic Freshwater Sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10(10): 1255-1265.

HARDMAN, D. J. 1991. Biotransformation of Halogenated Compounds. *CRC Crit. Rev. Biotech.* 11(1): 1-40.

HASAN, S., J. G. CHO, K. L. SUBLETTE, D. PAK et A. MAULE. 1992. Porphyrin-Catalyzed Degradation of Chlorinated Phenols and Nitro-Substituted Toluenes. *J. Biotechnol.* 24(2): 195-201.

HAYAT, M. A. 1974. Principles and techniques of scanning electron microscopy. New York. Van Nostrand Reinhold. 170 pages.

HENDRIKSEN, H. V. et B. K. AHRING. 1992. Metabolism and Kinetics of Pentachlorophenol Transformation in Anaerobic Granular Sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37(5): 662-666.

HENDRIKSEN, H. V., S. LARSEN et B. K. AHRING. 1991. Anaerobic Degradation of PCP and Phenol in Fixed-Film Reactors - The Influence of an Additional Substrate. *Water Sci. Technol.* 24(3-4): 431-436.

HENDRIKSEN, H. V., S. LARSEN et B. K. AHRING. 1992. Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(1): 365-370.

HOOS, R. A. W. 1978. "Patterns of pentachlorophenol usage in Canada - an overview", dans Rao, K. R.: Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology, and environmental toxicology. New York. Plenum Press. 3-11.

IDE, A., Y. NIKI, F. SAKAMOTO, I. WATANABE et H. WANTANABE. 1972. Decomposition of pentachlorophenol in paddy soil. *Agric. Biol. Chem.* 36: 1937-1944.

JACKSON, D. R. et D. L. BISSON. 1990. Mobility of polychlorinated aromatic compounds in soils contaminated with wood-preserving oil. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 40(8): 1129-1133.

JIANG, K., Y. D. CHEN et X. B. XU. 1992. Dioxins in Chinese Technical Pentachlorophenols. *Chemosphere*. 25(7-10): 1493-1497.

JONES, P. A. 1981. Chlorophenols and their impurities in the canadian environment. Ottawa. Environnement Canada. 434 pages.

JONES, P. A. 1984. Chlorophenols and their impurities in the canadian environment: 1983 supplement. Ottawa. Environnement Canada. 93 pages.

KAUFMAN, D. D. 1976. "Phenols", dans Kearney, P. C. et D.D. Kaufman: Herbicides: chemistry, degradation, and mode of actions. New York. Marcel Dekker. vol. 2: 665-707.

KENNEDY, K. J. et R. L. DROSTE. 1985. Startup of anaerobic downflow stationary fixed film (DSFF) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 27(8): 1152-1165.

KINDZIERSKI, W. B., M. R. GRAY, P. M. FEDORAK et S. E. HRUDEY. 1992. Activated Carbon and Synthetic Resins as Support Material for Methanogenic Phenol-Degrading Consortia - Comparison of Surface Characteristics and Initial Colonization. *Water Environ. Res.* 64(6): 766-775.

KITUNEN, V. H., R. J. VALO et M. S. SALKINOJA-SALONEN. 1987. Contamination of soil around wood-preserving facilities by polychlorinated aromatic compounds. *Environ Sci. Technol.* 21(1): 96-101.

KOGEVINAS, M., R. SARACCI, P. A. BERTAZZI, B. H. B. DEMESQUITA, D. COGGON, L. M. GREEN, T. KAUPPINEN, M. LITTORIN, E. LYNGE, J. D. MATHEWS, M. NEUBERGER, J. OSMAN, N. PEARCE et R. WINKELMANN. 1992. Cancer Mortality from Soft-Tissue Sarcoma and Malignant Lymphomas in an International Cohort of Workers Exposed to Chlorophenoxy Herbicides and Chlorophenols. *Chemosphere*. 25(7-10): 1071-1076.

KOHRING, G. W., X. M. ZHANG et J. WIEGEL. 1989. Anaerobic Dechlorination of 2,4-Dichlorophenol in Freshwater Sediments in the Presence of Sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(10): 2735-2737.

KOVACS, T. G., P. H. MARTEL, R. H. VOSS, P. E. WRIST et R. F. WILLES. 1993. Aquatic Toxicity Equivalency Factors for Chlorinated Phenolic Compounds Present in Pulp Mill Effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 12(2): 281-289.

KRUMME, M. L. et S. A. BOYD. 1988. Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. *Water Res.* 22(2): 171-177.

KURODA, M., M. YUZAWA, Y. SAKAKIBA et M. OKAMURA. 1988. Methanogenic bacteria adhered to solids supports. *Water Res.* 22(5): 653-656.

LAMAR, R. T. et D. M. DIETRICH. 1990. *In situ* Depletion of Pentachlorophenol from Contaminated Soil by *Phanerochaete* Spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10): 3093-3100.

LAMAR, R. T., M. J. LARSEN et T. K. KIRK. 1990. Sensitivity to and Degradation of Pentachlorophenol by *Phanerochaete* Spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(11): 3519-3526.

LAMPI, P., K. TOLONEN, T. VARTIAINEN et J. TUOMISTO. 1992. Chlorophenols in Lake Bottom Sediments - A Retrospective Study of Drinking Water Contamination. *Chemosphere*. 24(12): 1805-1824.

LARSEN, S., H. V. HENDRIKSEN et B. K. AHRING. 1991. Potential for Thermophilic (50°C) Anaerobic Dechlorination of Pentachlorophenol in Different Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 25(6): 1055-1061.

LEE, H. B., R. L. HONGYOU et P. J. A. FOWLIE. 1989. Chemical Derivatization Analysis of Phenols. Part 6. Determination of Chlorinated Phenolics in Pulp and Paper Effluents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72(6): 979-984.

LIN, J. E., H. Y. WANG et R. F. HICKEY. 1990. Degradation Kinetics of Pentachlorophenol by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Biotechnol. Bioeng.* 35(11): 1125-1134.

LIU, D. et G. PACEPAVICIUS. 1990. A Systematic Study of the Aerobic and Anaerobic Biodegradation of 18 Chlorophenols and 3 Cresols. *Tox. Assess.* 5(4): 367-387.

MACLEOD, F. A., S. R. GUIOT et J. W. COSTERTON. 1990. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6): 1598-1607.

MADSEN, T. et D. LICHT. 1992. Isolation and Characterization of an Anaerobic Chlorophenol-Transforming Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(9): 2874-2878.

MADSEN, T. et J. AAMAND. 1991. Effects of Sulfuroxy Anions on Degradation of Pentachlorophenol by a Methanogenic Enrichment Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(9): 2453-2458.

MADSEN, T. et J. AAMAND. 1992. Anaerobic Transformation and Toxicity of Trichlorophenols in a Stable Enrichment Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(2): 557-561.

MCBAIN, A., F. CUI et J. RUDDICK. 1993. "The microbiological treatment of chlorophenolic preservatives in spent utility poles" dans *Proceeding of 2e international wood preservation symposium*. Cannes-Mandelieu. 349-359.

MIDDELDORP, P. J. M., M. BRIGLIA et M. S. SALKINOJA-SALONEN. 1990. Biodegradation of Pentachlorophenol in Natural Soil by Inoculated *Rhodococcus Chlorophenolicus*. *Microb. Eco.* 20(2): 123-139.

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

MIKESELL, M. D. et S. A. BOYD. 1986. Complete Reductive Dechlorination and Mineralization of Pentachlorophenol by Anaerobic Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(4): 861-865.

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

MILESKI, G. J., J. A. BUMPUS, M. A. JUREK et S. D. AUST. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(12): 2885-2889.

MOHN, W. W. et J. M. TIEDJE. 1990. Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. *Arch. Microbiol.* 153: 267-271.

MOHN, W. W. et J. M. TIEDJE. 1991. Evidence of chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedje*. *Arch. Microbiol.* 157: 1-6.

MOHN, W. W. et J. M. TIEDJE. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microb. Rev.* 56(3): 482-507.

MOHN, W. W. et K. J. KENNEDY. 1992a. Limited Degradation of Chlorophenols by Anaerobic Sludge Granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7): 2131-2136.

MOHN, W. W. et K. J. KENNEDY. 1992b. Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedje* DCB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(4): 1367-1370.

MUELLER, J. G., S. E. LANTZ, B. O. BLATTMANN et P. J. CHAPMAN. 1991a. Bench-scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol- and creosote-contaminated materials: slurry-phase bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 25(6): 1055-1061.

MUELLER, J. G., S. E. LANTZ, B. O. BLATTMANN et P. J. CHAPMAN. 1991b. Bench-scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol- and creosote-contaminated materials: solid-phase bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 25(6): 1045-1055.

MURTHY, N. B. K., D. D. KAUFMAN et G. F. FRIES. 1979. Degradation of pentachlorophenol (PCP) in aerobic and anaerobic soil. *J. Environ. Sc. Health.* B14: 1-14.

NEILSON, A. H. 1990. The biodegradation of halogenated organic compounds. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 445-470.

NICHOLSON, D. K., S. L. WOODS, J. D. ISTOK et D. C. PEEK. 1992. Reductive Dechlorination of Chlorophenols by a Pentachlorophenol-Acclimated Methanogenic Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7): 2280-2286.

ÖBERG, L. G. et C. RAPPE. 1992. Biochemical Formation of PCDD/Fs from Chlorophenols. *Chemosphere.* 25(1-2): 49-52.

OMS. 1987. Environmental health criteria 71: Pentachlorophenol. Genève. Organisation mondiale de la santé. 236 pages.

PAASIVIRTA, J., K. HEINOLA, T. HUMPPI, A. KARJALAINEN, J. KNUUTINEN, K. MANTYKOSKI, R. PAUKKU, T. PIILOLA, K. SURMAAHO, J. TARHANEN, L. WELLIN et H. VIHONEN. 1985. Polychlorinated phenols, guaiacols and cathecols in environment. *Chemosphere.* 14(5): 469-491.

- PATEL, G. B. et G. D. SPROTT. 1990. *Methanosaeta concilii* gen. nov. sp. nov. ("Methanotrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 79-82.
- PATEL, G. B., B. J. AGNEW et C. J. DICAIRE. 1991. Inhibition of Pure Cultures of Methanogens by Benzene Ring Compounds. Appl. Environ. Microbiol. 57(10): 2969-2974.
- PAUSS, A., G. ANDRE, M. PERRIER et S. R. GUIOT. 1990. Liquid-to-gas mass transfert in anaerobic processes: inevitable transfert limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. Appl. Environ. Microbiol. 56(6): 1636-1644.
- PIERCE, R. H. et D. M. VICTOR. 1978. "The fate of pentachlorophenol in a aquatic ecosystem", dans Rao, K. R.: Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology, and environmental toxicology. New York. Plenum Press. 41-52.
- RADEHAUS, P. M. et S. K. SCHMIDT. 1992. Characterization of a Novel *Pseudomonas* Sp That Mineralizes High Concentrations of Pentachlorophenol. Appl. Environ. Microb. 58(9): 2879-2885.
- RAO, K. R. 1978. Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology, and environmental toxicology. New York. Plenum Press. 402 pages.
- REINEKE, W. et H. -J. KNACKMUSS. 1988. Microbial degradation of haloaromatics. Ann. Rev. Microbiol.. 42: 263-287.
- ROY-ARCAND, L. et F. S. ARCHIBALD. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. Enzyme Microb. Technol. 13: 194-203.
- RUCKDESCHEL, G., G. RENNER et K. SCHWARZ. 1987. Effects of Pentachlorophenol and Some of Its Known and Possible Metabolites on Different Species of Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53(11): 2689-2692.
- SABER, D. L. et R. L. CRAWFORD. 1985. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1512-1518.
- SAHASRABUDHE, S. R. et V. V. MODI. 1987. Microbial degradation of chlorinated aromatic compounds. Microbiol. Sc.. 4(10): 300-303.
- SALKINOJA-SALONEN, M. S., R. VALO, J. APAJALAHTI, R. HAKULINEN, L. SILAKOSKI et T. JAAKKOLA. 1984. "Biodegradation of Chlorophenolic Compounds in Wastes from Wood-Processing Industry", dans Klug, M. J. et C.A. Reddy: Current Perspective in Microbial Ecology. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 668-676.
- SAMSON, R., S. GUIOT et D. MORISSETTE. 1991. "Nouveaux potentiels de la digestion anaérobie dans le milieu industriel", dans AQTE: Compte rendu — 14e Symposium international sur le traitement des eaux usées. Montréal. Association québécoise des techniques de l'eau. 25-30.

SEECH, A. G., J. T. TREVORS et T. L. BULMAN. 1991. Biodegradation of pentachlorophenol in soil: the response to physical, chemical, and biological treatments. *J. Can. Microbiol.* 37: 440-444.

SEIGLE-MURANDI, F., R. STEIMAN et J. L. BENOIT-GUYOD. 1991. Biodegradation Potential of Some Micromycetes for Pentachlorophenol. *Ecotox. Environ. Saf.* 21(3): 290-300.

SHELTON, D. R. et J. M. TIEDJE. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 840-848.

SIERRA-ALVAREZ, R. et G. LETTINGA. 1991. The Effect of Aromatic Structure on the Inhibition of Acetoclastic Methanogenesis in Granular Sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34(4): 544-550.

STANLAKE, G. J. et R. K. FINN. 1982. Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1421-1427.

STINSON, M. K., H. S. SKOVRONEK et W. D. ELLIS. 1992. EPA site demonstration of the BioTrol soil washing process. *Journal Air Waste Manage. Assoc.* 42(1): 96-103.

SUFLITA, J. M., A. HOROWITZ, D. R. SHELTON et J. M. TIEDJE. 1982. Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science.* 218: 1115-1117.

SUFLITA, J. M., J. A. ROBINSON et J. M. TIEDJE. 1983. Kinetics of microbial dehalogenation of haloaromatic substrates in methanogenic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1466-1473.

THIELE, J. H. et G. ZEIKUS. 1988. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(1): 20-29.

US EPA. 1979. "Pentachlorophenol", dans US EPA: Water-Related environmental fate of 129 priority pollutants. Vol. II. Washington, D.C. US Environmental Protection Agency. 87.1-87.13.

VAN DER MEER, J. R., W. DE VOS, S. HARAYAMA et A. J. B. ZEHNDER. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56(4): 677-694.

VENKATADRI, R., S. P. TSAI, N. VUKANIC et L. B. HEIN. 1992. Use of a Biofilm Membrane Reactor for the Production of Lignin Peroxidase and Treatment of Pentachlorophenol by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Hazard. Waste Hazard. Mat.* 9(3): 231-243.

VERRIER, D., B. MORTIER et G. AIBAGNAC. 1987. Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnol. Lett.* 9(10): 735-740.

WOLIN, E. A., M. J. WOLIN et R. S. WOLFE. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238: 2882-2886.

WU, W. M., L. BHATNAGAR et J. G. ZEIKUS. 1993. Performance of Anaerobic Granules for Degradation of Pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(2): 389-397.

YE, D., J. F. QUENSEN III, J. M. TIEDJE et S. A. BOYD. 1992. Anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls (Aroclor 1242) by pasteurized and ethanol-treated microorganisms from sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(4): 1110-1114.

YU, J. et K. L. PINDER. 1992. Build-Up of Symbiotic Methanogenic Biofilms on Solid Supports. *Biotechnol. Lett.* 14(10): 989-994.

ZHANG, X. M. et J. WIEGEL. 1990. Isolation and Partial Characterization of a *Clostridium* Species Transforming *Para*-Hydroxybenzoate and 3,4-Dihydroxybenzoate and Producing Phenols As the Final Transformation Products. *Microb. Eco.* 20(2): 103-121.

ZHANG, X. M., T. V. MORGAN et J. WIEGEL. 1990. Conversion of C-13-1-Phenol to C-13-4-Benzoate, an Intermediate Step in the Anaerobic Degradation of Chlorophenols. *FEMS Microb. Lett.* 67(1-2): 63-66.

ZINDER, S. H. 1984. Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. *ASM News.* 50(7): 294-298.

ZITOMER, D. H. et R. E. SPEECE. 1993. Sequential Environments for Enhanced Biotransformation of Aqueous Contaminants. *Environ Sci. Technol.* 27(2): 226-244.