



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

ANNIC CHAREST

**DÉGRADATION DES COMPOSÉS PHÉNOLÉS EN
CONDITIONS MÉTHANOGENÈS DANS UN EFFLUENT
PÉTROCHIMIQUE**

DÉCEMBRE 1993

TABLES DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
SOMMAIRE	viii
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.	COMPOSÉS AROMATIQUES ET L'ENVIRONNEMENT	6
2.	INDUSTRIES PÉTROCHIMIQUES	7
3.	TRAITEMENT DES EFFLUENTS PÉTROCHIMIQUES	9
3.1	Traitement primaire (physico-chimique)	12
3.2	Traitement secondaire (biologique) . .	15
3.2.1	Procédés aérobies	15
3.2.1.1	Langunes	18
3.2.1.2	Films fixes	18
3.2.1.3	Boues activées	19
3.2.2	Procédés anaérobies	21
3.2.2.1	Réacteurs à boues granulaires (UASB) .	22
3.2.2.2	Réacteurs hybrides	25
3.2.2.3	Lagunes anaérobies	25
3.2.2.4	Réacteurs à film fixe	25
3.3	Traitement tertiaire	29
4.	COMPARAISON DES PROCÉDÉS ANAÉROBIES ET AÉROBIES	30
5.	DÉGRADATION ANAÉROBIE DE COMPOSÉS AROMATIQUES	31
6.	DÉGRADATION DU PHÉNOL PAR FERMENTATION MÉTHANOGENÈ	36
MATÉRIEL ET MÉTHODES	43
1.	MICROORGANISMES	44
2.	MAINTIEN DES MICROORGANISMES	44
2.1	Milieux de culture	44
2.2	Culture	45

TABLES DES MATIÈRES (suite)

3.	ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	46
3.1	Extraction	46
3.2	Dosage	46
3.3	Présence de méthane	47
3.4	Spectrométrie de masse (CG/SM)	48
4.	L'EFFLUENT PÉTROCHIMIQUE SPÉCIFIQUE	48
4.1	Choix de l'effluent spécifique	48
4.2	Conservation de l'effluent	49
4.3	Lot de référence	50
4.4	Autre effluent	50
5.	CARACTÉRISATION DE L'EFFLUENT DE RÉFÉRENCE	51
5.1	Analyses physico-chimiques	51
5.1.1	pH	51
5.1.2	Solides totaux (ST) et solides volatils totaux (SVT)	52
5.1.3	Solides en suspension (SS) et solides volatils en suspension (SVS)	52
5.1.4	Solides dissous (SD) et solides volatils dissous (SVD)	53
5.2	Analyses des constituants organiques	53
5.2.1	Composés phénolés	53
5.2.2	Demande chimique en oxygène (DCO)	54
5.2.3	Huiles et graisses	55
5.2.4	Carbone organique total	55
5.3	Analyses des constituants inorganiques	56
5.3.1	Azote total Kjeldahl	56
5.3.2	Azote ammoniacal	56
5.3.3	Phosphore total	57
5.3.4	Sulfures totaux	57
5.4	Analyses microbiologiques	58
5.4.1	Milieu liquide	58
5.4.2	Milieu solide	59
5.5	Analyse de la toxicité	59
6.	TRAITEMENT ANAÉROBIE DE L'EFFLUENT	60
6.1	Adaptation du consortium	60
6.1.1	Milieus de culture	60
6.1.2	Culture	61

TABLES DES MATIÈRES (suite)

6.2	Effet de la composition du milieu de culture	61
6.3	Réacteur anaérobie à film fixe	62
6.3.1	Démarrage	62
6.3.2	Étude de la performance du réacteur	66
6.3.3	Microscope électronique à transmission	67
RÉSULTATS	69
1.	EFFLUENT PÉTROCHIMIQUE	70
1.1	Choix de l'effluent	70
1.2	Conservation	70
1.3	Lot de référence	72
2.	CARACTÉRISATION	72
3.	TRAITEMENT ANAÉROBIE DE L'EFFLUENT	79
3.1	Adaptation du consortium	79
3.2	Effet de la composition du milieu de culture	82
3.3	Réacteur anaérobie à film fixe	87
3.3.1	Étude de la performance	96
3.3.2	Autre effluent	100
3.3.3	Microscopie électronique à transmission	105
DISCUSSION	110
1.	EFFLUENT PÉTROCHIMIQUE	111
2.	CARACTÉRISATION	112
3.	TRAITEMENT ANAÉROBIE DE L'EFFLUENT	118
CONCLUSION	129
REMERCIEMENTS	132
BIBLIOGRAPHIE	135

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Dégradation par le consortium du phénol contenu dans deux effluents spécifiques différents	71
Tableau 2:	Évaluation de certains paramètres avant la congélation et après la décongélation d'un effluent spécifique	73
Tableau 3:	Dégradation du phénol dans un effluent avant la congélation et après la décongélation	74
Tableau 4:	Dégradation du phénol par le consortium dans l'effluent de référence	75
Tableau 5:	Caractérisation de l'effluent de référence	77
Tableau 6:	Performance du réacteur anaérobie	99
Tableau 7:	Caractérisation du deuxième effluent	101

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Représentation typique d'une raffinerie avec les différentes unités de production	10
Figure 2:	Les différentes étapes du traitement d'un effluent pétrochimique	13
Figure 3:	Illustration des différents procédés de traitement aérobie	16
Figure 4:	Illustration des différents procédés de traitement anaérobie	23
Figure 5:	Les différentes étapes et les groupes de microorganismes impliqués dans la dégradation anaérobie des polymères en méthane (Zinder, 1984)	33
Figure 6:	Voies possibles de dégradation du phénol par fermentation méthanique, d'après Kobayashi <u>et al.</u> (1988)	38
Figure 7:	Schéma d'un réacteur anaérobie	63
Figure 8:	Dégradation du phénol A) et dosage de l'acide benzoïque B) dans les cultures contenant différentes concentrations d'effluent	80
Figure 9:	Transformation du phénol dans différentes sous-cultures	83
Figure 10:	Transformation du phénol dans différentes cultures avec des milieux de composition variée	85
Figure 11:	Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté avec le milieu de cultures contenant 150 mg/L de phénol	88
Figure 12:	Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté en continu avec l'effluent du lot de référence contenant 156 mg/L de phénol	92

LISTE DES FIGURES (suite)

Figure 13:	Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté en continu avec l'effluent du lot de référence (contenant 156 mg/L de phénol) auquel le Na ₂ S n'a pas été ajouté	94
Figure 14:	Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté en continu avec l'effluent du lot de référence (contenant 156 mg/L de phénol) auquel le protéose peptone n'a pas été ajouté	97
Figure 15:	Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté en continu avec le 2 ^e effluent pétrochimique (contenant 367 mg/L de phénol) prélevé avant le dessaleur	102
Figure 16:	Micrographie électronique du biofilm resuspendu présent sur les pierres du réacteur alimenté avec l'effluent pétrochimique observé dans un champ A) et un autre champ B)	106
Figure 17:	Micrographie électronique montrant quelques-uns des microorganismes du biofilm observé dans un champ A) et un autre champ B)	108

SOMMAIRE

La caractérisation de l'effluent pétrochimique spécifique constituant le lot de référence a révélé qu'il contenait des concentrations supérieures aux normes du Ministère de l'Environnement du Québec pour certains paramètres dont les composés phénolés. Un traitement anaérobie pour réduire la concentration des composés phénolés présents dans l'effluent a été étudié en laboratoire.

Un consortium de bactéries anaérobies capable de transformer certains composés phénolés a été adapté progressivement à l'effluent par repiquages successifs dans des cultures en bouteilles sérologiques (en cuvée). Il a été démontré que l'addition de protéose peptone à l'effluent de référence est essentielle pour obtenir la transformation du phénol. Un réacteur anaérobie (continu) à film fixe et à écoulement ascendant a été développé. Après un temps de résidence hydraulique (TRH) de 6 heures pour l'effluent de référence, 98 % du phénol et 79 % du o-crésol ont été éliminés. De plus, la toxicité de cet effluent a été diminuée de moitié mais certains contaminants légiférés n'ont pas été affectés par le biofilm. Le réacteur anaérobie a aussi été alimenté avec un effluent spécifique différent du lot de référence contenant une concentration supérieure de composés phénolés et 99 % du phénol a été transformé pour un temps de résidence hydraulique (TRH) de

7,8 heures. L'observation au microscope électronique à transmission des suspensions de microorganismes obtenues du biofilm a démontré que le consortium de bactéries anaérobies n'a pas été modifié par la présence de l'effluent pétrochimique.

Ces résultats démontrent que le consortium de bactéries anaérobies peut être utilisé efficacement pour traiter des effluents pétrochimiques fortement concentrés en phénol.

INTRODUCTION

Les industries pétrochimiques rejettent quotidiennement des quantités considérables d'effluent dans l'environnement. Des normes spécifiques sont appliquées afin de s'assurer que les rejets dans l'environnement soient le moins dommageables possible (Anonyme, 1983). Avec les années, ces normes deviennent de plus en plus sévères et, pour les respecter, différents traitements des eaux usées doivent être utilisés dans les raffineries afin d'éliminer les contaminants légiférés présents dans l'effluent global. Actuellement, le traitement secondaire (biologique) le plus efficace est le procédé de boues activées. Toutefois certaines raffineries ne possèdent pas un tel procédé de traitement et le remplacement de leur procédé par celui des boues activées serait très dispendieux.

Un procédé anaérobie serait une alternative intéressante pour le traitement des effluents pétrochimiques car il est reconnu dans la littérature que ce type de procédé, entre autres avantages, est moins coûteux qu'un procédé aérobie en termes de coûts d'investissement et de fonctionnement (Samson, 1991; Wang et al., 1986; Eckenfelder et al., 1985; Fedorak et Hrudehy, 1984). Pour ces raisons, à l'aide d'un consortium capable de dégrader certains composés phénolés en conditions méthanogènes et dont la composition microbienne est connue, un traitement anaérobie d'un effluent pétrochimique spécifique fortement concentré en composés phénolés a été

élaboré en laboratoire. Certains traitements d'effluents pétrochimiques ont déjà été effectués en utilisant des boues activées non définies (Parker et Farquhar, 1989; Vogel et Winter, 1988; Britz et al., 1983).

Dans ce travail, nous avons d'abord effectué la caractérisation de l'effluent pétrochimique de référence et ensuite le consortium de bactéries anaérobies a été adapté graduellement à cet effluent par repiquages successifs dans des cultures en bouteilles sérologiques (en cuvée). De plus, l'effet de la composition du milieu de culture, en présence de l'effluent, a été évalué. Un réacteur anaérobie à film fixe et à écoulement ascendant (continu) a ensuite été développé en laboratoire. Le temps de rétention hydraulique minimal pour une réduction importante du phénol a été déterminé. L'efficacité du biofilm à éliminer les autres contaminants légiférés a aussi été évaluée. Un effluent pétrochimique spécifique, différent du lot de référence, et contenant une concentration plus élevée en composés phénolés a été prélevé et traité dans le réacteur afin de démontrer l'efficacité du biofilm. Finalement, les microorganismes du biofilm mis en suspension ont été observés au microscope électronique à transmission.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'un consortium défini a été utilisé pour développer en laboratoire un procédé anaérobie utilisant un réacteur à film fixe pour le traitement d'un effluent pétrochimique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. COMPOSÉS AROMATIQUES ET L'ENVIRONNEMENT

L'activité industrielle génère une quantité importante de composés aromatiques dans l'environnement. Certains de ces composés sont reconnus comme étant récalcitrants et toxiques. Les composés phénoliques en sont un exemple et plusieurs sont désignés comme polluants prioritaires par "l'U.S. Environmental Protection Agency". Il a été démontré que le 2,4,6-trichlorophénol est carcinogène chez l'animal et il est probable que le p-chlorophénol est carcinogène selon des tests de mutagénicité (Anonyme, 1979). Lorsque la concentration des composés phénolés excède 2 mg/L, leur présence est toxique pour les poissons (Lanouette, 1977). Les composés phénolés d'origine naturelle, dont le phénol, sont retrouvés à une concentration inférieure à 1 mg/L dans l'environnement, alors que certaines activités humaines en génèrent des concentrations de 10 à plus de 10 000 mg/L (Jeannin, 1986; Neufeld et al., 1980). Les industries qui rejettent dans l'environnement des effluents fortement chargés en composés phénolés sont les usines de transformation du charbon, les usines de plastiques et résines, les industries de produits chimiques et les raffineries de pétrole (Goronszy et al., 1992; Vogel et Winter, 1988; Fedorak et Hrudey, 1986; Wang et al., 1986; Suidan et al., 1981; Lanouette, 1977).

2. INDUSTRIES PÉTROCHIMIQUES

Depuis les dernières années, les normes sur certains contaminants présents dans les effluents pétrochimiques deviennent de plus en plus sévères. Les contaminants légiférés par le Ministère de l'Environnement du Québec sont les solides en suspension, les composés phénolés, les sulfures, l'azote ammoniacal, les huiles et graisses, le phosphore total et le pH (Anonyme, 1983). La quantité moyenne mensuelle permise est exprimée en kg de contaminants par 1 000 barils de pétrole brut traité par la raffinerie. Pour fins de comparaison, les limites permises de chaque contaminant ont été converties en parties par million (ppm), en considérant le nombre de barils traités par jour et le débit des eaux usées à la raffinerie. Entre autres, la limite permise pour les composés phénolés sera bientôt abaissée. Présentement la norme est de 2 ppm et celle-ci sera renforcée d'un facteur de 13, soit 0,15 ppm. Il est prévu que la nouvelle norme entre en vigueur à l'automne 1995, mais deux ans seront alloués aux industries, retardant ainsi l'application de la nouvelle norme jusqu'à l'automne 1997. Par contre, une norme de transition de 1 ppm devrait être respectée d'ici la fin de l'année (M. Guillemette, communication personnelle). Pour faire face à cette situation, les industries doivent investir et modifier leur système de traitement.

Actuellement, parmi les procédés utilisés à l'échelle industrielle, seul le système de boues activées est assez performant pour rencontrer les normes futures (Dold, 1989) mais celui-ci est très dispendieux. Les raffineries ne possédant pas un traitement basé sur les boues activées, devront modifier la technologie en place ou la remplacer par un procédé utilisant des boues activées. Étant donné l'actuel contexte économique difficile pour l'industrie pétrolière, dû non seulement à la récession mais également à la mondialisation des marchés et à l'augmentation de la compétition, un tel investissement pour remplacer le traitement des effluents est problématique.

On retrouve dans la littérature trois types d'intervention possibles afin d'améliorer le traitement des effluents déjà en place (Eckenfelder et al., 1985). Premièrement, un traitement tertiaire (physico-chimique) peut être ajouté après le traitement biologique et avant le rejet de l'effluent dans l'environnement afin d'éliminer les constituants hors normes encore présents. Comme il s'agit d'un traitement spécifique sur un large volume (effluent global), les coûts associés à cette intervention sont considérables, ce qui en fait une option peu intéressante.

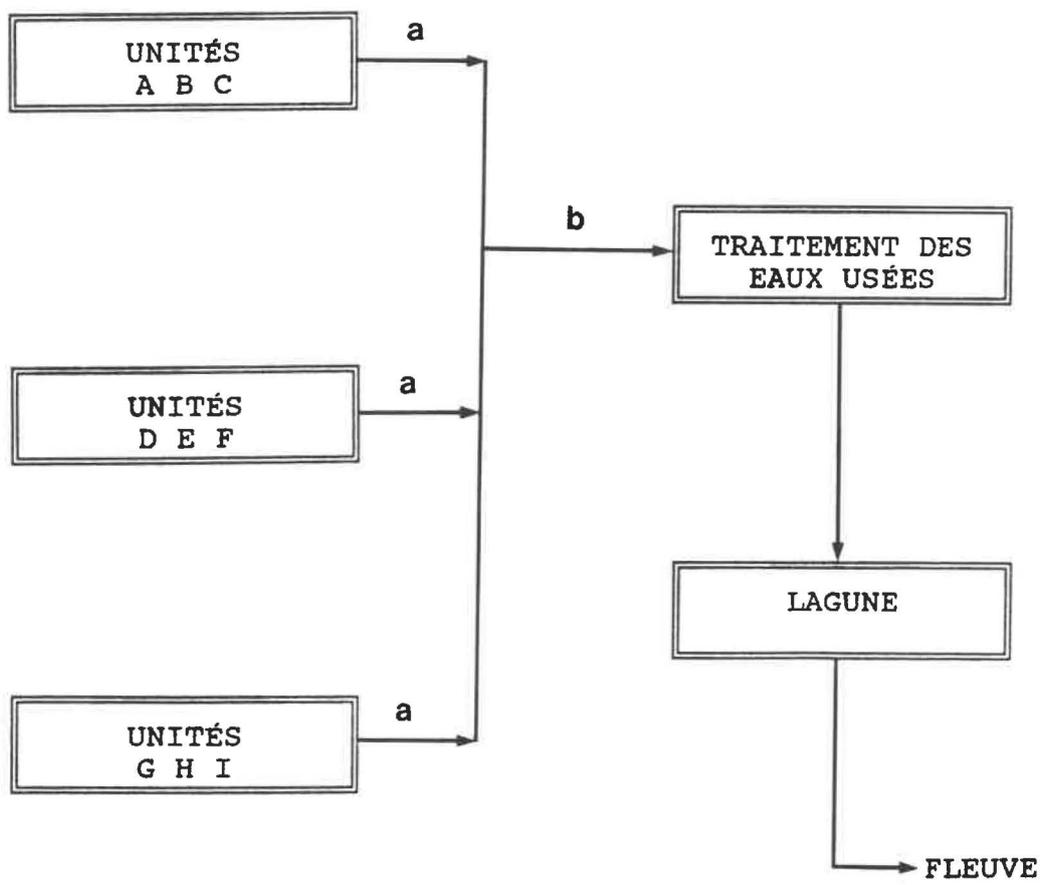
Deuxièmement, il s'agit du développement technologique qui pourrait améliorer les systèmes déjà existants.

La troisième solution est de traiter le problème à la source, c'est-à-dire intervenir au niveau des effluents spécifiques de plus faible volume et plus concentrés en polluants, au lieu d'intervenir au niveau de l'effluent global à l'unité de traitement des eaux usées (Figure 1). Les effluents spécifiques sont les différents effluents générés aux différentes unités de production qui sont impliquées dans chaque étape du raffinage du brut. Ces effluents seront combinés en un effluent global et c'est ce dernier qui sera acheminé à l'unité de traitement des eaux usées. Eckenfelder et al. (1985) ont mentionné que ce type d'intervention est généralement moins dispendieux que les coûts engendrés par l'élimination d'un polluant spécifique au niveau de l'effluent global. Par exemple, les composés phénolés sont surtout générés lors de la distillation du brut et du craquage des molécules lourdes (Dold, 1989); donc, au niveau de ces unités de production, l'effluent est fortement concentré en ces composés. Cet effluent spécifique pourrait être traité immédiatement après sa production par un système en continu (Goldman et Bowen, 1992; Eckenfelder et al., 1985).

3. TRAITEMENT DES EFFLUENTS PÉTROCHIMIQUES

Le traitement des effluents pétrochimiques est très complexe et variable d'une raffinerie à l'autre. Le système de traitement dépend de la composition, de la concentration et du

Figure 1 : Représentation typique d'une raffinerie avec les différentes unités de production.
a: effluents spécifiques
b: effluent global



débit de l'effluent à traiter (Eckenfelder et al., 1985). Même si on retrouve une variation au niveau des procédés employés, ceux-ci peuvent être regroupés en trois étapes principales.

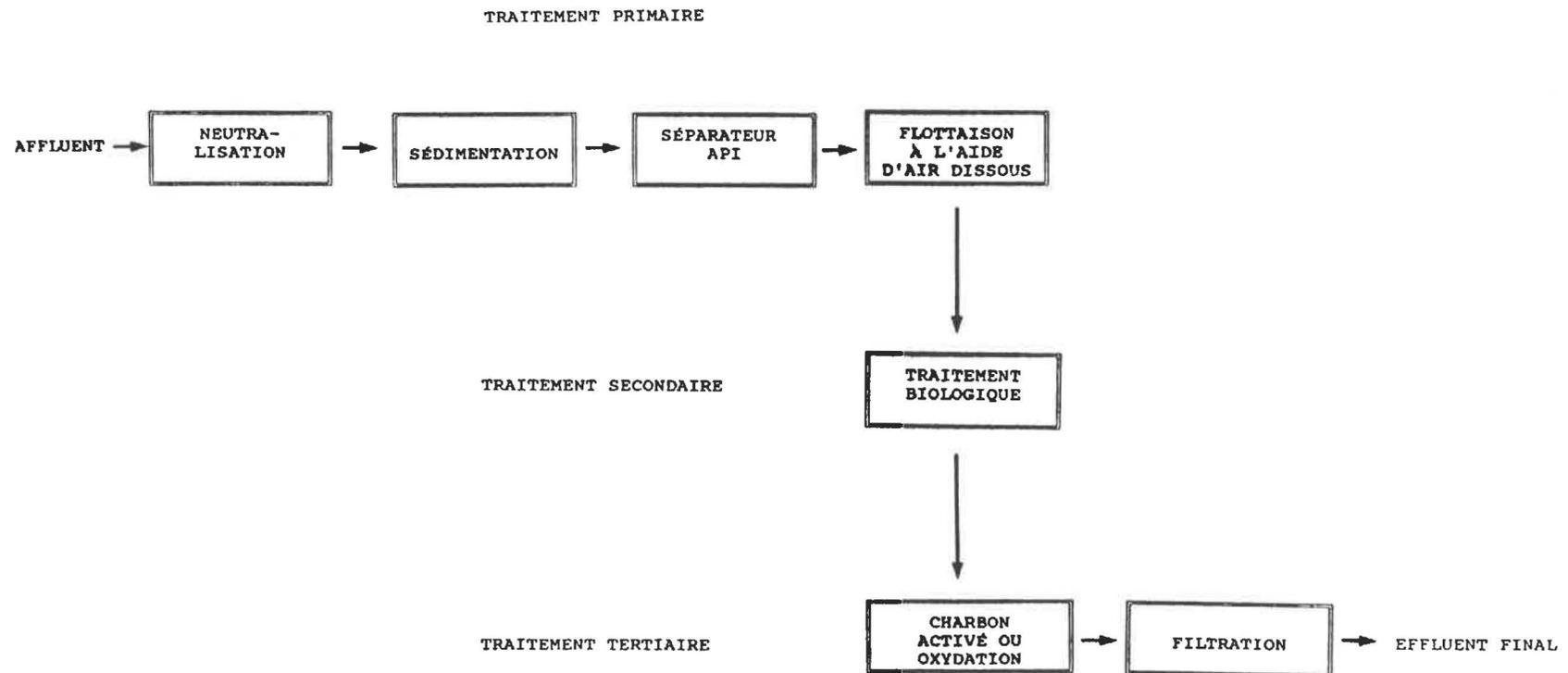
Ces étapes, soit les traitements primaire, secondaire et tertiaire sont présentées à la Figure 2 (Dold, 1989). Au Canada, en général seulement les traitements primaires et secondaires sont utilisés à l'échelle industrielle (Dold, 1989).

3.1 Traitement primaire (physico-chimique)

Les différentes étapes du traitement primaire peuvent être regroupées en quatre types. Le pH de l'effluent sera ajusté par neutralisation, les solides en suspension seront éliminés par sédimentation, la majorité des huiles et graisses seront retirées à l'aide d'un séparateur API (American Petroleum Institut) et les huiles et graisses encore présentes dans l'effluent seront éliminées lors de la flottaison à l'aide d'air dissous (Goldman et Bowen, 1992; Anonyme, 1990; Dold, 1989; Eckenfelder et al. 1985).

Ces différents prétraitements physico-chimiques sont importants puisqu'ils préparent l'effluent pour le traitement secondaire (biologique). Eckenfelder et al. (1985) ont

Figure 2 : Les différentes étapes du traitement d'un effluent pétrochimique.



déterminé que l'effluent qui sera acheminé vers le traitement biologique doit respecter certains critères comme: pH variant entre 6 et 9, moins de 125 mg/L de solides en suspension, moins de 15 mg/L d'huiles et graisses, moins de 50 mg/L de sulfures et moins de 1 mg/L de certains métaux lourds.

3.2 Traitement secondaire (biologique)

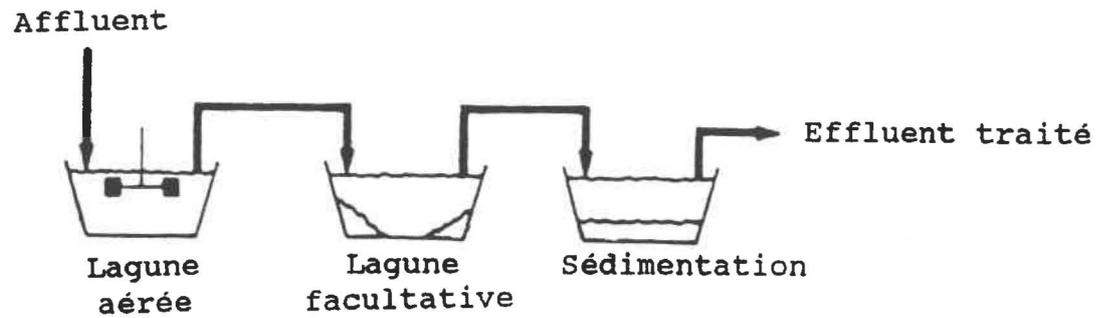
Le traitement secondaire est utilisé pour réduire la concentration des composés organiques solubles présents dans l'effluent à traiter. Il existe deux catégories de procédés, soit les procédés aérobies et les procédés anaérobies. Les procédés aérobies sont beaucoup plus utilisés à l'échelle industrielle que les procédés anaérobies (Anonyme, 1990; Ballerini et al., 1986).

3.2.1 Procédés aérobies

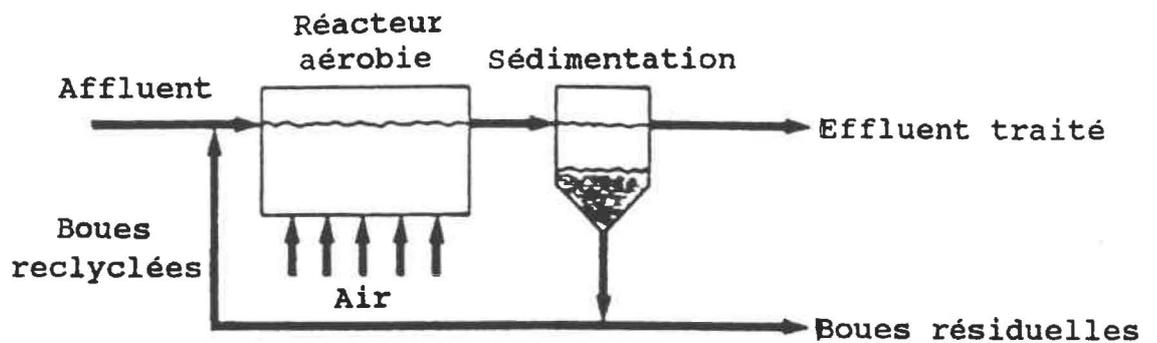
Dans un procédé aérobie, la matière organique est minéralisée en CO₂ et H₂O en présence d'oxygène (Dold, 1989). Plusieurs procédés aérobies ont été mis au point au cours des dernières années tels que les lagunes aérées, les films fixes et les boues activées (Goronszy et al., 1992; Ballerini et al., 1986). Ces différents procédés aérobies sont présentés à la Figure 3.

Figure 3 : Illustration des différents procédés de traitement aérobie.

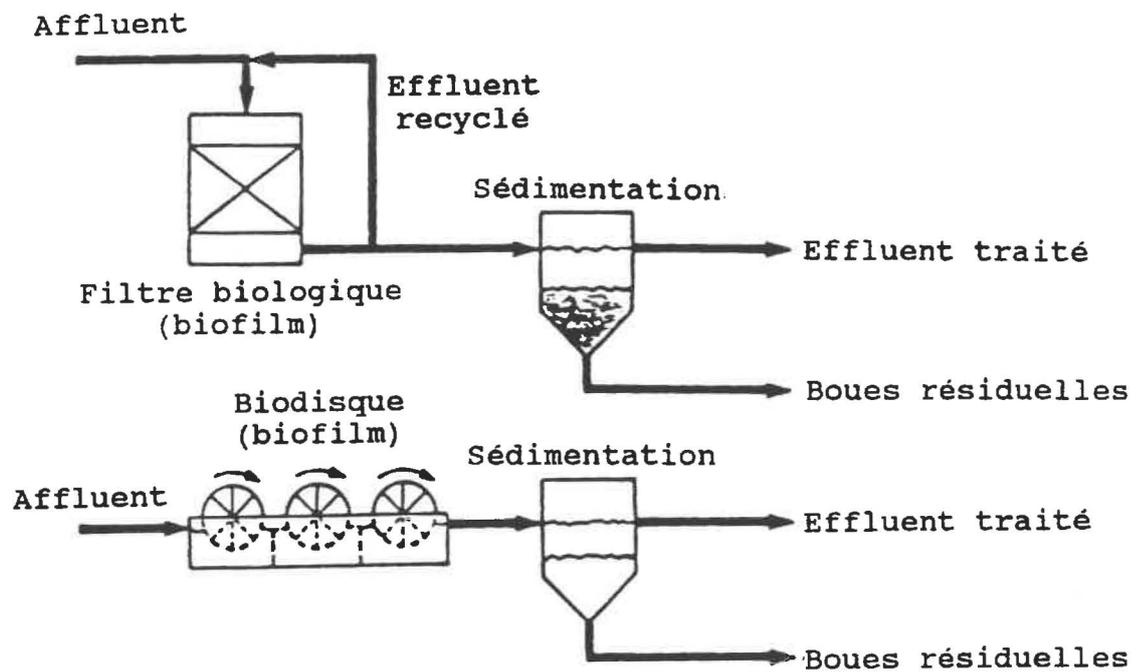
A: LAGUNE AÉROBIE



B: BOUES ACTIVÉES



C: FILMS FIXES



3.2.1.1 Lagunes

Les lagunes aérées représentent un des traitements les moins dispendieux, tout en étant assez efficace. Par contre, celles-ci sont rarement utilisées en pétrochimie puisqu'elles exigent de grands espaces de terrain et que pendant l'hiver le système est moins performant (Eckenfelder et al., 1985). Le procédé consiste en un bassin aéré, soit par insufflation d'air en surface ou en profondeur, soit par agitation mécanique. Les seuls microorganismes présents sont ceux retrouvés de façon naturelle dans l'effluent (Ballerini et al., 1986; Eckenfelder et al., 1985).

3.2.1.2. Films fixes

Les films fixes sont en général beaucoup plus utilisés comme traitement que les lagunes aérées. On retrouve deux types différents; soit des réacteurs à l'intérieur desquels les microorganismes sont fixés sur un support inerte et l'effluent s'infiltré à travers ce dernier ("trickling filter") ou, comme dans le second cas, les microorganismes sont fixés sur des disques qui sont à demi submergés dans l'effluent, et ces disques effectuent des rotations ("rotating biological contactor") (Tyagi et al., 1993; Ballerini et al.; Eckenfelder et al., 1985)

3.2.1.3 Boues activées

Le traitement biologique le plus efficace mais aussi le plus dispendieux pour les effluents pétrochimiques est le système de boues activées (Dold, 1989; Lanouette, 1977). Le procédé consiste en un bassin aéré qui contient une forte concentration de microorganismes en suspension et dans lequel circule l'effluent. A la sortie du bassin, les agglomérats de microorganismes doivent être séparés et récupérés de la phase liquide (Dold, 1989). Un rendement d'environ 95 % de réduction de la matière organique est obtenu avec les boues activées lors du traitement des effluents pétrochimiques (Dold, 1989).

Eckenfelder et al. (1985) ont précisé davantage les composés dégradés par le procédé des boues activées. Certains polluants sont dégradés à 95 % comme le nitrobenzène, le 2,4-dichlorobenzène, le 2,4-dinitrobenzène, le benzidine, l'acroléine, l'acrylonitrile, le phénol, le pentachlorophénol, le phénanthrène et le naphthalène. Même si ce procédé est très efficace, certains problèmes, autres que son coût élevé, existent, comme par exemple la volatilisation de la matière organique, la biosorption, la bioaccumulation et la précipitation des métaux lourds (Dold, 1989).

Dans un effluent pétrochimique, certains composés organiques toxiques sont assez volatils tels le benzène, le

toluène, le xylène et l'éthylbenzène. L'agitation et l'aération contribuent à la volatilisation de ces produits et ceux-ci alors s'échappent de la phase liquide pour se retrouver dans l'atmosphère. L'émission de ces composés dans l'atmosphère est néfaste et doit être contrôlée (Dold, 1989).

Un autre problème est la biosorption c'est-à-dire que les matières organiques et inorganiques présentes dans l'effluent peuvent s'adsorber sur les microorganismes (Dold, 1989). La majorité des huiles et graisses présentes dans un effluent pétrochimique seront éliminées au niveau du traitement primaire mais en général il en reste, et leur présence crée des problèmes au niveau du traitement secondaire. Ces huiles et graisses ont tendance à s'adsorber sur les agglomérats de microorganismes et ainsi diminuer la performance du système (Dold, 1989; Rebhun et Galil, 1987; Tabakian et al., 1978).

Les métaux lourds présents dans un effluent peuvent bioaccumuler ou précipiter dans le système de boues activées. Lorsque les microorganismes sont continuellement exposés à un excès de métaux lourds, ils les accumulent. Ce problème de bioaccumulation affecte le rendement du procédé et les boues résiduelles devront être traitées afin d'éliminer les métaux lourds présents (Dold, 1989). De plus, les effluents pétrochimiques contiennent de fortes concentrations de sulfures. Ces sulfures de métaux lourds sont relativement insolubles, donc

peuvent précipiter dans le système de boues activées. Ces boues résiduelles devront également être traitées et mises au rebut (Dold, 1989).

Certains problèmes ont été rapportés dans la littérature concernant l'effet des composés aromatiques sur les boues activées. Une étude de six mois effectuée dans les raffineries de l'Ontario a démontré que l'effluent global après traitement contenait environ 0,44 parties par milliard (ppb) de phénol, 0,66 ppb de benzène, 0,59 ppb de toluène, 1,35 ppb de o-xylène et 0,78 ppb de m- et p-xylène (Dold, 1989). Dans différentes raffineries, des problèmes d'opération du système de boues activées dus à l'inhibition de l'activité bactérienne ont été rapportés. Cette inhibition a été attribuée au phénol et à ses dérivés (Dold, 1989).

Rebhun et Galil (1987) ont démontré qu'un procédé de boues activées était stable et efficace pour le traitement d'un effluent contenant environ 100 mg/L de composés phénolés. Cette concentration a été subitement augmentée, à cause d'un problème au niveau du raffinage du brut, et le traitement par le procédé de boues activées s'est fait plus difficilement (Dold, 1989).

3.2.2 Procédés anaérobies

La dégradation anaérobie de divers rejets industriels

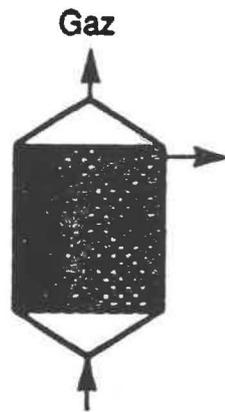
ou municipaux a reçu une attention particulière ces dernières années (Anonyme, 1990; Cecchi et al., 1988). Plusieurs types de réacteurs anaérobies ont été élaborés, soit le réacteur anaérobie à film fixe, le réacteur à boues granulaires (UASB) et le réacteur hybride (Figure 4). En plus de ces réacteurs, des lagunes non aérées peuvent également être utilisées.

Certaines études ont été effectuées en laboratoire afin de démontrer le potentiel d'application des procédés anaérobies pour le traitement des effluents pétrochimiques (Parker et Farquhar, 1989; Vogel et Winter, 1988; Britz et al., 1983). Dans tous ces cas, seulement le réacteur à film fixe a été utilisé.

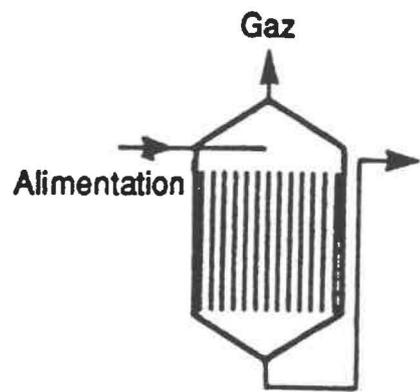
3.2.2.1 Réacteurs à boues granulaires (UASB)

Dans un réacteur à boues granulaires, les micro-organismes sont liés ensemble de façon naturelle sous forme de granules qui forment un lit de biomasse. A notre connaissance, on ne retrouve pas dans la littérature de cas où un réacteur à boues granulaires a été utilisé pour traiter un effluent pétrochimique. Par contre, certaines études ont démontré l'efficacité de ce type de réacteur pour transformer certains composés phénolés (Hendriksen et Ahring, 1992; van Lier et al., 1992).

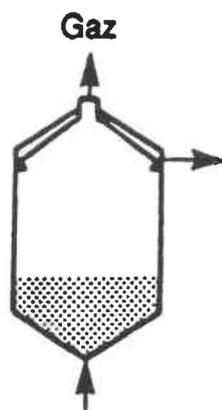
Figure 4 : Illustration des différents procédés de traitement anaérobie.



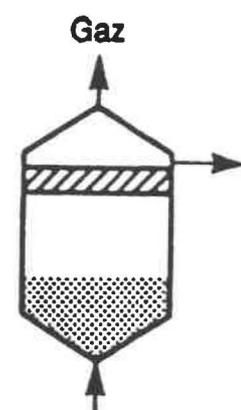
**Film-fixe à écoulement
ascendant**



**Film-fixe à écoulement
descendant (DSFF)**



**Réacteur à boues
granulaires (UASB)**



Réacteur hybride

3.2.2.2 Réacteurs hybrides

Dans un réacteur hybride, les procédés à film fixe et à boues granulaires sont combinés. La base du réacteur contient les boues et un support pour l'attachement des microorganismes est installé dans sa partie supérieure. Ce procédé ne semble pas être utilisé pour le traitement des effluents pétrochimiques.

3.2.2.3 Lagunes anaérobies

Les lagunes anaérobies sont des bassins non aérés où l'effluent à traiter séjourne durant un temps de rétention assez élevé. Hovious et al. (1972) ont démontré que les lagunes anaérobies pouvaient éliminer 53 % de la demande chimique en oxygène (DCO) d'un effluent pétrochimique. Mais si celles-ci sont utilisées, elles seront suivies généralement d'un traitement aérobie (Eckenfelder et al., 1985); il s'agit donc d'un traitement partiel. De plus, tout comme les lagunes aérées, de grands espaces de terrain sont nécessaires et le système est moins performant en hiver (Eckenfelder et al., 1985).

3.2.2.4. Réacteurs à film fixe

Un réacteur à film fixe est caractérisé par le support

qu'il contient afin que les microorganismes puissent s'y fixer. Plusieurs types de support peuvent être utilisés tels que: anneaux de plastique, pierres, argile et verre. Le support idéal doit avoir un rapport surface:volume élevé, une texture rugueuse pour permettre l'adhésion des microorganismes, être inerte biologiquement, être résistant et économique (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992; Bonastre et Paris, 1989).

Le temps de démarrage des réacteurs à film fixe peut prendre de deux à vingt-cinq semaines (Wu, 1981). Dans la littérature, on retrouve un cas où jusqu'à neuf mois ont été nécessaires pour le développement du biofilm (Switzenbaum et Jewell, 1980). Selon Wu (1981), certains paramètres doivent être ajustés pour un démarrage optimal, comme la quantité (plus de 10 % v/v) et qualité de l'inoculum, la composition du substrat à traiter, le potentiel nutritif et tampon de ce dernier, le temps de rétention hydraulique initial (plus de 30 jours), le type de support, la température d'incubation et le pH (neutre). Annachhatre et Bhamidimarri (1992) ont suggéré d'incuber les réacteurs anaérobies à 35°C pendant la période de démarrage afin de maximiser le développement du biofilm.

Britz et al. (1983) ont utilisé un réacteur anaérobie à film fixe à écoulement descendant pour traiter un effluent pétrochimique peu chargé. Le réacteur a été élaboré à partir d'une colonne de verre de un mètre avec un volume efficace de

3,5 litres et le support utilisé était un cylindre en polyéthylène. Le réacteur a été inoculé avec des boues provenant d'un système de traitement pour les déchets municipaux et a été incubé à 35⁰C. Les composés phénolés étaient présents à l'état de trace dans l'effluent pétrochimique global utilisé et ils n'ont pas été dosés avant et après le traitement anaérobie. Après l'ajustement du pH de cet effluent à 6,0 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium, un précipité rouge se formait (fer et métaux à l'état de trace) et nuisait à l'activité bactérienne. Donc, l'effluent a dû être filtré pour éliminer ce précipité. Une réduction de 93-95 % de la demande chimique en oxygène (DCO) a été obtenue pour un temps de rétention hydraulique de 2,3 jours lorsque la charge initiale était de 4,7 kg DCO/m³/j. Dans ces conditions, le gaz produit contenait une quantité élevée de méthane.

Vogel et Winter (1988) ont étudié la dégradation du phénol et du crésol dans un effluent pétrochimique constitué de plusieurs effluents spécifiques différents à l'aide d'un réacteur à film fixe et à écoulement ascendant, alimenté en semi-continu. Le volume du réacteur était de 1,5 litre, le support utilisé était des billes poreuses en argile et il a été incubé à 37⁰C. L'inoculum utilisé pour démarrer ce réacteur provenait de boues anaérobies non définies, c'est-à-dire que les microorganismes constituant cette boue n'ont pas été étudiés. La caractérisation de l'effluent a démontré qu'il contenait 90

mg/L de composés phénolés dont 58 mg/L de phénol et 7 mg/L de m-crésol. Pour un temps de rétention hydraulique de dix jours, une diminution de 55 % de la DCO a été observée et les composés phénolés étaient complètement transformés. Par la suite, une quantité croissante de phénol et de crésol a été ajoutée à l'effluent afin d'évaluer le taux de dégradation maximal par le biofilm. Ce taux est de 1 200 mg/L par jour pour le phénol et de 420 mg/L par jour pour le crésol.

Parker et Farquhar (1989) ont élaboré un réacteur à écoulement ascendant alimenté en continu dont l'inoculum provenait également de boues non définies pour traiter un mélange de différents effluents pétrochimiques spécifiques. Les réacteurs ont été construits à partir de colonnes acryliques de 10,2 cm de diamètre et 69,0 cm, de longueur. Deux types de support ont été utilisés, soit des anneaux de polyéthylène et des anneaux de porcelaine. Comme Britz et al. (1983) l'ont fait, les réacteurs ont été incubés à 35⁰C. L'effluent utilisé contenait des concentrations variant entre 142 et 223 mg/L pour les composés phénolés et de 3 250 et 5 800 mg/L pour le carbone organique total. Les composés phénolés présents dans un effluent dilué par 2 ont été dégradés pour un temps de rétention hydraulique de trois jours avec un rendement de plus de 75 % et pour le carbone organique total, le rendement était de 52 à 67 % .

Jusqu'à présent, il semblerait qu'on ne retrouve pas dans la littérature des cas où les réacteurs anaérobies à film fixe sont employés pour le traitement des effluents pétrochimiques à l'échelle industrielle. Le réacteur à film fixe possède cependant certaines caractéristiques qui le rendent intéressant pour ces industries. En plus des avantages économiques, il est assez résistant aux variations de pH et aux surcharges organiques (Chou et al., 1978; Bonastre et Paris, 1989), et le méthane représente 65 - 75 % du gaz produit (Eckenfelder et al., 1985).

3.3 Traitement tertiaire

Le traitement tertiaire peut être ajouté après le traitement biologique afin d'éliminer un type spécifique de contaminant. Par exemple, les solides colloïdaux encore présents dans l'effluent peuvent être éliminés par filtration. Certains composés organiques ne respectant pas les normes après le traitement biologique peuvent être adsorbés par le charbon activé ou oxydé chimiquement par le permanganate, par l'ozone en présence ou l'absence de rayons ultra-violet et par le peroxyde d'hydrogène. Le traitement tertiaire est rarement utilisé à l'échelle industrielle parce qu'il est assez dispendieux (Eckenfelder et al., 1985).

4. COMPARAISON DES PROCÉDÉS ANAÉROBIES ET AÉROBIES

Plusieurs chercheurs ont comparé les procédés anaérobies et aérobie afin de déterminer lesquels étaient les plus avantageux. La majorité de ceux-ci ont estimé que les procédés anaérobies (réacteur à film fixes, à boues granulaires (UASB), hybride) étaient préférables et ils ont suggéré leur utilisation (Wang et al., 1986; Speece, 1983; Pailthorp et al., 1971).

Les avantages d'un procédé anaérobie par rapport à un procédé aérobie sont nombreux. Le premier de ces avantages est celui du coût beaucoup moindre d'un traitement anaérobie puisque ce dernier, en outre, ne requiert ni l'énergie ni l'équipement nécessaire pour l'aération et l'agitation (Seif et al., 1992; Wang et al., 1986; Fedorak et Hruday, 1984). En général, la quantité de nutriments à ajouter est plus faible et les réacteurs sont de volume inférieur (Kindzierski, 1989). Également, les réacteurs anaérobies produisent moins de boues (biomasse) que les procédés aérobie (Bradford et Krishnamoorthy, 1991; Samson, 1991; Kindzierski, 1989; Wang et al., 1986; Eckenfelder et al., 1985), ce qui implique des coûts moindres pour les éliminer. Les boues générées par le traitement des eaux représentent le plus gros volume de déchets semi-solides retrouvés dans les raffineries. La capacité d'un système anaérobie de produire du méthane présente un autre

avantage, puisque le méthane peut être récupéré et utilisé comme source d'énergie (Samson, 1991; Anonyme, 1990; Wang et al., 1986; Eckenfelder et al., 1985). Compte tenu de tous ces avantages, nous avons choisi d'étudier un réacteur anaérobie à film fixe pour le traitement d'un effluent pétrochimique spécifique.

5. DÉGRADATION ANAÉROBIE DE COMPOSÉS AROMATIQUES

La dégradation de composés aromatiques en conditions anaérobies a fait l'objet d'excellents articles de revue (Evans et Fuchs, 1988; Berry et al., 1987; Sleat et Robinson, 1984; Young, 1984; Evans, 1977). Les composés aromatiques peuvent être dégradés par photométabolisme (Harwood et Gibson, 1986; Hutber et Ribbons, 1983; Dutton et Evans, 1969; Guyer et Hegeman, 1969), par le catabolisme lié à la réduction des sulfates (Szewzyk et Pfennig, 1987; Bak et Widdel, 1986; Widdel et Pfennig, 1984), par le catabolisme lié à la réduction des nitrates (Tschech et Fuchs, 1987; Schennen et al., 1985; Williams et Evans, 1975) et par fermentation en conditions méthanogènes. Ce dernier procédé a été retenu pour notre étude.

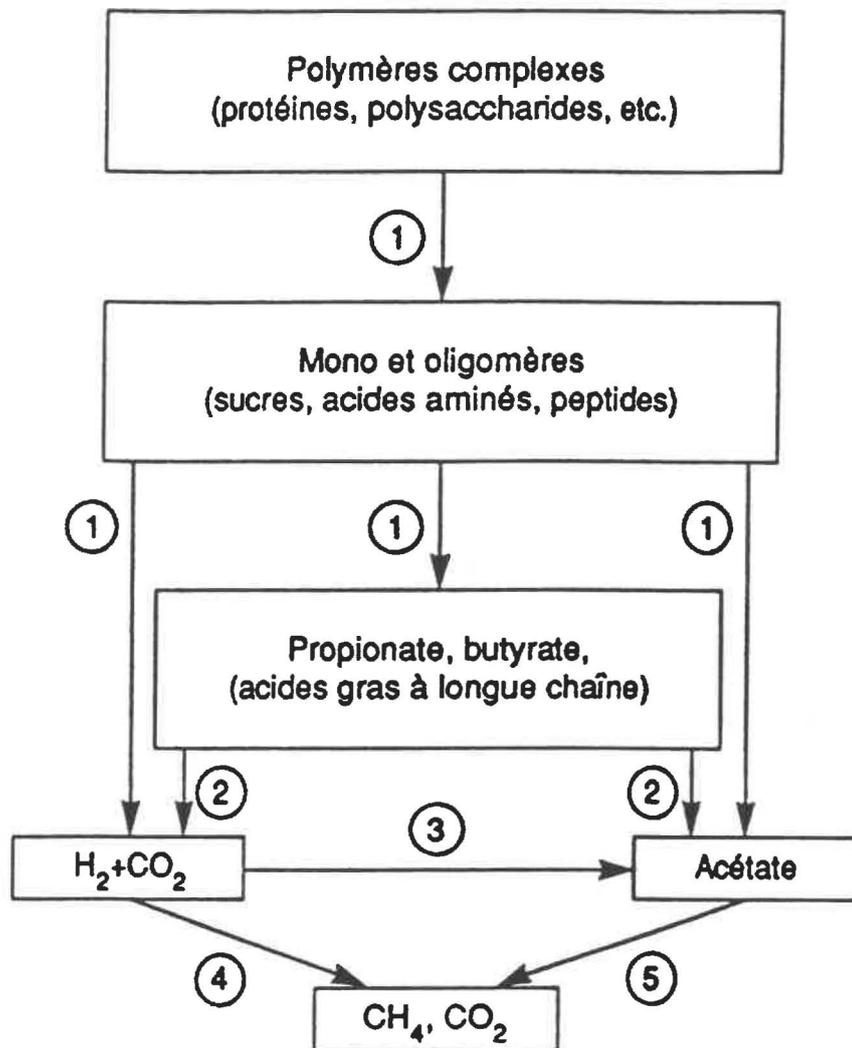
La fermentation méthanique des composés aromatiques s'effectue en l'absence de lumière, d'oxygène et d'accepteurs externes d'électrons (SO_4^{2-} , NO_3^-). Dans ce cas, les accepteurs d'électrons sont générés par le substrat lui-même (Zeikus,

1979). La source de carbone est dégradée par une série de réactions qui, à l'aide de la phosphorylation au niveau du substrat, libèrent de l'énergie (Evans, 1977). La minéralisation complète d'un substrat nécessite la coopération de plusieurs groupes bactériens, soit les bactéries acidogènes ou fermentaires, les bactéries acétogènes et les bactéries méthanogènes (Zinder et al., 1984). Dans un écosystème, ces différents groupes trophiques forment des associations complexes et stables où les rôles métaboliques de chacun se complètent pour former une chaîne alimentaire. Les principales étapes de la dégradation anaérobie ainsi que les groupes de microorganismes impliqués sont présentés à la Figure 5.

La fermentation méthanique est divisée en quatre principales étapes, soit la transformation du composé substitué en composé aromatique simple, la réduction et le clivage du noyau aromatique, la dégradation des acides gras et la méthanogénèse . Ces étapes sont nécessaires pour la minéralisation complète de composés aromatiques (Figure 5).

L'étape initiale de la dégradation consiste à modifier et couper les groupements de substitution des composés aromatiques. De nombreuses transformations sont observées, telles les oxydations d'alcools en aldéhydes ou en acides, les O-déméthylations, les déméthylations, les décarboxylations, les déshydrogénations, les déshydroxylations et l'hydratation des

Figure 5 : Les différentes étapes et les groupes de microorganismes impliqués dans la dégradation anaérobie des polymères en méthane (Zinder, 1984): 1) bactéries fermentaires, 2) bactéries acétogènes productrices d'hydrogène, 3) bactéries acétogènes consommatrices d'hydrogène, 4) bactéries méthanogènes réductrices de CO_2 et 5) bactéries méthanogènes acéticlastiques.



chaînes de substitution (Grbic-Galic, 1986; Roberts et Fedorak, 1986; Balba et al., 1979).

La deuxième étape consiste en la réduction et le clivage du noyau aromatique. Evans (1977) a postulé que tous les noyaux aromatiques étaient dégradés en anaérobiose par la voie réductrice, c'est-à-dire la réduction du cycle avant le clivage. La réduction du noyau aromatique nécessite une déstabilisation afin de permettre la désaromatisation par l'addition d'atomes d'hydrogène (Berry et al., 1987) ou un atome d'oxygène peut également être rattaché au cycle par hydratation. Dans le cas des composés non-carboxylés, la déstabilisation du noyau s'effectuerait peut-être par une tautomérisation céto-énol (Schink, 1986; Tschsch et Schink, 1986).

De grandes quantités d'acides gras sont produites lors de la fermentation méthanique. Ces acides gras saturés seront transformés en acétate et en hydrogène au cours de la troisième étape à l'aide d'une série de β -oxydations où des protons servent d'accepteurs d'électrons. Ceci entraîne donc l'accumulation d'hydrogène. Pour obtenir la minéralisation d'un substrat, l'hydrogène doit être éliminé puisque la dégradation anaérobie ne fonctionne qu'à une très faible pression d'hydrogène. La pression partielle optimale d'hydrogène a été évaluée à 10^{-3} à 10^{-5} atmosphère (Zeikus, 1982). Les bactéries productrices d'hydrogène devront donc vivre en étroite relation

avec les bactéries consommatrices d'hydrogène, telles que les bactéries méthanogènes pour une minéralisation complète du substrat en CO_2 et CH_4 (Zinder et al., 1984).

La dernière étape, la méthanogénèse, est la mieux documentée. La production de méthane se fait à partir de l'acétate ou du CO_2 et H_2 produits au cours des étapes précédentes. Deux types de bactéries méthanogènes sont retrouvés, soit les méthanogènes hydrogénotrophes qui participent aux réactions de transfert interspécifique d' H_2 et les méthanogènes acétoclastiques qui sont responsables de la transformations de l'acétate en méthane. Quelques articles de revue concernant les méthanogènes et leur rôle dans la fermentation anaérobie sont disponibles (Jones et al., 1987; Sleat et Robinson, 1984; Balch et al., 1979; Mah et al., 1977; Zeikus, 1977). Leur choix de substrat étant limité, les bactéries méthanogènes dépendent des populations qui produisent l' H_2 , le CO_2 et l'acétate.

6. DÉGRADATION DU PHÉNOL PAR FERMENTATION MÉTHANOGENÈNE

La dégradation du phénol par des consortia en conditions méthanogènes a été régulièrement rapportée dans la littérature (Galler et Winter, 1992; Bisailon et al., 1991 a,b; Béchard et al., 1990; Knoll et Winter, 1989; Sharak Genthner et

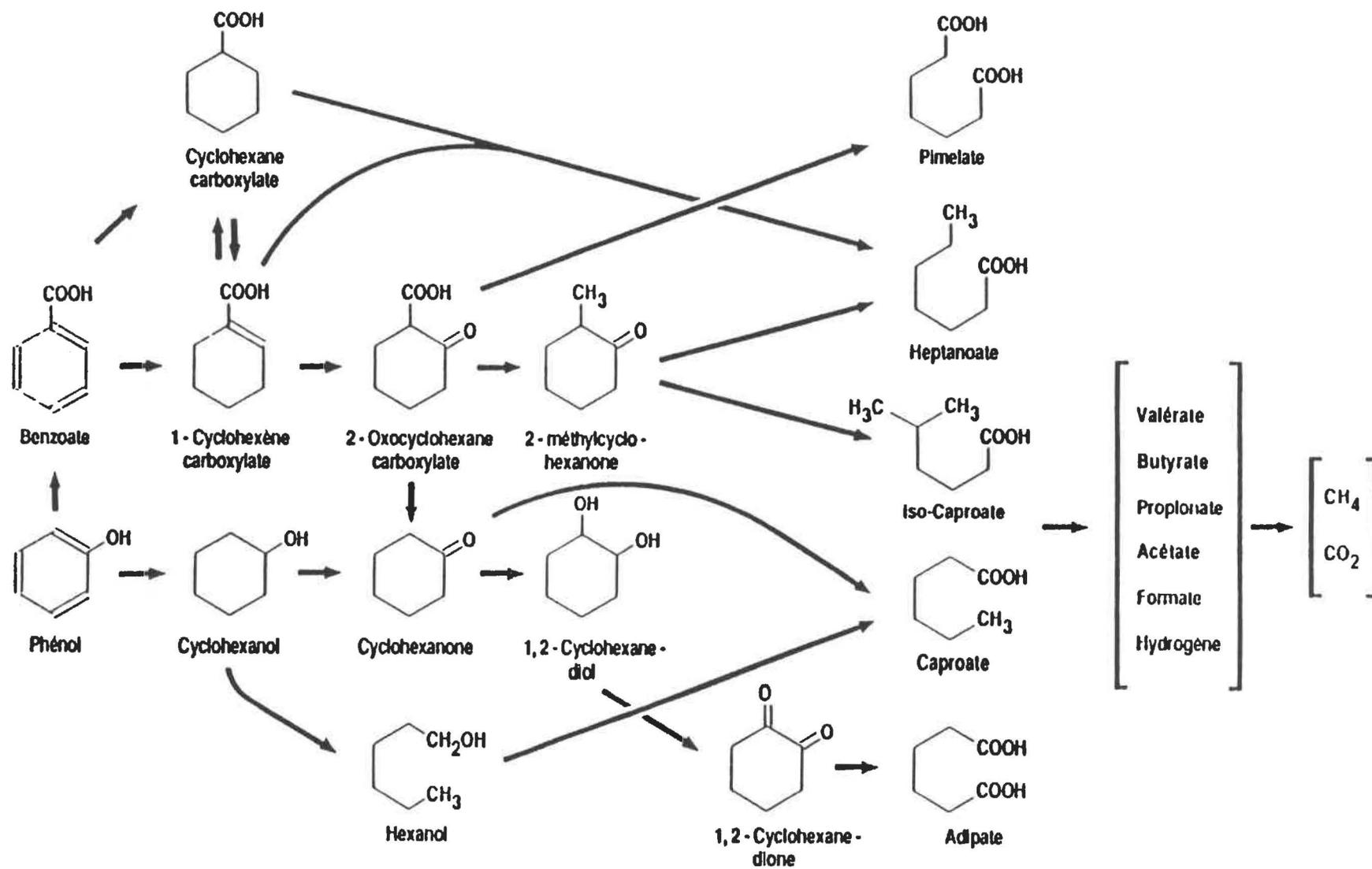
al., 1989; Beaudet et al., 1986; Young et Rivera, 1985; Healy et Young, 1978).

Une voie réductrice a été suggérée par plusieurs auteurs (Grbic-Galic et Vogel, 1987; Barik et al., 1985; Balba et al., 1979; Evans, 1977). Cette voie consiste d'abord en la réduction du phénol en cyclohexanone. Ensuite, le cycle est ouvert par hydrolyse et un acide aliphatique, soit le caproate ou l'adipate est obtenu. Finalement, ces acides sont dégradés en CH_4 et CO_2 (Figure 6).

Une seconde voie de dégradation impliquant une carboxylation, a été rapportée par Neufeld et al. (1980) en se basant sur les travaux de Chmielowski (1965). Le phénol est carboxylé en acide benzoïque et ce dernier est dégradé en CH_4 et en CO_2 par une voie réductrice. D'autres auteurs ont par la suite démontré l'existence de cette voie (Bisaillon et al., 1991 b; Béchard et al., 1990; Zhang et Wiegel, 1990; Knoll et Winter, 1989, 1987; Kohring et al., 1988; Sharak-Genthner et al., 1988, 1989, 1990, 1991; Jeannin, 1986). Kobayashi et al. (1988) ont proposé les intermédiaires de dégradation suivants: l'acide benzoïque, le cyclohexane carboxylate (ou le 1-cyclohexène carboxylate) et l'heptanoate (Figure 6).

Beaudet et al. (1986) ont isolé un consortium de bactéries anaérobies caractérisé par sa capacité de dégrader les

Figure 6 : Voies possibles de dégradation du phénol par fermentation méthanique, d'après Kobayashi et al. (1988).



composés phénolés par fermentation méthanique. Béchard et al. (1990) ont démontré que le consortium dégrade le phénol via une carboxylation en acide benzoïque. La carboxylation a lieu en position para (Bisaillon et al., 1991) et est effectuée par co-métabolisme en présence de protéose peptone (Béchard et al., 1990). Bisaillon et al. (1991) ont démontré que le protéose peptone peut être remplacé par de l'extrait de levure ou un mélange de tryptophane et de lysine, mais ne peut être remplacé par le glucose, le glycérol, le pyruvate, les acides gras volatils et le bicarbonate de sodium. La transformation du phénol en acide benzoïque est induite par le phénol. Le spectre d'activité du consortium n'est pas limité au phénol: les phénols substitués en position ortho (méthyl-, chloro-, fluoro-, bromo-, hydroxyl-, amino-, carboxyl-) sont transformés en acide benzoïque substitué en position méta (Bisaillon et al., 1993). Par contre, les phénols substitués en position méta et para (crésols, fluorophénols et chlorophénols) ne sont pas transformés. Le consortium peut également effectuer des réactions de O-déméthylation et d'oxydation (Bisaillon et al., 1993). Le consortium est constitué de sept formes morphologiques différentes soit: une bactérie en forme de croissant, un cocci, trois types de bâtonnets dont un méthanogène et un cocco-bacille. Les microorganismes carboxylants ont été évalués de 1×10^8 à 8×10^9 cellules/mL (Béchard et al., 1990). Ces microorganismes ne sont probablement pas syntrophes puisque l'inhibition de la

méthanogénèse et la présence d'hydrogène dans la phase gazeuse n'ont pas empêché la carboxylation du phénol. Récemment, Létourneau et al. (communication personnelle) ont démontré que la carboxylation du phénol est effectuée par des microorganismes sporulés. Le consortium défini de bactéries anaérobies a été utilisé pour notre étude.

Trois autres groupes de chercheurs étudient un consortium de bactéries anaérobies ayant la capacité de transformer le phénol. Ces consortia possèdent plusieurs points en commun avec le consortium de Beudet et al. (1986); par contre, leur aspect microbiologique diffère. Zhang et Wiegel (1990) ont observé trois formes morphologiques, soit deux types de bâtonnets et l'autre ressemblait à Methanospirillum hungatei. Sharak Genthner et al. (1990) ont observé que leur consortium était formé de cinq bactéries Gram négatives différentes dont deux ressemblaient à Methanospirillum sp et Methanothrix sp. Le consortium étudié par Knoll et Winter (1989) est formé de quatre formes morphologiques, soit deux bâtonnets, des microorganismes Desulfovibrio et des méthanogènes. Ces derniers ont suggéré qu'un long bâtonnet Gram négatif non mobile serait responsable de la carboxylation du phénol en acide benzoïque. Jusqu'à maintenant, aucun des groupes de recherche n'a réussi à isoler l'organisme responsable de la carboxylation du phénol.

A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée au traitement d'un effluent pétrochimique dans un réacteur anaérobie à film fixe dont le biofilm provient d'un consortium défini, déjà étudié en laboratoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MICROORGANISMES

Le consortium de bactéries anaérobies isolé par Beudet et al. (1986) pour sa capacité de dégrader certains composés phénolés a été utilisé lors de l'élaboration d'un traitement anaérobie d'un effluent pétrochimique spécifique.

2. MAINTIEN DES MICROORGANISMES

2.1 MILIEUX DE CULTURE

Le consortium a été maintenu dans le milieu minimal de Boyd et al. (1983). Celui-ci contient par litre de milieu: KH_2PO_4 , 0,27 g; K_2HPO_4 , 0,35 g; NH_4Cl , 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; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g; solution de minéraux, 10 mL; résazurine, 0,001 g. La solution de minéraux est composée des éléments suivants (mg/L): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1; ZnCl_2 , 0,1; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1; H_3BO_3 , 0,1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1. Du protéose peptone no. 3 (Difco Laboratories, Détroit, Michigan) 0.05 % (p/v) a été ajouté au milieu minimal. Des techniques d'anaérobiose stricte ont été employées: le milieu a été porté à ébullition en présence d'un réfrigérant pour condenser la vapeur produite, et transféré dans des bouteilles de 100 mL sous jet de $\text{N}_2:\text{CO}_2:\text{H}_2$ (80:10:10), puis les bouteilles ont été fermées avec un bouchon de butyle (Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey) et autoclavées 20 minutes à 121°C.

Les produits suivants ont été rajoutés au milieu après autoclavage (par litre): 10 mL d'une solution de vitamines (Wolin et al., 1963), 0,5 g de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, et 150 mg de phénol (Baker Chemical Co., Philippsburg, New Jersey). Ces produits ont été préalablement stérilisés par filtration avec une membrane de porosité de $0,20\ \mu$ (Nalge, Rochester, New York) et, barbottés avec un mélange de gaz $\text{N}_2:\text{CO}_2:\text{H}_2$ (80:10:10).

Tout au long de l'étude, ce milieu de culture de Boyd et al. (1983) enrichi de protéose peptone a été utilisé et pour simplifier le texte, ce milieu sera dorénavant appelé milieu de culture.

2.2 Culture

Les cultures dégradant le phénol ont été maintenues en les transférant à tous les quinze jours dans un milieu minimal frais en utilisant un inoculum de 12,5 % (v/v). Le pH du milieu a été ajusté à 7,5 avec une solution de NaHCO_3 10 % (p/v) et les cultures ont été incubées à 37°C en absence de lumière pendant quinze jours. La dégradation du phénol a été vérifiée périodiquement à l'aide de dosages par chromatographie en phase gazeuse.

3. ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

3.1 Extraction

Un volume de un mL de l'échantillon à analyser a été acidifié par l'addition de 0,2 mL de H₂SO₄ 50 % (v/v). Ensuite, 0,02 mL d'une solution de phénylphénol (Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, É-U) utilisée comme standard interne, 0,4 g de NaCl et un mL d'éther conservé à - 70°C, ont été ajoutés. Après agitation et centrifugation, la phase étherée a été recueillie et conservée sur de la glace.

3.2 Dosage

Un volume de 150 µL de la phase étherée a été évaporé sous jet d'azote et le vial conique a été fermé hermétiquement. L'extrait a été dérivé par la technique de silylation avec le N,O-bis- (triméthylsilyl)- trifluoroacétamide (BSTFA) (Pierce Chemicals, Rockford, Illinois). Un volume de 0,150 mL de BSTFA : Acétonitrile (1:4) a été ajouté à l'extrait évaporé et le mélange incubé à 70°C pendant trente minutes.

Deux µL de cette préparation ont été injectés dans le chromatographe en phase gazeuse. Le chromatographe modèle 5890 A (Hewlett-Packard) possédait une colonne capillaire de type phényl-méthyl-silicone HP-5 de Hewlett-Packard de 25 mètres de

longueur et 0,2 mm de diamètre interne. L'azote servait de gaz vecteur à un débit de 2,7 mL/min. Le chromatographe était muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La programmation du four était comme suit: la température initiale était de 50°C et augmentait de 11°C/min jusqu'à 230°C, et cette température finale était maintenue pendant six minutes. La température du détecteur était de 300°C et celle de l'injecteur de 250°C.

En plus du phénol, l'acide benzoïque, le cyclohexanol et les crésols ont été dosés par cette technique de chromatographie en phase gazeuse. Par contre, dans le cas du cyclohexanol, le taux d'augmentation de la température était de seulement 5°C/min.

3.3 Présence de méthane

La présence de méthane dans un échantillon de gaz prélevé à la sortie des réacteurs anaérobies a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (Modèle 5890 A, HP) avec un taux d'augmentation de la température de 21°C/min. Un gaz standard de CH₄ (Laval Oxygène) a servi de référence. L'échantillon a été préparé de la façon suivante: un vial a été rincé à l'azote, fermé hermétiquement et le gaz qui s'y trouvait a été retiré avec une seringue préalablement rincée à l'azote. Une seringue similaire, également rincée à l'azote, a servi à injecter 10 mL du gaz à analyser dans le vial préparé.

3.4 Spectrométrie de masse (CG/SM)

Les échantillons ont été préparés tel que décrit précédemment. L'appareil utilisé comprenait un chromatographe Varian 3500 muni d'une colonne capillaire similaire à celui mentionné précédemment, couplé à un spectromètre de masse modèle Ion Trap 800 (Finningan). L'hélium servait de gaz vecteur à un débit de 1,4 mL/min. La programmation du four était comme suit: la température initiale était de 70°C et augmentait de 10°C/min. jusqu'à 120°C et cette température était maintenue pendant deux minutes, ensuite, la température augmentait de 5°C/min. jusqu'à 230°C et de 20°C/min. jusqu'à 300°C. Les spectres de masse ont été obtenus par balayage répétitif à une vitesse de 1 s/décade de 70 à 400 daltons.

4. L'EFFLUENT PÉTROCHIMIQUE SPÉCIFIQUE

L'effluent a été prélevé à une raffinerie située à Montréal-Est. Il s'agissait d'un effluent spécifique et non d'un effluent global car nous voulions un effluent avec une concentration élevée en phénol et de volume réduit.

4.1 Choix de l'effluent spécifique

Deux effluents spécifiques différents ont été obtenus, compte tenu qu'ils possédaient des concentrations importantes de

phénol. Le premier a été prélevé avant le dessaleur et le second après le dessaleur. Le dessaleur est un réacteur qui permet d'enlever les sels minéraux contenus dans le pétrole brut. Quelques analyses ont été effectuées afin de choisir l'effluent le plus approprié pour le traitement. Dans un premier temps, le phénol de ces effluents a été dosé par chromatographie en phase gazeuse comme décrit à la section 3. Puis, des cultures en cuvée avec le milieu contenant 10 et 25% (v/v) de l'un ou l'autre de ces effluents spécifiques ont été effectuées. Pour faciliter le suivi, la concentration du phénol dans ces cultures a été ajustée à environ 200 ppm en ajoutant différents volumes d'une solution standard. Suite à l'inoculation du consortium de maintenance, la dégradation du phénol a été suivie dans chacune des cultures.

4.2 Conservation de l'effluent

La congélation a été étudiée comme moyen de conservation de l'effluent choisi. Certains paramètres (pH, le phénol, les composés phénolés, les solides totaux et la DCO) de cet effluent ont été évalués avant la congélation à -30°C et après décongélation. De plus, la dégradation du phénol a été suivie dans des cultures qui contenaient 10 % (v/v) d'effluent avant congélation et d'effluent décongelé et dans lesquelles la concentration de phénol a été ajustée à environ 200 ppm.

4.3 Lot de référence

Un lot de référence de 50 litres de l'effluent choisi a été prélevé le 16 juin 1992. Les échantillons pour la congélation furent recueillis dans des bouteilles de polypropylène de 1 L (Nalgène, Rochester, É-U) et dans des bouteilles de polyéthylène à basse densité de 4 L (Nalgène, Rochester, É-U.). Les échantillons composant le lot de référence ont été congelés à - 30°C. Le délai pour la congélation était de moins de 1 heure après la prise des échantillons. Pour les analyses de l'effluent avant la congélation, les échantillons ont été recueillis dans des bouteilles de verre de 1 L (Pyrex, Fisher Scientific, Ontario) et conservés à 4°C.

4.4 Autre effluent

Un deuxième effluent spécifique prélevé au même endroit que le lot de référence a été obtenu le 12 mai 1993. Ce prélèvement et la conservation de cet effluent ont été effectués comme celui du lot de référence décrit à la section précédente. La concentration du phénol a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, comme décrit à la section 3.

5. CARACTÉRISATION DE L'EFFLUENT DE RÉFÉRENCE

Dans le cas des paramètres légiférés par le Ministère de l'Environnement du Québec, leur évaluation s'est faite sur le lot de référence avant et après la congélation. Les méthodes normalisées décrites dans la 17ième édition du "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1989) ont été utilisées pour la caractérisation de l'effluent de référence. Les numéros dans le texte qui suit réfèrent aux méthodes utilisées. En conséquence, la méthode d'échantillonnage et la technique de dosage utilisées ne seront que brièvement décrites. Le carbone organique total et le phosphore total ont été déterminés par une firme privée d'analyses soit, Analex Inc., 3025, Montée St-Aubin, Laval, Québec, H7L 4E4.

5.1 Analyses physico-chimiques

Dans tous les cas, les délais d'analyse étaient de moins de deux heures pour le pH et de moins de 24 heures pour les solides en suspension. Pendant ce délai, les échantillons ont été conservés à 4°C.

5.1.1 pH

Le pH des échantillons a été mesuré à l'aide d'un pH-

mètre Radiometer Copenhagen PHM62 (Copenhague, Danemark) muni d'une électrode E-54 de Fisher Scientific Limited (Pittsburgh, É-U).

5.1.2 Solides totaux (ST) et solides volatils totaux (SVT)

Les méthodes 2540 B et 2540 E furent utilisées respectivement pour déterminer les solides totaux et volatils totaux. Le volume de l'échantillon utilisé a été choisi de façon à obtenir un résidu final se situant entre 2,5 et 200 mg. Pour la détermination des solides totaux, l'échantillon a été versé dans un creuset dont le poids est connu et évaporé à 103-105°C dans un four Pasteur modèle Thelco (Precision Scientific Co., Chicago, É-U). Ensuite, l'échantillon a été asséché dans un dessiccateur Pyrex jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La balance de précision utilisée était de modèle Sartorius 1801 (Sartorius, Allemagne). Les solides volatils totaux ont été déterminés en chauffant le résidu à 550°C dans un four de modèle SB 51848 (Lindgergh, Watertown, É-U) pendant 20 minutes, puis en asséchant dans le dessiccateur jusqu'à un poids constant.

5.1.3 Solides en suspension (SS) et solides volatils en suspension (SVS)

Les méthodes 2540 D et 2540 E furent utilisées

respectivement pour déterminer les solides en suspension et volatils en suspension. L'échantillon a d'abord été filtré sur un filtre de 47 mm de diamètre de type A/E (Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, É-U) et ce filtre portant les solides a été séché à 103-105°C et 550°C. Les détails de la procédure sont semblables à ceux décrits à la section 5.1.2.

5.1.4 Solides dissous (SD) et solides volatils dissous (SVD)

Les méthodes 2540 C et 2540 E furent utilisées respectivement pour déterminer les solides dissous et volatils dissous. La procédure est semblable à celle de la section 5.1.3, à l'exception que c'est le filtrat qui est séché à 180°C et 550°C.

5.2 Analyses des constituants organiques

5.2.1 Composés phénolés

La méthode de photométrie directe 5530 D a été utilisée pour la détermination des composés phénolés. Les échantillons ont d'abord été acidifiés à pH 4 avec de l'acide phosphorique et peuvent être conservés à 4°C pour un maximum de 24 heures avant d'être analysés. Dans un premier temps, les échantillons sont distillés pour enlever les impuretés. Puis,

on fait réagir les composés phénolés contenus dans le distillat avec du 4-aminoantipyrine, en présence de ferricyanure de potassium formant ainsi un complexe coloré. L'absorbance est mesurée à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre modèle SP6-550 UV/VIS (PYE Unicam, Canlab). Les résultats obtenus sont évalués en fonction d'une courbe standard qui a été préalablement effectuée avec différentes solutions dont la concentration de phénol variait de 1 ppm à 5 ppm. Les valeurs obtenues tiennent compte d'un facteur de dilution selon les différentes concentrations des composés phénolés de chaque échantillon.

5.2.2 Demande chimique en oxygène (DCO)

La méthode du reflux au dichromate 5220 B a été employée pour déterminer ce paramètre. Les échantillons ont d'abord été acidifiés à un pH inférieur à 2 avec de l'acide sulfurique concentré et ont été conservés à 4°C pour un maximum de sept jours avant d'être analysés. L'échantillon est digéré à reflux pendant deux heures dans l'acide sulfurique, en présence d'un catalyseur, le sulfate d'argent, de sulfate de mercure et de dichromate de potassium. Après la digestion, la quantité de dichromate qui n'a pas été réduite est titrée avec une solution de sulfate d'ammonium ferreux et de l'indicateur "ferroin". La quantité de matière organique oxydable est proportionnelle à la quantité de dichromate réduit pendant la digestion.

5.2.3 Huiles et graisses

La méthode de partition gravimétrique 5520 B a été utilisée pour la détermination des huiles et des graisses. Cette méthode mesure toutes les substances solubles dans le trichlorotrifluoroéthane (fréon), ce qui en fait un test peu précis. L'échantillon est extrait à trois reprises en présence de 30 ml de fréon et l'extrait obtenu est évaporé dans un ballon dont le poids est connu. L'évaporation se fait à 70°C dans un bain modèle 461 (Buchi, Suisse) muni d'un appareil rotatif modèle RE 121 (Buchi, Suisse). Ensuite, l'échantillon est asséché dans un dessiccateur Pyrex. Le poids final du ballon après l'évaporation du fréon moins son poids au départ indique la quantité d'huiles et graisses contenue dans l'échantillon.

5.2.4 Carbone organique total

La méthode oxydative 5310 C aux ultraviolets et au persulfate a été employée par Analex Inc pour la détermination du carbone organique total. En présence de rayons ultraviolets, le carbone organique est oxydé en dioxyde de carbone par une solution de persulfate. Le dioxyde de carbone produit a ensuite été dosé à l'infra-rouge.

5.3 Analyses des constituants inorganiques

5.3.1 Azote total Kjeldahl

La méthode semi-micro-Kjeldahl 4500-N_{org} C a été utilisée pour la détermination de l'azote total. Les échantillons ont été acidifiés à un pH inférieur à 2 avec de l'acide sulfurique concentré et conservés à 4°C. En présence d'acide sulfurique, de sulfate de potassium et de sulfate de mercure comme catalyseur, les groupements amino des composés organiques ainsi que les ions ammonium et l'ammoniaque sont transformés en sulfate d'ammonium. Pendant la digestion à forte température, un complexe entre le sulfate d'ammonium produit et le mercure se forme. Le mélange est alors distillé en milieu alcalin, puis absorbé avec de l'acide borique. L'ammoniaque présent dans le distillat est finalement titré avec de l'acide sulfurique 0.1 N.

5.3.2 Azote ammoniacal

La méthode titrimétrique 4500-NH₃ E a été employée pour la détermination de l'azote ammoniacal. Une distillation préliminaire par la méthode 4500-NH₃ B est d'abord nécessaire. Les échantillons ont été acidifiés à un pH inférieur à 2 avec de l'acide sulfurique concentré et conservés à 4°C. Les échantillons ont été alcalinisés à un pH 9,5 avec une solution

tampon de borate avant la distillation. L'ammoniac libéré au cours de la distillation est absorbé dans une solution d'acide borique. Ensuite, l'azote ammoniacal contenu dans le distillat est titré avec de l'acide sulfurique 0.1 N.

5.3.3 Phosphore total

La méthode colorimétrique 4500-P E faisant appel à l'acide ascorbique a été utilisée par Analex Inc pour la détermination du phosphore total. Les échantillons ont été conservés à -10°C et préparés selon la méthode 4500-P B. Il s'agit d'une digestion en présence des acides sulfurique et nitrique. Les orthophosphates produits au cours de la digestion réagissent en condition acide avec le molybdate d'ammonium et le sel d'antimoine du tartrate de potassium pour former l'acide phosphomolybdique. Cet acide est ensuite réduit par l'acide ascorbique en bleu de molybdène (coloration bleue). La concentration de phosphore est proportionnelle à la coloration de l'échantillon. La lecture se fait au spectrophotomètre à 880 nm, et la valeur est rapportée sur une courbe standard qui a été préalablement effectuée.

5.3.4 Sulfures totaux

La méthode iodométrique 4500-S²⁻ E a été utilisée pour l'évaluation des sulfures totaux. Les échantillons ont été

préservés en ajoutant une solution d'acétate de zinc. En présence d'acide chlorhydrique, l'iode réagit avec les sulfures présents dans l'échantillon pour les oxyder en soufre. Ensuite, le soufre produit est titré avec une solution standardisée de thiosulfate de sodium 0,025 N.

5.4 Analyses microbiologiques

La présence de bactéries anaérobies dans l'effluent possédant la capacité ou non de dégrader le phénol a été déterminée.

5.4.1 Milieu liquide

Deux essais différents ont été effectués en milieu liquide afin de vérifier la présence de bactéries anaérobies dégradant le phénol dans l'effluent. Dans le premier essai, le consortium de bactéries anaérobie a été remplacé par l'effluent (12,5% v/v) lors de l'inoculation du milieu de culture frais sous conditions anaérobies. Le pH a été ajusté à 7,5 avec une solution de NaHCO_3 10 % (p/v) et les cultures ont été incubées à 37°C à la noirceur. Le phénol a été dosé régulièrement par chromatographie en phase gazeuse.

Dans le deuxième essai, les éléments à l'état solide du milieu de culture, ont été ajoutés à l'effluent. Celui-ci a

ensuite été incubé à 37°C en conditions anaérobies sans être inoculé avec le consortium. Le phénol a également été dosé lors de cet essai. Dans une des cultures, 150 ppm de cyclohexanol ont été ajoutés, permettant ainsi de vérifier la voie de dégradation du phénol.

5.4.2 Milieu solide

La présence de bactéries anaérobies dans l'effluent a été vérifiée en inoculant l'effluent sur des milieux solides riches, soit des géloses sang Colombia 1121 (Quélab, Montréal, Qué). Ces géloses ont été pré-réduites dans des jarres anaérobies (Système BBL-GasPack, Becton-Diskenson) pendant 48 heures avant l'inoculation. Un échantillon de l'effluent a été étalé sur ces géloses à l'intérieur d'une hotte anaérobie, modèle 1025 SIN 10482-151 (Forma Scientific, Marietta, Ohio E.U.) afin de respecter les conditions d'anaérobiose stricte. La jarre anaérobie contenant les gélosesensemencées a été incubée à 37°C et à la noirceur.

5.5 Analyse de la toxicité

L'appareil Microtox 500 (Carlsbad, É-U) a été utilisé pour évaluer la toxicité de l'effluent. La procédure employée est celle retrouvée dans le mode d'emploi de Microbics Corporation (1990). Les temps d'incubation recommandés étaient

de 5 et 15 minutes. Peu de différences furent notées entre les valeurs obtenues pour ces deux temps. L'incubation de cinq minutes a donc été choisie pour exprimer les résultats. Le principe du test est le suivant: une suspension de bactéries marines luminescentes, Phosphobacterium phosphoreum est mise en contact avec l'effluent et il en résulte une baisse de luminescence proportionnelle à la toxicité de l'échantillon. Le résultat est exprimé en pourcentage d'effluent nécessaire pour provoquer une diminution de 50 % de la lumière émise par la suspension de bactéries.

6. TRAITEMENT ANAÉROBIE DE L'EFFLUENT

6.1 Adaptation du consortium

6.1.1 Milieux de culture

Le consortium a été adapté à l'aide de cultures en cuvées. Le milieu de culture, tel que décrit à la section 2.1, auquel différents pourcentages d'effluent étaient ajoutés, a été utilisé. Les différentes concentrations d'effluent étaient les suivantes: 0, 25, 50, 75 et 100 %. Dans ce dernier cas, ce sont les éléments, à l'état solide, du milieu de culture qui ont été ajoutés à l'effluent. L'effluent a été préalablement barbotté 30 minutes avec un mélange de gaz $N_2:CO_2:H_2$ (80:10:10) avant son utilisation. Le volume final de chaque culture, peu

importe la concentration d'effluent, était toujours de 70 mL. De plus, les différents éléments du milieu de culture étaient ajustés de façon à maintenir leur concentration originale, indépendamment de la concentration d'effluent utilisée dans les cultures.

6.1.2 Culture

Pour adapter le consortium, plusieurs repiquages successifs ont été effectués dans du milieu de culture contenant un pourcentage croissant d'effluent. Le pH a été ajusté à 7,5 avec une solution de NaHCO_3 10 % (p/v) et les cultures ont été incubées à 37°C en l'absence de lumière. Les cultures étaient repiquées lorsque le phénol était complètement dégradé. Les consortiums adaptés des cultures contenant 50 % et 75 % d'effluent ont été maintenus selon la procédure employée pour le consortium non adapté et déjà décrite à la section 2.

6.2 Effet de la composition du milieu de culture

L'effet des différents groupes de composés du milieu de culture sur l'activité du consortium adapté a été étudié. Des cultures ont été effectuées avec des milieux de composition variée: soit un milieu complet, sans minéraux, sans vitamines, sans protéose peptone, sans tous les éléments sauf le protéose peptone et un milieu où rien n'a été ajouté, c'est-à-dire

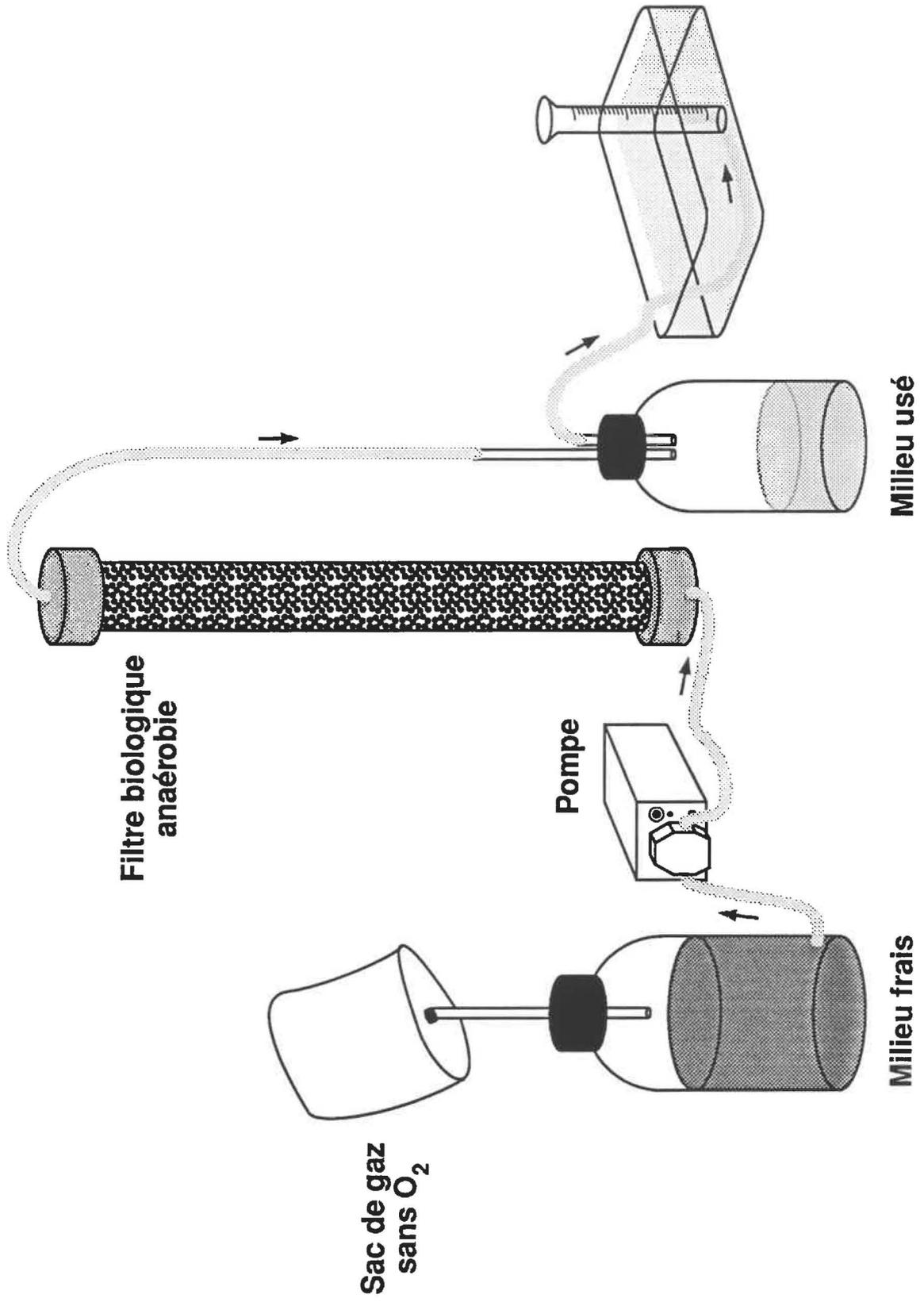
l'effluent seul. Les différents milieux de cultures ont été faits à partir de l'effluent et c'est à celui-ci qu'étaient ajoutés les différents éléments à l'état solide. Le consortium utilisé pour inoculer les différentes cultures a été préparé anaérobiquement de la façon suivante: une culture incubée 15 jours a été centrifugée (Beckman Modèle J-21C, Californie, É-U.) à 10 000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant de culture a été éliminé et le culot resuspendu dans une solution de tampon phosphate salin. Cette suspension a servi à inoculer des milieux dont le pH avait préalablement été ajusté à pH 7,5. Ces cultures ont par la suite été incubées à 37°C à la noirceur.

6.3 Réacteur anaérobie à film fixe

6.3.1 Démarrage

Deux réacteurs anaérobies à film fixe et à courant ascendant ont été démarrés. Un schéma d'un de ces réacteurs est présenté à la Figure 7. Les réacteurs ont été construits à partir d'anciennes colonnes de chromatographie en verre. Les dimensions de chaque réacteur étaient de 45 cm de hauteur et de 3 cm de diamètre interne. Leur capacité totale était de 200 mL et le volume efficace, soit la phase liquide, était de 60 mL. Le support utilisé était de la pierre concassée dont le diamètre variait entre 0,7 cm et 1 cm. Les réacteurs ont été maintenus à 37°C. Le démarrage des réacteurs s'est effectué en cuvée comme

Figure 7: Schéma d'un réacteur anaérobie.



s'il s'agissait de cultures en bouteilles sérologiques. A l'intérieur de la hotte anaérobie, modèle 1025 SIN 10482-151 (Forma Scientific, Marietta, Ohio, É-U.), les réacteurs ont été remplis avec les pierres et le milieu de culture, préalablement barbotté avec le mélange de gaz, stérilisé et réduit avec le Na_2S . Après avoir été inoculés avec le consortium 12,5% (v/v), les réacteurs ont été incubés en cuvée à 37°C pendant quinze jours.

Ensuite, les réacteurs ont été alimentés en semi-continu, toujours avec le milieu de culture, afin de permettre le développement d'un biofilm sur les pierres. Une pompe de modèle Masterflex MR-07520-35 (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, É-U) munie de deux têtes Easy-Load de Masterflex (Barnant, Barrington, É-U) a été utilisée. Le phénol a été régulièrement dosé à la sortie des réacteurs. Lorsque celui-ci était complètement dégradé, le débit du milieu de cultures a été augmenté. Après quatre mois dans ces conditions, les réacteurs ont été alimentés en continu avec le milieu de culture.

Après un mois de ce nouveau régime (en continu), lorsqu'il a été estimé que le biofilm s'était suffisamment développé sur les pierres, l'un des réacteurs a été alimenté en continu avec l'effluent pétrochimique auquel les éléments du milieu de culture ont été ajoutés à l'état solide. L'autre réacteur a été maintenu avec le milieu de culture et a servi de

témoin et de sécurité en cas de bris ou de mal fonctionnement du premier réacteur.

6.3.2 Étude de la performance du réacteur

L'efficacité du réacteur à éliminer les composés de l'effluent faisant l'objet de normes du Ministère de l'Environnement du Québec ainsi que certains autres paramètres a été évaluée. Les analyses ont été effectuées en deux étapes puisque l'ajout du Na_2S interférait pour la détermination de certains paramètres.

Dans un premier temps, le réacteur était alimenté avec l'effluent contenant tous les éléments du milieu de culture et le Na_2S . Le temps de rétention hydraulique (TRH) était de six heures. Les paramètres suivants ont été analysés à l'entrée et à la sortie du réacteur: phénol, composés phénolés, huiles et graisses, azote ammoniacal, toxicité et pH.

Dans un deuxième temps, le Na_2S n'a pas été ajouté à l'effluent. Le temps de rétention hydraulique (TRH) était de douze heures dans ce cas. Les paramètres suivants ont été analysés à l'entrée et à la sortie du réacteur: phénol, sulfures totaux, solides totaux et volatils totaux, solides en suspension et volatils en suspension, solides dissous et volatils dissous ainsi que la toxicité.

Les analyses ont été effectuées selon les méthodes normalisées décrites dans la section 5.

Le deuxième effluent spécifique, prélevé au même endroit que le lot de référence, a été caractérisé sommairement tel que décrit à la section 5 et adapté en bouteilles sérologiques comme à la section 6.1. Cet effluent, auquel les éléments du milieu de culture ont été ajoutés à l'état solide, a aussi été utilisé pour alimenter le réacteur anaérobie afin d'évaluer la performance du biofilm et de déterminer si le traitement proposé pouvait être efficace contre un effluent de composition différente.

6.3.3 Microscopie électronique à transmission

Les échantillons observés en microscopie électronique provenaient des deux réacteurs, un alimenté en continu par l'effluent du lot de référence et l'autre par le milieu de culture. Des pierres ont été prélevées à l'entrée et à la sortie des deux réacteurs. A titre de comparaison, deux échantillons provenant de cultures en bouteilles sérologiques (en cuvée) avec et sans effluent ont également été observés après cinq jours d'incubation.

Les grilles ont été préparées selon la méthode de Alain et al. (1987). Chaque échantillon était placé dans un

microtube (240 uL) de nitrocellulose dans lequel était déposé par la suite une grille de cuivre à microscopie électronique, puis ultracentrifugé à 120 000 X g pendant cinq minutes, permettant ainsi la sédimentation des microorganismes sur la grille. Cette grille était récupérée et lavée trois fois à l'eau distillée, puis asséchée avec du papier buvard. Celle-ci a été colorée négativement à l'acide phosphotungstique (PTA 3 % p/v, pH 6,0) pendant trente secondes, puis asséchée avec un papier buvard.

Les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission Philips EM 300 et, les observations furent effectuées en collaboration avec Robert Alain, Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier.

RÉSULTATS

1. EFFLUENT PÉTROCHIMIQUE

1.1 Choix de l'effluent

Deux effluents spécifiques différents ont été obtenus le 21-04-1992. L'effluent prélevé avant le dessaleur (pH 9,5) contenait en moyenne 63 mg/L de phénol, 77 mg/L de composés phénolés, 82 mg/L de solides totaux. Visuellement, il contenait peu de solides en suspension et d'huiles et graisses. L'effluent prélevé après le dessaleur contenait moins de 10 mg/L de phénol et le pH était moins basique (7,4). Visuellement, il contenait plus de matières en suspension et d'huiles et graisses que l'effluent prélevé avant le dessaleur.

Les valeurs moyennes obtenues, lors du suivi de la dégradation du phénol par le consortium dans le milieu de culture minimal contenant les effluents spécifiques, sont présentées au Tableau 1. Une concentration connue de phénol a dû être ajoutée aux cultures pour faciliter l'interprétation des résultats. Seules les cultures contenant l'effluent prélevé avant le dessaleur ont dégradé le phénol. Cet effluent a donc été choisi pour notre étude.

1.2 Conservation

Les paramètres suivants ont été évalués avant la

TABLEAU 1: DÉGRADATION PAR LE CONSORTIUM DU PHÉNOL CONTENU DANS DEUX EFFLUENTS SPÉCIFIQUES DIFFÉRENTS

TEMPS D'INCUBATION APRÈS INOCULATION DU CONSORTIUM (JOURS)	CONCENTRATION DE PHÉNOL (mg/L) DANS LE MILIEU DE CULTURE CONTENANT				
	AUCUN EFFLUENT (témoin)	EFFLUENT ^a AVANT DESSALEUR ^b		EFFLUENT ^a APRÈS DESSALEUR	
		10 % ^c	25 %	10 %	25 %
0	265 ^d	171	158	225	176
5	191	156	115	216	205
10	<10	<10	<10	220	211
15	<10	<10	<10	226	220
20	<10	<10	<10	248	203

a: prélevé le 21-04-1992

b: réacteur permettant d'enlever les sels minéraux

c: % d'effluent contenu dans le milieu de culture

d: tous les chiffres représentent les valeurs moyennes
obtenues de triplicata

congélation et après la décongélation de l'effluent prélevé avant le dessaleur: le pH, le phénol, les composés phénolés, les solides totaux et la demande chimique en oxygène (DCO). Il n'y avait pas de différence significative entre les résultats obtenus (Tableau 2). De plus, les valeurs moyennes obtenues lors de l'étude de la dégradation par le consortium du phénol dans les cultures contenant l'effluent avant congélation et après décongélation sont présentées au Tableau 3. Dans les deux cas, le phénol a été dégradé en moins de dix jours d'incubation à 37°C par le consortium. La congélation a donc été choisie comme méthode de conservation.

1.3 Lot de référence

Un lot de référence a été prélevé le 16-06-1992 et testé pour voir s'il était conforme à nos attentes. Le phénol dans les cultures contenant 10% (v/v) d'effluent du lot de référence a été complètement transformé par le consortium en acide benzoïque après sept jours d'incubation (Tableau 4). Tel que prévu, le prolongement de l'incubation de cette culture a entraîné la dégradation complète de l'acide benzoïque qui s'était accumulé.

2. CARACTÉRISATION

Les valeurs moyennes obtenues pour certains

**TABLEAU 2: ÉVALUATION DE CERTAINS PARAMÈTRES AVANT LA
CONGÉLATION ET APRÈS LA DÉCONGÉLATION
D'UN EFFLUENT SPÉCIFIQUE**

PARAMÈTRES	EFFLUENT ^a avant dessaleur ^b	
	AVANT CONGÉLATION	APRÈS DÉCONGÉLATION
pH	9,5 ^c	9,5
Phénol (mg/L)	63	52
Composés phénolés (mg/L)	77	80
Solides totaux (mg/L)	82	106
DCO (mg/L)	1 692	1 450

a: prélevé le 21-04-1992

b: réacteur permettant d'enlever les sels minéraux

c: tous les chiffres représentent les valeurs moyennes obtenues de triplicata

TABLEAU 3: DÉGRADATION DU PHÉNOL DANS UN EFFLUENT AVANT LA CONGÉLATION ET APRÈS LA DÉCONGÉLATION

TEMPS D'INCUBATION APRÈS INOCULATION DU CONSORTIUM (JOURS)	CONCENTRATION DE PHÉNOL (mg/L) DANS LE MILIEU DE CULTURE CONTENANT DE L'EFFLUENT ^a AVANT LE DESSALEUR		
	AUCUN (témoin)	AVANT CONGÉLATION 10 % ^b	APRÈS DÉCONGÉLATION 10 %
0	230 ^c	214	180
5	174	81	63
10	<10	<10	<10
15	<10	<10	<10

a: prélevé le 21-04-1992

b: % d'effluent contenu dans le milieu de culture

c: tous les chiffres représentent les valeurs moyennes obtenues de triplicata

TABLEAU 4: DÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LE CONSORTIUM DANS L'EFFLUENT DE RÉFÉRENCE^a

TEMPS D'INCUBATION APRÈS INOCULATION DU CONSORTIUM (JOURS)	CONCENTRATION DE PHÉNOL (mg/L) DANS LE MILIEU DE CULTURE CONTENANT DE L'EFFLUENT			
	AUCUN (témoin)		10 % ^b	
	Phénol	Acide benzoïque	Phénol	Acide benzoïque
0	175 ^c	0	214	0
3	155	45	162	41
5	76	107	81	107
7	<10	135	<10	117
9	<10	59	<10	<10
11	<10	<10	<10	<10

a: effluent prélevé le 16-06-1992, avant le dessaleur

b: % d'effluent contenu dans le milieu de culture

c: tous les chiffres représentent les valeurs moyennes obtenues de triplicata

paramètres, incluant tous ceux faisant l'objet de normes du Ministère de l'Environnement du Québec sont présentées au Tableau 5. Les paramètres légiférés ont été évalués avant congélation et après décongélation et les différences entre les valeurs obtenues ne sont pas significatives.

Des concentrations respectant les normes ont été observées seulement pour les solides en suspension et le pH. L'effluent dépassait donc les normes pour les composés phénolés, les huiles et graisses, l'azote ammoniacal et les sulfures.

Les valeurs obtenues démontrent que le phénol représente environ 70 % des composés phénolés contenus dans l'effluent. La majorité des solides étaient sous forme dissoute. Le rapport théorique optimal concernant le carbone organique total, l'azote total et le phosphore soit 100:10:1 n'est pas respecté dans l'effluent. L'azote total est en excès par rapport aux deux autres paramètres, tel qu'illustré par le rapport 100:36:1,3 ou 76:27:1.

La valeur obtenue pour la toxicité démontre que l'effluent est très toxique. Seulement 2% d'effluent sont nécessaires pour provoquer une diminution de 50% de la lumière émise par la suspension de bactéries.

TABLEAU 5: CARACTÉRISATION DE L'EFFLUENT DE RÉFÉRENCE^a

PARAMÈTRES	EFFLUENT		
	AVANT CONGÉLATION	APRÈS DÉCONGÉLATION	NORMES
pH	9,0 ^b	9,2	6,0-9,5 ^c
Phénol (mg/L)	150	156	NI
o-crésol (mg/L)	18	25	NI
m-crésol (mg/L)	26	34	NI
p-crésol (mg/L)	14	18	NI
Composés phénolés (mg/L)	186	178	2,0
Huiles et graisses (mg/L)	57	61	18
Azote ammoniacal (mg/L)	70	75	14
Sulfures (mg/L)	4,0	3,2	0,6
Solides totaux (mg/L)	ND	199	NI
Solides volatils totaux (mg/L)	ND	65	NI
Solides en suspension (mg/L)	3,0	3,2	41
Solides volatils en suspension (mg/L)	ND	0,03	NI
Solides dissous (mg/L)	ND	103	NI
Solides volatils dissous (mg/L)	ND	40	NI
DCO (mg/L)	2 538	2 738	NI

TABLEAU 5: CARACTÉRISATION DE L'EFFLUENT DE RÉFÉRENCE^a (suite)

PARAMÈTRES	EFFLUENT		
	AVANT CONGÉLATION	APRÈS DÉCONGÉLATION	NORMES
Carbone organique total (mg/L)	ND	198	NI
Azote total (mg/L)	ND	71,4	NI
Phosphore (mg/L)	ND	2,6	NI
Toxicité EC50 (%)	ND	2	NI

a : effluent prélevé le 16-06-1992

b : tous les chiffres représentent les valeurs moyennes
obtenues de triplicata

c : les normes ont été converties en mg/L en considérant le
nombre de barils traités par jour et le débit des eaux
usées à la raffinerie

ND : non déterminé

NI : norme inexistante

Les analyses microbiologiques effectuées sur l'effluent ont révélé qu'après cent jours d'incubation à 37°C, le phénol et le cyclohexanol contenus dans les cultures liquides inoculées avec 12,5% d'effluent n'ont pas été dégradés. De plus, aucune colonie n'a été observée sur les géloses sang inoculées avec l'effluent après trente jours d'incubation à 37°C en condition anaérobie stricte. C'est donc dire qu'aucune bactérie anaérobie dégradant ou non le phénol ou le cyclohexanol n'a pu être mise en évidence dans l'effluent.

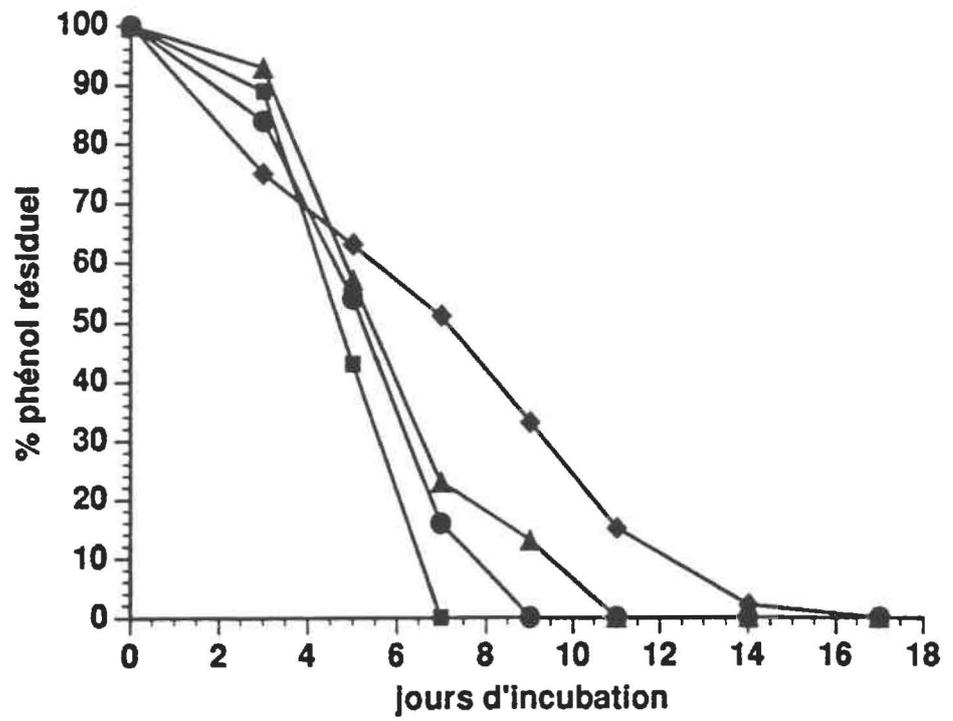
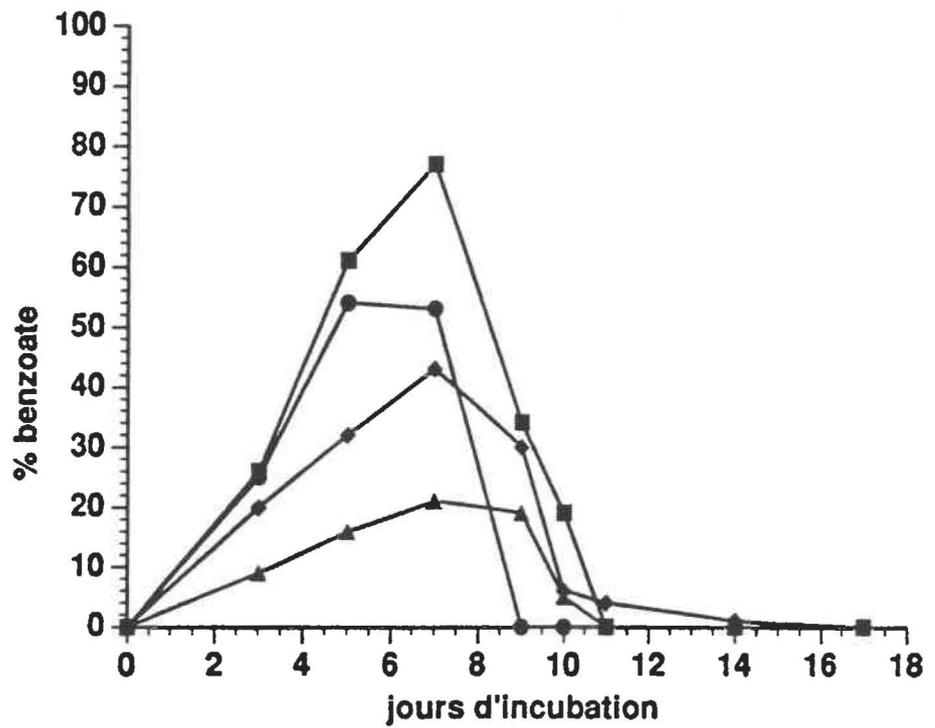
3. TRAITEMENT ANAÉROBIE DE L'EFFLUENT

3.1 Adaptation du consortium

L'augmentation de la concentration d'effluent contenu dans le milieu de culture a ralenti la transformation du phénol par le consortium (Figure 8). Dix jours d'incubation supplémentaires sont nécessaires pour les cultures contenant 100% d'effluent, auquel les éléments du milieu de culture sont ajoutés à l'état solide, par rapport aux cultures sans effluent (témoin) pour obtenir la transformation complète du phénol par le consortium.

L'acide benzoïque a aussi été dosé dans cette expérience. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 8. L'acide benzoïque s'est accumulé pendant les sept premiers jours

Figure 8 : Dégradation du phénol A) et dosage de l'acide benzoïque B) dans les cultures contenant différentes concentrations d'effluent. Témoin 0 % d'effluent (■), 25 % effluent (●), 50 % effluent (▲), 100 % effluent (◆).

A**B**

d'incubation, puis a été dégradé par le consortium dans toutes les cultures. La plus forte accumulation a été observée dans la culture transformant le phénol plus rapidement, soit celle ne contenant pas d'effluent.

Étant donné que nous avons maintenu un consortium dans un milieu de culture contenant 50 % d'effluent, il a été possible de suivre l'évolution de la vitesse de transformation du phénol après différents nombres de sous-cultures. La transformation du phénol par le consortium a été plus rapide après 17 sous-cultures effectuées en présence de 50% d'effluent (Figure 9). Seulement cinq jours d'incubation à 37°C ont été nécessaires pour transformer complètement le phénol dans cette sous-culture, comparativement à onze pour le consortium non adapté.

3.2 Effet de la composition du milieu de culture

La dégradation du phénol a été suivie dans les cultures effectuées avec des milieux de composition variée et contenant 100% d'effluent (Figure 10). Aucune dégradation n'est survenue dans l'effluent seul et dans l'effluent additionné du milieu sans le protéose peptone, comparativement à l'effluent additionné de tous les éléments du milieu de culture dans lequel la dégradation a été presque complète après seulement 13 jours d'incubation. L'addition de protéose peptone à l'effluent a eu

Figure 9 : Transformation du phénol dans différentes sous-cultures.
Première sous-culture (■), troisième sous-culture (●), 17e sous-culture (▲).

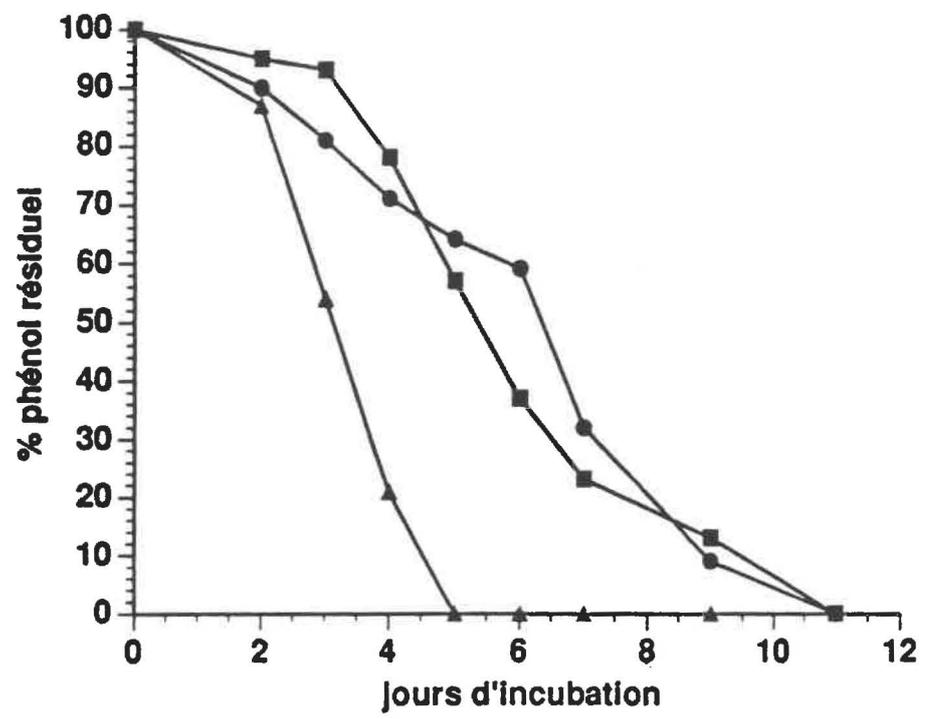
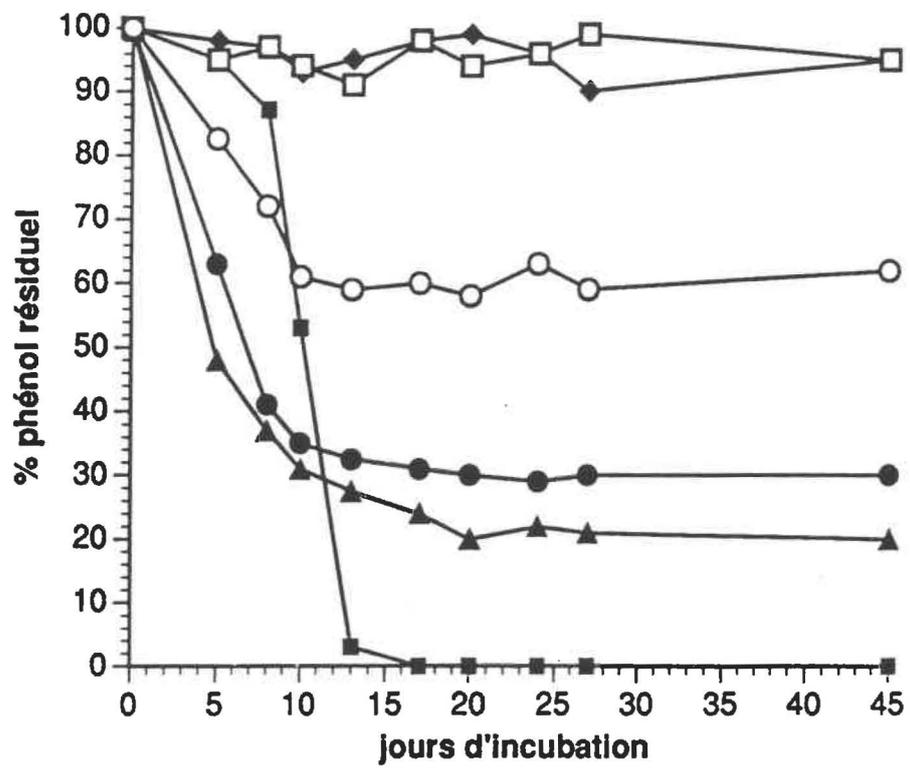


Figure 10 : Transformation du phénol dans différentes cultures avec des milieux de composition variée. Témoin milieu complet (■), sans les vitamines (●), sans les minéraux (▲), sans protéose peptone (◆), effluent additionné de protéose peptone seulement (○), effluent seul (□).



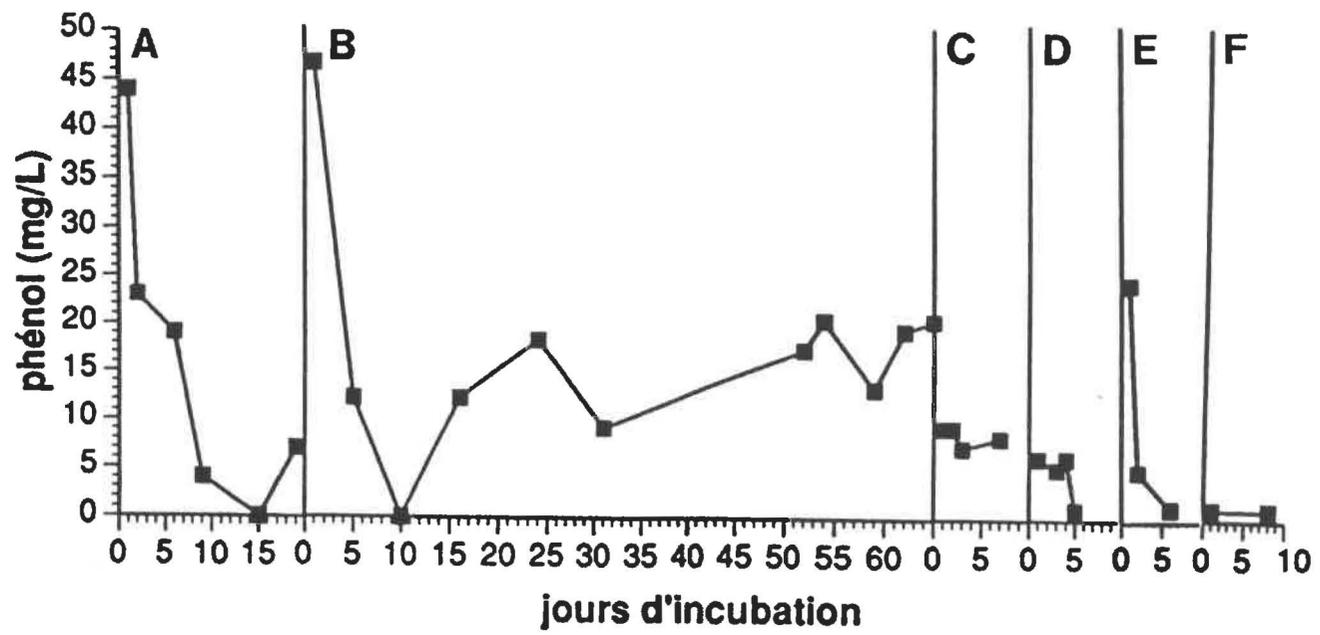
un effet bénéfique puisqu'environ 40 % du phénol a été dégradé après plus de 13 jours d'incubation. L'enlèvement des minéraux ou des vitamines du milieu a eu un effet moindre, étant donné que 70 à 80 % du phénol a été dégradé dans ces cultures après une vingtaine de jours d'incubation. De plus, la dégradation du phénol n'a été complète que dans le milieu contenant tous les éléments. Dans les autres cultures, un minimum a été atteint et celui-ci n'a pu être franchi, même après la prolongation de l'incubation.

3.3 Réacteur anaérobie à film fixe

Le phénol a été dosé à la sortie des réacteurs alimentés en semi-continu, à raison de deux heures consécutives par jour (30mL/heure) sans recirculation en circuit fermé, ce qui correspondait à un TRH de 24 heures. Les résultats obtenus sont illustrés à la Figure 11. Après neuf jours à ce régime, le phénol résiduel à la sortie des réacteurs était à une concentration de 4 mg/L. Pendant les dix jours suivants, la concentration du phénol résiduel a varié de ≤ 1 à 7 mg/L. Ce régime a ensuite été changé, soit une alimentation de trois heures consécutives par jour au même débit que précédemment. La concentration du phénol résiduel après 15 jours dans ces conditions, a varié entre 9 et 20 mg/L.

Figure 11 : Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté avec le milieu synthétique contenant 150 mg/L de phénol.

A:	semi-continu;	TRH 24 heures
B:	semi-continu;	TRH 24 heures
C:	semi-continu;	TRH 24 heures
D:	continu	; TRH 24 heures
E:	continu	; TRH 6 heures
F:	continu	; TRH 4 heures



Puis l'alimentation a été effectuée en semi-continu, comme précédemment; mais cette fois, le temps de pompage de deux heures a été réparti sur 24 heures (4 fois 30 minutes, soit 15 mL/30 min) . A ce régime, la phénol résiduel était assez constant à environ 10 mg/L.

Puisque la concentration de phénol résiduel à la sortie des réacteurs était assez faible, ils ont été par la suite alimentés en continu avec un TRH de 24 heures (2,5 mL/heure). Dans ces conditions, la concentration de phénol résiduel était en général légèrement inférieure à celle déjà observée.

Ensuite, le régime a été augmenté à un TRH de 6 heures (10 mL/heure) et le phénol résiduel, après deux jours de ce nouveau régime, était de moins de 5 mg/L. Par la suite, le régime a été augmenté à un TRH de 4 heures (15 mL/heure) et le phénol résiduel était également inférieur à 5 mg/L.

Lorsque les réacteurs ont été alimentés en semi-continu avec le milieu de culture, un pic inconnu a été observé sur les chromatogrammes. Ce produit inconnu a été identifié par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse comme étant l'acide adipique dont la concentration variait entre 0 à environ 150 mg/L. Une solution de phénol deutéré aux cinq positions (phénol-d₅) a été ajoutée au milieu

de culture afin de vérifier si l'acide adipique provenait de la transformation du phénol. Les échantillons analysés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont démontré que l'acide adipique n'était pas marqué dans ces échantillons.

Par la suite, un des réacteurs a été alimenté avec l'effluent pétrochimique auquel les éléments du milieu de culture ont été ajoutés à l'état solide. Le débit a également été augmenté graduellement lorsque la concentration de phénol résiduel à la sortie était faible (Figure 12). La limite atteinte dans ces conditions pour obtenir une concentration résiduelle de phénol variant autour de 20 mg/L était de 4 heures pour le TRH (15 mL/heure). Pour un TRH plus court, la concentration résiduelle de phénol augmentait. La limite pour obtenir une concentration de phénol inférieure à 5 mg/L était de 6 heures pour le TRH (10 mL/heure).

Un essai a été effectué sans l'ajout de l'agent réducteur (Na_2S) à l'effluent. Après un jour d'alimentation à un TRH de 12 heures (5 mL/heure), le phénol résiduel a été dosé à différents intervalles. La concentration du phénol résiduel a été constante à moins de 5 mg/L pendant au moins treize jours (Figure 13).

Figure 12 : Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté en continu avec l'effluent du lot de référence contenant 156 mg/L de phénol.

- A: TRH 24 heures
- B: TRH 12 heures
- C: TRH 6 heures
- D: TRH 4 heures

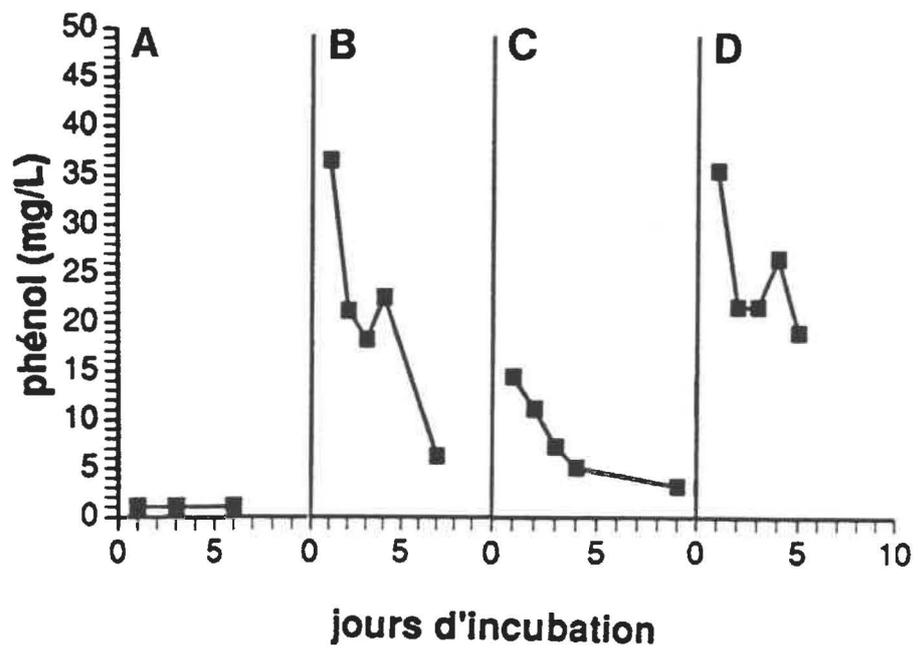
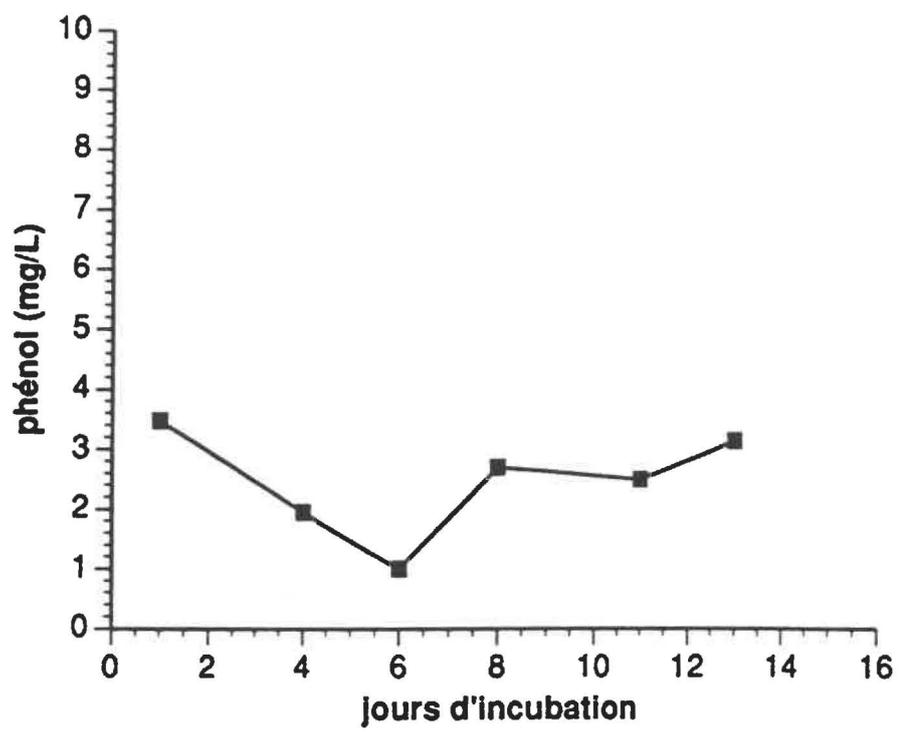


Figure 13 : Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté en continu avec l'effluent du lot de référence (contenant 156 mg/L de phénol) auquel le Na_2S n'a pas été ajouté.



Lorsque le réacteur a été alimenté avec l'effluent sans protéose peptone à un TRH de 12 heures (5 mL/heure), la concentration du phénol résiduel a graduellement augmenté jusqu'à 55 mg/L (Figure 14) après cinq jours à ce régime.

3.3.1 Étude de la performance

Certains paramètres ont été dosés avant et après le traitement anaérobie de l'effluent de référence en réacteur pour un TRH de 6 heures (avec Na_2S) ou 12 heures (sans Na_2S). Les résultats obtenus sont présentés au Tableau 6. Pour un TRH de 6 heures, 98 % du phénol, 79 % du o-crésol et 83 % des composés phénolés contenus dans l'effluent ont été dégradés alors que la concentration des m- et p-crésols, de l'azote ammoniacal et des huiles et graisses n'a pas diminué. Sous ces conditions, la toxicité a également été diminuée par un facteur d'environ 2. Pour un TRH de 12 heures (sans Na_2S), un résultat similaire a été obtenu pour la toxicité, soit une diminution d'un facteur d'environ 2. L'ajout du Na_2S à l'effluent a entraîné une augmentation de la toxicité de l'effluent mais ceci n'a pas semblé influencer le traitement. En général, la concentration des solides a été diminuée, soit une réduction de 24 % pour les solides totaux et 57 % pour les solides volatils totaux ainsi que 20 % pour les solides dissous et 72 % pour les solides volatils dissous mais par contre, la concentration des solides en suspension et volatils en suspension n'a pas été réduite. De

Figure 14 : Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté en continu avec l'effluent du lot de référence (contenant 156 mg/L de phénol) auquel le protéose peptone n'a pas été ajouté.

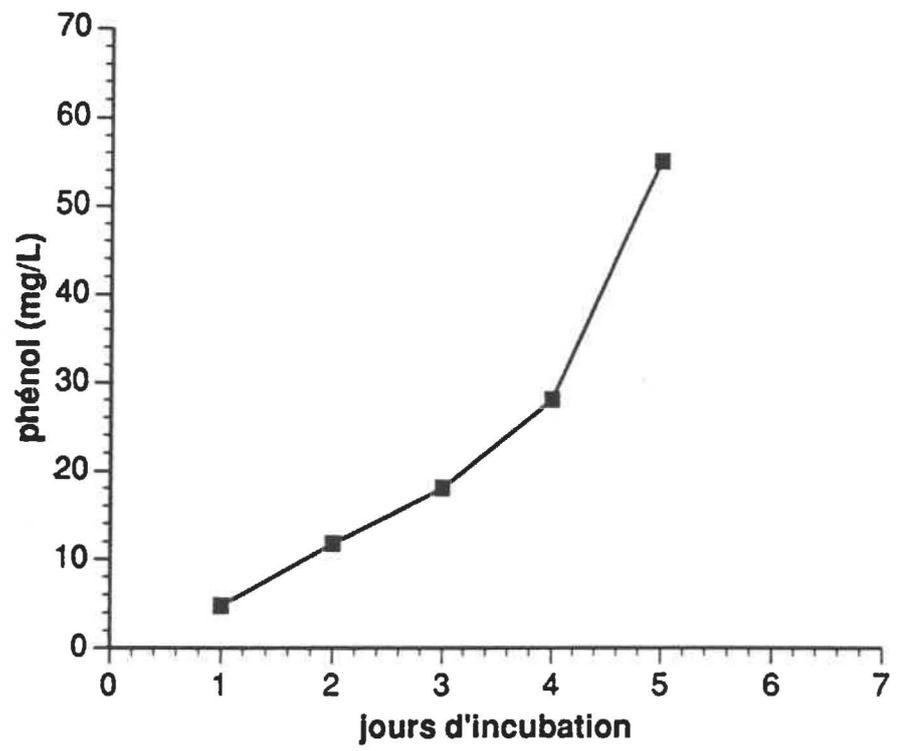


TABLEAU 6: PERFORMANCE DU RÉACTEUR ANAÉROBIE

PARAMÈTRES	EFFLUENT AVANT TRAITEMENT	EFFLUENT APRÈS TRAITEMENT	% de RÉDUCTION
pH ^a	7,5 ^c	7,7	ND
Phénol (mg/L) ^a	148	4	98
o-crésol (mg/L) ^a	27	6	79
m-crésol (mg/L) ^a	40	38	6
p-crésol (mg/L) ^a	20	18	12
Composés phénolés (mg/L) ^a	168	29	83
Azote ammoniacal (mg/L) ^a	230	200	13
Huiles et graisses (mg/L) ^a	41	45	ND
Toxicité EC50 (%) ^a	2,9	5,2	50
Solides totaux (mg/L) ^b	2 100	1 600	24
Solides volatils totaux (mg/L) ^b	820	350	57
Solides en suspension (mg/L) ^b	5,0	20	ND
Solides volatils en suspension (mg/L) ^b	6,0	16	ND
Solides dissous (mg/L) ^b	1 740	1 400	20
Solides volatils dissous (mg/L) ^b	470	130	72
Sulfures (mg/L) ^b	10	3	70
Toxicité EC50 (%) ^b	4,6	8,5	50

a : TRH = 6 heures avec Na₂S

b : TRH = 12 heures sans Na₂S

c : tous les chiffres représentent les valeurs moyennes
obtenues de triplicata

ND: non déterminé

plus, une réduction de 70 % a été obtenue pour la concentration des sulfures.

3.3.2 Autre effluent

Le deuxième effluent spécifique, prélevé au même endroit que le lot de référence, a été sommairement caractérisé (Tableau 7). La concentration de phénol obtenue était de 367 mg/L et la toxicité exprimée en EC50 était de 1,3 %. Ce deuxième effluent contient donc plus de phénol et est plus toxique que l'effluent du lot de référence. Visuellement, il contenait aussi plus d'huiles et graisses et de matières en suspension que l'effluent du premier lot de référence et il avait une coloration orangée.

Le réacteur anaérobie a été alimenté en continu avec cet effluent auquel les éléments du milieu de culture ont été ajoutés à l'état solide. Au début l'effluent a été dilué afin de permettre l'adaptation du biofilm et le débit a également été augmenté graduellement lorsque la concentration de phénol résiduel à la sortie était faible (Figure 15). Pour débiter, l'effluent a été dilué 1:3 et la concentration de phénol résiduel était inférieure à 5 mg/L pour les TRH de 6 heures (10 mL/heure) et de 5 heures (12 mL/heure). Par contre, lorsque le régime a été augmenté à un TRH de 4 heures (15 mL/heure), la

TABLEAU 7: CARACTÉRISATION DU DEUXIÈME EFFLUENT^a

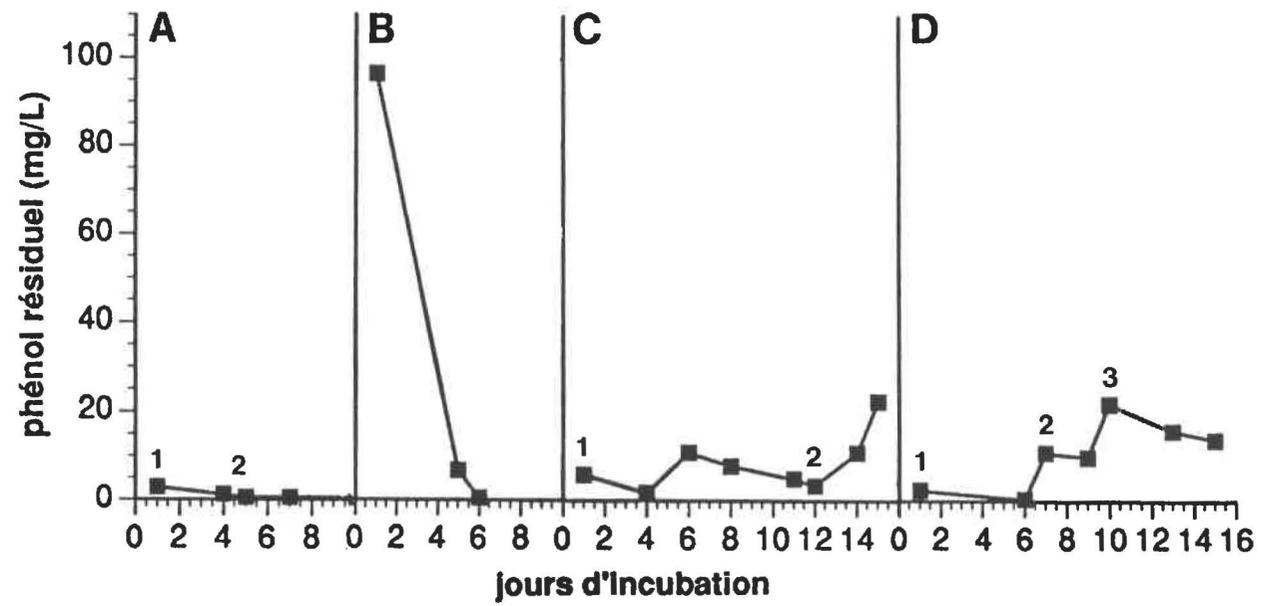
PARAMÈTRES	EFFLUENT
pH	8,3 ^b
Phénol (mg/L)	367
o-crésol (mg/L)	89
m-crésol (mg/L)	83
p-crésol (mg/L)	62
Toxicité EC50 (avec Na ₂ S) (%)	1,3

a: prélevé le 12-05-1993

b: tous les chiffres représentent les valeurs moyennes obtenues de triplicata

Figure 15 : Concentration du phénol résiduel à la sortie du réacteur alimenté en continu avec le 2^e effluent pétrochimique (contenant 367 mg/L de phénol) prélevé avant le déssaleur.

- A: effluent dilué 1:3
 - 1: TRH 6 heures
 - 2: TRH 5 heures
- B: effluent dilué 1:2
 - TRH 5 heures
- C: effluent dilué 3:4
 - 1: TRH 5,7 heures
 - 2: TRH 4,5 heures
- D: effluent non dilué
 - 1: TRH 7,8 heures
 - 2: TRH 7 heures
 - 3: TRH 6 heures



concentration de phénol résiduel à la sortie était d'environ 100 mg/L, et ce pendant trois jours d'alimentation.

Ensuite, l'effluent a été dilué 1:2 et le réacteur a été alimenté avec un TRH de 5 heures (12 mL/heure). Après un jour à ce nouveau régime, la concentration du phénol résiduel était de 95 mg/L mais celle-ci a diminué pour atteindre 0,5 mg/L après six jours d'alimentation.

La dernière dilution de cet effluent a été 3:4. La concentration de phénol résiduel a varié entre 2 et 11 mg/L pendant onze jours d'alimentation selon un TRH de 5,7 heures (10,5 mL/heure). Lorsque le régime a été augmenté à un TRH de 4,5 heures (13 mL/heure), la concentration de phénol résiduel était de 22,5 mg/L après six jours d'alimentation.

Par la suite, le réacteur a été alimenté avec le deuxième effluent spécifique non dilué. Pour un TRH de 7,8 heures (7,7 mL/heure), la concentration de phénol résiduel était inférieure à 5 mg/L. Lorsque le régime a été augmenté à un TRH de 7 heures (8,6 mL/heure) et de 6 heures (10 mL/heure), la concentration de phénol résiduel a passé à environ 10 et 17 mg/L. Donc, le TRH minimum obtenu, permettant d'obtenir une concentration de phénol résiduel inférieure à 5 mg/L pour le traitement de l'effluent non dilué, était de 7,8 heures.

Sous ces conditions, la quantité de gaz produit a été évaluée à environ 68,3 mL/L par heure. De plus, les échantillons de gaz analysés par chromatographie en phase gazeuse ont démontré qu'il y avait production de méthane au cours du traitement de l'effluent.

3.3.3 Microscopie électronique à transmission

Les observations au microscope électronique ont démontré que toutes les formes microbiennes du consortium de départ ont été retrouvées dans les échantillons du biofilm resuspendu provenant, soit du réacteur alimenté avec l'effluent du lot de référence, soit du réacteur alimenté avec le milieu de culture. Aucune différence n'a été observée entre les échantillons provenant des deux réacteurs (en continu) et les échantillons provenant de cultures en bouteilles sérologiques (en cuvée). Une vue d'ensemble des microorganismes constituant le biofilm est présentée à la Figure 16 et quelques-uns des microorganismes sont présentés à la Figure 17. En général, des agglomérats de méthanogènes (chaînes) (a), des cocco-bacilles Gram négatifs à faibles ondulations (b), des bâtonnets Gram positifs (c) et un type de long filament (d) ont été observés.

Figure 16: Micrographie électronique du biofilm resuspendu présent sur les pierres du réacteur alimenté avec l'effluent pétrochimique observé dans un champ A) et un autre champ B): méthanogènes (a), cocco-bacilles Gram négatifs à faibles ondulations (b), bâtonnets Gram positifs (c) et long filament (d).

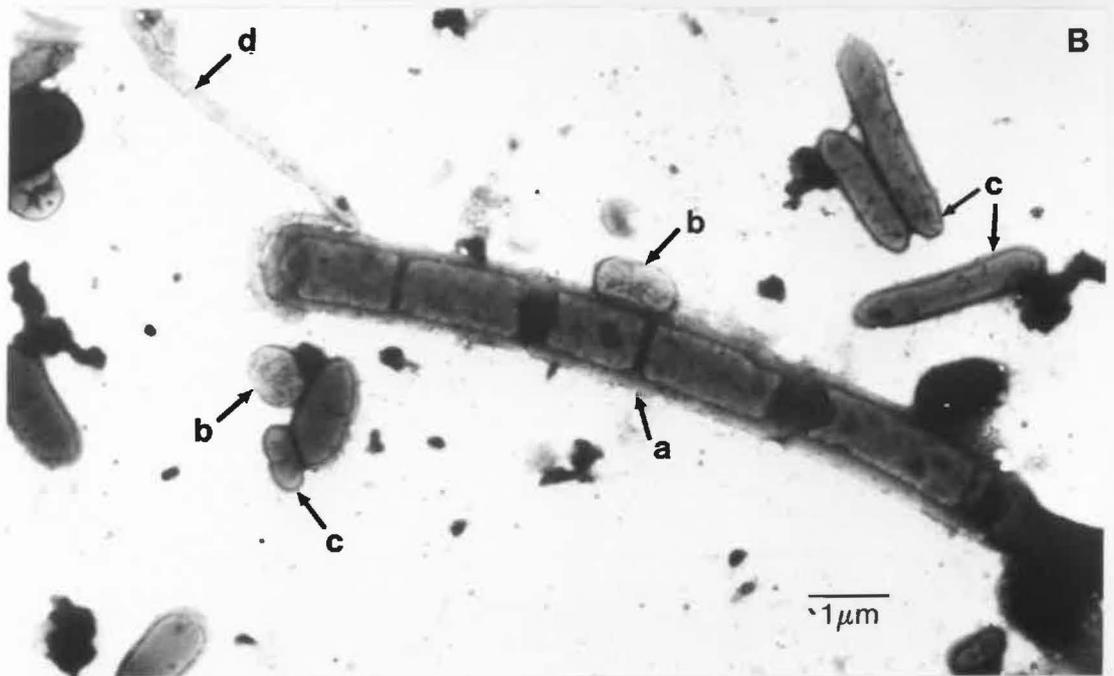
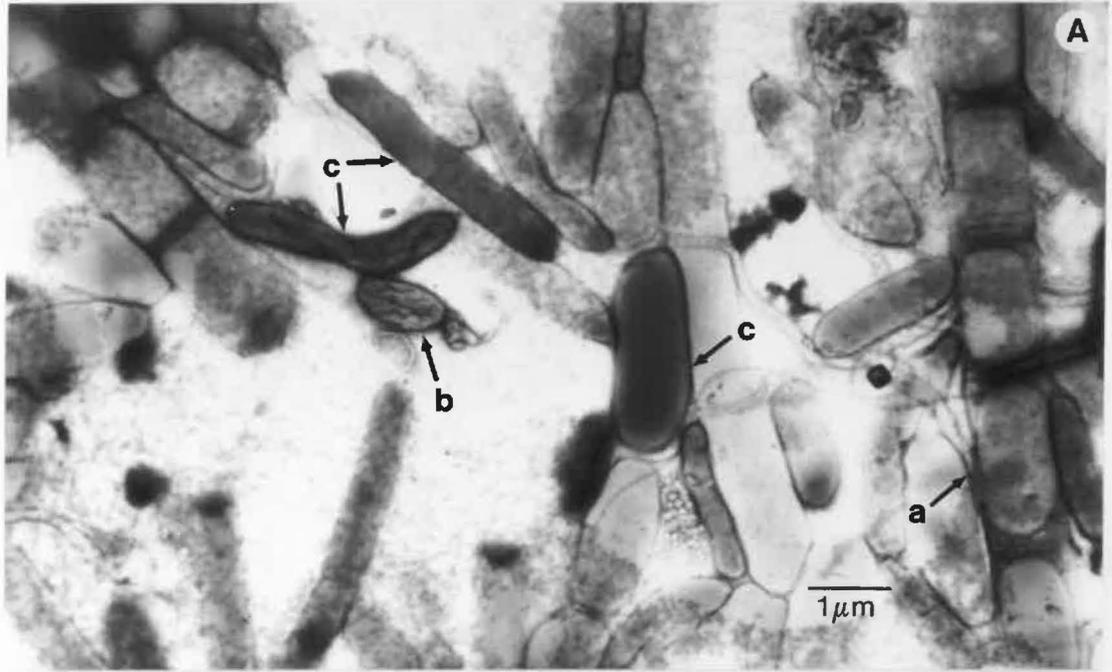
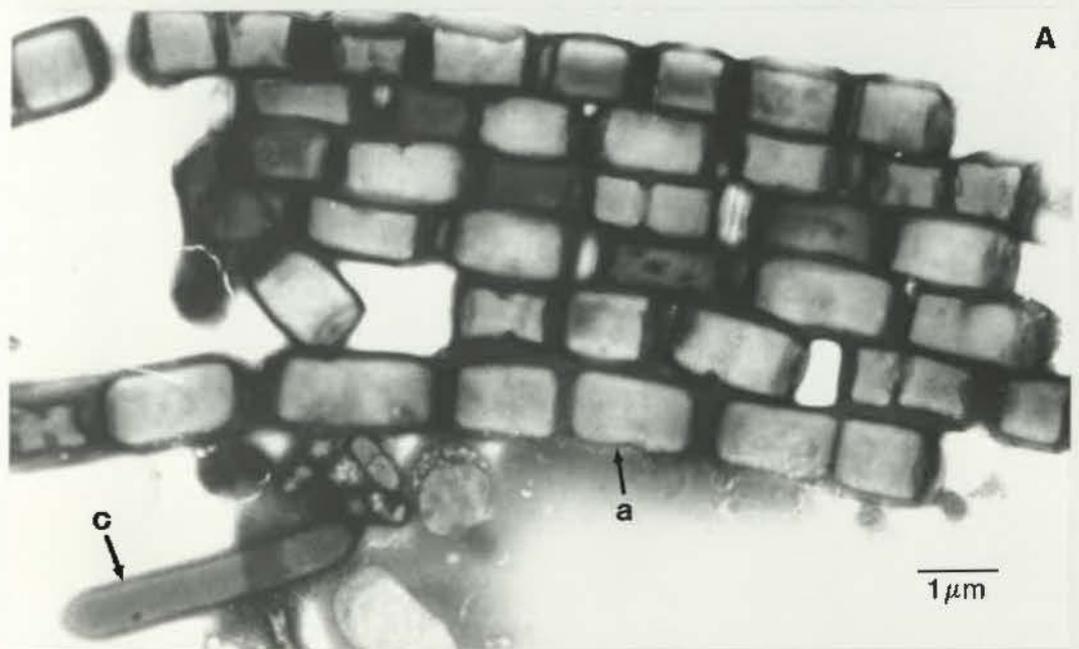


Figure 17 : Micrographie électronique montrant quelques-uns des microorganismes du biofilm observé dans un champ A) et un autre champ B): méthanogènes (a), cocco-bacilles Gram négatifs à faibles ondulations (b) et bâtonnets Gram positifs (c).



DISCUSSION

1. EFFLUENT PÉTROCHIMIQUE

Ce travail a été orienté vers le traitement non pas d'un effluent pétrochimique global comme l'ont fait d'autres auteurs (Tyagi et al., 1993; Britz et al., 1983) ou un mélange de plusieurs effluents spécifiques différents (Parker et Farquhar, 1989; Vogel et Winter, 1988) mais plutôt d'un effluent spécifique, compte tenu de sa forte concentration en phénol et de son volume réduit. Des deux effluents spécifiques testés, celui provenant après le dessaleur a inhibé complètement la transformation du phénol par le consortium, et ce, même en faible concentration. Ceci pourrait être dû entre autres à la forte concentration d'ions chlorures, caractéristique de cet effluent (M. Guillemette, communication personnelle). De plus, la concentration plus élevée d'huiles et graisses et de matières en suspension dans cet effluent pourrait jouer un rôle.

L'effluent prélevé avant le dessaleur a été retenu pour cette étude puisqu'il n'a pas inhibé l'activité du consortium. Le phénol a été transformé en présence de cet effluent par la même voie métabolique que celle rapportée par Béchard et al. (1990) dans le milieu de culture de Boyd et al. (1983) enrichi de protéose peptone. C'est-à-dire que le phénol est d'abord transformé en acide benzoïque qui est par la suite dégradé.

Il a été démontré que la congélation n'avait aucun effet significatif sur les constituants de l'effluent et que l'activité du consortium n'a pas été modifiée. Donc, comme Cross et al. (1982) et Giabbai et al. (1985) l'ont fait pour des effluents de gazéification du charbon, la congélation a été choisie comme méthode de conservation de l'effluent pétrochimique spécifique. Un volume important de l'effluent avant le dessaleur a été prélevé pour constituer un lot de référence permettant d'éviter les fluctuations d'un lot à l'autre causées par l'utilisation de bruts différents ou par des problèmes d'opération aux unités de production. Ceci permet aussi une meilleure comparaison des résultats obtenus d'une expérience à l'autre.

2. CARACTÉRISATION

La caractérisation de l'effluent spécifique choisi a permis d'identifier les composés qui ne respectaient pas les normes de rejet du Ministère de l'Environnement du Québec (Anonyme, 1983), à savoir les composés phénolés, les huiles et graisses, l'azote ammoniacal et les sulfures. Ceci veut donc dire qu'un traitement efficace de l'effluent est nécessaire avant son rejet dans l'environnement, principalement pour abaisser la concentration de ces composés.

A notre connaissance, il n'y a eu que seulement trois études portant sur le traitement en conditions anaérobies d'un effluent pétrochimique dans lesquelles l'effluent a été chimiquement caractérisé (Parker et Farquhar, 1989; Vogel et Winter, 1988; Britz et al., 1983). Dans le cas où un effluent global a été utilisé (Britz et al., 1983), la concentration des composés phénolés et du phénol est inférieure à celle obtenue pour l'effluent spécifique du lot de référence, mais la DCO est supérieure pour l'effluent global. Une étude en conditions aérobies (Tyagi et al., 1993) où un effluent global a été utilisé après un traitement primaire, a démontré que la concentration du phénol était également inférieure à celle obtenue dans cette étude pour l'effluent spécifique. Cependant, dans ce cas, la DCO et la concentration de l'azote ammoniacal étaient inférieures à celles observées dans la présente étude, ce qui démontre la grande variabilité dans la composition des effluents pétrochimiques.

Lorsqu'un mélange de différents effluents spécifiques a été utilisé (Parker et Farquhar, 1989; Vogel et Winter, 1988), la concentration de phénol a généralement été plus élevée que celle observées dans les effluents globaux. La concentration des composés phénolés pour l'effluent spécifique de référence était similaire à celle du mélange des effluents utilisé par Parker et Farquhar (1989) mais la DCO, la concentration du carbone organique total, de l'azote total et du phosphore était

supérieure pour le mélange des effluents. Par contre, le contraire a été obtenu pour le mélange des effluents spécifiques utilisé par Vogel et Winter (1988). La DCO était similaire alors que la concentration des composés phénolés, dont le phénol et le m-crésol, était inférieure à celle obtenue pour l'effluent spécifique de référence. Ces auteurs ont également déterminé que la concentration du phénol de leur effluent représentait environ 64 % des composés phénolés alors que dans cette étude un pourcentage légèrement plus élevé, soit 73 %, a été observé. Il est donc difficile de comparer les résultats obtenus au cours du traitement de l'effluent de référence avec ceux des autres études, puisqu'il existe une grande variabilité dans la composition des différents effluents spécifiques et globaux. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences, tels que la sorte de brut utilisé, les différents paramètres d'opération et la nature des produits pétroliers raffinés.

Le rapport carbone organique total, azote total et le phosphore obtenu pour l'effluent de référence, soit 100:36:1,3 (76:27:1), ne correspond pas au rapport théorique optimal de 100:10:1. Pour maximiser le rendement de l'activité microbienne, ce rapport devrait être équilibré afin de respecter le rapport théorique, soit en ajoutant une source de carbone assimilable et de phosphore.

La toxicité n'a pas été évaluée dans les études mentionnées précédemment où l'effluent pétrochimique utilisé a été caractérisé. Celle-ci est rarement évaluée dans les études puisque ce paramètre ne fait pas l'objet d'une norme. Par contre, il serait prévu dans le nouveau règlement (automne 1995) l'ajout d'une norme pour la toxicité (M. Guillemette, communication personnelle). La limite permise n'est pas encore déterminée mais elle devra être évaluée par des bioessais utilisant les truites arc-en-ciel (CL50 96 heures), les daphnies (CL50 24 heures) ou le Microtox (EC50 %). Certaines études ont comparé la sensibilité du Microtox avec celle des bioessais utilisant les truites arc-en-ciel et les daphnies pour certains composés organiques (Munkittrick et al., 1991; Qureshi et al., 1982; Burks et al., 1981; Lebsack et al., 1981). Munkittrick et al. (1991) ont démontré que le Microtox a été plus sensible que les deux autres bioessais pour le chloroforme, le styrène, les composés phénolés, l'éthanol et les pentadiones substitués. Le Microtox est peu utilisé même s'il est rapide et possède une grande sensibilité pour plusieurs composés. De plus, Qureshi et al. (1982) ont démontré que le Microtox était plus sensible que les deux autres bioessais (dix fois plus) pour les effluents pétrochimiques.

Erten et al. (1992) ont évalué la toxicité d'un effluent pétrochimique global à l'aide des bioessais utilisant les crevettes (Mysidopsis bahia) et les poissons vairons

(Cyprinodon variegatus). Cet effluent a démontré une concentration similaire à celle que nous avons obtenue pour le carbone organique total, mais la concentration des solides en suspension était supérieure et celle du phénol était de beaucoup inférieure (0,014 mg/L). La toxicité de cet effluent global a varié entre 9 et 68 % pour la LC50. La toxicité de l'effluent spécifique de référence exprimée en EC50 était de 2 %, c'est-à-dire qu'une solution contenant 2% de l'effluent réduisait de 50 % la bioluminescence phosphobactérienne. Il est difficile de comparer ces deux toxicités puisqu'elles n'ont pas été déterminées par la même méthode. Une solution aqueuse de phénol ayant la même concentration que celle de l'effluent de référence, possédait une toxicité quatre fois moindre, soit une EC50 de 8,6 %. Erten et al. (1992) ont également évalué la toxicité de certains composés en solution dont le phénol. Ils ont démontré par régression linéaire qu'aucune corrélation n'existe entre la concentration du phénol en solution et la toxicité de l'effluent contenant une concentration identique de phénol. La toxicité serait donc, selon Erten et al. (1992), due à une interaction entre certains polluants plutôt qu'à un seul. Il est donc certain que la toxicité de l'effluent spécifique que nous avons utilisé ne peut pas être seulement attribuée au phénol. L'effluent contiendrait d'autres composés organiques et inorganiques toxiques qui pourraient potentiellement nuire à l'activité bactérienne du consortium lors du traitement.

Généralement, peu de contrôles bactériologiques sont effectués dans les études sur le traitement des effluents (Tyagy *et al.*, 1993; Tanemura *et al.*, 1992; Parker et Farquhar, 1989; Vogel et Winter, 1988; Britz *et al.*, 1983). La présence ou non de bactéries dans l'effluent à traiter n'est pas importante puisque l'inoculum utilisé dans ces études est rarement défini. Dans notre cas, un contrôle bactériologique s'imposait afin de s'assurer que la transformation du phénol était effectuée par le consortium de bactéries anaérobies définies (isolé par Beaudet *et al.*, 1986) utilisé comme inoculum. Stroo (1992) a mentionné dans son étude que, de façon générale, la population microbienne indigène est relativement faible dans les effluents industriels. Les résultats ont démontré qu'aucune croissance de bactéries anaérobies et facultatives n'a été observée sur les milieux solides inoculés avec l'effluent et de plus, qu'en culture liquide, le phénol ou le cyclohexanol n'a pas été transformé après addition de l'effluent spécifique. Par conséquent, aucune bactérie anaérobie dégradant ou non le phénol ou le cyclohexanol ne semble présente dans l'effluent. Cette absence de microorganismes pourrait être attribuée au pH alcalin (9,2) et à la température élevée, variant entre 104 et 121⁰C, de l'effluent spécifique qui a été préalablement chauffé lors du raffinage. Donc, l'effluent peut être utilisé directement sans stérilisation et l'activité observée doit être attribuée au consortium inoculé.

3. TRAITEMENT ANAÉROBIE DE L'EFFLUENT

La transformation du phénol a été ralentie proportionnellement à l'augmentation de la concentration de l'effluent dans les différentes cultures en cuvée. Comme mentionné précédemment, l'effluent contiendrait en plus du phénol d'autres composés organiques et inorganiques toxiques. Puisque le consortium non-adapté, c'est-à-dire inoculé pour la première fois dans une culture contenant 100 % d'effluent, a seulement été ralenti et non inhibé, ceci implique qu'une adaptation du consortium pourrait être possible. L'adaptation de microorganismes à des effluents industriels a été rapportée dans la littérature (Bradford et Krishnamoorthy, 1991; Anonyme, 1990) et McGinnis *et al.* (1988) ont observé une dégradation plus rapide des hydrocarbures aromatiques polycycliques par une population bactérienne adaptée.

La vitesse de transformation du phénol en fonction du nombre de sous-cultures effectuées a été évaluée à l'aide d'un milieu contenant 50 % d'effluent afin de démontrer s'il y a ou non adaptation du consortium. Puisqu'après 17 sous-cultures, la transformation complète du phénol a nécessité six jours d'incubation de moins, ceci impliquerait que le consortium a été adapté à l'effluent pétrochimique.

L'ajout des éléments nutritifs à l'état solide à l'effluent augmente le coût du traitement. Dans l'éventualité d'un traitement de l'effluent à l'échelle industrielle, la minimisation des coûts de fonctionnement est nécessaire. Afin de déterminer les éléments nutritifs strictement nécessaires, l'effet de la composition du milieu de culture a été évalué en bouteilles sérologiques (en cuvée). Les résultats obtenus sont difficilement comparables avec ceux retrouvés dans la littérature puisque les approches utilisées diffèrent. Le consortium défini de bactéries anaérobies a jusqu'à maintenant été maintenu dans le milieu minimal de Boyd et al. (1983) enrichi de protéose peptone. Afin de faciliter l'adaptation à l'effluent, tous ces éléments ont été ajoutés à l'état solide. Par la suite, ces éléments ont été éliminés un à un. En général, les autres auteurs ont utilisé une boue non définie de microorganismes et une sélection s'est effectuée en présence des différents effluents à traiter (Parker et Farquhar, 1989; Vogel et Winter, 1988). Donc, relativement peu d'éléments nutritifs sont ajoutés puisqu'aucun milieu synthétique précis n'a été utilisé. A titre d'exemple, Britz et al. (1983) ont ajouté à l'effluent pétrochimique seulement du sulfate d'ammonium et du phosphate acide de potassium. Cross et al. (1982) ont ajouté à un effluent de gazéification du charbon, un effluent de composition semblable à celle d'un effluent pétrochimique, du glucose lors de la phase d'adaptation et ensuite, seulement un mélange de phosphate de sodium et de phosphate de potassium. Il

a déjà été démontré par Béchard et al. (1990) que le consortium transforme le phénol par co-métabolisme en présence de protéose peptone dans le milieu de culture et son addition à l'effluent semble être également nécessaire, puisque le phénol n'a pas été transformé dans les cultures sans protéose peptone et dans l'effluent seul. De plus, l'effluent ne peut compenser pour l'absence des minéraux et des vitamines dans le milieu de culture standard même après ajout de protéose peptone. C'est donc dire que dans un éventuel traitement industriel avec ce consortium, il faudrait absolument enrichir l'effluent avec du protéose peptone, des sels minéraux et des vitamines. Des travaux additionnels devraient être entrepris avant l'utilisation du consortium à une échelle industrielle pour trouver un substitut adéquat et moins dispendieux au protéose peptone et peut-être aussi pour définir plus précisément les besoins en minéraux et vitamines du consortium.

Comme Lovan et Force (1971) et Canovas-Diaz et Howell (1987) l'ont fait, le réacteur a été alimenté dans un premier temps avec un milieu synthétique et graduellement ce milieu a été remplacé par l'effluent à traiter, ceci ayant pour but de favoriser le développement du biofilm. Quelques paramètres importants pour un démarrage optimal, tel que démontré par Wu (1981), ont été respectés. Par exemple, l'inoculum était important, soit 12,5 % v/v, et le temps de rétention hydraulique initial était long, soit un mois. Annachhatre et Bhamidimarri

(1992) ont suggéré de suivre les paramètres de cultures optimums des microorganismes lors du démarrage d'un réacteur puisqu'ils ont un effet positif sur le développement du biofilm. Dans cet ordre d'idée, les réacteurs ont donc été incubés à 37°C après avoir ajusté le pH du milieu synthétique à 7,5.

Au cours de l'alimentation des réacteurs avec le milieu de culture, de l'acide adipique a été observé dans le milieu, après traitement. L'acide adipique est un intermédiaire possible d'une des voies de dégradation du phénol par fermentation méthanique (Kobayashi et al., 1988). Bisailon et al. (1991) ont démontré que la voie de dégradation du phénol par le consortium de bactéries anaérobies en cultures en cuvée ne semble pas inclure cet acide adipique même si ce dernier peut être métabolisé par le consortium. L'essai avec le phénol marqué a démontré que l'acide adipique ne provenait pas de la dégradation du phénol puisqu'il n'était pas marqué. Donc, la formation du biofilm ne semble pas avoir modifié les microorganismes du consortium et la même voie de transformation du phénol en acide benzoïque serait utilisée. L'acide adipique proviendrait donc du protéose peptone et il s'accumulerait sous les conditions rencontrées dans le réacteur mais non sous celles des cultures en cuvée.

En général, de un à trois mois sont nécessaires pour la phase de démarrage d'un réacteur anaérobie à film fixe

(Annachhatre et Bhamidimarri, 1992). Vogel et Winter (1988) ont remplacé le milieu synthétique par l'effluent pétrochimique après trois mois d'alimentation. Par contre, Seif et al. (1992) ont complété en un mois le remplacement graduel du milieu synthétique par un effluent pharmaceutique, mais quatre et six mois ont été respectivement nécessaires pour la stabilisation de leurs réacteurs mésophile et thermophile. Dans cette étude, pour plus de certitude, un temps d'attente de cinq mois d'alimentation en semi-continu et continu avec le milieu de culture a été utilisé.

Après que le biofilm ait été adapté à l'effluent, la performance du réacteur a été évaluée. La toxicité, les composés phénolés dont le phénol et le o-crésol, les sulfures, les solides totaux et volatils totaux et les solides dissous et volatils dissous ont diminué dans l'effluent au cours du traitement. La concentration résiduelle des solides totaux et dissous obtenue dans ces conditions est supérieure à celle obtenue lors de la caractérisation de l'effluent de référence. Cette différence pourrait être attribuée à l'ajout des différents éléments du milieu de culture à l'état solide à l'effluent de référence, lors de l'évaluation de la performance, augmentant ainsi la concentration des solides dissous ainsi que celle des solides totaux.

Un rendement supérieur à celui atteint par Parker et Farquhar (1989) a été obtenu. En effet, pour un TRH de trois jours, ils ont observé plus de 75 % de dégradation des composés phénolés alors que dans cette étude, après un TRH de seulement six heures, 83 % des composés phénolés ont été transformés par le biofilm. De plus, leur réacteur a été alimenté avec un effluent pétrochimique dilué (1:2) et dont la concentration des composés phénolés variait entre 71 et 112 mg/L. Dans la présente étude, une concentration plus élevée de composés phénolés a été dégradée en moins de temps et avec un rendement supérieur.

Vogel et Winter (1988) ont obtenu la transformation complète du phénol et des composés phénolés présents dans l'effluent pétrochimique, soit respectivement 58 et 90 mg/L pour un TRH de 10 jours avec un réacteur alimenté en semi-continu. Il est difficile de comparer les rendements puisque leur réacteur a été alimenté en semi-continu et le nôtre en continu, et que le TRH minimal n'a pas été déterminé dans leur cas. Cependant, les rendements rapportés par ces auteurs semblent inférieurs à ceux obtenus dans la présente étude (98 % phénol, 83 % composés phénolés) puisque les concentrations de phénol et de composés phénolés dans notre effluent sont supérieures (148 mg/L, 168 mg/L) et ce, pour un TRH de seulement 6 heures.

Dans une autre série d'expériences, Vogel et Winter (1988) ont déterminé qu'en augmentant la concentration de phénol dans l'effluent et en maintenant le TRH à 10 jours, que le taux de dégradation maximal du phénol dans ces conditions était de 1 200 mg/L par jour. Ce résultat semble légèrement supérieur au taux obtenu ici, soit 612 mg/L par jour (156 mg/L de phénol - 3 mg/L de phénol résiduel = 153 mg/L de phénol dégradés après un TRH de 6 heures; alors pour 24 heures: $153 \text{ mg/L} \times 4 = 612 \text{ mg/L}$ par jour) et 1 124 mg/L par jour (368 mg/L de phénol - 3 mg/L de phénol résiduel = 365 mg/L de phénol dégradés après un TRH de 7,8 heures; alors pour 24 heures: $365 \text{ mg/L} \times 3,08 = 1 124,2 \text{ mg/L}$ par jour) mais encore là, la comparaison est difficile à faire puisque l'expérimentation n'a pas été faite de la même façon. L'étude de Vogel et Winter portant sur la concentration maximale pouvant être dégradée pour un TRH de 10 jours alors que dans ce travail le TRH était ajusté de façon à obtenir une concentration résiduelle de phénol de $< 5 \text{ mg/L}$.

De plus, 79 % du o-crésol a été transformé par le biofilm. Dans la littérature, peu de travaux ont démontré la dégradation du o-crésol (Bisaillon et al., 1991; Rudolphi et al., 1991; Suflita et al., 1989). Cet isomère du crésol est plutôt considéré comme récalcitrant en conditions anaérobies (Kuhn et al., 1988; Wang et al., 1988; Smolenski et Suflita, 1987; Boyd et al., 1983; Horowitz et al., 1982) et dans certaines études, alors que le m- et p-crésol ont été dégradés,

le o-crésol a persisté (Suidan et al., 1981). Le consortium utilisé est reconnu pour dégrader le o- mais non le m- et p-crésol (Bisaillon et al., 1993) en cultures liquides (cuvées). Le spectre d'activité du biofilm ne semble pas avoir été modifié par la présence de l'effluent pétrochimique puisqu'une réduction n'a été observée que pour l'isomère o-crésol.

La toxicité a été diminuée par un facteur de 2 par le traitement anaérobie. Cette diminution de la toxicité peut être attribuée, en autres, à la transformation des composés phénolés dont le phénol et le o-crésol. A notre connaissance, dans la littérature, aucune étude ne semble avoir évalué la toxicité avant et après traitement d'un effluent pétrochimique. Des expériences additionnelles seraient nécessaires afin de préciser les composés toxiques persistant après le traitement.

La transformation du phénol par le biofilm n'a pas été affectée lorsque le Na_2S n'a pas été ajouté à l'effluent puisque la concentration du phénol résiduel est demeurée inférieure à 5 mg/L. En fait, le Na_2S agit comme sécurité pour prévenir toute entrée d'oxygène indésirable au cours des expérimentations puisque l'oxygène inhiberait l'activité microbienne. Il est donc possible de se passer du Na_2S sans affecter le traitement en autant qu'il n'y ait pas d'oxygène qui vient inhiber les microorganismes.

Il a déjà été démontré que le protéose peptone était nécessaire pour la transformation du phénol par le consortium (Béchar et al., 1990). Afin de démontrer que le phénol a été transformé par le biofilm et qu'il ne s'agissait pas d'adsorption sur les cellules, le réacteur a été alimenté avec l'effluent sans protéose peptone. Cette procédure a été suivie jusqu'à ce qu'une concentration de phénol résiduel de 55 mg/L soit atteinte et ce, afin d'éviter d'endommager le biofilm. Donc, la concentration du phénol résiduel a graduellement augmenté, ce qui confirme que le phénol est transformé par le biofilm.

Un deuxième effluent a été prélevé avant le dessaleur afin de vérifier si le réacteur pouvait traiter efficacement un effluent de composition différente. Au niveau de la raffinerie, la composition des effluents spécifiques et de l'effluent global varie constamment. Ces fluctuations peuvent être occasionnées par exemple par l'utilisation de bruts différents, par un problème d'opération ou la nature des produits pétroliers à raffiner. Le système de traitement des eaux usées doit être assez performant pour supporter ces différentes variations.

La caractérisation de ce deuxième effluent a révélé qu'il était plus concentré en phénol et en crésols et qu'il est deux fois plus toxique que le premier effluent de référence. Cette variation de la composition de ces deux effluents est

probablement due à l'unité de production traitant certains résidus pétroliers lourds, générés à des étapes précédentes du raffinage du brut, qui a été ajouté à la raffinerie entre les deux prélèvements des effluents spécifiques. La transformation du phénol par le consortium dans les cultures en bouteilles sérologiques contenant ce deuxième effluent a été ralentie d'environ 15 jours.

Le biofilm a transformé le phénol dans ce second effluent après un TRH de 7,8 heures et a permis de réduire la concentration de phénol résiduel à une valeur inférieure à 5 mg/L. Ce résultat est excellent puisque même si la concentration de phénol double dans ce deuxième effluent, le TRH n'a augmenté que de seulement 1,8/heure. Lorsque les taux de transformation du phénol sont comparés, soit 612 mg/L par jour pour l'effluent de référence et 1 124 mg/L pour jour pour le deuxième, le réacteur anaérobie semble plus performant lorsqu'alimenté avec le deuxième effluent spécifique. Ceci pourrait peut-être s'expliquer par la présence d'une biomasse plus abondante avec le deuxième effluent, mais aucune étude n'a été effectuée pour confirmer cette hypothèse. Le taux de transformation obtenu semble similaire à celui de Vogel et Winter (1988) lorsqu'ils ont déterminé le taux maximum de leur réacteur en augmentant jusqu'à 1 200 mg/L par jour la concentration de phénol dans l'effluent. Ces résultats

suggèrent que le réacteur anaérobie pourrait supporter certaines variations de la composition des effluents à traiter.

L'analyse des gaz produits lors du traitement du deuxième effluent spécifique par le biofilm a démontré la présence de méthane. Ceci confirmerait l'activité et la présence de toutes les formes microbiennes du consortium puisqu'en cultures liquides avec le milieu de culture, le consortium transforme le phénol jusqu'au méthane. Donc cet effluent, malgré sa toxicité élevée, n'aurait pas inhibé les méthanogènes qui sont reconnus comme étant des microorganismes très sensibles.

Des échantillons du biofilm ont été observés au microscope électronique et comparés avec le consortium standard en suspension (bouteilles sérologiques). Toutes les formes morphologiques du consortium ont été observées dans les échantillons du biofilm resuspendu. La présence de l'effluent pétrochimique ne semble pas avoir modifié le consortium de bactéries anaérobies.

CONCLUSION

L'effluent pétrochimique spécifique, qui a servi de lot de référence, était caractérisé par une concentration élevée de composés phénolés constitués principalement de phénol. De plus, il a démontré une forte toxicité. Les normes du Ministère de L'Environnement du Québec n'étaient pas respectées pour les composés phénolés, les huiles et graisses, l'azote ammoniacal et les sulfures. Seulement le pH et les solides en suspension respectaient les normes provinciales.

Des repiquages successifs ont permis l'adaptation du consortium à l'effluent de référence. Cette adaptation s'est traduite par une accélération de la transformation du phénol par le consortium. L'absence des vitamines et des sel minéraux ainsi que l'ajout du protéose peptone seulement à l'effluent spécifique occasionnent un ralentissement de la transformation du phénol par le consortium. Par contre, la transformation du phénol ne s'effectue que si le protéose peptone a été ajouté à l'effluent.

Le réacteur anaérobie à film fixe à écoulement ascendant a transformé efficacement le phénol et le o-crésol présents dans l'effluent. Pour un TRH de seulement 6 heures (10 ml/heure), une excellente performance a été obtenue, soit une transformation de 98 % du phénol et 79 % du o-crésol. De plus, la toxicité de l'effluent a été diminuée de moitié. La concentration des solides totaux et dissous ainsi que celle des

sulfures a été réduite par le biofilm. Les autres contaminants légiférés n'ont pas été significativement éliminés (TRH de 12 heures).

Le consortium de bactéries anaérobies ne semble pas avoir été modifié par l'exposition prolongée du biofilm à l'effluent. Le réacteur possède la capacité de s'adapter à des variations de la composition de l'effluent. Une performance supérieure a même été obtenue avec le deuxième effluent comparativement au premier, en dépit de sa plus grande concentration en phénol et de sa toxicité.

On peut donc conclure que la biodégradation anaérobie, par le consortium de bactéries définies à l'aide d'un réacteur ascendant à film fixe, peut être utilisée efficacement pour traiter des effluents pétrochimiques fortement concentrés en phénol.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier sincèrement:

Le docteur François Lépine pour avoir accepté de diriger ce travail ainsi que pour sa constante disponibilité, pour ses conseils judicieux et son appui tout au long de ma maîtrise.

Le docteur Jean-Guy Bisailon pour avoir accepté d'être le co-directeur de cette recherche ainsi que pour sa constante disponibilité, ses qualités de communication et de compréhension et de son appui tout au long de ma maîtrise.

Monsieur Louis Racine pour son aide technique et sa présence stimulante dans le laboratoire.

Madame Rita Alary et monsieur Guy McSween pour leur aide précieuse et leurs conseils pertinents.

Monsieur Gilles Paquette pour son assistance avec le Microtox.

Monsieur Marc Guillemette, superviseur, Contrôle de la pollution à la raffinerie de Montréal-Est, pour son entière collaboration tout au long de ma maîtrise.

Monsieur Martin Chénier pour son aide précieuse.

Finalemment, je voudrais remercier tous ceux et celles qui ont contribué à rendre mon travail et mon séjour à l'Institut Armand-Frappier, une expérience des plus enrichissantes.

BIBLIOGRAPHIE

ALAIN, R., F.NADON, C. SÉGUIN, P. PAYMENT et M. TRUDEL. 1987. Rapid virus subunit visualisation by direct sedimentation of samples on electron microscope grids, *J. Virol. Methods*, 16: 209-216.

ANNACHHATRE, A.P. et S.M.R. BHAMIDIMARRI. 1992. Microbial attachment and growth in fixed-film reactors: process startup considerations, *Biotechnol. Adv.* 10: 69-91.

ANONYME. 1979. National Cancer Institute. Bioassay of 2, 4, 6-trichlorophenol for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Technical Report Serv. no 155. DHEN Pub. No (NIH) 79-1711. U.S. Government Printing Office. Washington, D.C.

ANONYME. 1983. Règlement sur les effluents liquides des raffineries de pétrole Q-2, r-6, Gouvernement du Québec, éditeur officiel du Québec, 7 pages.

ANONYME. 1990. Advanced biological solutions to liquid effluent problems, *Chem. Eng.* Novembre 15: 22-28.

APHA, AWWA, WPCF. 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 17ième éd., APHA, Washington, É-U.

BAK, F. et F. WIDDEL. 1986. Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by Desulfobacterium phenolicum sp. nov., *Arch. Microbiol.* 146: 177-180.

BALBA, M.T., N.A. CLARKE et W.C. EVANS. 1979. The methanogenic fermentation of plant phenolics, *Biochem. Soc. Trans.*, 7: 1115-1116.

BALCH, W.E., G.E. FOX, L.T. MAGRUM, C.R. WOESE et R.S. WOLFE. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group, *Microbiol. Rev.* 43: 260-296.

BALLERINI, D., M. DORBON, C. GATELLIER et J.P. VANDECASTEELE. 1986. Pétrole et biotechnologies, *Biofutur*, Janvier: 27-47.

BARIK, S., W.J. BRULLA et M.P. BRYANT. 1985. PA-1, a versatile anaerobe obtained in pure culture, catabolizes benzenoids and other compounds in syntrophy with hydrogenotrophs, and P-2 plus Wolinella sp. degrades benzenoids, *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 304-310.

BEAUDET, R., J.G. BISAILLON, M. ISHAQUE et M. SYLVESTRE. 1986. Isolation of an anaerobic bacterial consortium degrading phenolic compounds-assay in swine waste, *Agric. Wastes*, 17: 131-140.

BÉCHARD, G. 1988. Étude d'un consortium de bactéries anaérobies dégradant le phénol et le p-crésol en conditions méthanogènes. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval (Canada).

BÉCHARD, G., J.-G. BISAILLON et R. BEAUDET. 1990. Degradation of phenol by a bacterial consortium under methanogenic conditions, *Can. J. Microbiol.* 36: 573-578.

BERRY, D.F., A.J. FRANCIS et J.M. BOLLAG. 1987. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions, *Microbiol. Rev.* 51: 43-59.

BISAILLON, J.-G., F. LÉPINE, R. BEAUDET et M. SYLVESTRE. 1991a. Carboxylation of o-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2131-2134.

BISAILLON, J.-G., F. LÉPINE et R. BEAUDET. 1991b. Study of methanogenic degradation of phenol via carboxylation to benzoate, *Can. J. Microbiol.* 37: 573-576.

BISAILLON, J.-G., F. LÉPINE, R. BEAUDET et M. SYLVESTRE. 1993. Potential for carboxylation-dehydroxylation of phenolic compounds by a methanogenic consortium, *Can. J. Microbiol.* 39: 642-648.

BONASTRE, N. et J.M. PARIS. 1989. Survey of laboratory, pilot, and industrial anaerobic filter installations, *Process Biochem.* 24: 15-21.

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: 50-54.

BRADFORD, M.L. et R. KRISHNAMOORTHY. 1991. Consider bioremediation for the waste site cleanup, *Chem. Eng. Prog.* 87: 80-85.

BRITZ, T.J., L.C. MEYER et P.J. BOTES. 1983. Anaerobic digestion of a petrochemical effluent, *Biothechnol. Lett.* 5: 113-118.

BURKS, S.L., M. AMALON et E.F. STEBLER. 1981. Comparison of acute response of *Microtox*, *Daphnia magna* and fathead minnows to oil refinery wastewaters. Unpublished manuscript, Environmental Protection Agency.

CANOVAS-DIAZ, M. et J.A. HOWELL. 1987. Stratified ecology techniques in the startup of an anaerobic downflow fixed film percolating reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 30: 289-296.

- CECCHI, F., P.G. TRAVERSO, J. MATA-ALVAREZ, J. CLANCY et C. ZAROR. 1988. State of the art of R & D in the anaerobic digestion process of municipal solid waste in Europe, *Biomass*, 16: 257-284.
- CHMIELOWSKI, J. 1965. Biochemical degradation of some phenols during methane fermentation, *Zesk. Nauk. Politech. Salska. Inz. (Pol)*, 8: 97.
- CHOU, W.L., R.E. SPEECE et R.H. SIDDIQI. 1978. Methane production from the anaerobic treatment of Petrochemical wastewaters, Drexel University, Philadelphia, PA, Final Report NSF/6I/43864.
- CROSS, W.H., E.S.K. CHIAN, F.G. POHLAND, S. HARPER, S. KHARKAR, S.S. CHENG et F. LU. 1982. Anaerobic biological treatment of coal gasifier effluent, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 12, 349 - 363.
- DOLD, P.L. 1989. Current practice for treatment of petroleum refinery wastewater and toxics removal, *Water Poll. Res. J. Canada*, 24: 363-390.
- DUTTON, P.L. et W.C. EVANS. 1969. The metabolism of aromatic compounds by *Rhodospseudomonas palustris*, *J. Biochem.* 113: 525-536.
- ECKENFELDER, W.W., Jr., J. PATORZKA et A. T. WATKIN. 1985. Wastewater treatment, *Chem. Eng.* 92: 60-74.
- ERTEN, M.U., A.B. GELDERLOOS, J.S. HUGHES et C.H. WALLACE. 1992. An industrial toxicity reduction evaluation for an oily wastewater treatment plant, 47th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings, Lewis Publishers, Inc, Michigan, 61-72.
- EVANS, W.C. 1977. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments, *Nature*, 270: 17-22.
- EVANS, W.C. et G. FUCHS. 1988. Anaerobic degradation of aromatic compounds, *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 289-317.
- FEDORAK, P.M. et S.E. HRUDEY. 1984. Batch anaerobic methanogenesis of phenolic coal conversion wastewater, *Water Sci. & Technol.* 21: 133-143.
- FEDORAK, P.M. et S.E. HRUDEY. 1986. Anaerobic treatment of phenolic coal conversion wastewater in semicontinuous cultures, *Water Res.* 20: 113-122.

- FRIGON, J.-C. 1992. Caractérisation et traitement anaérobie du lixiviat d'un lieu d'enfouissement sanitaire. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval (Canada).
- GALLERT, C. et J. WINTER. 1992. Comparison of 4-hydroxybenzoate decarboxylase and phenol carboxylase activities in cell-free extracts of a defined, 4-hydroxybenzoate and phenol-degrading anaerobic consortium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 119-124.
- GIABBAI, M.F., W.H. CROSS et E.S. K. CHIAN. 1985. Characterization of major and minor organic pollutants in wastewaters from coal gasification processes, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 20: 113-129.
- GOLDMAN, J.C., Jr. et P.T. BOWEN. 1992. Exploring wastewater treatment: A treasure chest of technologies, *Pollut. Eng.* 24: 57-62.
- GORONSZY, M.C., W.W. ECKENFELDER et E. FROELICH. 1992. Waste water, *Chem. Eng.* 99: 78-83.
- GRBIC-GALIC, D. 1986. Anaerobic production and transformation of aromatic hydrocarbons and substituted phenols by ferrilic acid-degrading BESA-inhibited methanogenic consortia, *FEMS Microbiol. Eco.* 38: 161-169.
- GRBIC-GALIC, D. et T.M. VOGEL. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures, *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 254-260.
- GUYER, M. et G. HEGEMAN. 1969. Evidence for a reductive pathway for the anaerobic metabolism of benzoate, *J. Bacteriol.* 99: 906-907.
- HARWOOD, C.S. et J. GIBSON. 1986. Uptake of benzoate by *Rhodopseudomonas palustris* grown anaerobically in light, *J. Bacteriol.* 165: 504-509.
- HEALY, J.B., Jr. et L.Y. YOUNG. 1978. Catechol and phenol degradation by a methanogenic population of bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 216-218.
- HENDRIKSEN, H.V. et B.K. AHRING. 1992. Metabolism and kinetics of pentachlorophenol transformation in anaerobic granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 662-666.
- HOROWITZ, A., D.R. SHELTON, C.P. CORNELL et J.M. TIEDJE. 1982. Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digested sludge, *Dev. Ind. Microbiol.* 23: 435-444.

HOVIOUS, J.C., J.A. FISHER et R.A. CONWAY. 1972. Anaerobic treatment of synthetic organic wastes, U.S. EPA Report, Projet no. 12020 dis.

HUTBER, D.W. et D.W. RIBBONS. 1983. Involvement of coenzyme A esters in the metabolism of cyclohexane-carboxylic acid by Rhodopseudomonas palustris, J. Gen. Microbiol. 129: 2413-2420.

JEANNIN, P. 1986. Dégradation du phénol en conditions méthanogènes. Aspects microbiologiques et biochimiques, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I et École Vétérinaire de Lyon, Lyon (France).

JONES, W.J., D.P. NAGLE, Jr et W.B. WHITMAN. 1987. Methanogens and the diversity of archaebacteria, Microbiol. Rev. 51: 135-177.

KINDZIERSKI, W.B. 1989. Enhanced anaerobic biological treatment of phenolic wastewaters, Dans: Diss. Abstr. Int. (1990) 50: 3054.

KNOLL, G. et J. WINTER. 1987. Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge. Benzoate formation from phenol and CO₂ in the presence of hydrogen, Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 384-391.

KNOLL, G. et J. WINTER. 1989. Degradation of phenol via carboxylation to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 318-324.

KOBAYASHI, T., T. HASHINAGA, E. MIKAMI et T. SUZUKI. 1988. Methanogenic degradation of phenol and benzoate acclimated sludge, The 14th IAWPRC Biennial International Conference, Brighton, 17-22 July.

KOHRING, G.W., X. ZHANG, D.D. DALTON et J. WIEGEL. 1988. Anaerobic degradation of 2,4-dichloroaromatics: temperature effect and enrichment of degrading organisms. Abstr. Ann. Mtng. Am. Soc. Microbiol. Q63-293.

KUHN, E.P., J. ZEYER, P. EICHER et R.P. SCHEVARZENCACH. 1988. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns, Appl. Environ. Microbiol. 54: 490-496.

LANOUILLE, K.H. 1977. Treatment of phenolic wastes, Chem. Eng, 17: 99-106.

LEBSACK, M.E., A.D. ANDERSON, G.M. DeGRAEVE et H.L. BERGMAN. 1981. Comparison of bacterial luminescence and fish bioassay results for fossil-fuel process wastes and phenolic constituents, Dans: D.R. Branson et K.L. Dickson (eds), Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference, ASTM STP 737, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 348-356.

LOVAN, C.R. et E.G. FORCE. 1971. The anaerobic filter for the treatment of brewery press liquor waste, Proc. Purdue Ind. Waste Conf. 20: 1076.

MAH, R.A., D.M. WARD, L. BARESI et T.L. GLASS. 1977. Biogenesis of methane, Ann. Rev. Microbiol. 31: 309-341.

MCGINNIS, G.D., H.BORAZJANI, L.K. McFARLAND, D.F. POPE et D.A. STROBEL. 1988. Characterization and laboratory soil treatability studies for creosote and pentachlorophenol sludges and contaminated soil, EPA/600/2-88/055: 251.

MICROBICS CORPORATION. 1990. Microtox[™] manual, How to run toxicity tests using the Microtox model 500.

MUNKITTRICK, K.R., E.A. POWER et G.A. SERGY. 1991. The relative sensitivity of Microtox, Daphnid, Rainbow trout and fathead minnow acute lethality tests, Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal, 6: 35-61.

NEUFELD, R.D., D.M. JOHN et J.P. STRAKEY. 1980. Anaerobic phenol biokinetics, J. Water Poll. Control Fed. 52: 2367-2377.

PAILTHORP, R.E., G.A. RICHTER et J.W. FILBERT. 1971. Anaerobic secondary treatment of potato-process wastewater, 44th Water Pollution Control Federation Annual Conference, San Francisco.

PARKER, W. et G. J. FARQUHAR. 1989. Treatment of a petrochemical wastewater in an anaerobic packed bed reactor, Water Poll. Res. J. of Canada, 24: 195-205.

QURESHI, A.A., K.W. FLOOD, S.R. THOMPSON, S.M. IANHURST, C.S. INNIS et D.A. ROKOSH. 1982. Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents, Dans: J.G. Pearson, R.B. Foster et W.E. Bishop (eds), Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, Philadelphia, 179-195.

REBHUN, M. et N. GALIL. 1987. Biotreatment inhibition by hazardous compounds in an integrated oil refinery, Proceedings 42nd Purdue University Industrial Waste Conference: 163-174.

- ROBERTS, D.J. et P.M. FEDORAK. 1986. Comparison of the fates of the methyl carbons of m-cresol and p-cresol in methanogenic consortia, *Can. J. Microbiol.* 33: 335-338.
- RUDOLPHI, A., A. TSCHECH et G. FUCHS. 1991. Anaerobic degradation of cresol by denitrifying bacteria, *Arch. Microbiol.* 155: 238-248.
- SAMSON, R. 1991. Importance de l'hydrodynamique dans la conception et l'opération des digesteurs anaérobies, *Sci. Tech. Eau*, Vol. 35-43.
- SCHINK, B. 1986. Environmental aspects of degradation potential of anaerobic bacteria, Dans: Biology of Anaerobic Bacteria. eds, H.C. Dubourguier et al. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 2-15.
- SCHNEN, U., K. BRAUN et H.J. KNACKMUS. 1985. Anaerobic degradation of 2-fluorobenzoate by benzoate-degrading, denitrifying bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 161: 321-325.
- SEIF, H.A.A., S.G. JOSHI et S.K. GUPTA. 1992. Effect of organic load and reactor height on the performance of anaerobic mesophilic and thermophilic fixed film reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater, *Environ. Technol.* 13: 1161-1168.
- SHARAK GENTHNER, B.R., W. A. PRICE et F. J. GENTHNER. 1988. Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments, *Abstr. Ann. Mtng. Am. Soc. Microbiol.* K93-222.
- SHARAK GENTHNER, B.R., G.T. TOWNSEND et P.J. CHAPMAN. 1989. Anaerobic transformation of phenol to benzoate via para-carboxylation: use of fluorinated analogues to elucidate the mechanism of transformation, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 162: 945-951.
- SHARAK GENTHNER, B.R., G.T. TOWNSEND et P.J. CHAPMAN. 1990. Effect of fluorinated analogues of phenol and hydroxybenzoates on the anaerobic transformation of phenol to benzoate, *Biodegradation*, 1: 65-74.
- SHARAK GENTHNER, B.R., G.T. TOWNSEND et P.J. CHAPMAN. 1991. para-Hydroxybenzoate as an intermediate in the anaerobic transformation of phenol to benzoate, *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 265-270.
- SLEAT, R. et J.P. ROBINSON. 1984. The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds, *J. Appl. Bacteriol.* 57: 381-384.

- SMOLENSKI, W.J. et J.M. SUFLITA. 1987. Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers, *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 710-716.
- SPEECE, R.D. 1983. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment, *Environ. Sci. & Technol.* 17: 416A-427A.
- STROO, H.F. 1992. Biotechnology and hazardous waste treatment, *J. Environ. Qual.* 21: 167-175.
- SUFLITA, J.M., L. LIANG et A. SAXENA. 1989. The anaerobic biodegradation of o-, m-, p-cresol by sulfate-reducing bacterial enrichment cultures obtained from a shallow anoxic aquifer, *J. Ind. Microbiol.* 4: 255-266.
- SUIDAN, M.T., W.H. CROSS, M. FONG et J.W. CALVERT. 1981. Anaerobic carbon filter for degradation of phenols, *J. Environ. Eng. Div.* 107: 563-579.
- SWITZENBAUM, M.S. et W.J. JEWELL. 1980. Anaerobic attached-film expanded-bed reactor treatment, *J. Water Poll. Control Fed.* 46: 860-872.
- SZEWZYK, R. et N. PFENNIG. 1987. Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov., *Arch. Microbiol.* 147: 163-168.
- TABAKIAN, R.B., P. TRATTNER, et P.N. CHEREMISINOFF. 1978. Oil/Water separation technology: The options available - Part 2.
- TANEMURA, K., K. KIDA, K. IWASAKI et Y. SONODA. 1992. Operation conditions for anaerobic treatment of wastewater from a beer brewery, *J. Ferm. Bioeng.* 73: 332-335.
- TSCHECH, A. et B. SCHINK. 1986. Fermentative degradation of monohydroxy-benzoates by defined syntrophic cocultures, *Arch. Microbiol.* 145: 396-402.
- TSCHECH, A. et G. FUCHS. 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads, *Arch. Microbiol.* 148: 213-217.
- TYAGI, R. D., F.T. TRAN et A. K. M.M. Chowdhury. 1993. Biodegradation of petroleum refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with polyurethane foam attached to the disks, *Water Res.* 27: 91-99.

- VAN LIER, J.B., K.C.F. GROLLE, A.J.M. STAMS, E. C. de MACARIO et G. LETTINGA. 1992. Start-up of a thermophilic upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor with mesophilic granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 130-135.
- VOGEL, P. et J. WINTER. 1988. Anaerobic degradation of phenol and cresol in petrochemical wastewater, Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion, Italy: 689-694.
- WANG, Y.T., M.T. SUIDAN et B.E. RITTMAN. 1986. Anaerobic treatment of phenol by an expanded bed reactor, *J. Water Poll. Control Fed.* 58: 227-233.
- WANG, Y.T., M.T. SUIDAN, J.T. PFEFFER et J. NAJM. 1988. Effects of some alkyl phenols on methanogenic degradation of phenol, *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1277-1279.
- WIDDEL, F. et N. PFENNIG. 1984. Dissimilatory sulfate- or sulfure-reducing bacteria. Dans: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1 éds N.R. KRIEG et J.G. HOLT. Williams et Wilkins, Baltimore. pp. 663-679.
- WILLIAMS, R.J. et W.C. EVANS. 1975. The metabolism of benzoate by Moraxella sp. through anaerobic nitrate respiration, *J. Biochem.* 148: 1-10.
- WOLIN, E.A., M.J. WOLIN et R.S. WOLFE. 1963. Formation of methane by bacterial extracts, *J. Biol. Chem.* 238: 2882-2886.
- WU, Y.C. 1981. Treatment of high strength organic wastes by submerged media reactors: state of the art review, *Proceeding 1st International Conference Fixed-film Biology Processes*, Pittsburgh.
- YOUNG, L.Y. 1984. Anaerobic degradation of aromatic compounds, *Microbiol. Series*, 13: 487-523.
- YOUNG, L.Y. et M.D. RIVERA. 1985. Methanogenic degradation of four phenolic compounds, *Water Res.* 19: 1325-1332.
- ZEIKUS, J.G. 1977. The biology of methanogenic bacteria, *Bacteriol. Rev.* 41: 514-541.
- ZEIKUS, J.G. 1979. Microbial population in anaerobic digestors, 1st International Symposium on Anaerobic Digestion, Cardiff.
- ZEIKUS, J.G. 1982. Microbial intermediary metabolism in anaerobic digestion, Dans: Anaerobic digestion 1981, Hugues et al. eds, Elsevier Biomedical Press, New York, 23-35.

ZHANG, X. et J. WIEGEL. 1990. Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments, Appl. Environ. Microbiol. 56: 1119-1127.

ZINDER, S.H. 1984. Microbiology of anaerobic conversion of organic waste to methane: recent developments, Am. Soc. Microbiol. News, 50: 294-299.

ZINDER, S.H., S.C. CARDWELL, T. ANGUISH, M. LEE et M. KOCH. 1984. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: Methanotrix sp. as an important aceticlastic methanogen, Appl. Environ. Microbiol. 47: 796-802.

