

Titre: Production et caractérisation d'un consortium microbien pour le
Title: traitement de sol contaminé aux produits de préservation du bois

Auteur: Valérie Bécaert
Author:

Date: 1999

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Bécaert, V. (1999). Production et caractérisation d'un consortium microbien pour
le traitement de sol contaminé aux produits de préservation du bois [Mémoire de
maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/8585/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/8585/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Réjean Samson
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PRODUCTION ET CARACTÉRISATION D'UN CONSORCIEL MICROBIEN
POUR LE TRAITEMENT DE SOL CONTAMINÉ AUX PRODUITS DE
PRÉSERVATION DU BOIS

VALÉRIE BÉCAERT

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

MAI 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

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

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

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

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

0-612-57392-3

Canadä

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

PRODUCTION ET CARACTÉRISATION D'UN CONSORCIEL MICROBIEN
POUR LE TRAITEMENT DE SOL CONTAMINÉ AUX PRODUITS DE
PRÉSERVATION DU BOIS

Présenté par : BÉCAERT Valérie

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par jury d'examen constitué de :

M. PERRIER Michel, Ph. D., président

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

Mme DESCHÈNES Louise, Ph. D., membre et codirectrice de recherche

M. COMEAU Yves, Ph. D., membre

CITATIONS

*"Il avait fait alors une grande démonstration de sa découverte
à un Congrès International d'Astronomie.*

Mais personne ne l'avait cru à cause de son costume.

Les grandes personnes sont comme ça"

(Le Petit Prince) Antoine de Saint Exupéry

"J'en ai pas eu des chocolats, moi, Thérèse!"

(Le père Noël est une ordure) Josette

REMERCIEMENTS

Un merci particulier à Réjean Samson et Louise Deschênes, qui ont su me communiquer rigueur et enthousiasme pour la recherche.

Josée Gagnon et Adrienne Savoie, deux femmes qui m'ont inspirées tout au long de la maîtrise et qui ont su me faire comprendre que tout est possible avec de la persévérance.

Sandra, Pierre, Manon et Maude pour leur soutien technique et moral, leurs conseils et leurs encouragements.

Yves, Gontran et Manu pour votre crayon rouge.

Geneviève, Marie-Julie et Katia, pas besoin de vous expliquer.

Tous mes confrères de la chaire pour les nombreux conseils, rires et sourires.

Les partenaires de la chaire pour leur support financier.

Mes parents qui m'ont toujours encouragée et toujours soutenue dans toutes mes entreprises,

et Patrice avec qui je deviens ce que j'aspire à être.

RÉSUMÉ

Depuis l'instauration des critères A, B et C de qualité du sol de la politique du Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF), la biorestauration de sites contaminés aux produits de préservation du bois, plus particulièrement au PCP, est problématique. Le concept de bioaugmentation par sol activé est une technique fort prometteuse qui permettrait d'atteindre le critère C du MEF. La technique de production de sol activé a été développée au cours des cinq dernières années dans le but de produire un inoculum permettant une biodégradation efficace du PCP dans un laps de temps le plus court possible.

Le concept du sol activé repose essentiellement sur le développement d'un consortium provenant d'une fraction de sol contaminé et possédant l'activité recherchée. Cette biomasse immobilisée sur des particules de sol est développée en réacteur par enrichissement sélectif pour son utilisation subséquente comme inoculum pour le traitement de sol contaminé en biopile.

Les travaux de Otte (1998) et Barbeau (1996) ont porté sur la production de sol activé à l'aide de solution de PCP comme substrat d'enrichissement. La bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois à l'aide d'un de ces sols activés a permis la dégradation de 500 mg/kg de PCP à 5 mg/kg en 130 jours. Cependant plusieurs aspects sont encore problématiques. Premièrement, le PCP présent dans un sol est très souvent accompagné d'autres contaminants comme les hydrocarbures pétroliers ($C_{10}-C_{50}$), les dioxines et les furannes, dont il faudra aussi se débarrasser afin de respecter les critères du MEF. Le devenir des impuretés contenues dans une solution de préservation du bois n'a pas encore fait l'objet d'étude. De plus, dans l'optique des nouvelles dispositions de la loi fédérale sur les substances nouvelles concernant les produits de biotechnologies (LPCE), la biomasse produite lors de l'activation d'un sol doit être caractérisée avant de pouvoir utiliser cette technologie à grande échelle.

Afin d'améliorer la technique d'activation des sols et de caractériser la biomasse produite, des essais de bioactivation en laboratoire ont été effectués. Au cours des activations, un réacteur était alimenté au sel de pentachlorophénol (NaPCP) grade technique (tel que fait par Barbeau, 1996), alors qu'un deuxième réacteur alimenté avec une solution commerciale de préservation de bois à base de PCP et de diésel #2. L'hypothèse de base du présent projet était que la production d'une biomasse active sous forme de sol activé à l'aide d'une solution de préservation du bois à base de PCP permet l'acclimatation de la flore indigène à plusieurs contaminants tout en maintenant une bonne activité de dégradation du PCP et en ne modifiant pas la biodiversité de l'inoculum.

En premier lieu, trois activations ont été effectuées dans des réacteurs de 10 L en acier inoxydable. Les milieux de culture étaient constitués de 10% (p/v) de sol contaminé et d'une solution saline minérale (MSM). Deux sols activés étaient produits lors de chaque activation; un qui a été alimenté au NaPCP et un autre qui a été alimenté à l'aide de la solution de préservation du bois.

Une première activation avait pour but de vérifier la possibilité d'activer plus d'une flore microbienne à la fois, ainsi que de mettre au point les techniques de suivi. La deuxième activation avait pour but de comparer l'activité de biodégradation ainsi que les biomasses produites par la technique de bioactivation à l'aide des deux solutions d'activation. Suite aux informations recueillies lors des deux premières activations, une troisième production a été effectuée dans le but de produire un inoculum pour la bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois.

Les résultats obtenus ont permis d'affirmer que l'utilisation de la solution de préservation à base de diésel #2 et de PCP comme contaminant cible lors de la production d'un sol activé, augmente non seulement les capacités de dégradation du PCP de la flore indigène mais aussi stimule la dégradation des hydrocarbures pétroliers. En effet, les taux de dégradation du PCP dans les réacteurs alimentés à la solution de préservation étaient comparables à ceux obtenus dans les réacteurs alimentés au

NaPCP. De plus, le suivi des hydrocarbures pétroliers et des essais de minéralisation en microcosmes avec de l'hexadécane radio-marqué, ont montré la stimulation des bactéries hydrocarbonoclastes.

Une analyse des résultats des comptes microbiens a permis de déterminer que le procédé d'activation avait une influence sur la biodiversité de la flore indigène. En effet, dans les deux réacteurs, la sélection microbienne, due à la spécificité du substrat, a commencé par favoriser les dégradeurs pour ensuite atteindre un second équilibre où d'autres souches tolérantes au PCP ont pu croître grâce au carbone provenant de la mortalité des bactéries.

La comparaison des trois productions de biomasse active a permis de déterminer que la méthode d'alimentation influence l'activité de dégradation du PCP. Les périodes de famine ont ralenti la minéralisation du PCP et probablement celle des hydrocarbures. À l'opposé, les ajouts de PCP faits lorsque l'activité de dégradation était à son maximum ont décuplé les taux de dégradation.

Un bilan de masse sur la deuxième activation, des dibenzo-*p*-dioxines et dibenzofurannes polychlorées, n'a pas permis de conclure à une dégradation malgré la récupération de seulement 52 et 60% en équivalents toxiques dans le réacteur alimenté au NaPCP et le réacteur alimenté à la solution de préservation de bois respectivement.

La deuxième phase du projet portait sur la bioaugmentation d'un sable contaminé aux produits de préservation du bois (110 mg/kg de PCP et 1350 mg/kg de C₁₀-C₅₀). Le principal objectif de cette phase expérimentale était de déterminer l'efficacité des derniers inoculum produits. Trois traitements ont donc été comparés à un sol stérilisé, une bioaugmentation avec un sol activé au NaPCP, une bioaugmentation avec un sol activé à la solution de préservation du bois et une biostimulation (ajout de nutriments).

Les trois traitements étudiés ont permis d'atteindre le critère C du MEF pour la concentration en PCP après 10 semaines dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP, 12 semaines dans les réacteurs traités par biostimulation et 13 semaines dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la SPB. Les bioaugmentations

successives n'ont pas réussi à abaisser la concentration résiduelle du PCP sous 4 mg/kg. Tous les traitements ont réussi à abaisser la concentration de C₁₀-C₅₀ sous le critère B du MEF (700 mg/kg) dès la semaine 4. Selon les résultats de la semaine 13 à 19, les bioaugmentations successives n'ont pas vraiment stimulé la dégradation des hydrocarbures pétroliers.

Le suivi du pH a montré que la majorité de la dégradation des PCP a eu lieu entre la semaine 0 et la semaine 4. Le premier échantillonnage a été effectué à la semaine 5. Les trois traitements étudiés ont montré des performances (taux de dégradation et concentrations finales) similaires autant pour la dégradation du PCP que pour les C₁₀-C₅₀.

Le sol activé à la solution de préservation utilisé pour les essais de bioaugmentation montrait, avant son inoculation, de faibles performances de minéralisation du PCP et de l'hexadécane. Le sol bioaugmenté avec ce sol activé a aussi montré de faibles performances de minéralisation comparativement aux deux autres traitements.

Les résultats obtenus lors des essais de bioaugmentation soulignent deux facteurs importants à considérer lors du choix d'un traitement par ajout de biomasse acclimatée. Premièrement, la bioaugmentation étant une solution plus coûteuse que la simple biostimulation, les capacités de dégradation de la flore indigène du sol doivent être bien établies avant de considérer l'ajout de biomasse. En effet, un sol dont la contamination et les caractéristiques ne nuisent pas au développement d'une flore de dégradeurs efficaces, peut être traité par l'ajout de nutriments et l'apport d'oxygène nécessaires. En second lieu, le caractère inhibiteur observé de l'ajout du sol activé à la solution de préservation de bois soulève une problématique nouvelle dans le domaine de la décontamination des sols qui est le devenir de la biodiversité microbienne de la flore indigène d'un sol lors d'un traitement biologique tel que la bioaugmentation par sol activé. L'écologie des sols fait partie du cycle de la vie de la planète et son déséquilibre peut se répercuter à des niveaux trophiques supérieurs.

ABSTRACT

Since the establishment of the A,B and C criteria for soil and groundwater quality by the Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF), bioremediation of sites contaminated by wood preservation products, especially pentachlorophenol (PCP), is problematic. The concept of bioaugmentation using activated soil is a promising approach that would permit reaching the MEF's C criteria. The activated soil technique was developed during the last five years in order to produce an inoculum capable of degrading PCP efficiently in a short period of time.

The concept of activated soil is based on the enrichment of a consortium from a portion of contaminated soil that demonstrates degradation capacities. This biomass immobilized on soil particles is cultivated in bioreactors and fed with a targeted contaminant. Once the desired biomass density is reached, it is used as an inoculum to treat contaminated soil in biopiles.

Barbeau's (1996) and Otte's (1998) studies were related to the production of activated soil with PCP as targeted contaminant. Bioaugmentation of a soil contaminated with wood preservation compounds with one of these activated soils permitted the degradation of PCP from 500 mg/kg to 5 mg/kg in 130 days. However, many aspects remain problematic. First, PCP is often accompanied by other contaminants such as petroleum hydrocarbons, polychlorinated dioxins and furans that also require remediation. The environmental fate of the impurities contained in the wood-preserving oil has not been studied. Moreover, the new dispositions of the Canadian law on new substances requires that the impact of this technology on soil ecology be assessed before it can be tested in the field.

In order to improve the soil activation technique and to characterise the biomass produced, laboratory scale bioactivation experiments were performed. During the activations, one reactor was fed with technical grade PCP salt (NaPCP) as previously done by Barbeau (1996), the other reactor was fed with an industrial wood-preserving oil containing commercial grade PCP and diesel oil #2.

The hypothesis of the project was that production of an active biomass in the form of soil activated with PCP based wood-preserving oil permits the acclimation of the indigenous flora to several contaminants while maintaining good PCP degradation activity and not modifying the inoculum biodiversity.

Three activations were performed in 10 L stainless steel reactors. The growth medium was composed of 10% (w/v) of contaminated soil and mineral salt medium (MSM). Two activated soils were produced during each activation; one was fed with NaPCP and the other with wood-preserving oil.

The objective of the first activation was to verify the possibility of activating more than one flora and to develop monitoring techniques. The purpose of the second activation was to compare the biodegradation activities and the biomass produced with the two activating solutions. With the information acquired during the first two activations, a third one was performed in order to produce an inoculum for the bioaugmentation experiments.

The results obtained permitted to assert that the use of PCP based wood-preserving oil as targeted contaminant in the production of activated soil increased not only PCP degradation but also stimulated the petroleum hydrocarbon degradation. Indeed, PCP degradation rates in the reactor fed with wood-preserving oil were comparable to those reached in the reactor fed with NaPCP. Moreover, petroleum hydrocarbons concentration monitoring and mineralisation experiments with radiolabeled hexadecane showed the stimulation of hydrocarbonoclastic bacteria.

The analysis of microbial counts determined that the process of activation had an influence on the indigenous flora biodiversity. Indeed, in both reactors, microbial selection, due to the substrate specificity, initially favoured the growth of PCP degrading bacteria. A second equilibrium was reached later during the activation process when other PCP tolerant bacteria could grow on carbon from deceased bacteria.

The three biomass production comparisons determined that the feeding method influenced PCP degradation activity. Periods of starvation slowed PCP mineralisation and probably petroleum hydrocarbons mineralisation. In contrast, spiking the reactors with PCP while the degradation activity was at its maximal rate significantly increased degradation rates.

Mass balances on polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans did not permit to conclude that biodegradation of these contaminants even if only 52 and 60% in toxic equivalence were recuperated in the reactor fed with NaPCP and wood-preserving oil respectively.

The second phase of the project focused on the bioaugmentation of sand contaminated with wood preservation compounds (110 mg/kg of PCP and 1350 mg/kg C₁₀-C₅₀). The principal objective of the experiments was to determine the efficiency of the inoculum produced during activation. Three treatments were compared to a sterilised soil; bioaugmentation using soil activated with NaPCP, bioaugmentation using soil activated with wood-preserving oil and biostimulation.

All three treatments permitted to reach the MEF's C criteria for PCP concentration in 10 to 13 weeks and B criteria for petroleum hydrocarbons concentration in 4 weeks. A second inoculation of activated soils after 12 weeks did not succeed in bringing down PCP concentration under 4 mg/kg.

pH monitoring showed that the majority of PCP degradation occurred during the first 4 weeks. However, the first sample for PCP monitoring was taken during the fifth week. The three treatments studied showed similar performances for PCP and C₁₀-C₅₀ degradation.

The soil activated with wood-preserving oil used for the bioaugmentation experiments showed, before its inoculation, low PCP and hexadecane mineralisation performances. The bioaugmented soil also showed low mineralisation performances compared to the two other treatments.

Results obtained during the bioaugmentation experiments underlines two major factors to consider when a bioaugmentation treatment is chosen. First, bioaugmentation being more expensive than biostimulation, the degradative capacity of the indigenous flora must be well known before considering adding biomass. Indeed, a soil in which contamination and characteristics do not inhibit the growth of indigenous degraders can be remediated by adding the necessary nutriments and oxygen. Secondly, the mineralisation inhibition observed in the soil bioaugmented with soil activated with wood-preserving oil emphasises a new problematic in the field of soil remediation which is the fate of the indigenous microbial diversity after a bioaugmentation treatment using activated soil.

TABLE DES MATIÈRES

CITATIONSiv
REMERCIEMENTS.....	v
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	x
TABLE DES MATIÈRES	xiv
LISTE DES ANNEXES	xviii
LISTE DES TABLEAUX	xix
LISTE DES FIGURES.....	xxi
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	xxiv
LISTE DES NOTATIONS ET SYMBOLES	xxvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1.1 PRODUITS DE PRÉSERVATION DU BOIS	5
1.1.1 <i>Source</i>	5
1.1.2 <i>Propriétés physico-chimiques de la solution de préservation du bois</i>	6
1.1.2.1 Pentachlorophénol (PCP)	6
1.1.2.2 Huile diésel #2.....	9
1.1.2.3 Dibenzo-p-dioxines polychlorées et dibenzofurannes polychlorées	10
1.2 BIODÉGRADATION AÉROBIE.....	12
1.2.1 <i>Biodégradation du Pentachlorophénol</i>	13
1.2.2 <i>Biodégradation des hydrocarbures pétroliers</i>	16
1.2.3 <i>Biodégradation des dioxines et furannes polychlorées</i>	19
1.3 BIOTRAITEMENT DES SOLS CONTAMINÉS AUX PRODUITS DE PRÉSERVATION DU BOIS .	26
1.3.1 <i>Biostimulation</i>	26

1.3.2 <i>Bioaugmentation</i>	29
1.3.3 <i>Sol activé</i>	31
1.3.3.1 Alimentation en continu (Otte et al., 1994).....	32
1.3.3.2 Alimentation par ajouts (Barbeau et al., 1997)	32
1.3.4 <i>Influence des paramètres environnementaux</i>	33
1.3.4.1 Présence d'une matrice solide.....	34
1.3.4.2 Flore acclimatée	35
1.4 BIODIVERSITÉ D'UN SOL	37
1.4.1 <i>Loi Fédérale concernant les produits biotechnologiques</i>	38
1.4.2 <i>Biodiversité des sols contaminés</i>	39
1.5 CONCLUSION	40
1.6 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS.....	41
CHAPITRE 2 PRODUCTION DE BIOMASSE ACTIVE SOUS FORME DE SOL ACTIVÉ	42
2.1 INTRODUCTION	42
2.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	44
2.2.1 <i>Caractérisation des sols</i>	44
2.2.2 <i>Caractérisation des solutions d'activation</i>	45
2.2.3 <i>Production de sol activé</i>	46
2.2.3.1 Montage expérimental.....	46
2.2.3.2 Production et suivi des biomasses actives.....	47
2.2.3.2.1 Activation 1 : Production préliminaire de biomasse.....	47
2.2.3.2.2 Activation 2 : Production de biomasse avec suivi exhaustif des paramètres physico-chimiques et biologiques	49
2.2.3.2.3 Activation 3 : Production de biomasse active pour bioaugmentation d'un sol contaminé.	50
2.2.4 <i>Protocoles analytiques</i>	51
2.2.4.1 Analyses physico-chimiques	51
2.2.4.2 Analyses biologiques	54
2.2.4.2.1 Comptes bactériens sélectifs et totaux.....	54
2.2.4.2.2 Essais de minéralisation en microcosmes.....	56

2.2.4.2.3 Analyse des courbes de minéralisation.....	57
2.3 RÉSULTATS.....	60
2.3.1 Caractérisation des sols et des solutions d'activation.....	60
2.3.1.1 Caractérisation physico-chimique	60
2.3.1.2 Caractérisation biologique.....	62
2.3.2 Activation 1 : Production préliminaire de biomasse.....	63
2.3.2.1 Dégradation du PCP	63
2.3.2.2 Dégradation des hydrocarbures pétroliers	67
2.3.2.3 Production de biomasse.....	68
2.3.3 Activation 2 : Suivi exhaustif des paramètres physico-chimiques et biologiques	70
2.3.3.1 Dégradation du PCP	70
2.3.3.2 Dégradation des hydrocarbures pétroliers	73
2.3.3.3 Activité de biodégradation du PCP et de l'hexadécane	74
2.3.3.4 Croissance microbienne	76
2.3.3.5 Bilans de masse sur les dibenzo-p-dioxines et dibenzofurannes polychlorées	78
2.3.3.6 Effet des périodes de famine sur la minéralisation du PCP	80
2.3.4 Activation 3 : Production de biomasse active pour bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois.....	82
2.3.4.1 Dégradation du PCP	82
2.3.4.2 Production de Biomasse et activité de minéralisation.....	85
2.3.5 Comparaison des résultats obtenus pour les trois activations	87
2.3.6 Acclimatation des microorganismes indigènes à l'hexadécane.....	89
2.4 DISCUSSION	93
2.4.1 Production de biomasse active	93
2.4.1.1 Activité de dégradation du PCP et des hydrocarbures pétroliers	93
2.4.1.2 Activation 3 à la solution de préservation de bois: périodes de famine.	94
2.4.1.3 Devenir des dioxines et furannes dans le procédé d'activation	96
2.4.1.4 Effet de l'activation sur la biodiversité microbienne d'un sol.....	97
2.4.2 Influence de la méthode d'alimentation.....	98
2.4.2.1 Effet de périodes de famine sur l'activité de minéralisation.....	99

2.4.2.2 Effet d'ajouts successifs de concentrations similaires	101
2.4.2.3 Alimentation idéale	102
2.4.3 <i>Effet de l'huile diésel sur la dégradation du PCP</i>	104
2.4.4 <i>Influence des caractéristiques physico-chimiques du sol sur sa bioactivation</i> ..	105
2.4.5 <i>Proposition d'un modèle mathématique de consommation du PCP</i>	107
2.4.5.1 Cinétique de dégradation.....	108
2.4.5.2 Cinétique d'équilibre	110
2.4.5.3 Interactions sol-diésel-PCP	111
2.5 CONCLUSION	113
CHAPITRE 3 BIOAUGMENTATION D'UN SOL CONTAMINÉ AUX PRODUITS DE PRÉSÉRATION DU BOIS	115
3.1 INTRODUCTION	115
3.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	116
3.2.1 <i>Caractérisation du sol</i>	116
3.2.2 <i>Montage expérimental</i>	116
3.2.3 <i>Suivi du traitement par bioaugmentation</i>	117
3.2.4 <i>Bioaugmentations successives</i>	117
3.3 RÉSULTATS.....	118
3.3.1 <i>Caractérisation du sol</i>	119
3.3.2 <i>Biodégradation du PCP et des C₁₀-C₅₀</i>	120
3.3.3 <i>Effet de la bioaugmentation sur l'activité de minéralisation</i>	123
3.3.4 <i>Bioaugmentations successives</i>	127
3.3.4.1 Densité microbienne des sols activés inoculés lors de la seconde bioaugmentation	127
3.3.4.2 Minéralisation suite à la seconde bioaugmentation.....	128
3.4 DISCUSSION	130
3.5 CONCLUSION	133
RECOMMANDATIONS	134
RÉFÉRENCES	136

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I Séquençage de l'ADN d'une souche prélevée dans le réacteur NaPCP lors de l'activation 2	150
ANNEXE II Protocoles Expérimentaux 16	153
PE 16 A Caractérisation préliminaire pour le choix de sol à bioactiver	154
PE16 B Comparaison de deux méthodes (NPP tube et NPP marqué) de comptes microbiens totaux sélectifs (PCP et hydrocarbonoclastes).....	160
PE 16 C Détermination de la concentration en ions Cl- dans un sol par potentiométrie	167
PE 16 D Décompte des micro-organismes dégradeurs du PCP dans un sol selon la méthode NPP	170
PE 16 E Production de sol activé pour la biodégradation du PCP. activation préliminaire	174
PE 16 E version 2 Production de sol activé pour la biodégradation du PCP, avec suivi intensif du pH	188
PE 16 F Essais de minéralisation en microcosmes d'un sol en phase boueuse en cours de bioactivation	220
PE 16 H Extraction au chlorure de méthyle du PCP d'un échantillon de boue liquide par la méthode base/acide	223
PE 16 I Vérification de l'influence du PCP sur la minéralisation de l'hexadécane et vice versa	226
PE 16L Bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois par un inoculum bactérien sous forme de sol activé	230

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Propriétés physiques et chimiques du PCP	8
Tableau 1.2 Propriétés physiques de l'huile diésel #2.....	9
Tableau 1.3 Propriétés physico-chimiques du 2,3,7,8-TétraCDD	12
Tableau 1.4 Paramètres permettant l'optimisation de la biodégradation aérobie.....	28
Tableau 2.1 Concentration en PCP des ajouts alimentés aux réacteurs, activation 1.	48
Tableau 2.2 Concentration de PCP ajoutée dans les réacteurs lors de la production principale de biomasse active	50
Tableau 2.3 Concentration en PCP des ajouts alimentés au réacteurs, Activation 3....	51
Tableau 2.4 Caractérisation des sols utilisés lors des trois activations	60
Tableau 2.5 Caractérisation physico-chimique des solutions d'activation utilisées.....	61
Tableau 2.6 Composition détaillée en PCDD et PCDF des solutions d'activation et la proportion que représente chaque groupe d'isomères	62
Tableau 2.7 Taux moyen de dégradation du PCP dans les deux réacteurs en fonction des ajouts, activation 1.....	66
Tableau 2.8 Taux maximum et moyens de dégradation du PCP dans les deux réacteurs, activation 2.....	72
Tableau 2.9 Bilan de masse des PCDD/DF dans les deux réacteurs en équivalence toxique	78
Tableau 2.10 Composition détaillée des PCDD et PDGF récupérés dans les deux réacteurs au jour 61 et représentation de la proportion des groupes d'isomères.....	79
Tableau 2.11 Caractérisation de la biomasse produite lors des trois activations	89

Tableau 2.12 Concentration en C₁₀-C₅₀ et en bactéries hydrocarbonoclastes des flores non-acclimatées et acclimatées représentées à la figure 2.13	91
Tableau 3.1 Caractérisation du sol utilisé pour les essais de bioaugmentation	119

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure chimique du pentachlorophénol (Nilsson <i>et al.</i> , 1978).....	7
Figure 1.2 Structures chimiques des PCDD et PCDF (Nilsson <i>et al.</i> , 1978)	11
Figure 1.3 Voie bactérienne de dégradation du PCP en condition aérobie (Mc Allister <i>et al.</i> , 1996).....	14
Figure 1.4 Dégradation des n-alcanes (Baker et Herson, 1994).....	18
Figure 1.5 Résumé des voies de dégradation des dibenzo-p-dioxines (DD) et des congénères mono et dichlorés.	22
Figure 1.6 Résumé de voies de dégradation des dibenzofurannes (DF) et des congénères mono et dichlorés	24
Figure 2.1 Montage expérimental des bioréacteurs pour la production de sol activé 1)Condenseurs, 2) agitateurs 3)diffuseurs d'air 4) port d'échantillonnage..	46
Figure 2.2 Illustration des paramètres utilisés pour décrire une courbe de minéralisation	59
Figure 2.3 Consommation de PCP, production d'ions chlorures et suivi du pH dans le réacteur alimenté A) au NaPCP, B) à la SPB.....	65
Figure 2.4 Concentration résiduelle en C ₁₀ -C ₅₀ suite au sixième ajout, dans le réacteur SPB.....	68
Figure 2.5 Dénombrements bactériens selon la méthode NPP, activation 1	69
Figure 2.6 Consommation du PCP, production d'ions chlorure et suivi du pH, dans le réacteur alimenté au NaPCP (A), dans le réacteur alimenté à la solution de préservation du bois.	71

Figure 2.7 Concentration de C₁₀-C₅₀ dans le réacteur alimenté à la solution de préservation de bois.....	74
Figure 2.8 Minéralisation du PCP dans le réacteur alimenté (A) au NaPCP, (B) à la SPB. Minéralisation de l'hexadécane dans le réacteur alimenté (C) au NaPCP, (D) à la SPB.....	76
Figure 2.9 Comptes bactériens MPN dans le réacteur alimenté (A) au NaPCP, (B) à la SPB.....	77
Figure 2.10 . Effets des périodes de famine sur l'activité de minéralisation du PCP (A). Relation entre la concentration de dégradeurs de PCP et l'activité de minéralisation du PCP(B).....	81
Figure 2.11 Consommation du PCP, production d'ions chlorures et pH dans le réacteur alimenté A) au NaPCP et B) à la solution de préservation. Troisième activation (sol AES).	84
Figure 2.12 Activité de minéralisation du ¹⁴C-PCP et de ¹⁴C-hexadécane, activation 3	86
Figure 2.13 Allures des courbes de minéralisation de l'hexadécane. A) biomasses non acclimatées (sol initial utilisé pour les activations 1 et 2, mélange 10% (p/v) sol-MSM), B) biomasses acclimatées (Activation 2 et bioaugmentation chapitre 3).....	91
Figure 2.14 Représentation du bilan de matière du PCP dans un sol activé	108
Figure 3.1 Dégradation du PCP et des C₁₀-C₅₀ et suivi du pH dans les réacteurs. (moyenne des triplicatas avec erreur relative).....	121
Figure 3.2 Courbes de minéralisation du PCP A) dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP, B) dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la solution de préservation C) dans les réacteurs biostimulés (moyenne des	

séries de 3 réacteurs et des triplicatas des microcosmes pris avant la seconde bioaugmentation).....	125
Figure 3.3 Courbes de minéralisation de l'hexadécane A) dans les réacteurs bioaugmenté au sol activé au NaPCP, B) dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la solution de préservation C) dans les réacteurs biostimulés. (moyenne des séries de 3 réacteurs et des triplicatas des microcosmes pris avant la seconde bioaugmentation).	126
Figure 3.4 Courbes de minéralisation du PCP et de l'hexadécane suite à la seconde bioaugmentation qui a eu lieu à la semaine 13 pour le sol activé au NaPCP et à la semaine 12 pour le sol activé à la SPB.....	129

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

^{14}C	un carbone marqué au carbone 14
ADN	acide désoxyribonucléique
ASTM	American Society for Testing and Materials
$\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$	hydrocarbures pétroliers contenant de 10 à 50 carbones
CDD	dibenzo-p-dioxine chlorée
CDF	dibenzofuranne chlorée
COT	carbone organique total
CRC	capacité de rétention au champ
dpm	désintégration par minute
GC-MS	chromatographe en phase gazeuse et spectroscopie de masse
HAP	hydrocarbure aromatique polycyclique
HPLC	chromatographe en phase liquide à haute pression
LAG	temps requis pour atteindre 1/5 de %MAX
MAX%	pourcentage maximal de minéralisation
MEF	Ministère de l'Environnement et de la Faune
MSM	milieu salin minéral
NaPCP	sel de pentachlorophénol
NPP	nombre le plus probable

PCDD et PCDF:	Dibézo-p-dioxine polychlorée et dibenzofurane polychlorée
PCP	pentachlorophénol
Réacteur NaPCP	réacteur alimenté au NaPCP
Réacteur SPB	réacteur alimenté à la solution de préservation du bois
RMAX	taux de minéralisation entre LAG et 2/3%MAX
rpm	rotation par minute
Sol AES	sol provenant du site de traitement AES
Sol BSL	sol provenant du site de traitement BSL
SPB	solution de préservation de bois
TB	témoin biotique
U.S. EPA	Agence de protection Environnementale des États-Unis
U ¹⁴ -C	uniformément marqué au carbone 14
UV	ultraviolet

LISTE DES NOTATIONS ET SYMBOLES

μ	taux de croissance microbienne
μ_0	constante reliée à la croissance microbienne
f_{dw}	fraction de diésel
f_{oc}	fraction de matière organique
K_d	constante de décès
K_i	constante d'ihnibition
K_s	constante de saturation
$\text{Log } K_{oc}$	coefficient de partage avec la fraction de carbone organique
$\text{Log} K_{dw}$	coefficient de partage diésel-eau
$\text{Log} K_{ow}$	coefficient de partage octano-eau
pK_a	pH auquel 50% d'un composé est ionisé
S	concentration de substrat
S_{bd}	concentration de substrat biodisponible
X	concentration microbienn
$Y_{x/s}$	rendement d'utilisation du substrat pour la croissance microbienne

Introduction

Le pentachlorophénol (PCP) est un composé xénobiotique utilisé par l'industrie de la préservation du bois pour ses propriétés biocides. Il est utilisé sous forme dissoute dans une huile comprenant également plusieurs impuretés, telles les dioxines et les furannes. Cette solution de préservation, quoique très utile pour sa capacité de protection à long terme du bois, est également une source importante de contamination de sol et d'eau souterraine. Le PCP fait partie des contaminants listés prioritaires par l'agence américaine de protection de l'environnement, et est réglementé dans la politique de réhabilitation des sols contaminés (MENVIQ, 1988).

Le PCP peut être dégradé de biologiquement par des souches bactériennes, sous des conditions aérobies et anaérobies. Des champignons possèdent également la capacité de s'y attaquer. Cependant, les conditions nécessaires à la biodégradation du PCP ne sont pas toujours présentes dans les environnements naturels, ce qui fait que la demi-vie du PCP dans l'eau souterraine et le sol est estimée à 178 jours et 4,2 années respectivement (Howard *et al.*, 1991). Depuis l'instauration des critères A, B et C de qualité du sol de la politique du Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF), la biorestauration de sites contaminés au PCP est problématique. Au Québec, d'importantes quantités de sol sont à traiter et le critère C est difficilement atteignable par les méthodes conventionnelles telles les biopiles. Le concept de bioaugmentation par sol activé permettrait la décontamination de sol contaminé au PCP jusqu'au critère C. La technique de production de sol activé a été développée au cours des cinq dernières années dans le but de produire un inoculum permettant une biodégradation efficace du PCP dans un laps de temps le plus court possible (Barbeau *et al.*, 1997; Otte, 1998; Otte *et al.*, 1994).

Le concept du sol activé repose essentiellement sur le développement d'un consortium provenant d'une fraction de sol contaminé et possédant l'activité recherchée. Cette biomasse immobilisée sur des particules de sol est développée en réacteur par enrichissement sélectif pour son utilisation subséquente comme inoculum pour le traitement de sol contaminé en biopile. Mueller *et al.*(1991) préconisent l'utilisation de bioréacteur en phase boueuse pour la biodégradation de composés récalcitrants. En général, les taux et l'activité des dégradeurs se contrôlent mieux et sont ainsi plus prévisibles en bioréacteurs. Ceci est dû à plusieurs phénomènes le meilleur mélange par contact entre les micro-organismes et les polluants et le maintient des conditions optimales (pH, température, oxygène dissous, nutriments, biodisponibilité du substrat, etc.). Le traitement de sol contaminé en biopile est une pratique très répandue pour la rémédiation de sol contenant des hydrocarbures pétroliers. Cette technique peu coûteuse consiste essentiellement à disposer le sol en piles rectangulaires et à lui fournir nutriments et oxygène nécessaires à la dégradation. Lorsque des composés plus récalcitrants sont en jeu, l'ajout de biomasse acclimatée est souvent recommandé.

Les travaux de Otte (1998) et Barbeau (1996) ont démontré que la bioaugmentation de sol contaminé aux produits de préservation du bois à l'aide d'un sol activé est une technique fort prometteuse qui permettrait de traiter des sols fortement contaminés rapidement et économiquement. Cependant plusieurs aspects demandent encore de la recherche. Premièrement, le PCP présent dans un sol est très souvent accompagné d'autres contaminants comme les hydrocarbures pétroliers ($C_{10}-C_{50}$), les dioxines et les furannes, dont il faudra aussi se débarrasser afin de respecter les critères du MEF. Le devenir des impuretés contenues dans une solution de préservation du bois n'a pas encore fait l'objet d'étude. De plus, dans l'optique des nouvelles dispositions de la loi fédérale sur les substances nouvelles concernant les produits biotechnologiques (LPCE), la biomasse produite lors de l'activation d'un sol doit être caractérisée afin de

pouvoir utiliser cette technologie à grande échelle (Gouvernement du Canada *et al.*, 1999).

Ce mémoire porte sur la problématique de la rémédiation de sols contaminés aux produits de préservation du bois et plus particulièrement sur le concept de bioaugmentation à l'aide de sols activés. Afin d'améliorer la technique d'activation des sols et de caractériser la biodiversité de la biomasse produite, des essais de bioactivation en laboratoire ont été effectués. Au cours des expérimentations, un réacteur était activé à l'aide de sel de pentachlorophénol (NaPCP) grade technique, alors qu'un deuxième réacteur était activé à l'aide d'une solution commerciale de préservation de bois à base de PCP. L'acclimatation de la flore microbienne à plus d'un contaminant, tel que les composants de la solution de préservation de bois, permettrait le traitement de plusieurs contaminants en même temps par la technologie de bioaugmentation de biopiles par sols activés. Des essais de bioaugmentation en réacteurs utilisant les deux sols activés produits ont permis de vérifier l'effet de l'inoculation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois.

Au terme d'une revue de littérature mettant en relief les éléments clefs permettant de bien situer le sujet de la recherche effectuée par rapport aux travaux publiés jusqu'à ce jour, les hypothèses de recherche et objectifs sont présentés. Ce projet de recherche est constitué de 2 phases expérimentales se retrouvant sous forme de chapitres où sont présentés le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les résultats et discussions. Le chapitre suivant traite donc de l'étude de la technique de bioactivation ainsi que de la caractérisation de la biomasse produite. Les effets de la bioaugmentation sur le traitement de sols contaminés aux produits de préservation du bois par les consortiums microbiens en fonction de la solution d'activation utilisée sont le sujet du chapitre 3. Les principales conclusions et recommandations émergeant de ce projet de recherche sont ensuite résumées.

Chapitre 1 Revue de littérature

Ce premier chapitre a pour but de mettre en relief les éléments clefs permettant de bien situer le sujet de la recherche effectuée par rapport aux travaux publiés jusqu'à ce jour. Les différents aspects touchant la production d'une biomasse indigène sous forme de sol activé pour la bioaugmentation de sol contaminé aux produits de préservation du bois seront ainsi traités afin d'aider à la compréhension des phénomènes qui seront discutés.

La plupart des études traitant de traitements de sites contaminés aux produits de préservation du bois ciblent la dégradation du PCP (et des HAP dans les cas de contamination à la créosote). C'est un composé récalcitrant mais biodégradable (Alexander, 1994). Récemment, les dibenzo-p-dioxines et dibenzofurannes, des produits secondaires de la fabrication du PCP excessivement toxiques (Mc Allister *et al.*, 1996), prennent place dans la problématique. Enfin, le principal composant de solutions de préservation est le solvant utilisé pour dissoudre le PCP. Dans le cadre du projet ce solvant était une huile diésel #2.

Cette revue de littérature explore en premier lieu, l'état de l'industrie du traitement du bois au Canada afin de situer le projet dans la problématique actuelle. Les propriétés physico-chimiques et les modes de biodégradation aérobie des principaux constituants de la solution de préservation de bois, c'est à dire le pentachlorophénol, les hydrocarbures pétroliers, les polychlorodibenzo-*p*-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofurannes (PCDF), seront explorés. Les interactions possibles entre ces contaminants devront être soulignées puisque la contamination et le traitement suggéré concernent un mélange de produits chimiques. Deux approches de biotraitement de sols contaminés seront abordées, la biostimulation et la

bioaugmentation. Finalement, une nouvelle problématique concernant l'utilisation de biotechnologie dans le traitement de sol contaminé sera examinée ; l'avenir de la biodiversité microbienne des sols.

1.1 Produits de préservation du bois

1.1.1 Source

Les forêts étant une ressource naturelle importante au Canada, l'utilisation du bois et son exportation représentent une source de revenus considérable pour l'industrie canadienne. Plusieurs utilisations du bois impliquent son traitement dans le but de prolonger sa durée de vie. Au Québec, le traitement du bois se fait selon plusieurs techniques, utilisant différents composés chimiques toxiques pour lutter contre les organismes xylophages. Les agents de préservation du bois sont potentiellement dangereux pour l'environnement en raison même de leurs propriétés biocides envers une grande variété d'organismes. Les produits de traitement du bois peuvent être constitués d'un ou plusieurs ingrédients actifs. La matière active la plus fréquemment utilisée au Canada est le pentachlorophénol (Henning Environmental consultants et LTD, 1984). Il peut être retrouvé dilué dans un solvant ou un produit pétrolier.

L'industrie de préservation du bois est maintenant réglementée et surveillée de près par les agences gouvernementales de protection de l'environnement ce qui n'était pas le cas il y a 10 ans. Les usines de préservation du bois n'étaient généralement pas au courant des risques environnementaux engendrés par leurs activités. L'égouttement du bois traité sur le sol, des méthodes de travail inappropriées et des déversements accidentels ont contaminé le sol québécois pendant près de 40 ans (MENVIQ, 1989).

1.1.2 Propriétés physico-chimiques de la solution de préservation du bois

La préparation de PCP utilisée au cours de ces travaux est un mélange typique d'huile diésel #2 et de PCP de grade commercial ajouté sous forme de flocons ou de blocs solides. Cette solution peut contenir des impuretés reliées à la fabrication du PCP, entre autre des chlorophénols et des dioxines et furannes polychlorées (Mc Allister *et al.*, 1996). Les solutions utilisées pour la préservation du bois contiennent entre 3% et 6% de PCP (MENVIQ, 1989).

La plupart des mélanges sont effectués aux usines de traitement du bois et les proportions varient beaucoup d'un mélange à l'autre et d'une usine à l'autre. De plus, les mélanges utilisés lors du traitement du bois n'ont pas tous subit les mêmes conditions d'entreposage (Henning Environmental consultants et LTD, 1984).

1.1.2.1 Pentachlorophénol (PCP)

Le pentachlorophénol (PCP) est un antiparasitaire de la famille des organochlorés, de formule chimique C_6Cl_5OH et dont la structure est illustrée à la Figure 1.1. Il peut être utilisé sous forme de phénol (PCP), de sel (NaPCP) ou sous forme d'ester (acétate ou laurate). Les propriétés physiques et chimiques de ces dérivés ne sont pas identiques à celles du PCP sous sa forme phénol. Le PCP dont il sera question dans cette revue de littérature est un PCP grade technique ou commercial (sous forme phénol) d'une pureté de 85 à 90% tel qu'utilisé dans la production de solution de préservation de bois. La production industrielle du PCP s'effectue principalement à l'aide d'une chloration catalytique du phénol. Certaines réactions secondaires indésirables ont lieu lors de cette chloration à très haute température, générant des impuretés telles les dioxines et furannes polychlorées (Nilsson *et al.*, 1978).

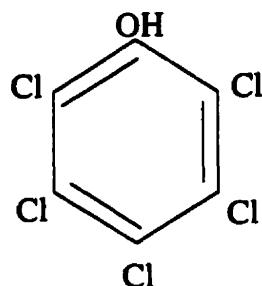


Figure 1.1 Structure chimique du pentachlorophénol (Nilsson *et al.*, 1978)

Sous sa forme de phénol, le PCP se présente comme une poudre blanche très peu soluble dans l'eau, mais dont la solubilité augmente avec la température et le pH. Ses principales propriétés sont exposées au Tableau 1.1.

Le PCP est un composé stable, soluble dans la plupart des solvants organiques et partiellement soluble dans l'eau (14 à 19 mg/L). Le PCP est un acide faible, le pH a une grande influence sur ses propriétés physiques et chimiques. La dégradation du PCP entraînant une diminution du pH par production d'acide chlorhydrique, sa solubilité, ses coefficients de partage et d'adsorption sont susceptibles de varier avec sa dégradation. Le pKa du PCP se situe autour de 4,75 (Shimizu *et al.*, 1992), sa solubilité augmente avec le pH. Lorsque le PCP est dissous dans l'eau, il se retrouve sous deux formes : sa forme neutre non dissociée (PCP^0) et sous sa forme ionisée de pentachlorophénolate (PCP^-). A pH 2,7, le PCP est seulement ionisé à 1%, alors qu'à pH 6,7, il est ionisé à 99% (Arcand *et al.*, 1995). Les propriétés physico-chimiques ainsi que les réponses microbiennes et toxiques de ces deux formes diffèrent. En effet, la toxicité et la bioaccumulation augmentent avec un abaissement du pH (Rutgers *et al.*, 1998). Arcand *et al.* (1995) ont développé un modèle non-empirique permettant d'estimer la solubilité aqueuse "totale" du PCP selon le pH.

$$[\text{PCP}_t]_{\text{maq}} = [\text{PCP}^0]_{\text{maq}} \cdot \{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}\}$$

où PCP_t est le PCP total dissous

PCP^0 est le PCP non-dissocié dissous

maq indique la concentration aqueuse maximale

Pour des composés ionisables tel le PCP, les valeurs de K_{ow} sont dépendantes du pH et de la force ionique. Par contre, Nowosielski et Fien (1998) ont déterminé que les valeurs de $\log K_{ow}$ sont indépendantes du pH pour des $\text{pH} < \text{pK}_a - 1$ et $\text{pH} > \text{pK}_a + 3$. À l'intérieur de cette plage, par contre, la valeur de $\log K_{ow}$ diminue avec une augmentation de pH. La force ionique a l'effet d'augmenter $\log K_{ow}$ avec son augmentation. Shimizu *et al.* (1992) ont quant à eux, observé que la sorption du PCP à des solides naturels diminuait avec une augmentation du pH (2-12).

Le PCP est sensible aux rayons ultraviolets, il peut être réduit photochimiquement en isomère tri- et tétrachlorophénol. En milieu aqueux, 100 mg de PCP est photodégradé par la lumière du soleil en 20 heures (Wong et Crosby, 1978).

Tableau 1.1 Propriétés physiques et chimiques du PCP

Propriétés	Valeurs
Poids moléculaire	266,36 g
Point de fusion	190 °C
Point d'ébullition	293 °C
Densité	1,85 g/l
Pression de vapeur (20 à 100°C)	0,00011 à 0,12 mm Hg
Constante de dissociation pKa	4,75
Solubilité dans l'eau (20 à 30 °C)	14 à 19 mg/L
Solubilité dans 100 g de méthanol (20 à 30°C)	57 à 65 g
Coefficient d'adsorption sur la matière organique ($\log K_{oc}$)	4,80
Coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$)	3,69 ^a

^a à pH 7,2 et force ionique 0,1M (Nowosielski et Fien, 1998)

Source: Handbook of chemistry and physics, 68th edition, 87-88, CRC press

1.1.2.2 Huile diésel #2

Le principal constituant de la solution de préservation du bois est l'hydrocarbure pétrolier, en l'occurrence de l'huile diésel #2, dans laquelle est dissoute la matière active de préservation. La composition des huiles diésel est complexe. Elles peuvent contenir des centaines de composés. La proportion des divers constituants peut varier d'une huile à l'autre. La composition générale de l'huile diésel numéro 2 est majoritairement constituée d'alcanes de 10 à 20 carbones, quelques alcanes C₂₀ à C₃₀, un peu de cycloalcanes aromatiques et non-aromatiques et d'alcènes (Baker et Herson, 1994). Frankenberger *et al.* (1989) décrivent la composition du diésel comme étant généralement 30% d'alcanes, 45% de cycloalcanes et 24% d'aromatiques.

Le tableau 1.2 décrit les principales propriétés physiques de l'huile diésel #2. Le diésel ayant une densité plus faible que celle de l'eau, il aura tendance à flotter à la surface de systèmes aqueux. De plus, sa solubilité dans l'eau étant faible, elle risque d'être limitante pour la biodégradation. Le diésel dynamique du diésel est grande ce qui implique qu'il est peu mobile dans la matrice de sol. En particulier si le sol possède une faible teneur en eau, le diésel aura de la difficulté à atteindre la phase aqueuse.

Tableau 1.2 Propriétés physiques de l'huile diésel #2

Propriétés	Valuers
Densité (15°C)	0,86 g/L
Viscosité dynamique (20°C)	4 cP
Viscosité cinématique (15°C à 38°C)	2 cSt
Solubilité aqueuse (20°C) eau distillée (20°C)	3,12 mg/L 3,2 mg/L

source (Centre de Technologie Environnementale, 1999)

1.1.2.3 *Dibenzo-p-dioxines polychlorées et dibenzofurannes polychlorées*

Il existe 75 isomères possibles de dibenzo-p-dioxines chlorées et 135 variétés de dibenzofurannes chlorées, plus communément appelés dioxines et furannes (Halden et Dwyer, 1997). Dès la fin des années soixante, les dioxines et furannes, retrouvés dans le pesticide 2,4,5-T et les chlorophénols, font l'objet de recherches quant à leurs effets potentiellement néfastes (Arsenault, 1976). Les dioxines et furannes sont plus qu'un contaminant ; ils forment une problématique en soit. Sans aucune utilité pour la société, les dioxines et furannes sont des sous-produits contaminant les dérivés des chlorophénols (2,4,5-T, 2,4-D, PCP,...).

La structure générale des PCDD et PCDF est illustrée à la Figure 1.2. Chacune des positions numérotées peut être substituée par un atome de chlore, donnant lieu à des mono jusqu'aux octachlorodibenzo-p-dioxines. Les isomères étant très nombreux, la 2,3,7,8 TCDD est choisie comme exemple et ses propriétés physico-chimiques sont montrées au Tableau 1.3. Les propriétés des dioxines varient suivant le nombre d'atomes de chlore qu'elles possèdent.

Les polychlorodibenzo-p-dioxines et polychlorodibenzofurannes, plus particulièrement l'isomère 2,3,7,8-TCDD, sont parmi les polluants les plus dangereux pour l'environnement à cause de leur structure moléculaire planaire et leur capacité à s'adsorber aux récepteurs biologiques. (Barkovskii, 1996).

En général, à la température ambiante, les dioxines et furannes se présentent à l'état solide. Les points de fusion pour les dioxines varient de 80°C (1-MonoCDD) à 330°C (OctaCDD). Ceux des furannes sont du même ordre (World Health Organisation, 1988). Les dioxines et furannes sont peu solubles dans l'eau. En général, leur solubilité dans tout type de solvant diminue lorsque le nombre d'atomes de chlore augmente (Dy, 1985). En ce qui concerne leur pression de vapeur, celle-ci diminue en fonction du nombre d'atome de chlore présent de 3×10^{-3} pour les composés non

substitués à moins de 10^{-11} Torr pour l'octachlorodibenzo-*p*-dioxine (Kwork *et al.*, 1996). Le coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$) augmente en fonction de sa substitution, ce qui veut dire que plus ils sont substitués, plus le risque d'accumulation de ces molécules dans le sol, les sédiments, les tissus adipeux animaux et humains est élevé. Cela implique aussi que la biodisponibilité des dioxines et furannes pour les microorganismes diminue avec l'augmentation du nombre d'atomes de chlore.

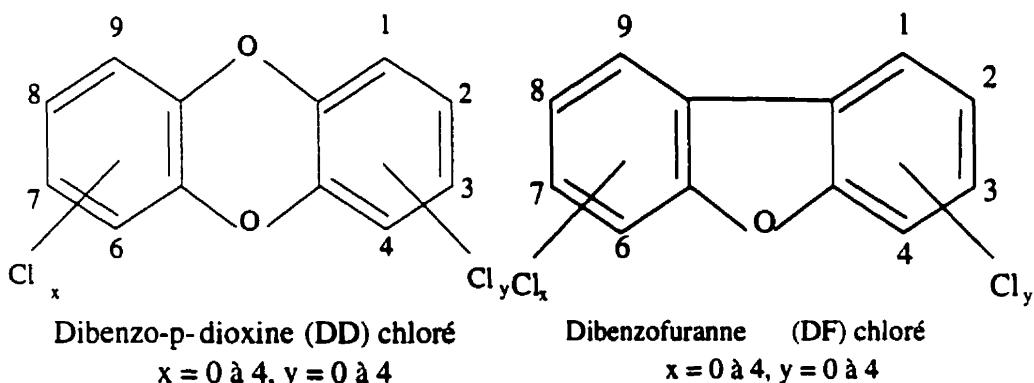


Figure 1.2 Structures chimiques des PCDD et PCDF (Nilsson *et al.*, 1978)

Afin de faciliter l'évaluation toxicologique d'un mélange de PCDD/DF, la toxicité des différents congénères est souvent exprimée en FET (facteur d'équivalence toxique), sur la base de leur toxicité relative à celle du 2,3,7,8-TCDD. Ce facteur en multiplié à la concentration de l'isomère et la nouvelle valeur est alors appelée TEQ (toxicité équivalente) (Gouvernement du Canada, 1990). Seulement 16 congénères se sont vus attribuer une valeur FET.

Tableau 1.3 Propriétés physico-chimiques du 2,3,7,8-TétraCDD

Propriétés	Valeurs
Formule moléculaire	C ₁₂ H ₄ Cl ₄ O ₂
Point de fusion	305°C
Tension de vapeur à 25°C	10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁷ mm Hg
Solubilité à 25°C	
eau	0,0002 mg/L
benzène	57 mg/L
n-octanol	4,8 mg/L
méthanol	1,0 mg/L
Coefficient de partage Log K _{ow}	7,14
Vitesse d'évaporation	2,0 x 10 ⁻¹² g/cm ² /s

Tiré de (Dy, 1985)

1.2 Biodégradation aérobie

La biodégradation est un phénomène naturel impliquant des réactions biochimiques produites par des micro-organismes sous certaines conditions environnementales. Tous les composés formant la solution de préservation du bois sont potentiellement biodégradables en condition aérobie (Atlas, 1988; Halden et Dwyer, 1997; Mc Allister *et al.*, 1996). Le carbone des contaminants est utilisé soit pour la synthèse cellulaire en étant assimilé intracellulairement (métabolisme microbien) soit pour la production d'énergie en formant du CO₂ (minéralisation) (Cookson, 1995). Les vitesses de biodégradation ainsi que les microorganismes impliqués sont différents d'un contaminant à l'autre. Les prochaines sections mettront en relief les souches bactériennes et les mécanismes clefs propres à la biodégradation du PCP, des hydrocarbures pétroliers et des PCDD et PCDF.

1.2.1 Biodégradation du Pentachlorophénol

Les micro-organismes capables de dégrader le PCP se retrouvent dans différents environnements ayant habituellement connu un épisode de contamination : des sols, des boues activées, des déchets industriels, etc. Plusieurs souches capables de dégrader le PCP ont été identifiées au cours des années : *Flavobacterium* sp., *Rodococcus chlorophenolicus*, *Arthrobacter* sp., *Mycobacterium* sp., *Sphingomonas* sp. et *Pseudomonas* sp.

Bien que toutes les souches n'empruntent pas la même voie métabolique, la première étape dans la dégradation aérobie du PCP, pour la majorité des dégradeurs de PCP, est l'oxydation, le remplacement d'un atome de chlore en position *para* par -OH pour former du tétrachlorohydroquinone (Mc Allister *et al.*, 1996). Cette étape est commune à la majorité, mais la source du groupement hydroxy peut être différente (oxygène pour *Sphingomonas chlorophenolica*, eau pour *M. chlorophenolicum*). Dans tous les cas la minéralisation du PCP est possible (figure 1.3). Pour la bactérie *Sphingomonas chlorophenolica*, cette première étape est catalysée par l'enzyme PCP-4-monooxygénase codée par le gène *pcpB*. Selon Orser *et al.*(1993), le gène *pcpB* serait probablement présent sur le chromosome et non sur un élément mobile (plasmide ou opéron). La dégradation du PCP par *Sphingomonas chlorophenolica* sp. nov est effectuée par l'entremise de 4 gènes structuraux *pcpA*, *pcpB*, *pcpC* et *pcpD* ainsi que par le gène régulateur *pcpR* (Lange *et al.*, 1996). La transcription du gène *pcpB* est induite par la présence de PCP dans la bactérie *Flavobacterium* sp. ATCC 39723 (Orser *et al.*, 1993). La présence de PCP est aussi nécessaire à la bactérie *Rhodococcus chlorophenolicus*, lors de la dégradation de plusieurs chlorophénols (Apajalahti et Salkinoja-Salonen, 1986).

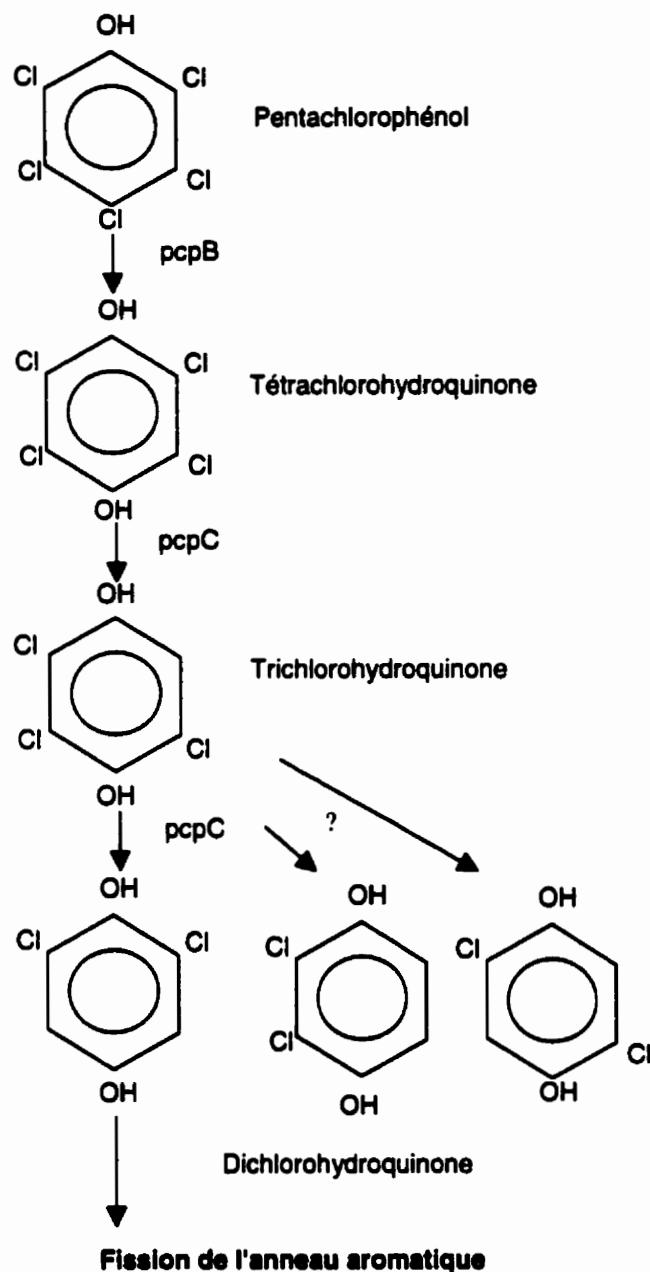


Figure 1.3 Voie bactérienne de dégradation du PCP en condition aérobie (Mc Allister *et al.*, 1996)

L'identification de souches capables de dégrader le PCP est un domaine en constante évolution. Des études récentes (Ederer *et al.*, 1997; Karlson *et al.*, 1995; Nohynek *et al.*, 1995) ont reclassifié quatre souches capables de dégrader le PCP; *Arthrobacter* sp. ATCC 3390, *Pseudomonas* sp. SR3, *Flavobacterium* ATCC 39723 et *Pseudomonas* sp. RA2. Ces souches sujettes à plusieurs études (Crawford et Mohn, 1985; Edgehill et Finn, 1982; Orser *et al.*, 1993) sont maintenant reconnues sous le nom de *Sphingomonas chlorophenolica* sp. nov. Cette souche est la référence génétique du gène *pcpB* souvent utilisé dans l'identification de dégradeurs de PCP par l'entremise de sondes génétiques ou PCR "Polymerase Chain Reaction". L'hypothèse à la base des travaux englobant l'identification ou la détection de dégradeurs de PCP par l'entremise du gène *pcpB*, est que la présence du gène indique un potentiel de dégradation.

Il faut cependant être prudent lors de l'utilisation de telles hypothèses puisqu'elles restent une généralisation. En effet, Saboo et Gealt (1998) ont observé que la présence du gène *pcpB* et la croissance bactérienne ne sont pas suffisantes à prédire le pouvoir de dégradation. Ils ont isolé des bactéries d'un site contaminé avec du pentachlorophénol, pouvant croître en présence de 50 mg/L de PCP et possédant le gène *pcpB*, mais ont observé qu'elles étaient incapables de dégrader du PCP en milieu liquide ou en présence de 1% de terreau d'empottement. De plus, la croissance de bactéries ne possédant pas ce gène, en présence de 50 mg /l de PCP, a indiqué que la présence du gène n'est pas non plus un élément critique pour la protection des bactéries contre les effets toxiques du PCP.

La nature toxique du PCP est due au fait qu'il est un découpleur de la phosphorylation oxidative. En effet, il possède la capacité de rendre une membrane cellulaire perméable aux protons, résultant en une dissipation du gradient de pH transmembranaire et du potentiel électrique (Mc Allister *et al.*, 1996).

La dégradation du PCP en conditions aérobies a déjà été observée dans des sols contaminés aux produits de préservation du bois. La plupart des études utilisent des

consortiums microbiens. Frisbie et Nies (1997) ont observé la dégradation de 6 mg/kg de PCP âgé par une flore indigène d'un site contaminé. Valo et Salkinoja-Salonen (1986) ont composté un sol contaminé au Ky-5 (un mélange de chlorophénols, pour la préservation du bois). La concentration de chlorophénols totaux est passée de 212 mg/kg à 30 mg/kg.

1.2.2 Biodégradation des hydrocarbures pétroliers

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les micro-organismes est un procédé majeur régissant le devenir des huiles dans l'environnement. Aucune source d'hydrocarbures ne peut, par contre, être dégradée à 100%. Parmi les types de microorganismes hydrocarbonoclastes (pouvant dégrader les hydrocarbures) les plus souvent cités dans la littérature, on retrouve *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Clostridium* et *Enterobacter*. Par contre, la dégradation de mélanges d'hydrocarbures demande l'activité combinée de plusieurs populations microbiennes (Atlas, 1988).

Un des problèmes que les bactéries doivent surmonter lors de la dégradation de composés hydrophobes tels les hydrocarbures pétroliers, est de justement rendre cette source de carbone hydrophobe accessible à la cellule (Hommel, 1990). Bien que les mécanismes d'assimilation ne soient pas bien connus, trois hypothèses sont souvent considérées (Angelova et Schmauder, 1999). 1- Pour les alcanes C₁₀ et plus, Klug et Markovetz (1971) proposent l'incorporation du substrat via contact direct entre l'alcane et les cellules colonisant la surface de la goutte. 2- Plusieurs auteurs ont observé une incorporation de fines gouttelettes d' alcanes adhérant à la paroi des microorganismes (Hommel, 1990), cette hypothèse implique la production d'un agent tensioactif émulsifiant. 3- Enfin, pour les alcanes de plus faible poids, l'incorporation solubilisée est proposée (Fukui et Tanaka, 1981; Haferburg, 1986).

Les substrats hydrocarbonés de choix pour les microorganismes sont les alcanes ayant entre 10 et 20 atomes de carbone. Plus la ramification est importante, plus difficile est sa biodégradation. Les alcènes présents dans certains carburants sont des composés volatils (C_4-C_5) et auront tendance à s'évaporer. Lorsqu'ils sont présents, ils sont moins bien métabolisés que les alcanes correspondants. Les cycloalcanes sont rarement utilisés comme substrat de croissance. À de faibles concentrations, ils sont dégradés lentement (Atlas, 1988).

Les alcanes constituant une portion importante des huiles diésels, la plupart des études se sont penchées sur la dégradation de ceux-ci. Bien qu'il existe des différences entre les voies métaboliques empruntées par différents types de micro-organismes, il existe aussi des similitudes importantes. Les chaînes d'alcanes sont principalement dégradées par une oxydation du groupement terminal méthyle à un acide gras organique (figure 1.4).

L'oxydation initiale est le résultat de trois étapes de réaction au cours desquelles l'hydrocarbure est d'abords oxydé pour former un alcool. L'alcool est ensuite oxydé à un aldéhyde et finalement, l'aldéhyde est transformé en un acide gras organique. Par la suite, l'acide gras est dégradé selon la voie métabolique connue sous le nom de β -oxydation, pendant laquelle deux carbones sont clivés séquentiellement de la molécule, formant l'acetyl-CoA et l'acyl-CoA gras. Ceux-ci sont ensuite métabolisés via le cycle de Krebs. L'acyl-CoA gras sert de substrat à d'autres β -oxydation (Baker et Herson, 1994).

La biodégradation d'huiles diésels dans les sols a été observée en laboratoire aussi bien que sur le terrain. Plusieurs études décrivent même la dégradation d'hydrocarbures pétroliers en climat nordique (Aislabié *et al.*, 1998; Whyte *et al.*, 1998). L'approche la plus populaire dans le traitement des hydrocarbures pétroliers est la biorestauration *in situ*. Les bactéries hydrocarbonoclastes sont retrouvées dans la plupart des écosystèmes (Atlas, 1988) et la stimulation de bactéries indigènes est souvent la voie la moins coûteuse. Les performances de restauration *in situ* sont impressionnantes.

Frankenberg *et al.* (1989) ont réussi, par injection de nutriments et de peroxyde d'oxygène, à traiter une contamination de 1500 mg/kg d'hydrocarbures en 7 mois (moins de 1 mg/kg à la fin du traitement).

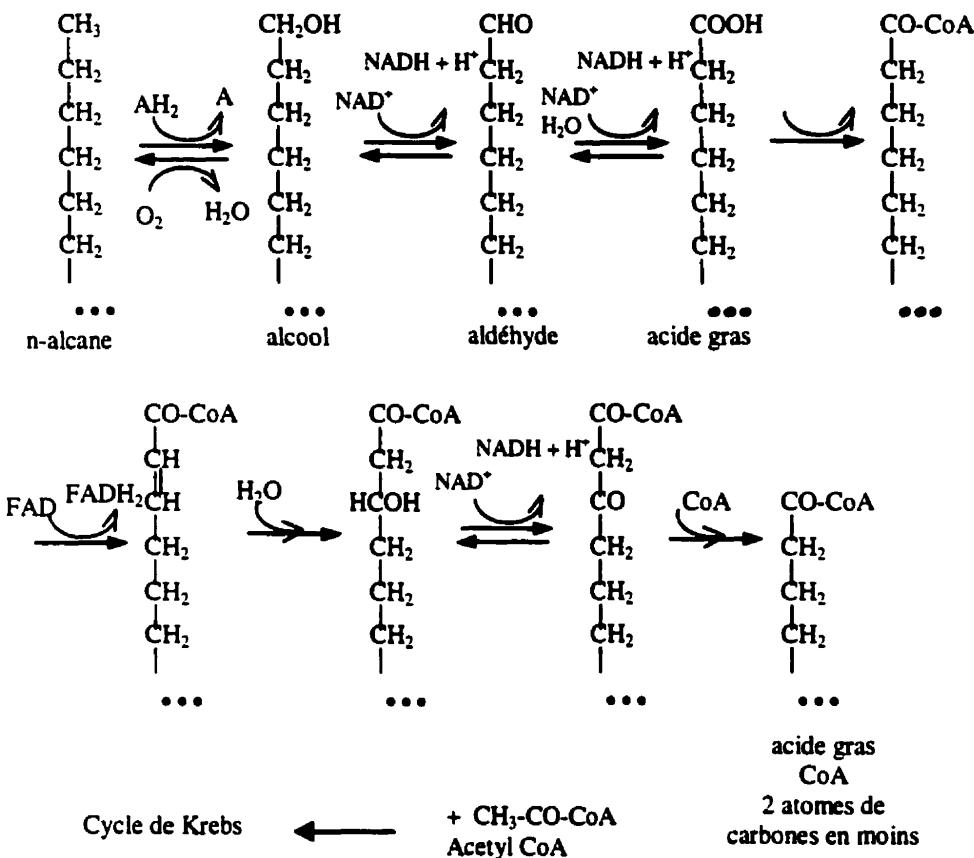


Figure 1.4 Dégradation des n-alkanes (Baker et Herson, 1994)

La présence d'une variété de contaminants dans un sol peut influer sur les réponses biologiques des différents dégradeurs. En effet, la flore bactérienne doit faire face à plusieurs sources de carbone et les contaminants font l'objet d'une sélection préférentielle de la part des microorganismes. La dégradation des hydrocarbures présents dans la solution de préservation du bois peut être influencée par la présence des chlorophénols.

Pour ce qui est de l'influence du PCP sur la dégradation des hydrocarbures, des résultats différents sont rapportés. En effet, Samson et Zaloum (1989) rapportent que la présence de PCP en faible quantité (<100 mg/kg) empêche l'activité de biodégradation des hydrocarbures. Par contre, Trudell *et al.* (1994) ont observé la biodégradation d'hydrocarbures (13 000 mg/kg) et de PCP (300 mg/kg) lors d'un traitement *in situ* de sol contaminé aux produits de préservation du bois. En général, le PCP de par sa toxicité semble ralentir ou inhiber la dégradation de composés plus facilement métabolisables. Certains auteurs ont étudié l'influence de composés chlorés sur la dégradation d'hydrocarbures. Millette *et al.* (1995) observaient lors d'une étude sur l'interaction des différents constituants de la créosote, une augmentation du temps de latence lors de la minéralisation du carbazole en présence de PCP ou de dibenzofurannes. Morris (1995) *et al.* ont observé que la présence de BPC inhibait la dégradation d'hydrocarbures pétroliers, mais ne pouvaient conclure sur la nature de l'inhibition.

1.2.3 Biodégradation des dioxines et furannes polychlorées

Les travaux portant sur la biodégradation des dioxines et furannes sont très récents. En effet, ce n'est que depuis peu que l'on s'attarde à la problématique des dioxines présentes dans le sol de même qu'aux moyens de décontamination.

Plusieurs études ont porté sur la dégradation des dioxines et furannes par des souches pures de micro-organismes aérobies (Fortnagel, 1990; Harms, 1990; Klecka, 1980; Megharaj *et al.*, 1997; Mona, 1993; Wilkes, 1996; Wittich, 1992). Peu de ceux-ci se sont montrés capables de dégrader ces contaminants, ou alors ne dégradent que les composés faiblement chlorés. La plupart des souches ne peuvent utiliser les dioxines comme source de carbone, et nécessite donc un apport de carbone supplémentaire afin de permettre leur croissance. Halden *et al.* (1997) rapportent que la plupart des études effectuées sur la biodégradation des dioxines et furannes n'observent qu'une

biotransformation limitée des contaminants produisant des produits mono et dihydroxylés analogues.

Klecka *et al.* (1980) ont déterminé que le genre *Beijerinckia* était incapable d'utiliser les dibenzo-p-dioxines polychlorées comme source de carbone. Le contaminant est simplement oxydé par l'espèce. Lors de cette étude, la dégradation des 1-MonoCDD, 2-MonoCDD, 2,3DiCDD et 2,7DiCDD a été observée. Aucun métabolite n'a été retrouvé dans la culture croissant en présence de DiCDD. Par contre, des métabolites provenant de MonoCDD ont été détectés. Lors de cette dégradation les noyaux des molécules ont été brisés, et les enzymes 2,3-dihydroxybiphényle et catécol (responsables de la fission des anneaux aromatiques) ont été détectés.

Harms *et al.* (1990) ont constaté que la dégradation par *Pseudomonas* était très lente et que les DD et DF ne servaient pas de source de carbone. Ils ont constaté l'apparition d'un métabolite principal, le 2-phénoxymuconique. Par contre, Fortnagel (1990) et Kasuga *et al.* (1997) ont observé la croissance de *Pseudomonas* HH69 et DBF63 en utilisant le DF comme seule source de carbone. Une culture mixte isolée par culture sélective, incapable d'utiliser les dibenzofurannes comme source de carbone, démontrait des productions de métabolites différents des cultures pures de *Pseudomonas* (Fortnagel, 1990).

Le genre *Sphingomonas* inclus plusieurs bactéries capables de transformer les dioxines et furannes et de les utiliser comme source de carbone et d'énergie. En effet, plusieurs études (Megharaj *et al.*, 1997; Wilkes, 1996; Wittich, 1992) permettent de croire que la dégradation des dibenzo-p-dioxines se fait facilement à l'aide de cette bactérie. Par contre, la dégradation des dioxines possédant plus de trois atomes de chlore est impossible. Les *Sphingomonas* RW1 peuvent minéraliser les DF et DD (Wittich, 1992) et peuvent cométaboliser les mono et dichloro dérivés de ces composés en mono et dichloro-catécols et salicylates (Wilkes, 1996). Cette espèce est donc le sujet de recherches intensives puisqu'elle montre un important potentiel catabolique, qui tentent

d'élargir ses capacités de dégradation vers des isomères plus chlorés.

Le *Staphylococcus auriculans* DBF63 est une bactérie Gram positive qui peut utiliser les dibenzofurannes comme unique source de carbone et d'énergie (Mona, 1993). Le processus de dégradation des DD et DF par cette bactérie ressemble grandement au processus de dégradation suivi par les bactéries *Pseudomonas*. Il n'a pas été déterminé lors de ces essais si les composés polychlorés pouvaient être dégradés par cette bactérie.

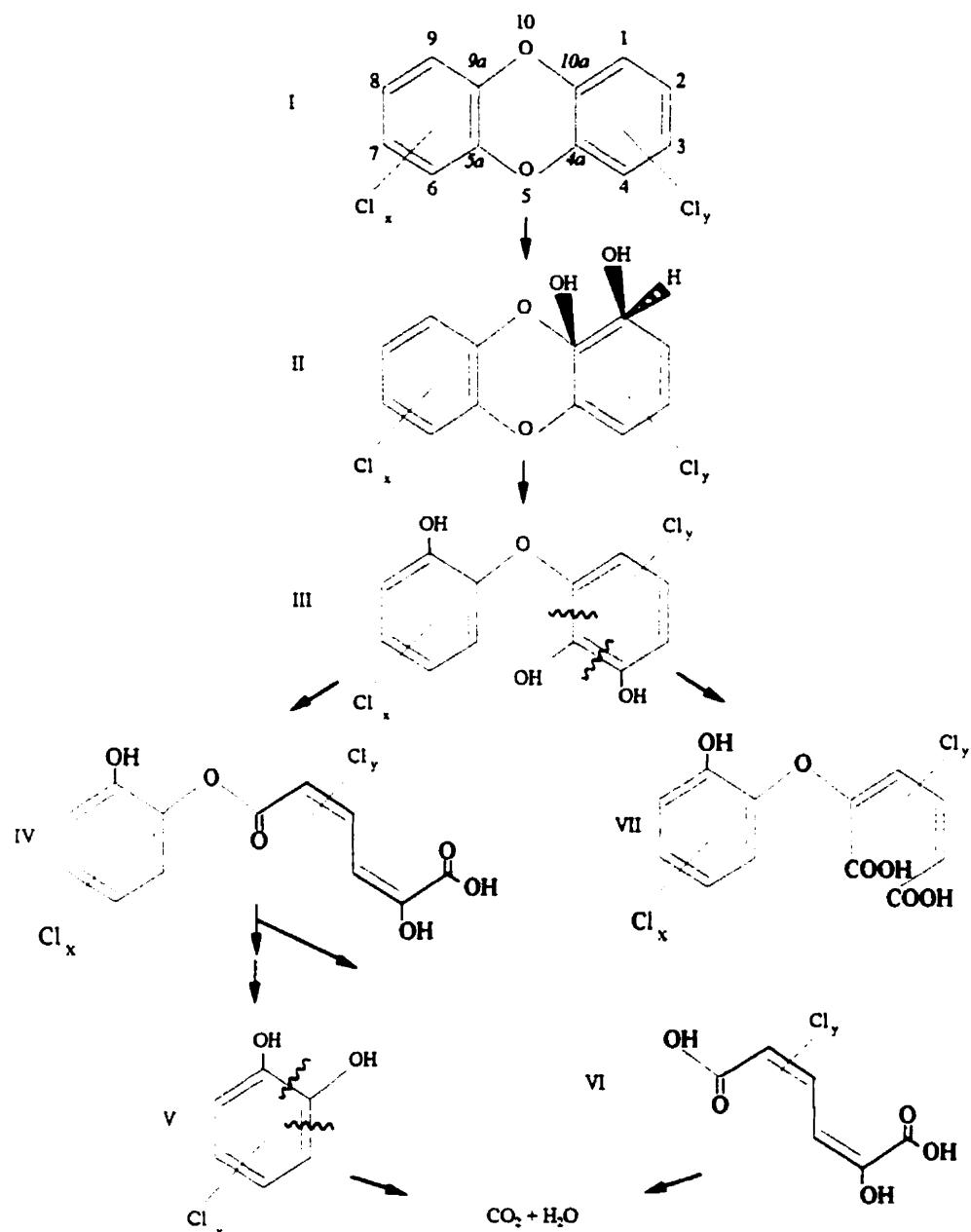


Figure 1.5 Résumé des voies de dégradation des dibenzo-p-dioxines (DD) et des congénères mono et dichlorés.

Les DD (structure I figure 1.5, $x + y = 0$) possède quatre sites où une attaque de dioxygénase régioselectif est possible (positions : 1, 10a-, 4, 4a-, 5a, 6-et 9,9a-). *Sphingomonas* spp. RW1, HH69 et SS3 utilisent le système de dibenzofuranne 4,4a-dioxygénase et des enzyme de fonctionnalité identique pour insérer la molécule d'oxygène dans le DD. L'hemicetal (1-hydro-1,10a-dihydroxydibenzo-p-dioxines ; structure II) résultant est réaromatisé spontanément pour former de l'éther 2,2',3-trihydroxydiphenyl (structure III). Dans le cas de RW1, III subit un clivage extradiol par 2,2',3-trihydroxybiphenyl dioxygénase (THBD) et devient un acide 2-hydroxy-6-(2-hydroxyphenoxy)-6-oxo-2,4-hexadienoic (structure IV, figure 1.5). Une saponification de IV peut subvenir produisant un acide 2-hydroxymunoic (structure VI, figure 1.5) et ultimement du catechol (structure V, figure 1.5). Les deux produits du clivage sont minéralisé dans le cycle d'acide tricarboxylic. Dans le cas de HH69 et SS3, l'éther 2,2',3-trihydroxyphényl subit un clivage extradiol aboutissant à l'accumulation d'acide 2-(2-hydroxyphenoxy)-muconic (structure VII, figure 1.5). RW1 transforme aussi certains congénères mono et dichlorés (structure I figure 1.5, $x + y = 1$ et $x + y = 2$, respectivement) en catechols chlorés analogues.

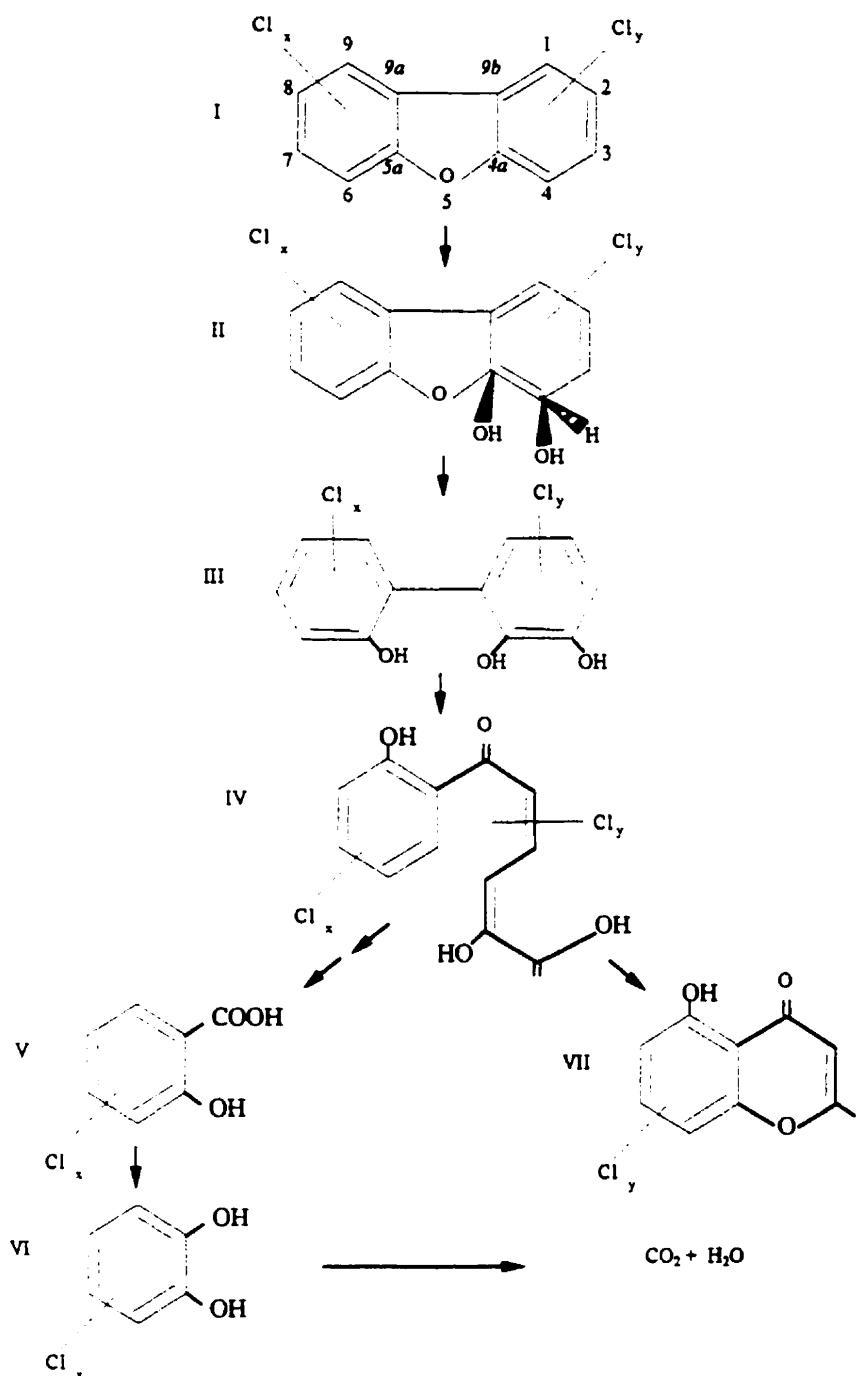


Figure 1.6 Résumé de voies de dégradation des dibenzofurannes (DF) et congénères mono et dichlorés

Les DF (structure I, figure 1.6, $x + y = 0$) possède deux sites (positions 4,4a-, 5a,6-) où une attaque par dioxygénase régioselectif est possible. *Sphingomonas* spp. RW1, HH69 et HH19k, *Terrabacter* spp. DPO360, et DPO1361, ainsi que *Staphylococcus auriculans* DB63 utilisent plusieurs DF 4,4a-dioxygénase de fonctionnalité identique pour insérer la molécule d'oxygène dans le DF. L'hemicetal (1-hydro-,1,10a-dihydroxydibenzo-p-dioxines ; structure II, figure 1.6) résultant est réaromatisé spontanément pour former de l'éther 2,2',3-trihydroxydiphenyl (structure III, figure 1.6). Dans le cas de RW1, III subit un clivage extradiol par 2,2',3-trihydroxybiphenyl dioxygénase (THBD) et devient un acide 2-hydroxy-6-(2-hydroxyphenoxy)-6-oxo-2,4-hexadienoic (structure IV, figure 1.6). IV est dégradé via une succession de racourcissement de la chaîne ; l'accumulation passagère d'acide salicylique (structure V, figure 1.6) indique souvent cette voie de dégradation. V est d'abords oxydé en catéchol (structure VI, figure 1.6) qui est ensuite minéralisé suivant un cycle acide tricarboxylique. La transformation de certains congénères mono et dichlorés (structure I figure 1.6, $x + y = 1$ et $x + y = 2$, respectivement) est typiquement improductive et produits des correspondant chlorés analogues à V et sont de produits "cul-de-sac". Des dérivés chlorés de 2-methyl 4H-chomen-4-one (structure VII, figure 1.6) peuvent aussi être produits pendant la conversion de dichloro-DF.

L'étude du devenir des dioxines et furannes dans les sols contaminés commence à être exigée par les gouvernements. Jusqu'à présent, peu d'études ont été publiées. Laine *et al.* (1997) rapportent qu'aucune disparition des PCDD et PCDF n'est observée suite au traitement d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois par compostage. Le profil de la composition des congénères à la fin du traitement était semblable à celui de la solution de préservation de bois à la source de la contamination.

1.3 Biotraitements des sols contaminés aux produits de préservation du bois

Le Québec s'est doté depuis 1988 d'une politique de réhabilitation des sols contaminés. Faute de normes légales, cette politique implique diverses actions correctrices lorsque la contamination dépasse une concentration limite appelée critère C. En ce qui concerne les différentes composantes de la solution de préservation du bois, ce critère est de 5 mg/kg de sol pour le PCP, de 5 mg/kg de sol pour chacun des chlorophénols, de 3500 mg/kg pour les hydrocarbures pétroliers ($C_{10}-C_{50}$) et de 750 ppt en équivalents toxiques pour les PCDD et PCDF (MEF, 1998).

Aucune donnée dans la littérature ne fait état du traitement biologique de tous les composés xénobiotiques d'un sol contaminé à la solution de préservation du bois. La créosote, un autre mélange utilisé pour la préservation du bois, est par contre le sujet de plusieurs travaux. Elle est principalement constituée d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et de chlorophénols.

Deux approches sont populaires en ce qui attire à la biorestauration de sites contaminés aux hydrocarbures pétroliers ou au PCP. La biostimulation qui consiste à stimuler la flore indigène et la bioaugmentation qui est l'apport d'une biomasse cultivée.

1.3.1 Biostimulation

L'addition de nutriments à un sol dans le but d'aider la biodégradation est appelée biostimulation (Alexander, 1994). On peut inclure dans cette définition la stimulation de l'activité microbienne d'un milieu par des ajustements de pH, d'humidité, de l'aération et de température. Dans le domaine de l'assainissement des sols, la biostimulation se retrouve à la base de plusieurs techniques. Il faut cependant que le sol contaminé réponde à certains critères pour espérer une décontamination par

biostimulation. Il faut que la flore indigène soit capable de métaboliser le composé et que celui-ci soit disponible aux microorganismes (Baker et Herson, 1994).

Le Tableau 1.4 présente les principaux paramètres permettant d'optimiser la dégradation aérobie. La teneur en eau doit représenter de 25 à 85% de la capacité de rétention au champ. En plus d'être important pour la solubilité des contaminants, de l'oxygène et des nutriments, elle est un facteur important à la mobilité des micro-organismes. Dans un milieu liquide, la concentration en oxygène minimale pour s'assurer des conditions aérobies est de 0,2 mg/L alors que dans un milieu poreux, l'air doit représenter 10% (v/v) des pores. Pour ce qui est de la présence d'une source de carbone secondaire lors de la dégradation du PCP, les essais dans la littérature sont contradictoires. Alors que Valo *et al.* (1985) notaient que les sources de carbone ajoutées (extrait de levure, acide glutamique et peptone) ne rehaussaient pas la dégradation du PCP par une culture mixte, Watanabe (1977) démontrait qu'un ajout de levure accélérerait la dégradation du PCP.

Le traitement en biopile de sols contaminés à l'essence ou au diésel, maintenant très répandu, en est un exemple (Chaconas *et al.*, 1997; Cyr et Spieles, 1997; Graves *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1997; Tamburini *et al.*, 1997). Les traitements de bioventilation et de biosuccion sont aussi des techniques de biostimulation, favorisant la dégradation par l'apport d'oxygène.

Lors d'une évaluation des conditions optimales de dégradation d'hydrocarbures en laboratoire (Tamburini *et al.*, 1997), la température et l'humidité ont été les paramètres les plus influents sur la dégradation. Toutefois, notons qu'Alexander (1994) cite plusieurs exemples démontrant que l'ajout de nutriments n'est pas toujours bénéfique. En effet, pour des raisons encore inexpliquées, l'ajout d'azote aurait inhibé la minéralisation d'hydrocarbures aromatiques et aliphatiques. Ils soupçonnent par contre que la présence d'azote ait affecté le rendement de l'utilisation du carbone.

Tableau 1.4 Paramètres permettant l'optimisation de la biodégradation aérobie

Paramètres	Effets	Plages optimales
Humidité du sol	<u>carence</u> : inhibe le métabolisme des microorganismes ainsi que leur mobilité dans le sol <u>surplus</u> : limite le transport de l'oxygène	de 25% à 85% de la capacité de rétention au champ
Contenu du sol en argile	<u>surplus</u> : limite la mobilité des microorganismes et les contaminants ont tendance à être adsorbés	< 25% d'argile
Aération	<u>carence</u> : manque d' O_2 limite la biodégradation aérobie <u>surplus</u> : volatilisation des contaminants	> 0,2 mg de O_2/l ou >10% d'air (v/v)
Nutriments	Les microorganismes ont besoin d'autres composés que le carbone pour croître	ratio C:N:P = 120:10:1
Potentiel d'oxydo-réduction	Surtout nécessaire à la biodégradation anaérobiose, des accepteurs d'électrons autres que O_2 L'activité microbienne dépend du pH.	aérobie > 50 mV
pH	La solubilité et l'adsorption des contaminants polaires sont dépendants du pH.	entre 6 et 8
Température	Le métabolisme microbien est fonction de la température	15 à 45 °C pour mésophiles
co-substrats	Pour le co-métabolisme ou la biodégradation de composés présents en trop faible concentration	Ajout de co-substrats biodégradables ou analogues chimiques

Sources: (Providenty *et al.*, 1993) et (Environmental Protection Agency, 1990)

1.3.2 Bioaugmentation

Pour la biorestauration de sols contaminés par des composés organiques complexes, la biostimulation de la flore indigène ne s'avère pas une méthode assez "agressive". Mueller *et al.*(1991) soulignent que la nature récalcitrante du PCP rend un simple traitement de biostimulation inefficace.

L'inoculation d'un sol par des microorganismes sous forme de souche pure ou de consortium microbien est appelée bioaugmentation. Lors de biotraitements de sols contaminés, la bioaugmentation peut s'avérer nécessaire si un contaminant est trop毒ique pour la flore indigène, s'il est présent en concentration trop élevée ou trop faible pour supporter une activité microbienne ou s'il n'y a tout simplement pas d'organismes indigènes présents capables de dégrader le composé (Alexander, 1994). Selon Forsyth *et al.* (1995), l'inoculation d'un sol contaminé par une flore acclimatée améliore les chances de succès d'un traitement de bioassainissement.

La bioaugmentation peut se faire à l'aide d'inoculum sous forme de souches pures ou mixtes, avec des organismes modifiés génétiquement ou des micro-organismes encapsulés ou immobilisés (Karamanev *et al.*, 1998; Laine et Jorgnson, 1996).

Le traitement de sols contaminés au PCP par bioaugmentation à l'aide de souches pures de dégradeurs a fait l'objet de plusieurs travaux (Colores *et al.*, 1995; Crawford et Mohn, 1985; Edgehill et Finn, 1983). Cependant, dans l'optique des traitements de sols à grande échelle, l'isolement de souches pures de dégradeurs et leur culture est une approche fastidieuse et coûteuse. De plus, leur introduction dans un environnement étranger réduit leur chance de survie, et en conséquence les chances de décontamination du sol. Crawford et Mohn (1985) rapportent que plusieurs inoculations de *Flavobacterium* sur plusieurs mois ont été nécessaires à la décontamination d'un sol contenant 298 mg de PCP/kg à 58 mg/kg.

Les microorganismes ne se retrouvent pas à l'état de culture pure dans la nature. Bien que des souches capables de dégrader les chlorophénols aient été isolées, il n'en reste pas moins que les consortiums bactériens montrent des performances et tolérances supérieures en milieu liquide (Apajalahti et Salkinoja-Salonen, 1984; Brown *et al.*, 1986, Karamarev, 1998 #3; Valo *et al.*, 1985). Par exemple, Karamarev *et al.* (1998) ont réussi à atteindre un taux de dégradation de 920 mg de PCP/l·j en utilisant un consortium immobilisé sur géotextile. Par ailleurs, la dégradation de plusieurs composés aromatiques halogénés est le résultat du travail combiné des bactéries d'un consortium microbien (Baker et Herson, 1994). Suite à une revue des travaux effectués sur des cultures pures, on se rend compte que tous les dégradeurs de PCP n'agissent pas de la même façon. Certains sont incapables de minéraliser le 2,6-dichlorophénol alors que d'autres ne peuvent que minéraliser les chlorophénols substitués aux positions 2 et 6. Ces différences soulignent l'importance de l'utilisation d'un consortium de dégradeurs pour faire face à une contamination mixte. Malheureusement, le potentiel de biodégradation des chlorophénols, par des cultures mixtes en milieu poreux (sol, tourbe, polymères...), est peu étudié. Pourtant, la présence d'un support solide joue un rôle important dans l'activité de dégradation des micro-organismes (voir section 1.3.4). De plus, Briglia *et al.* (1990) illustrent l'effet du support solide sur l'activité des microorganismes en montrant clairement que la culture de souches en milieu liquide ne permet pas de prédire leur comportement lorsqu'elles seront introduites dans un sol.

L'approche de traitement de sol par bioaugmentation peut s'avérer complexe et coûteuse. Pour certaines applications, la biostimulation, bien que moins rapide, s'avère plus efficace si l'on considère les coûts et les performances (Leavitt et Brown, 1993). C'est pourquoi, lorsque l'on opte pour un traitement par bioaugmentation, il est important de s'assurer de la survie des micro-organismes inoculés dans leur nouvel environnement. Van Elsas *et al.* (1998) recommandent l'utilisation de bactéries isolées

du même milieu que celui dans lequel elles seront inoculées. Étant déjà adaptées au milieu, elles devraient théoriquement mieux supporter les stress environnementaux.

1.3.3 Sol activé

Le concept de bioaugmentation par sol activé est une des méthodes de bioaugmentation par un inoculum immobilisé les plus récentes. Ce concept a été développé au cours des cinq dernières années dans le but de permettre une biodégradation efficace du PCP dans un laps de temps le plus court possible. Le principe du sol activé est d'utiliser la biomasse mixte déjà présente dans un sol et possédant la capacité de dégrader un contaminant cible et de la multiplier en bioréacteur, en présence de particules de sol d'où elle provient, en l'alimentant avec ce contaminant cible.

Le terme de sol activé provient d'une analogie empruntée au domaine du traitement des eaux usées ; les boues activées. Le principe supportant le concept est que la présence du sol rend le milieu très favorable à la croissance microbienne. Les micro-organismes peuvent se fixer aux particules de sol qui représentent un support potentiel pour la formation de biofilm. De plus, la surface spécifique élevée des particules favorise l'adsorption des contaminants, abaissant leur concentration en phase aqueuse. Finalement, le fait d'utiliser le consortium indigène et de le cultiver à même son sol d'origine permet de compter sur les relations écologiques existantes afin de diminuer le stress du biotraitemennt sur l'environnement (Otte, 1998).

Le procédé d'activation de sol permet d'augmenter en une courte période de temps la densité des microorganismes d'intérêt (Otte, 1998). Une fois produite à la densité désirée, la biomasse est introduite dans un sol contaminé et utilise le contaminant comme substrat.

Jusqu'à maintenant, deux types de production de sol activé ont été étudiés. L'une en alimentation continue (Otte *et al.*, 1994) et l'autre en alimentation par ajouts (Barbeau *et al.*, 1997).

1.3.3.1 Alimentation en continu (Otte et al., 1994)

La production de sol activé a été effectuée dans un réacteur de 15-L alimenté en continu avec du PCP pur dissous dans une solution alcaline. Le taux de chargement (alimentation) a été augmenté progressivement (0, 50, 100, 300, 500, 700, 900 mg/L·j) pendant les 35 jours d'opération. Pendant la production, la concentration de PCP résiduel en solution se maintenait proche de la limite de détection. Le taux de dégradation est passé de 70 mg/L·j à 700 mg/L·j en 25 jours.

Des essais en microcosmes ont aussi montré que l'inoculation avec le sol activé d'un sol contaminé à la créosote diminue considérablement le temps requis pour la minéralisation du PCP et des HAP.

Pendant la production en continu, le réacteur fut alimenté momentanément par ajouts consécutifs de 100 mg/L. Le temps requis pour une dégradation complète est passé de 25h à 10h puis à 5h. Ces résultats suggéraient qu'une méthode d'alimentation par ajouts successifs s'avérerait une façon efficace d'augmenter l'activité des dégradeurs et peut-être aussi leur tolérance au PCP. De plus, cette approche permettrait de diminuer les coûts de production de la biomasse active puisque le principe d'alimentation du bioréacteur est plus simple.

1.3.3.2 Alimentation par ajouts (Barbeau et al., 1997)

Suite à ces résultats, Barbeau *et al.* (1997) étudièrent la production de sol activé avec un mode d'alimentation par ajouts. La solution alcaline alimentée contenait du PCP sous sa forme de sel de sodium. Des ajouts successifs de concentrations croissantes (50, 100, 150, 200, 250, 300 mg/L) étaient alimentés lorsque la concentration de PCP se trouvait sous la limite de détection. Le taux de consommation du PCP lors de la production de sol activé a atteint 200 mg/L·j. L'inoculation d'un sol fortement contaminé au PCP, dont l'activité microbienne était inexistante, permis d'abaisser la concentration de 400 mg/kg de PCP à 5 mg/kg en 130 jours.

Les résultats positifs obtenus jusqu'à présent permettent de considérer le traitement de sols contaminés par bioaugmentation de sol activé comme une technologie fort prometteuse dans le domaine de la biorestauration.

1.3.4 Influence des paramètres environnementaux

Les principaux facteurs stimulant la croissance bactérienne sont exposés dans la section 1.3.1. Ce sont des facteurs généralisés permettant la stimulation de biodégradation dans les sols de composés peu récalcitrants comme les alcanes. Certains phénomènes influençant particulièrement les performances d'un procédé de biorestauration d'un sol contaminé méritent une attention plus particulière lorsque des composés récalcitrants sont impliqués.

À titre d'exemple, Crawford et Mohn (1985) ont introduit des bactéries du genre *Flavobacterium* sp. dans un sol contenant 100 mg/kg de PCP et n'ont pas observé de dégradation de PCP. Par contre, les résultats de Edgehill et Finn (1982) et Colores *et al.* (1995) inoculant respectivement des bactéries du genre *Arthrobacter* et *Sphingomonas* sp. dans un sol contaminé au PCP, ont montré une dégradation significativement accrue par rapport au sol non inoculé. Ce qui est très intéressant de noter ici, c'est que les cultures utilisées par Crawford et par Edgehill ont été reclassifiées par Nohynek *et al.* (1995) ainsi que par Karlson *et al.* (1995). Ces deux cultures seraient toutes deux du genre *Sphingomonas chlorophenolica* sp. nov. Les différences de performances ne seraient donc pas dues à la souche utilisée mais à un ensemble d'autres variables tel que le type de sol utilisé ou la méthode de culture des souches.

La production d'une biomasse active sous forme de sol activé, fait intervenir deux facteurs d'importance. L'utilisation d'une matrice solide lors de la production d'une biomasse active fait intervenir une deuxième phase amenant de nouvelles interactions. Ensuite, les réactions des biomasses acclimatées et actives, face aux facteurs

environnementaux ne sont pas nécessairement similaires aux réactions de biomasse à leur état "naturel".

1.3.4.1 Présence d'une matrice solide

Plusieurs facteurs peuvent influencer la toxicité ou la biodisponibilité d'un composé, le plus déterminant semble être la présence d'une matrice solide pouvant supporter la biomasse. Plusieurs fonctions peuvent lui être attribuées.

Support pour la biomasse. Harvey *et al.* (1984) ont montré que la plupart des bactéries sont attachées aux sédiments des aquifères alors qu'une faible proportion reste dans l'eau. Dans un habitat tel que le sol, les bactéries existent à la surface de matériaux particulaires, et ces cellules sont fréquemment sous formes de petites colonies ou agrégats de cellules (Alexander, 1994).

Le support peut servir de protection contre la toxicité des contaminants. Le support joue le rôle d'adsorbant pour le contaminant et diminue conséquemment sa concentration en solution (Otte, 1998). Des copeaux de bois rajoutés à un substrat contaminé au PCP absorbent une partie du polluant réduisant ainsi sa toxicité (Apajalahti et Salkinoja-Salonen, 1984). L'immobilisation de bactéries sur l'alginate de calcium (O'Reilly *et al.*, 1988) ou sur géotextile (Karamarev *et al.*, 1998) augmente le seuil de toxicité du substrat lors du traitement d'eau usée. L'adsorption sur les particules de sol implique divers mécanismes tels que par exemple l'attraction électrostatique, les forces de Van der Walls, la chemisorption et des réactions d'échange d'ions (Christodoulatos et Mohiuddin, 1996). L'adsorption des contaminant dépend des propriétés physiques et chimiques du sol et du contaminant. Selon Christodoulatos *et al* (Christodoulatos *et al.*, 1994), les propriétés du sol qui peuvent agir sur l'adsorption du PCP sont le pH, la taille des particules, la capacité d'échange ionique (CEC), le contenu en carbone organique et la minéralogie des argiles.

Le support peut aussi devenir une source de nutriments quand ceux-ci possèdent une fraction organique. Certains supports comme les sols naturels, la tourbe ou le compost peuvent être des sources de nutriments non négligeables. Lyman *et al.* (1992) soulignent que les capacités d'échanges ioniques régissant les échanges d'ions entre le complexe adsorbant du sol et son milieu sont responsables de l'accumulation de différentes sources de nutriments (acides gras, acides aminés, hydrates de carbone) dans les sols. Laine *et al.* (1996), ont utilisé un compost comme support microbien et source de nutriment pour le traitement de sol contaminé au PCP.

La nature de cette matrice joue un rôle très important. L'impact sera différent selon le support solide présent. Otte *et al.* (1998) ont observé lors d'essais de minéralisation du PCP, des différences marquées de performances en fonction du support utilisé. En effet, après 5 jours, la minéralisation de 100 mg/L de PCP a atteint 75% en présence de sol contaminé, alors qu'elle n'était que de 35% en présence de paille et de sciure de bois, et de 5% et 0,5% en présence d'argile et de sable respectivement. La présence de substances humiques dans un sol contaminé est aussi déterminante. La liaison entre les composés xénobiotiques et les substances humiques constitue une des réactions majeures qui transforment les produits chimiques dans la nature. La sorption des composés xénobiotiques diminue la quantité de matière pouvant interagir avec la biomasse, abaissant ainsi la toxicité des composés parents (Bollag, 1992). Lors du choix d'un support, il faudra aussi tenir compte d'une propriété importante qui influence grandement la réussite d'une décontamination ; la biodisponibilité du ou des substrats. La sorption irréversible des contaminants à la matrice solide pourrait avoir l'effet d'abaisser sa biodisponibilité, empêchant la décontamination (Alexander, 1994).

1.3.4.2 Flore acclimatée

L'acclimatation de microorganismes à des composés organiques récalcitrants est une étape très importante dans un procédé de biodégradation. L'acclimatation est la période

pendant laquelle la biodégradation d'un composé n'est pas détectée. Plusieurs facteurs peuvent intervenir. L'organisme peut ne pas posséder l'enzyme inductrice si le composé n'est pas présent dans le médium, une période d'acclimatation est donc nécessaire à la production de cette enzyme. La période d'acclimatation peut aussi être le temps requis afin qu'une petite population de dégradeurs se multiplie jusqu'à ce que leur action devienne visible. Il est aussi possible que la flore bactérienne ait besoin de s'acclimater aux toxines ou aux inhibiteurs présents dans l'environnement. Une biomasse acclimatée et active est caractérisée par sa densité importante de dégradeurs et son activité de dégradation élevée. Buitron *et al.* 1995 ont observé que l'acclimatation d'un consortium bactérien en cuvée a permis d'augmenter 26 fois le taux moyen de dégradation du phénol et 35 fois celui du 4-chlorophénol. Selon ces conditions particulières, plusieurs nouveaux paramètres peuvent influencer leurs réponses. En effet, ils ont aussi pu noter une réduction importante de 80% de l'activité enzymatique d'un consortium acclimaté suite à 6 heures de famine. Ils soulignent donc l'importance d'une méthodologie adéquate lors de l'acclimatation d'un consortium microbien.

Lors de la culture d'une biomasse adaptée aux dibenso-p-dioxine et dibenzofuranne, Megharaj *et al.* (1997) ont observé une baisse importante de densité de dégradeurs suite à une période de famine, qui sont réapparus dès que du dibenzofuranne a été réintroduit.

De plus, les cultures acclimatées sont souvent de densité microbienne importante. Cette "masse organique" peut avoir des influences physiques sur son milieu. Par exemple, en culture liquide, l'adsorption du PCP sur la biomasse est non négligeable selon Tsezos *et al.* (1991). Ces observations sont confirmées par Moos *et al.* (1983) qui ont observé qu'en culture liquide, de fortes concentrations de PCP inhibait sa dégradation, mais que des concentrations élevées de biomasse sont capables de tolérer de plus importantes concentrations de PCP.

1.4 Biodiversité d'un sol

Nul part dans la nature, la densité d'espèces se côtoyant n'est aussi impressionnante que dans le sol. Le nombre de bactéries par kg de sol est d'environ 10^9 à 10^{12} , ce qui correspond à environ 300 kg de bactéries par ha (Bollag et Stotsky, 1993). On estime que dans un seul gramme de sol il peut y vivre jusqu'à plusieurs milliers d'espèces (Giller *et al.*, 1997). Tout ça sans compter les champignons, les levures, les algues, les protozoaires et les nématodes. Si les relations entre les organismes qui composent l'écosystème d'un sol sont analysées, il en ressort que chacun a son rôle fonctionnel que l'on appelle niche écologique (VanDemark et Batzing, 1987).

Il y a plusieurs raisons de protéger la biodiversité des sols. Des raisons écologiques, premièrement parce que la décomposition et la formation de sol sont des mécanismes clefs dans le fonctionnement de l'écosystème. Puis, parce que les organismes du sol font partie de la chaîne alimentaire de plusieurs espèces. Il y a aussi les raisons utilitaires comme l'agriculture, puisque la biodiversité des sols est à la base des sciences agricoles. Il y a aussi la détoxicification de déchets, eaux usées et sols qui est effectuée par l'entremise de microorganismes provenant du sol. Certains iront même jusqu'à citer des raisons d'éthique (Hagvar, 1994), toute forme de vie devant avoir la même valeur. Pour toutes ces raisons, l'utilisation de produits chimiques ou autre traitement qui pourrait réduire la biodiversité du sol doivent être évités (Hagvar, 1998).

La diversité d'un sol peut être exprimée selon différents indices, la littérature en propose plusieurs (Ekschmitt et Griffiths, 1998). De plus, plusieurs modèles mathématiques peuvent être utilisés. Malheureusement aucun n'a été accepté comme étant une adéquate description des relations entre les différentes variables définissant la biodiversité, soit l'abondance, la richesse et le patron dominant.

1.4.1 Loi Fédérale concernant les produits biotechnologiques

L'utilisation des produits de biotechnologie, tel que des microorganismes génétiquement modifiés, peut avoir des répercussions indésirables sur l'environnement. L'introduction de souches bactériennes modifiées ou stimulées peut influencer et nuire à la biodiversité des sols ou d'un écosystème. C'est pourquoi le gouvernement canadien a entrepris des mesures de protection contre de telles possibilités. Les nouvelles dispositions du Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles, de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement, en vigueur depuis septembre 1997, requiert maintenant que toutes les substances nouvelles, incluant celles qui sont des organismes vivants, soient évaluées pour leur potentiel d'effets nocifs sur l'environnement essentiel pour la vie humaine, ou sur la vie ou la santé humaine (Environnement Canada, Déclaration des produits biotechnologiques, Brochure, 1998).

Sous ce règlement, les fabricants ou importateurs de substances nouvelles contenant des organismes vivant assujettis à une déclaration, doivent fournir les renseignements exigés par le Règlement. Il existe des exclusions de déclaration. Les organismes qui n'ont pas été isolés de leur environnement et dont la croissance est stimulée, ne sont pas considérés comme fabriqués, donc non assujettis au Règlement. Les opérations de compostage qui n'isolent pas et ne traitent pas les micro-organismes des déchets traités ne sont pas non plus assujetties au Règlement.

Un procédé de bioaugmentation avec des sols activés de sols contaminés par des produits de préservation du bois devra se soumettre au règlement et les renseignements visés à l'annexe XVIII devront être fournis si l'introduction de sol activé se limite à l'inoculation du sol contaminé d'origine.

1.4.2 Biodiversité des sols contaminés

La biodiversité d'un sol qui a été contaminé n'est naturellement plus la même qu'avant sa contamination. La contamination par des produits xénobiotiques bouleverse l'équilibre écologique du sol. C'est pourquoi il est important de ne pas agraver l'état de la flore du sol lors de son assainissement.

La biodiversité d'un sol peut aussi être utile à sa décontamination. En effet, une étude sur la biodiversité d'un consortium provenant d'un sol contaminé au 2,4-D (acide 2,4 – dichlorophenoxyacétique) (Vallaeys *et al.*, 1997) démontre la participation de différentes espèces et genres de bactéries lors de la dégradation de l'herbicide 2,4-D.

Certaines études touchent spécifiquement à évaluer la santé d'un sol. Par exemple, une équipe finlandaise a étudié la réponse d'une communauté de décomposeurs d'un sol de forêt à un stress combiné de précipitations acides et de présence de PCP (Salminen et Haimi, 1998). Durant l'expérience, ils ont noté un changement dans la biodiversité du sol, mais après 19 semaines de suivi, la communauté de décomposeurs était de retour à la normale.

D'autres études vont indirectement évaluer les changements de biodiversité en suivant la croissance des hétérotrophes totaux et de dégradeurs spécifique tel que Watanabe (1977) l'a fait. En effet, les résultats de comptes bactériens d'hétérotrophes totaux et de bactérie tolérante au PCP fait par, sur un sol régulièrement contaminé au PCP, indiquaient une augmentation du ratio de bactéries tolérantes au PCP sur les bactéries totales après chaque ajout de contaminant, puis une baisse de leur concentration quand plus aucun substrat n'était disponible.

1.5 Conclusion

L'assainissement de sols contaminés aux produits de préservation du bois est un domaine encore problématique. La présence de composés récalcitrants comme le PCP et les PCDD/F rendent l'activité microbienne difficile. L'inoculation d'une biomasse acclimatée peut augmenter les chances de décontamination. Par contre, il faudra considérer différents paramètres tel la nature du sol et le mode de production de la biomasse. L'utilisation d'un consortium cultivé sur support solide, de préférence son sol d'origine, semble l'approche la plus efficace. De plus, dans l'optique écologique des biotraitements, un débalancement de la biodiversité des sols est à éviter. La technique de bioaugmentation par sol activé est une approche efficace et respectueuse de l'environnement face au problème de contamination des sols par les produits de préservation du bois.

1.6 Hypothèse de recherche et objectifs

L'hypothèse de recherche sur laquelle se base le projet est la suivante :

La production d'une biomasse active sous forme de sol activé à l'aide d'une solution de préservation du bois à base de PCP permet d'acclimater la flore indigène à plusieurs contaminants tout en maintenant une bonne activité de dégradation du PCP, en ne modifiant pas la biodiversité de l'inoculum.

Les objectifs visés par cette étude sont les suivants :

- Comparer les performances de dégradation du PCP lors de l'activation d'un sol avec une solution de NaPCP et une solution de préservation du bois.
- Comparer la croissance microbienne produite par l'ajout des deux solutions d'activation.
- Comparer les performances d'une biostimulation et de la bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois avec du sol activé aux produits de préservation du bois et avec du sol activé au NaPCP.
- Vérifier que l'activation n'introduit pas de changement irréversible à la biodiversité intrinsèque des sols*

*Note : Cette section du projet faisant partie du projet de recherche au niveau doctoral de la candidate ainsi que d'un projet de maîtrise à l'INRS Institut-Armand-Frappier, les résultats ne seront pas discutés en détail.

Chapitre 2 Production de biomasse active sous forme de sol activé

2.1 Introduction

Le concept du sol activé repose essentiellement sur le développement d'un consortium provenant d'une fraction de sol contaminé et possédant l'activité recherchée. Cette biomasse immobilisée sur des particules de sol est développée en réacteur par enrichissement sélectif en utilisant un contaminant d'intérêt, pour son utilisation subséquente comme inoculum pour le traitement de sol contaminé en biopile. La production de biomasse active sous forme de sol activé se fait par ajouts successifs de contaminants dans un mélange boueux de sol et de milieu salin minéral (MSM). Les travaux publiés jusqu'à ce jour (Otte *et al.*, 1994, Barbeau *et al.* 1997 et Karamanev *et al.* 1998) ont utilisé des solutions alcalines de PCP et NaPCP comme source de substrat lors de production de biomasse acclimatée sous forme de sol activé. Afin de vérifier si l'acclimatation de la flore indigène aux constituants d'une solution de préservation du bois était possible tout en gardant une bonne activité de dégradation du PCP, une solution de préservation du bois a été utilisée en parallèle avec une solution alcaline de NaPCP.

Trois activations ont été effectuées. Une première avait pour but de vérifier la possibilité d'activer plus d'une flore microbienne à la fois, ainsi que de mettre au point les techniques de suivi. Il fallut, entre autre, développer des méthodes d'analyse permettant de comparer trois types de flores différentes (hétérotrophes totaux, dégradeurs de PCP et hydrocarbonoclastes). Ensuite, la méthode d'analyse du PCP par HPLC a dû être validée. En effet, la phase huileuse de la solution de préservation du bois à base de PCP présentait de nouveaux défis analytiques qu'il fallut relever. La deuxième activation avait pour but de comparer l'activité de biodégradation ainsi que

les biomasses produites par la technique de bioactivation à l'aide des deux solutions d'activation. Suite aux informations recueillies lors des deux premières activations, une troisième production a été effectuée dans le but de produire un inoculum pour la bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois. L'effet de plusieurs facteurs ont été vérifiés, tels la méthode d'alimentation, la présence d'une phase huileuse et les caractéristiques physico-chimiques du sol. Finalement, un modèle mathématique simple est proposé afin d'illustrer les interactions possibles entre les divers composants du sol activé.

Ce chapitre est séparé en trois sections distinctes. Premièrement les matériels et méthodes utilisés au cours des expériences sont décrits, puis les résultats sont présentés et enfin une discussion des résultats obtenus est faite.

2.2 Matériels et Méthodes

Note: Les protocoles expérimentaux détaillés incluant les résultats bruts obtenus sont contenus dans l'annexe II, sous la forme de protocoles expérimentaux validés par les personnes ressources désignées par le comité GLP "Good Laboratory Practices" de la Chaire industrielle CRSNG sur les bioprocédés d'assainissement des sites.

2.2.1 Caractérisation des sols

Deux sols de provenances différentes ont été utilisés lors des productions de sol activé. Les deux premières productions ont été effectuées avec un sol contaminé provenant du centre de traitement de sol contaminé B.S.L. inc. à St-Anaclet, ce sol est nommé *sol BSL*. Le sol BSL a été tamisé à 2 mm et gardé à 4°C dans des bocaux de verre ambré jusqu'à son utilisation. Une caractérisation préliminaire du sol a permis d'identifier si ce sol était apte à servir aux essais de bioactivation. Des échantillons ont été caractérisés selon les paramètres physico-chimiques suivants : granulométrie, pH, carbone organique total, concentrations d'ions chlorures, de C₁₀-C₅₀, de chlorophénols (incluant le PCP) et de PCDD/DF. Des essais de minéralisation ont aussi été effectués afin de déterminer l'activité de minéralisation du PCP et de l'hexadécane de la biomasse indigène. Des comptes bactériens pour les hétérotrophes totaux, les dégradeurs de PCP et les bactéries hydrocarbonoclastes ont aussi été effectués.

La granulométrie a été évaluée selon le protocole standard ASTM D421, D422, D1140, D2217, E11(ASTM, 1990) basé sur la distribution selon la taille des particules et par hydrométrie. Les analyses de pH ont été faites par potentiométrie (électrode Orion perpHect, Orion) selon le protocole standard ASTM D4972 (ASTM, 1989). Le contenu en carbone organique a été déterminé selon la méthode ASTM D2974 (ASTM, 1988) basé sur la combustion à 500°C d'un échantillon sec et sa perte de poids conséquente.

Le sol utilisé pour la troisième production de biomasse active, provenait d'un site de traitement des sols contaminés de la firme AES, ce sol est nommé *sol AES*. Le sol AES a été tamisé à 2 mm et entreposé dans des contenants de verre ambré à 4°C jusqu'à son utilisation. Des échantillons du sol AES ont été caractérisés afin d'évaluer les paramètres suivants : contenu en PCP, en ions chlorures, en carbone organique total et en C₁₀-C₅₀, le pH et la granulométrie. Des essais de minéralisation ont aussi été effectués afin de déterminer le potentiel de minéralisation du PCP de la flore indigène.

En plus des protocoles détaillés en annexe, une description des méthodes est résumée dans la section 2.2.4 Protocoles analytiques.

2.2.2 Caractérisation des solutions d'activation

Une solution de préservation de bois (utilisé par Bell Canada) à base de diésel #2 et de PCP grade commercial ainsi qu'une solution alcaline constituée de NaPCP (pureté 85%) grade technique (16 g/L dans NaOH 0,25N) ont été utilisées. Les concentrations en chlorophénols (incluant le PCP), en C₁₀-C₅₀, et en PCDD/DF ont été évaluées. La concentration stœchiométrique permettant d'annuler l'acidification générée par la dégradation du PCP est de 16 g de PCP par litre de NaOH 0,25N (Anachemia, Montréal). Dans le but de contrôler la concentration en PCP de chacun des ajouts sans influencer le volume du réacteur ainsi que de contrer partiellement l'acidification causée par la dégradation du PCP, la solution de préservation de bois (brute) a été diluée dans une solution alcaline de NaOH 0,25N, jusqu'à une concentration finale en PCP de 11 g/L.

2.2.3 Production de sol activé

2.2.3.1 Montage expérimental

Des réacteurs de 10 litres, en acier inoxydable, étaient munis de deux agitateurs et d'un aérateur fait de tubes en acier inoxydable perforés (Figure 2.1). Les réacteurs étaient fermés par un couvercle. Un port d'échantillonnage et une sortie d'air étaient situés sur le couvercle des réacteurs. L'air sortant des réacteurs était acheminé vers un condenseur en verre afin de limiter l'évaporation. Le mélange boueux était agité à 190 rpm (HS-4Stirrer, Phipps & Bird, Richmond) et laissé à la température de la pièce (environ 22°C). L'air était humidifié avant son entrée dans les réacteurs, et le débit était ajusté selon les besoins de la flore bactérienne, en mesurant l'oxygène dissous.

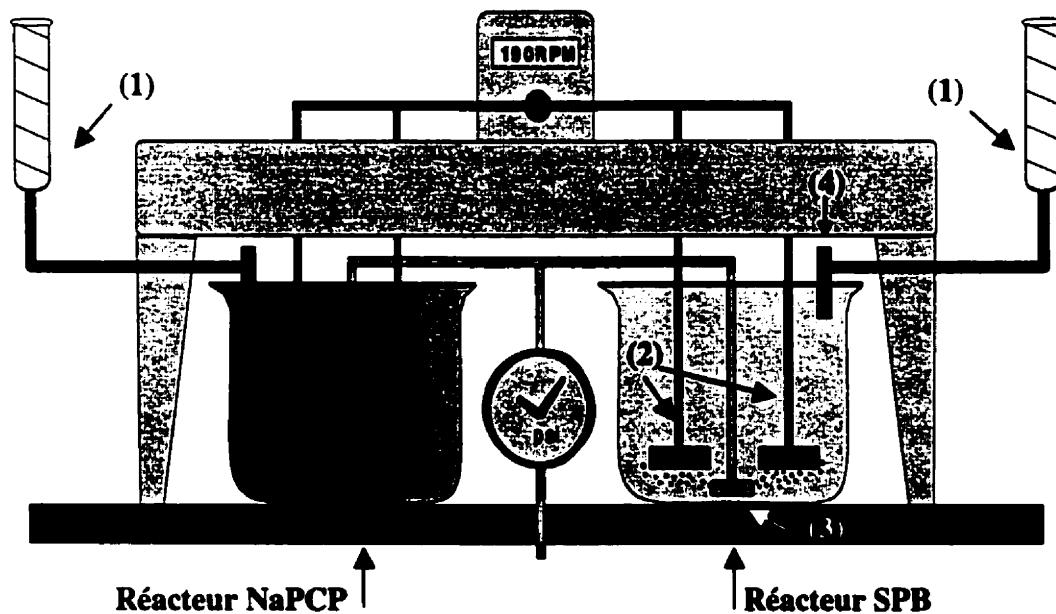


Figure 2.1 Montage expérimental des bioréacteurs pour la production de sol activé
1)Condenseurs, 2) agitateurs 3)diffuseurs d'air 4) port d'échantillonnage.

2.2.3.2 *Production et suivi des biomasses actives*

La biomasse était produite en cuvée, en phase boueuse de 10% (p/v) constituée de 8 litres de milieu salin minéral (MSM, Greer *et al.* 1990) et de 800 g de sol contaminé. Chacun des réacteurs a été alimenté en PCP de sources différentes : une solution alcaline de NaPCP grade technique (dans le réacteur NaPCP) et une solution de préservation du bois fait de PCP grade commercial et de diésel #2 (dans le réacteur SPB). Trois séries de production des deux types de biomasse active ont été effectuées au cours du projet. Les deux premières ont été faites avec le sol BSL et la dernière avec le sol AES. Les modes d'alimentation ainsi que le suivi des trois productions de biomasses sont présentés dans les sections suivantes.

2.2.3.2.1 Activation 1 : Production préliminaire de biomasse

Ce premier essai a duré 42 jours. Les ajouts initialement prévus, étaient de même concentration dans les deux réacteurs. Des difficultés analytiques n'ont pas permis d'évaluer assez rapidement les concentrations de PCP ajoutées dans le réacteur alimenté à la SPB. Les concentrations des ajouts successifs dans chacun des réacteurs sont présentées au Tableau 2.1. Les ajouts ont été effectués lorsque la concentration de PCP résiduel atteignait la limite de détection (0,5 mg/L).

Pour les trois activations, le premier ajout a été effectué après 2 à 5 jours d'incubation. Les boues liquides faites de sol contaminé et de MSM ont été mélangées et aérées afin de permettre à la flore de dégrader le peu de PCP présent dans le sol et de s'acclimater au nouveau milieu. Cette période d'adaptation est importante. En effet, Otte *et al.* (1994) ont déterminé qu'une période initiale d'adaptation permettait au PCP contenu dans le sol de se désorber et à l'activité de dégradation du PCP de démarrer, ce qui permet de réduire le temps de dégradation de 50 mg de PCP/l.

Tableau 2.1 Concentration en PCP des ajouts alimentés aux réacteurs, activation 1

No de l'Ajout	Réacteur NaPCP		Réacteur SPB	
	Temps (jours)	Concentration (mg/L)	Temps (jours)	Concentration (mg/L)
1	2	50	2	30
2	12	60	8	60
3	15	110	9	120
4	20	110	10	120
5	23	110	12	120
6	27	230	13	240
7	-	-	22	240

La concentration en PCP, en ions chlorures, le pH, la température et l'oxygène dissous ont été suivis quotidiennement. Une fois par jour, un échantillon de 5 mL de boue de chaque réacteur était filtré à 0,5 microns sur filtre millipore en Teflon puis analysé sur HPLC pour quantifier le PCP et sur HPLC ionique pour quantifier les ions chlorures. Sur le même échantillon (mais non-filtré), le pH et les ions chlorures étaient mesurés par potentiométrie. La concentration en oxygène dissous était suivie grâce à une sonde à membrane (Cole-Parmer, Illinois) et maintenue au-dessus de 2 mg de O₂/L. Le réacteur SPB a été échantillonné aux deux jours afin de déterminer la concentration en C₁₀-C₅₀. Des dénombrements microbiens hétérotrophes totaux et dégradeurs de PCP ont été effectués par la méthode NPP avant chaque ajout, sur chacun des réacteurs. Un dénombrement de bactéries hydrocarbonoclastes a été fait avant chaque ajout sur le réacteur SPB.

Des bilans de masse, sur le PCP, les ions chlorures et les C₁₀-C₅₀ ont été effectués pour les deux réacteurs. Les phases solides et liquides ont été extraites et analysées tel que décrit à la section 2.2.4 au début et à la fin des activations. La volatilisation n'a pas été considérée puisque les réacteurs étaient équipés de condenseurs et que les contaminants

suivis ne possèdent pas de pression de vapeur élevée (PCP: 1.1×10^{-4} mm Hg (Weast *et al.*, 87-88), 2,3,7,8-TCDD: 10^{-6} to 10^{-7} mm Hg (Dy, 1985)). De plus, les travaux de Otte *et al.* (1994) ont montré que la volatilisation du PCP était négligeable.

2.2.3.2.2 Activation 2 : Production de biomasse avec suivi exhaustif des paramètres physico-chimiques et biologiques

Afin de limiter les variations de pH, le milieu salin minéral a été doublement tamponné à l'aide de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (98% pureté, Anachemia, Montréal) et K_2HPO_4 (98% pureté, Anachemia, Montréal). Cet essai a duré 90 jours. La production de biomasse a été réalisée selon les spécifications présentées au Tableau .

Le suivi de plusieurs variables a été effectué tout au long de l'expérimentation. La concentration en PCP et en ions chlorures, le pH, la température et la concentration d'oxygène dissous ont été suivis deux fois par jour. Le pH était maintenu constant (entre 7 et 7,5) par des ajouts de H_2SO_4 1N et NaOH 1N. Des échantillons étaient prélevés 4 fois par semaine pour fin d'analyse des $\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$.

Les échantillons prélevés du réacteur alimenté au NaPCP ont été filtrés à la seringue sur 0,5 micron (Teflon, Millipore) avant leur analyse au HPLC pour déterminer leur concentration en PCP. Une méthode d'extraction rapide à petit volume a été mise au point afin de traiter les échantillons prélevés du réacteur SPB (voir section 2.2.4.1).

Des dénombrements NPP des micro-organismes ont été faits avant chaque ajout de solution activante. Les résultats permettent de suivre l'évolution de la flore microbienne tout au long de l'essai. Le dénombrement d'hétérotrophes totaux et de dégradeurs de PCP a été réalisé sur les deux réacteurs. Des dénombrements de bactéries hydrocarbonoclastes ont été faits avant chaque ajout sur les échantillons du réacteur SPB, mais seulement au temps 0 et au jour 60 pour le réacteur NaPCP.

Tableau 2.2 Concentration de PCP ajoutée dans les réacteurs lors de la production principale de biomasse active, activation 2.

No de l'ajout	Réacteur NaPCP		Réacteur SPB	
	Temps (jours)	Concentration (mg/L)	Temps (jours)	Concentration (mg/L)
1	4	50	4	50
2	15	100	18	100
3	24	100	26	100
4	30	100	33	100
5	35	200	40	200
6	50	200	50	200
7	60	300	60	300

Des bilans de masse, sur le PCP, les ions chlorures, les C₁₀-C₅₀ et les PCDD/DF ont été effectués pour les deux réacteurs. Les phases solides et liquides ont été extraites et analysées au début et à la fin des activations, tel que décrit à la section 2.2.4.

2.2.3.2.3 Activation 3 : Production de biomasse active pour bioaugmentation d'un sol contaminé.

Lors de cette production, le choix du nombre et de la concentration des ajouts a été déterminé en fonction du sol contaminé qui sera inoculé. Le sol traité par bioaugmentation est un sable contaminé par 100 mg/kg de PCP (voir la caractérisation au chapitre 3). Le tableau 2.3 indique que les ajouts de PCP dans les deux réacteurs n'ont pas dépassé cette concentration. L'essai a duré 40 jours.

Tableau 2.3 Concentration en PCP des ajouts alimentés aux réacteurs, Activation 3

No de l'Additif	Réacteur NaPCP		Réacteur SPB	
	Temps (jours)	Concentration (mg/L)	Temps (jours)	Concentration (mg/L)
1	5	50	5	50
2	11	100	11	100
3	15	100	20	100
4	22	100	24	100

Le suivi a été minimal puisque l'objectif de cet essai était de produire rapidement un consortium actif afin de l'utiliser comme inoculum. Les analyses effectuées ont permis de vérifier les performances de dégradation du PCP et la densité de la biomasse produite. La concentration en PCP, en Cl^- , et le pH ont été suivis quotidiennement. Des essais de minéralisation du PCP et de l'hexadécane radio-marqués en microcosmes ainsi que les dénombrements bactériens d'hétérotrophes totaux, dégradeurs de PCP et bactéries hydrocarbonoclastes ont été faits au début et à la fin de la production.

Des bilans de masse, sur le PCP, les ions chlorures et les $\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$ ont été effectués pour les deux réacteurs. Les phases solides et liquides ont été extraites et analysées tel que décrit à la section 2.2.4 au début et à la fin des activations. La volatilisation n'a pas été considérée.

2.2.4 Protocoles analytiques

2.2.4.1 Analyses physico-chimiques

PCDD et PCDF dans les sols et les réacteurs: Les analyses de PCDD et PCDF ont été effectuées par un laboratoire spécialisé selon la méthode d'Environnement Canada 1/RM/23. Les extractions de 20 heures se faisaient à l'aide d'un Soxhlet et de toluène

puis les analyses par HPLC avec une limite de détection de 0,1 ng/kg (Env. Canada, 1998).

C₁₀-C₅₀ dans les sols et les réacteurs: La concentration en hydrocarbures pétroliers C₁₀-C₅₀ dans les sols a été évaluée par un laboratoire spécialisé selon la méthode 410-HYD.1.0 du Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec (MEF, 1995). Les hydrocarbures ont été extraits à l'hexane à l'aide d'un bain à ultrasons puis analysés par GC-MS.

PCP dans les sols: La concentration en PCP et en chlorophénols dans les sols a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse et spectroscopie de masse (GC-MS) après une extraction acide/base inspirée du protocole de la méthode U.S. EPA 625 (Keith, 1996).

Extraction du PCP de la phase organique du réacteur SPB: Le sol activé à la solution de préservation de bois (SPB) contenait des hydrocarbures pétroliers en quantités variables au cours de l'activation. Les difficultés rencontrées lors de la filtration et de l'analyse au HPLC des échantillons prélevés lors de la première production de sol activé à la SPB ont exigé de mettre au point une méthode rapide d'extraction du PCP. En effet, la présence de la phase organique bouchait les pores du filtre de Teflon rendant la filtration difficile et encrassait prématurément la colonne du HPLC. Les extractions étaient effectuées dans des vials de verre de 20ml avec bouchon d'aluminium. Un échantillon de 3 mL était prélevé du réacteur alimenté à la SPB et son pH était ajusté à 11 avec du NaOH 1N. Un volume de 3 mL de chlorure de méthylène (grade HPLC, Anachemia) était ensuite ajouté, puis le vial était placé sur un agitateur Wrist Action (Wrist Action Shaker, Burrell Scientific, Pittsburg, P.A.) pour 30 min. La phase aqueuse était ensuite récupérée puis son pH ajusté à 2 avec du H₂ SO₄ 1N. Du chlorure de méthylène était ajouté (3 mL) puis le vial retournait sur l'agitateur Wrist Action pour 30 min. La phase organique était ensuite récupérée puis évaporée avec un

petit jet d'air. Le PCP restant dans le vial était solubilisé avec du méthanol (grade HPLC, Anachemia).

Analyse du PCP en phase liquide, Réacteur NaPCP et extrait de réacteur SPB: L'analyse du PCP dans une phase aqueuse ou dans du méthanol se faisait, après filtration de l'échantillon (0,5 µm filtre Teflon), par HPLC Spectra-Physics SP AS 3000 muni d'un détecteur UV 3000 réglé à 214 nm. La colonne de chromatographie était de type ODS-1 (250 x 4,6 mm) et le volume d'injection était de 10 µL. La phase mobile était constituée de 30 % (v/v) d'eau acidifiée (pH = 3,5 avec H₃PO₄) et 70% méthanol. L'eau et le méthanol étaient pompés à un taux de 0,7 mL/min à 60°C. Le temps de rétention de l'échantillon dans la colonne était de 25 minutes. L'erreur relative a été déterminée à 5% et la limite de détection à 0,5 mg/L.

Extraction des ions chlorures du sol: Le contenu en ions chlorures dans les sols ont été évalués sur des échantillons de 10 g de sol mélangés au Wrist Action avec 100 mL d'eau distillée pendant 30 minutes dont 2 mL était prélevé et filtré sur filtre Teflon de 0,5 micron.

Ions chlorures dans les réacteurs et extrait de sol: (Millipore Co). Les analyses étaient faites par HPLC ionique Dionex Dx500 muni d'un conductimètre CD-20 avec cellule DS3 (Dionex, Oakville, Ont.). Le volume d'injection était de 10 µL. La colonne de polymères IonPac AS14 (Dionex) de 4 x 250 mm fonctionnait sur le mode de séparation par échange d'ions. La phase mobile était constituée d'un mélange aqueux de NaHCO₃ (1 mM) et de Na₂CO₃ (3,5 mM) et était pompée en mode isocratique à un taux de 1,0 mL/min.

Les ions chlorures en phase aqueuse dans le réacteur alimenté au NaPCP ont été mesurés par HPLC ionique (Dionex) après filtration sur filtre Teflon 0,5 micron. Ils étaient mesurés en parallèle par potentiométrie. Le contenu en ions chlorures des échantillons prélevés au réacteur alimenté à la SPB étaient évalué par potentiométrie et

3 échantillons furent analysés à l'externe (extraction acide et HPLC ionique) afin de valider les valeurs obtenues dans nos laboratoires. Les analyses d'ions chlorure par potentiométrie étaient effectuées avec une électrode de marque Orion modèle 9417B (Fisher, Montréal, Qc) et un pH/ion-mètre Accumet modèle 25 (Fisher Scientific, Montréal, Qc), sur des échantillons de 10 ml auxquels on ajoutait 2% d'une solution d'ajustement ionique (NaNO_3 5M). L'électrode était préalablement calibrée à l'aide de solutions standards (Fisher, Montréal, Qc).

L'oxygène dissous dans les réacteurs: L'oxygène dissous était suivi grâce à une sonde à membrane munie d'une électrode polarographique (type Clark) (Cole-Parmer, Illinois, É.-U.) et d'un potentiomètre Cole-Parmer modèle 01972-00. La calibration du point zéro se faisait par l'absence de signal et le 100% (air) par bullage d'air dans de l'eau distillée.

pH dans les réacteurs: Le pH était suivi par potentiométrie à l'aide d'une électrode combinée de type Orion perpHect préalablement calibrée à l'aide de solutions standards (Fisher, Montréal, Qc) ainsi qu'à l'aide d'un pH/ion-mètre Accumet modèle 25 (Accumet).

2.2.4.2 *Analyses biologiques*

2.2.4.2.1 Comptes bactériens sélectifs et totaux

Les dénombrements bactériens ont été effectués selon la méthode NPP en tubes (milieu liquide)(APHA *et al.*, 1992) afin d'évaluer la densité des hétérotrophes totaux, des dégradeurs de PCP et des bactéries hydrocarbonoclastes. Dans le cas d'échantillons de sol, une masse de $10 \pm 0,5$ g de sol était déposée dans une bouteille de verre de 150 mL contenant 95 mL de solution saline stérile (NaCl 8,5 g/L) et environ trente petites billes de verre (3 mm) stériles. Le mélange était agité pendant 30 min sur un agitateur Wrist

Action et représentait la dilution 10^0 . Dans les cas de boues liquides, 10 mL était mélangé à 90 mL de solution saline stérile et représentait la dilution 10^{-1} .

Par la suite, 10 mL de ce mélange était prélevé puis mélangé à 90 mL de solution saline stérile. Des dilutions (1:10) en séries étaient effectuées jusqu'à l'obtention d'une dilution de 10^{-11} . Enfin, 1 mL était prélevé des bouteilles de dilution puis mélangé à 9 mL de milieu de culture dans des tubes de verres de 15 mL. Toutes les manipulations étaient effectuées sous une hotte biologique à la flamme d'un brûleur et la stérilisation des solutions liquides se faisait par autoclavage (121°C pour 20 min à 103,4 kPa). La composition des milieux de culture utilisés ainsi que les méthodes de détection des tubes positifs sont les suivants:

Comptes des hétérotrophes totaux: Le milieu de culture utilisé était composé de bouillon nutritif (Nutrient Broth) stérile (8 g/L, BBL, Becton Dickinson, MD, É.-U.) Après une période d'incubation de 7 jours à 30°C à l'obscurité, le nombre de tubes positifs (milieu turbides) était enregistré. Des tubes de contrôles étaient faits en ajoutant 1 mL de solution saline stérile à 9 mL de milieu de culture.

Comptes sélectifs des dégradeurs de PCP: Le milieu de culture utilisé consistait en une solution de MSM à un pH de 7,2 non-tamponné, contenant 20 mg/L de PCP pur (recette en annexe II PE 16D). Une série de 6 tubes par dilution était utilisée, 5 étaient incubés à l'obscurité à 30°C pour 30 jours et 1 était congelé à -20°C afin de servir de témoin négatif en indiquant le pH initial de chacune des dilutions. Suite à la période d'incubation, tous les tubes étaient ramenés à la même température dans un bain thermostaté (Canadian Laboratory Supplies) et le pH de chacun des tubes était déterminé. Un tube positif présentait une baisse de pH par rapport au témoin (exemple: 7,2 à 6,9). La méthode est inspirée de Wiggins *et al.*(1988).

Comptes sélectifs des bactéries hydrocarbonoclastes: L'hexadécane fut choisi comme représentant des hydrocarbures pétroliers (Wrenn et Venosa, 1996) et 50 µL

d'hexadécane filtré (0,5 micron, filtre Teflon, Millipore Co.) ont été ajoutés à chacun des tubes contenant 9 mL de solution minérale stérile(Mills *et al.*, 1978). La période d'incubation à l'obscurité à 30°C était de 30 jours et les tubes présentant une émulsification de l'hexadécane étaient considérés positifs. Les tubes témoins étaient faits en ajoutant 1 mL de solution saline stérile à 9 mL de milieu de croissance stérile.

2.2.4.2.2 Essais de minéralisation en microcosmes

L'activité microbienne des sols a été évaluée par des essais de minéralisation de PCP et d'hexadécane radiomarqués en microcosmes. Ces derniers permettent de suivre la minéralisation du contaminant, en suivant la production de $^{14}\text{CO}_2$ résultant de la respiration bactérienne. Les microcosmes (fait en triplicatas) consistaient en des bouteilles sérologiques en verre de 120 mL équipées de tubes de verre de 5 mL contenant 1 mL de KOH 1N servant de trappe à CO_2 .

Pour les échantillons de sol, 2,5 g de sol contaminé était mélangé dans les microcosmes à 25 ml de milieu salin minéral (MSM) (Greer *et al.*, 1990) dont la recette exacte se retrouve à l'annexe II au protocole PE 16 E.

Lors du suivi des réacteurs, 10 ml de boue liquide étaient déposés dans les microcosmes. Dans le cas des essais de minéralisation du PCP, du PCP pur dissous dans une solution alcaline (14 g de PCP par litre de NaOH 0,25N) était ajouté aux microcosmes pour atteindre une concentration de 20 mg/L.

Chacun des microcosmes (faits en triplicatas) a reçu 100 000 dpm de radioactivité sous forme de [$\text{U}^{14}\text{-C}$]PCP (activité spécifique 10,4 mCi/mmol, pureté >98%) dilué dans du toluène ou de [1- ^{14}C]hexadécane (activité spécifique 4,1 mCi/mmol, pureté >98%) dilué dans de l'hexane. Les produits radiomarqués proviennent de chez Sigma, St-Louis, Mo., É.-U. Des témoins abiotiques contenant 0,2% (w/w) d'azoture de sodium ont été préparés afin de permettre d'évaluer les pertes abiotiques lors des essais. Une fois les composés radiomarqués injectés, les microcosmes étaient scellés à l'aide de

bouchons de cahoutchouc-butyle. Les microcosmes ont ensuite été placés à température ambiante, à l'obscurité sur une plaque giratoire (G10 Gyratory Shaker, New Brunswick Scientific) à 130 rpm. Le prélèvement du KOH contenant le $^{14}\text{CO}_2$ était fait tous les jours et était remplacé par du KOH frais. Le KOH prélevé était mélangé à 10 mL de cocktail à scintillation (Opti-Phase Hisafe-3, Wallac, Montréal) et analysé par un compteur à scintillation Wallac modèle 1409. La minéralisation était suivie pendant 30 jours.

2.2.4.2.3 Analyse des courbes de minéralisation

Afin de pouvoir décrire les courbes de minéralisation du PCP et de l'hexadécane certaines caractéristiques doivent être ressortie. La majorité des courbes de minéralisation peuvent être séparée en trois phases. La phase I est la phase de latence où aucune minéralisation n'est détectée, avant qu'une dégradation appréciable ne soit observée. La phase II est caractérisée par une importante activité de minéralisation et la phase III est marquée d'un ralentissement de la minéralisation.

Afin de pouvoir quantifier les caractéristiques de chacune des phases, des paramètres doivent être définis. Trois systèmes ont été choisis afin de bien caractériser 3 types de courbes: les courbes de minéralisation dans les sols (faites de peu de points), les courbes de PCP dans les réacteurs et les courbes d'hexadécane dans les réacteurs. Les deux premiers types de courbes suivent la description donnée précédemment (courbe 1 et 2, Figure 2.2). Par contre, les courbes d'hexadécane dans les réacteurs ne suivent pas toujours cette description (courbe 3, Figure 2.2).

L'analyse des courbes de minéralisation du PCP des biomasses acclimatées produites a été faite à l'aide d'un système de paramètres mis au point par Millette *et al.* (1995) permettant une interprétation plus précise des courbes (courbe 1 sur la Figure 2.2). Les paramètres qui ont été définis et qui serviront à l'analyse de l'effet des périodes de famine sont les suivants:

1. **MAX%** représente le pourcentage maximal de contaminant radiomarqué récupéré sous forme de [^{14}C]CO₂,
2. **LAG** est le temps requis pour atteindre une valeur de 1/5MAX%,
3. **RMAX** est le taux de minéralisation entre les valeurs LAG et 2/3MAX%.

Dans le cas de notre étude, les paramètres ont été définis sur une période d'incubation des microcosmes de 25 jours.

Les courbes de minéralisation dans les sols étant faites de peu de points, il est difficile d'obtenir des valeurs de LAG, %MAX et RMAX exactes et représentatives. C'est pourquoi elles ont simplement été décrites selon les paramètres suivant: période de latence qui correspond au nombre de jours avant que la minéralisation soit visible, pourcentage atteint en 5 jours (depuis la fin de la période de latence) qui est relié à la vitesse de dégradation et pourcentage atteint en 25 jours (après la période de latence) qui correspond au pourcentage maximal (courbe 2 sur la Figure 2.2).

Dans le cas des courbes d'hexadécane dans les réacteurs, si aucune phase de latence et aucune phase de minéralisation rapide ne sont visibles. Un seul paramètre est utilisé, la minéralisation atteinte en 25 jours (courbe 3 sur la Figure 2.2).

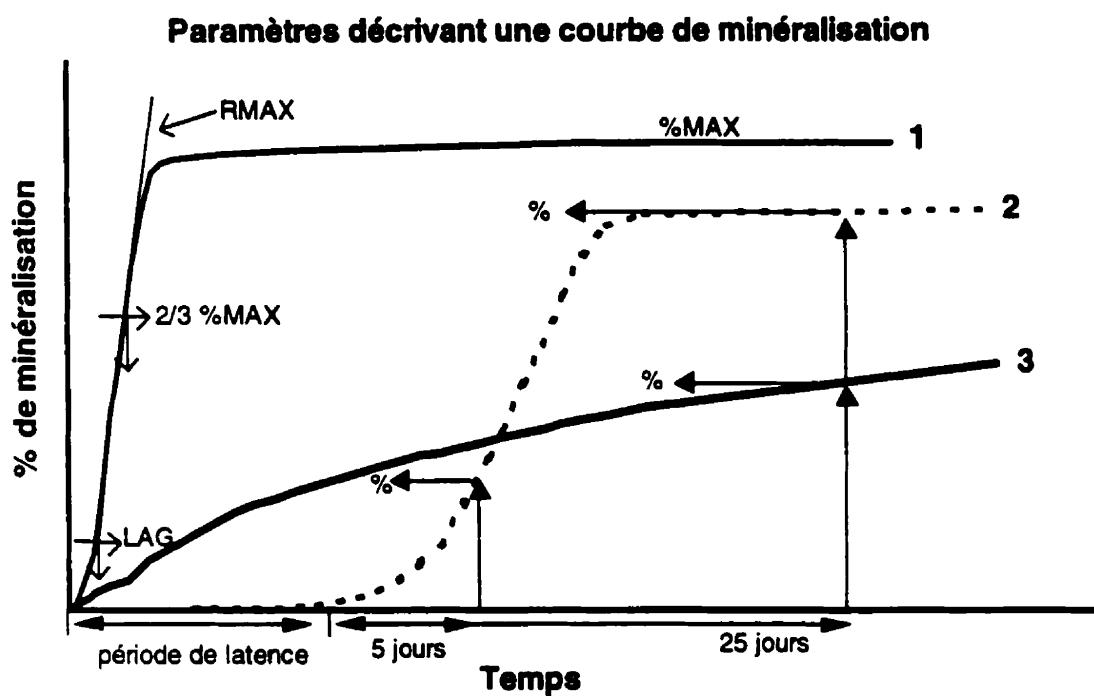


Figure 2.2 Illustration des paramètres utilisés pour décrire une courbe de minéralisation

2.3 Résultats

2.3.1 Caractérisation des sols et des solutions d'activation

2.3.1.1 Caractérisation physico-chimique

Tel que présenté au Tableau 2.4, le sol BSL utilisé lors des activations 1 et 2 était un sable avec un pH de 7,02 et un contenu de carbone organique total de 14 g/kg. Les concentrations initiales en PCP et en C₁₀-C₅₀ étaient de 2,3 et 68 mg/kg respectivement. Il contenait 221,9 ng/kg en équivalent toxique de PCDD et PCDF. Aucun autre chlorophénol n'a été détecté dans le sol. La seule caractéristique du sol qui diffère de la première activation à la seconde est son entreposage à 4°C pendant les 6 mois qui ont séparés les deux expériences. Les résultats des analyses en PCP et C₁₀-C₅₀ dans les échantillons de sol provenant du centre de traitement AES ne démontrent qu'une faible contamination en PCP (3 mg/kg) et en C₁₀-C₅₀ (<0,1 mg/kg). Aucun autre chlorophénol n'a été détecté. Le sol utilisé pour l'activation 3 est aussi un sable au pH neutre avec un faible contenu en carbone organique de 13g/kg.

Tableau 2.4 Caractérisation des sols utilisés lors des trois activations

Paramètres	Activation 1 sol BSL	Activation 2 sol BSL	Activation 3 sol AES
pH	7,02	7,02	7,12
COT	14g/kg	14g/kg	13 g/kg
granulométrie	89% sable 10% silt 1% arg.	89% sable 10% silt 1% arg.	92% sable 7% silt 1% arg.
Âge du sol	sol frais	4°C pendant 6 mois	sol frais
contenu en PCP	2,3 mg/kg	2,3 mg/kg	3 mg/kg
contenu en C ₁₀ -C ₅₀	68 mg/kg	68 mg/kg	<0,1 mg/kg
contenu en Cl ⁻	3,2 mg/kg	3,2 mg/kg	0,24 mg/kg
contenu PCDD/DF ^a	222 x 10 ⁻⁶ mg/kg	222 x 10 ⁻⁶ mg/kg	ND

^a en équivalent toxique

Les deux sols présentent les caractéristiques physico-chimiques idéales pour les essais de bioactivation. Le faible contenu en argile limitera l'adsorption irréversible du PCP et les faibles concentration de contaminants ne devrait pas avoir intoxiqué la flore. La faible concentration en Cl^- peut suggérer que les sols n'ont jamais été fortement contaminés au PCP puisque sa dégradation aurait généré des ions chlorures. Par contre, ceux-ci auraient pu être lessivés des sols par les pluies.

La composition chimique des solutions d'activation (solution de préservation du bois et NaPCP) est présentée au Tableau 2.5. Il semble que la solution de préservation du bois contient plusieurs sources de carbone. En effet, elle contient 40 g/L de PCP, 0,57 g/L tétrachlorophénol (TétraCP), 390 g/L d'hydrocarbures pétroliers et 74 $\mu\text{g/l}$ de PCDD et PCDF en équivalent toxique. La solution de NaPCP contient un ratio plus important de TétraCP/PCP que la solution de préservation avec 633 mg/L de tétrachlorophénol pour 16 g/L de PCP. La solution de NaPCP contient également des ions chlorures (0,2 mg/L) et 1,6 $\mu\text{g/L}$ de PCDD et PCDF en équivalent toxique. Aucun autre chlorophénol n'a été détecté dans les solutions d'activation. Les compositions des solutions d'activation en PCDD et PCDF est détaillée au Tableau 2.6. Elles sont présentées en terme de concentration et non en équivalence toxique.

Tableau 2.5 Caractérisation physico-chimique des solutions d'activation utilisées

Paramètres	Solution au NaPCP	Solution de préservation du bois
	mg/L	mg/L^a
contenu en PCP	16 000	40 000
contenu en TetraCP	633	570
contenu en $\text{C}_{10}-\text{C}_{50}$	-	390 000
COT	-	-
contenu PCDD et PCDF ^b	16.2×10^{-3}	74×10^{-3}
contenu en Cl^-	0,2	-

^a pas encore dilué dans du NaOH.

^b en équivalent toxique

Tableau 2.6 Composition détaillée en PCDD et PCDF des solutions d'activation et la proportion que représente chaque groupe d'isomères

Isomères	NaPCP		SPB*	
	concentration ng/L	proportion %	concentration ng/L	proportion %
2,3,7,8-TCDD	ND	0	500	0,002
Tétra CDD totaux	ND	0	1 000	0,005
Penta CDD totaux	110	0,002	2 600	0,01
Hexa CDD totaux	88 000	1,3	49 000	0,24
Hepta CDD totaux	1 400 000	20,4	2 400 000	11,8
Octa CDD	4 700 000	68,6	3 800 000	18,7
Tétra CDF totaux	ND	0	1 100	0,005
Penta CDF totaux	230	0,003	5 000	0,02
Hexa CDF totaux	44 000	0,6	340 000	1,7
Hepta CDF totaux	310 000	4,5	4 300 000	21,2
Octa CDF totaux	310 000	4,5	9 400 000	46,3

* Solution de préservation du bois non diluée dans le NaOH

2.3.1.2 Caractérisation biologique

Sol BSL

Les dénombrements bactériens ont montré que la densité des hétérotrophes totaux dans le sol BSL était de 1.3×10^4 bactéries/g de sol sec. La densité des populations de dégradeurs de PCP et des bactéries hydrocarbonoclastes étaient de 7×10^2 et 2.1×10^2 bactéries/g de sol sec respectivement.

Les essais de minéralisation du PCP (résultats à l'annexe II PE 16A) indiquent que la flore indigène possède des capacités de dégradation du PCP. En effet, 80% du [¹⁴C]PCP a été récupéré sous forme de [¹⁴C]CO₂ après 15 jours d'incubation, avec une période de latence de 2 jours (un contrôle fait avec un sol stérilisé n'a récupéré que 1% après 15 jours).

Les courbes de minéralisation de l'hexadécane montrent la présence de dégradeurs d'hydrocarbures. Par contre, seulement 35% de [¹⁴C]hexadecane a été récupéré sous forme de [¹⁴C]CO₂ en 20 jours et aucune période de latence n'était visible.

Sol AES

Les essais de minéralisation (résultats présentés à l'annexe II PE 16 A) ont permis de montrer une bonne activité de dégradation du PCP avec la récupération de 82% du PCP en ¹⁴CO₂ en 27 jours comparativement à 1,2% pour le témoin abiotique. Aucun dénombrement bactérien ou essai de minéralisation de l'hexadécane n'ont été effectués puisque l'objectif de l'activation 3, dans laquelle ce sol a été utilisé, était de produire rapidement des sols activés.

2.3.2 Activation 1 : Production préliminaire de biomasse

2.3.2.1 Dégradation du PCP

Au cours de l'activation, 5360 mg de PCP ont été alimentés au réacteur NaPCP et 7440 mg ont été alimentés au réacteur SPB. La production de sol activé à la SPB a duré 30 jours alors que 42 jours ont été nécessaires à la production de sol activé à la solution de NaPCP (Figure 2.3). Durant cette période, le réacteur SPB a reçu un ajout de plus que le réacteur NaPCP. Des contraintes analytiques ont empêché une alimentation similaire dans les deux réacteurs. La présence de la phase huileuse dans le réacteur SPB a perturbé les analyses par HPLC de PCP résiduel. En effet, la phase organique rendait la filtration des échantillons ardue, ses composantes réagissaient avec l'unité de filtration et la colonne du HPLC. De plus, l'affinité du PCP pour les phases organiques ($\log K_{ow}=3,69$ à pH 7,2 (Nowosielski et Fien, 1998)) laissait croire qu'une partie du PCP de la phase liquide restait dans le diésel (voir section 2.4.3). Une technique d'extraction base/acide du PCP a donc été mise au point afin d'éliminer les interférences dues à la phase organique et a été utilisée lors des activations suivantes.

Le premier ajout, dans chacun des réacteurs, est suivi de 5 à 6 jours de latence avant la dégradation du PCP. Par la suite, les temps de latence ont été plus longs dans le réacteur NaPCP. En effet, 2 jours et demi furent nécessaires à la flore du réacteur NaPCP avant que la dégradation des 60 mg de PCP/l, du deuxième ajout, commence à être visible alors que dans le réacteur alimenté à la SPB, la dégradation commence dès l'ajout des 60 mg/L sans période de latence. En fait, les périodes de latence ont disparu après le premier ajout dans le réacteur SPB alors que dans le réacteur NaPCP, il a fallut trois ajouts.

Une diminution importante du pH fut notée dans le réacteur SPB entre les jours 11 et 14 (encerclé, Figure 2.3). En effet, la minéralisation du PCP entraîne une acidification du milieu qui devrait être contrée par la solution de NaOH dans laquelle la solution de préservation est diluée. Cependant, la solution de préservation du bois était diluée dans une plus faible proportion de NaOH que la solution de NaPCP. Un réajustement du pH à la hausse, au jour 15, a permis la solubilisation d'une quantité de PCP qui, manifestement, était présente dans le réacteur mais sous forme insoluble. Une augmentation soudaine et importante de la concentration de PCP en phase aqueuse a eu l'effet de ralentir l'activité de dégradation. À l'opposé, le sixième ajout au réacteur NaPCP est accompagné d'une augmentation de pH (de 7,2 à 8,5). L'activité de dégradation du PCP a ralenti suite à cet ajout pour reprendre quand le pH fut ajusté à 7,5 à l'aide de H₂SO₄.

La concentration en ions chlorures a augmenté avec la dégradation du PCP jusqu'à des concentrations de 12,9 et 17,9 mM dans les réacteurs NaPCP et SPB respectivement.

La concentration de PCP adsorbée aux particules de sol dans les deux réacteurs a été déterminée à la fin des activations. Le sol activé du réacteur alimenté au NaPCP contenait 1,6 mg de PCP/kg et le sol activé du réacteur alimenté à la solution de

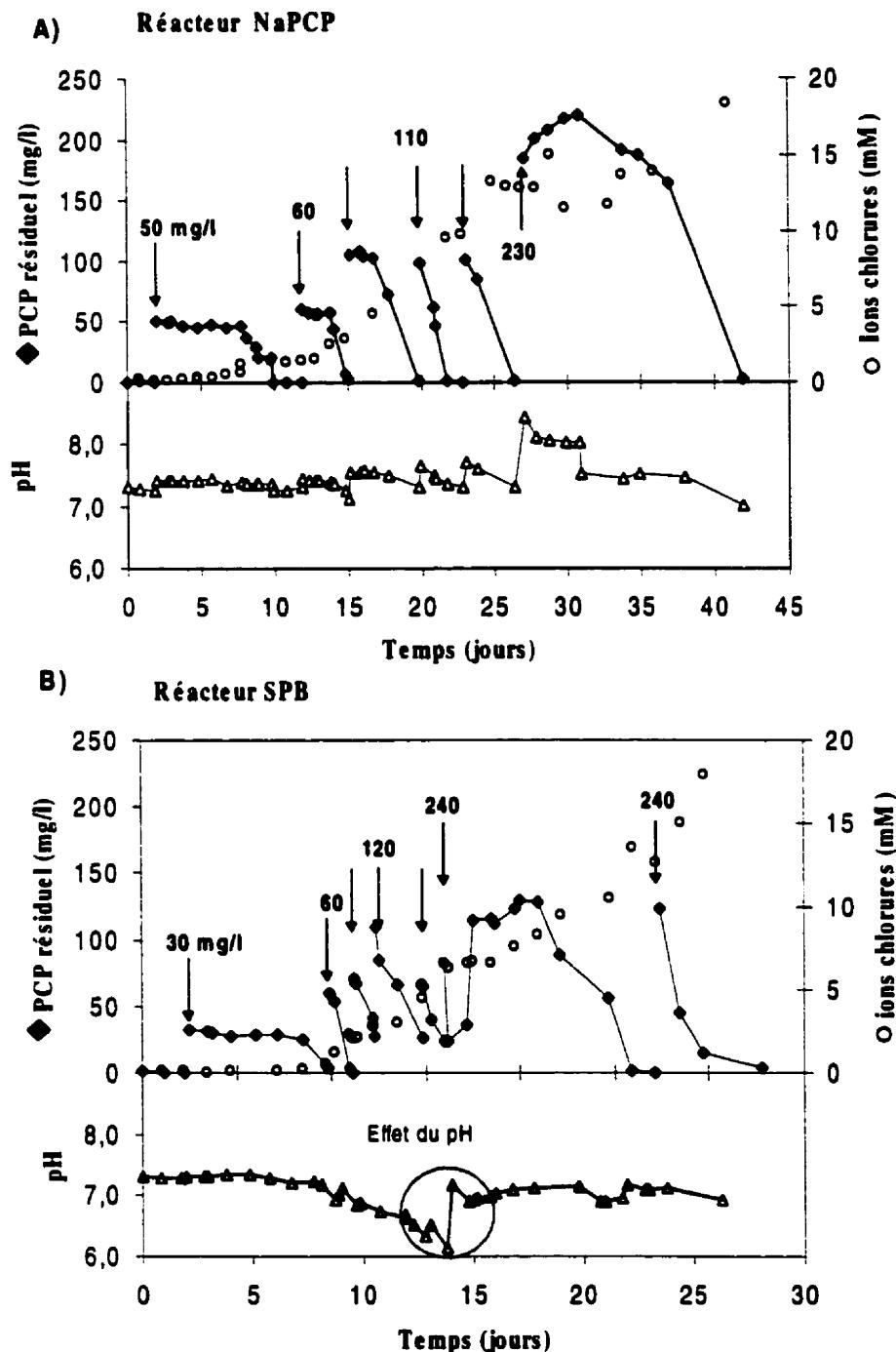


Figure 2.3 Consommation de PCP, production d'ions chlorures et suivi du pH dans le réacteur alimenté A) au NaPCP, B) à la SPB

préservation 20 mg/kg. Ces résultats étaient prévisibles étant donné la faible proportion de matière organique et de particules fines dans le sol (Tableau 2.7).

Lors de cette activation, les taux de consommation moyens du PCP dans le réacteur NaPCP ont été très inférieurs à ceux rencontrés dans le réacteur SPB (Tableau 2.7). En effet, le taux moyen de dégradation d'un ajout de PCP atteint dans le réacteur SPB est de 63 mg de PCP/L·j et seulement 33 mg de PCP/L·j dans le réacteur NaPCP. Dans le réacteur NaPCP, les taux de dégradation moyens des ajouts de 110 mg/L ont augmenté de 20 à 33 mg/L·j. Le taux de dégradation de l'ajout suivant (230 mg/L) a chuté à 16 mg/L·j à cause du pH probablement inadéquat pour la flore de dégradeurs. Les taux de dégradation moyens observés dans le réacteur SPB ne suivent pas le même patron. En effet, ils sont passés de 50 à 43 à 53 mg/L·j pour les trois ajouts consécutifs de 120 mg/L. L'ajustement du pH suite à l'ajout 6 a fait baisser le taux de dégradation à 16 mg/L·j, mais le septième ajout a permis d'augmenter le taux de dégradation à 31 mg/L·j.

Tableau 2.7 Taux moyen de dégradation du PCP dans les deux réacteurs en fonction des ajouts, activation 1.

Ajout	Réacteur NaPCP		Réacteur SPB	
	PCP ajouté (mg/L)	Taux moyen (mg/L·j)	PCP ajouté (mg/L)	Taux moyen (mg/L·j)
Ajout 1	50	6	30	4
Ajout 2	60	19	60	63
Ajout 3	110	22	120	50
Ajout 4	110	33	120	43
Ajout 5	110	33	120	53
Ajout 6	230	16	240	16
Ajout 7	-	-	240	31

Des bilans de masse sur le PCP et les ions chlorures ont permis de vérifier qu'il n'y avait aucune accumulation de contaminants dans les réacteurs. En effet, selon un bilan effectué sur le PCP total, 99,6% (début: 2,3 mg/kg dans le sol, 688 mg/L ajouté, fin: 1,6 mg/kg dans le sol et 0,39 mg/L dans liquide) et 99,3% (début: 2,3 mg/kg dans le sol, 930 mg/L ajouté, fin: 20 mg/kg dans le sol et 0,7 mg/L dans liquide) du PCP ajouté a été dégradé dans le réacteur NaPCP et le réacteur SPB respectivement. De plus, un bilan effectué sur la production des ions chlorures permet de constater que 96,7% (13,33 mM de Cl⁻ théorique, 12,9 mM récupérés) du PCP ajouté dans le réacteur NaPCP a été minéralisé et 99,9% (17,88 mM de Cl⁻ théorique, 17,87 mM récupérés) a été minéralisé dans le réacteur SPB.

2.3.2.2 *Dégradation des hydrocarbures pétroliers*

Afin de vérifier le potentiel de dégradation des hydrocarbures pétroliers du sol activé à la SPB, des échantillons prélevés suite au premier ajout de 240 mg de PCP/L ont été analysés pour déterminer la concentration en C₁₀-C₅₀. Les résultats présentés à la Figure indiquent qu'il y a une consommation des hydrocarbures pétroliers entre les jours 13 et 21 de l'activation. À l'ajout 6, 2 300 mg de C₁₀-C₅₀ ont été alimentés au réacteur SPB, seulement 800 mg ont été mesurés 5 minutes après l'ajout. Le diésel étant plus léger que l'eau, une bonne partie de la phase organique avait tendance à rester en surface malgré le mélange vigoureux des réacteurs. Les échantillons ont tous été prélevés à 5 cm de la surface, la concentration en C₁₀-C₅₀ de ces échantillons est donc inférieure à la concentration réelle dans le réacteur. La Figure 2.4 permet cependant de constater que la biomasse produite possède un bon potentiel de dégradation des hydrocarbures.

L'apparition d'une mousse abondante à la surface du mélange, quelques heures après un ajout de solution de préservation du bois, suggère que les bactéries hydrocarbonoclastes produisaient un surfactant. Suite à l'apparition de cette mousse, le pH et la

concentration de PCP résiduel baissaient ce qui indiquerait que la biomasse commençait son activité de dégradation des hydrocarbures pétroliers avant de dégrader le PCP. Trudell *et al.* (1991) ont observé le même phénomène lors d'un traitement *in situ* de sol contaminé aux produits de préservation du bois.

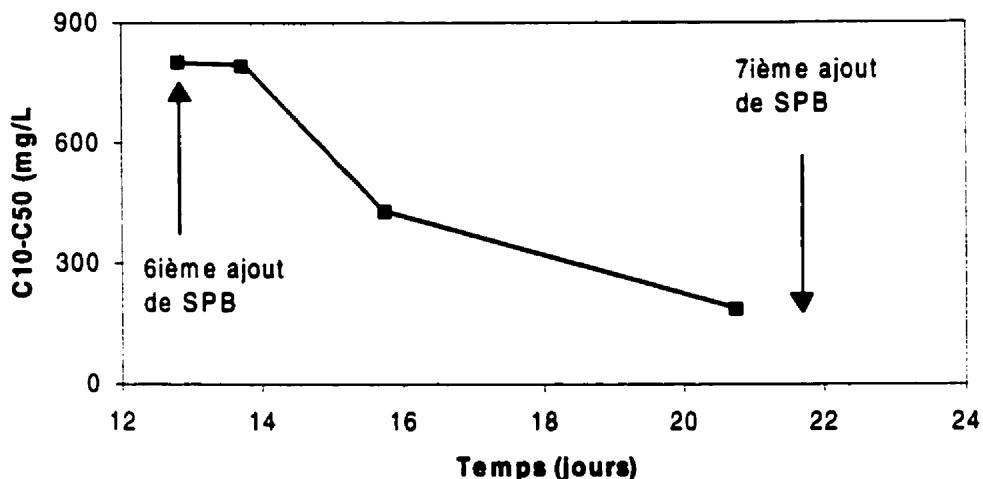


Figure 2.4 Concentration résiduelle en C₁₀-C₅₀ suite au sixième ajout, dans le réacteur SPB.

De plus, un bilan de masse sur les C₁₀-C₅₀ (seul échantillonnage représentatif, fait de 5 fois 2mL prélevés à 5 hauteurs différentes) a permis de déterminer qu'il n'y a pas eu d'accumulation d'hydrocarbures pétroliers dans le réacteur. En effet, seulement 190 mg/L d'hydrocarbures pétroliers (0,2% des C₁₀-C₅₀ ajoutés) ont été récupérés à la fin de l'activation.

2.3.2.3 Production de biomasse

Des dénombrements de bactéries hétérotrophes totales, dégradeurs de PCP ont été effectués sur les deux réacteurs. Des dénombrements de bactéries hydrocarbonoclastes ont été effectués sur le réacteur SPB. La concentration d'hétérotrophes totaux a plafonné à 10⁸ bactéries/mL dans le réacteur alimenté au NaPCP et a atteint un plafond

de 10^9 bactéries/mL dans le réacteur SPB (Figure 2.5). Les concentrations finales de dégradeurs de PCP sont similaires atteignant une concentration de 10^6 bactéries/mL dans les deux réacteurs. Une baisse de la densité des dégradeurs de PCP est par contre observable dans les deux réacteurs entre les ajouts 2 et 6 malgré les taux de dégradation élevés.

La population des bactéries hydrocarbonoclastes a significativement augmenté d'un facteur de 3 log dans le réacteur alimenté à la solution de préservation du bois.

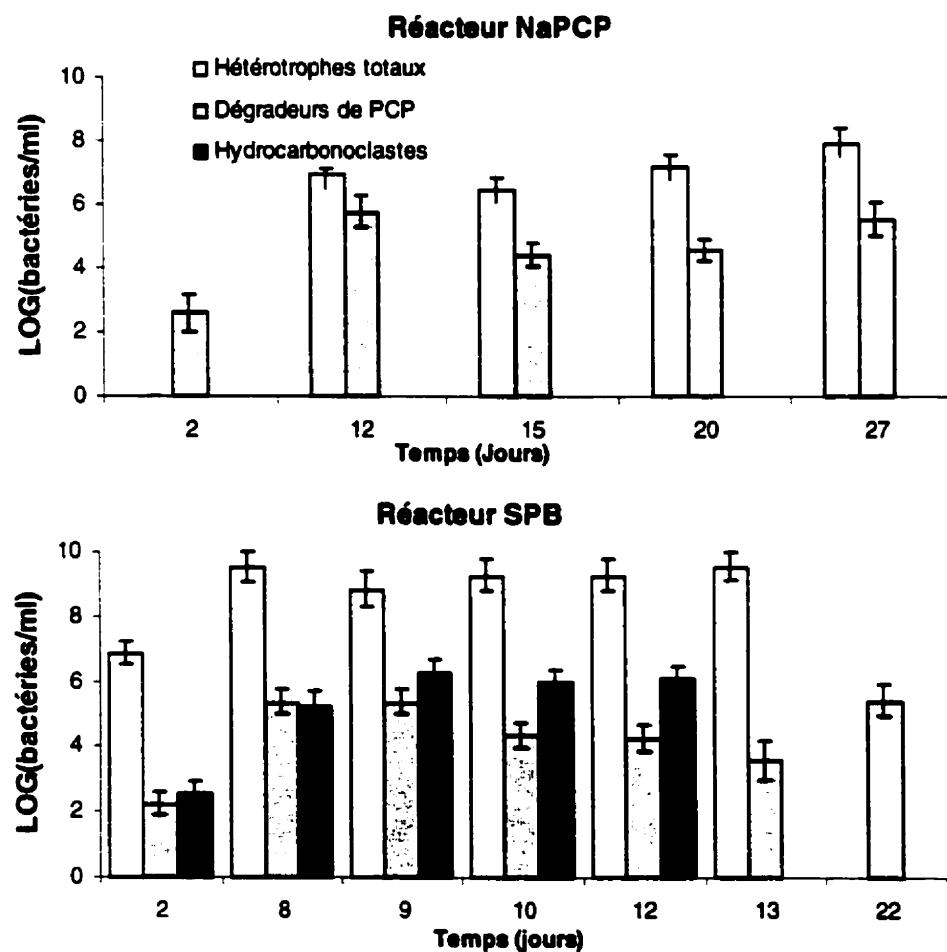


Figure 2.5 Dénombrements bactériens selon la méthode NPP, activation 1

2.3.3 Activation 2 : Suivi exhaustif des paramètres physico-chimiques et biologiques

Suite aux résultats obtenus lors de la première activation, les méthodes analytiques requises afin de pouvoir comparer les deux types de production ont été mises au point et le suivi exhaustif de la production de biomasse active a été entrepris.

2.3.3.1 Dégradation du PCP

Durant les 60 premiers jours d'activation, 6000 mg de PCP ont été alimentés à chacun des réacteurs. Le pH a été maintenu entre 6,8 et 7,5 dans les deux réacteurs afin de ne pas influencer la solubilité du PCP Figure 2.6. La concentration en ions chlorures a atteint, avec la dégradation du PCP, une concentration au jour 60 de 16 mM dans les deux réacteurs. Puis 1800 mg (300 mg/L) de PCP ont été ajoutés aux réacteurs et aucune dégradation du PCP n'a été observée par la suite. Les concentrations d'ions chlorures et le pH sont restés stables. Ce seuil de tolérance est comparable à celui atteint par Barbeau *et al.*(1997) puisqu'une inhibition de la dégradation avait été notée à une concentration de 300 mg/L.

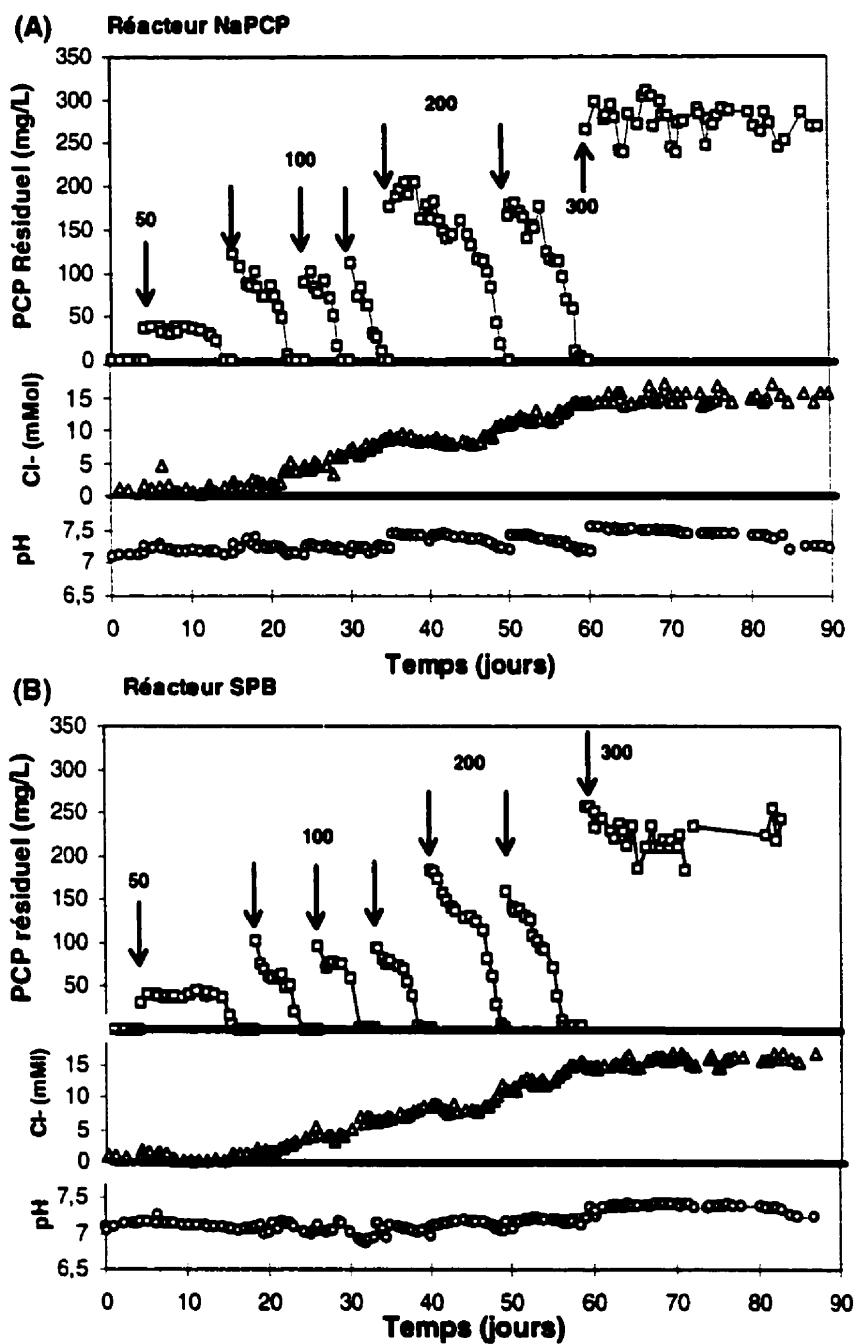


Figure 2.6 Consommation du PCP, production d'ions chlorure et suivi du pH, dans le réacteur alimenté au NaPCP (A), dans le réacteur alimenté à la solution de préservation du bois.

Pendant les 60 premiers jours de l'activation, les taux de dégradation du PCP ont augmenté dans les deux réacteurs. Lors de la dégradation des deux premiers ajouts, le taux moyen de consommation du PCP a augmenté de 5 mg/L·j pour le sol activé au NaPCP et 4 mg/L·j pour le sol activé à la solution de préservation, jusqu'à 13 et 17 mg/L·j respectivement (Tableau 2.8). Le taux moyen de consommation dans les deux réacteurs a, par la suite, augmenté lentement jusqu'à des valeurs de 21 mg/L·j dans le réacteur alimenté au NaPCP et 26 mg/L·j dans le réacteur alimenté à la SPB. L'échantillonnage important a permis de déterminer des taux maximums de dégradation du PCP (pentes maximales de la Figure 2.6). Les taux maximums de dégradation ont augmenté de 20 mg/L·j à 132 mg/L·j dans le réacteur alimenté avec du NaPCP et de 40 mg/L·j à 112 mg/L·j dans le réacteur alimenté à la solution de préservation.

Tableau 2.8 Taux maximum et moyens de dégradation du PCP dans les deux réacteurs, activation 2

No de l'ajout	[PCP] ajouté (mg/L)	Taux de dégradation du PCP dans réacteur NaPCP		Taux de dégradation du PCP dans réacteur SPB	
		MAX (mg/L·j)	MOYEN (mg/L·j)	MAX (mg/L·j)	MOYEN (mg/L·j)
1	50	20	5	41	4
2	100	51	13	48	17
3	100	70	18	50	20
4	100	64	24	47	20
5	200	79	15	64	22
6	200	132	21	112	26

Des bilans de masse effectués sur les deux réacteurs montrent qu'il n'y a pas eu d'accumulation de contaminants jusqu'au jour 60 de l'activation. Un bilan a été fait en phase liquide car aucun échantillon de sol avait été pris au jour 60. Selon ce bilan 99,9% (début: 2,3 mg/kg dans le sol, 750 mg/L ajouté, fin: 0,4 mg/L liquide) et 99,5%

(début: 2,3 mg/kg dans le sol, 750 mg/L ajouté, fin: 2,7 mg/L dans liquide) du PCP ajouté au réacteur alimenté au NaPCP et à la SPB respectivement, ont été consommés. L'accumulation d'ions chlorures dans les réacteurs indique que 97,4% (14,8 mM Cl⁻ théorique, 14,4 mM récupérés) du PCP ajouté au sol activé au NaPCP a été minéralisé et 96,9% (15,0 mM Cl⁻ théorique, 14,5 mM récupérés) du PCP ajouté au réacteur alimenté à la SPB a été minéralisé.

2.3.3.2 *Dégénération des hydrocarbures pétroliers*

Les analyses C₁₀-C₅₀ dans le réacteur alimenté à la solution de préservation au long de l'activation indique une dégradation importante des hydrocarbures pétroliers. Par contre, les chiffres obtenus étaient biaisés par la nature insoluble des hydrocarbures. En effet, les hydrocarbures avaient tendance à s'accumuler en surface alors que les échantillons étaient prélevés à 5 cm de profondeur à partir de la surface. Pour cette raison il n'a pas été jugé acceptable de déterminer des taux de dégradation. De plus, l'émulsion observée à la surface du réacteur est un indice des variations de tension de surface pouvant avoir une influence sur la solubilité des hydrocarbures pétroliers. Par contre, la Figure 2.7 montre clairement la disparition des C₁₀-C₅₀ entre chacun des ajouts. Les échantillonnages faits pendant les ajouts 2, 4 et 5 permettent de conclure à une dégradation puisque les concentrations d'hydrocarbures chutent chaque fois sous 200 mg/L.

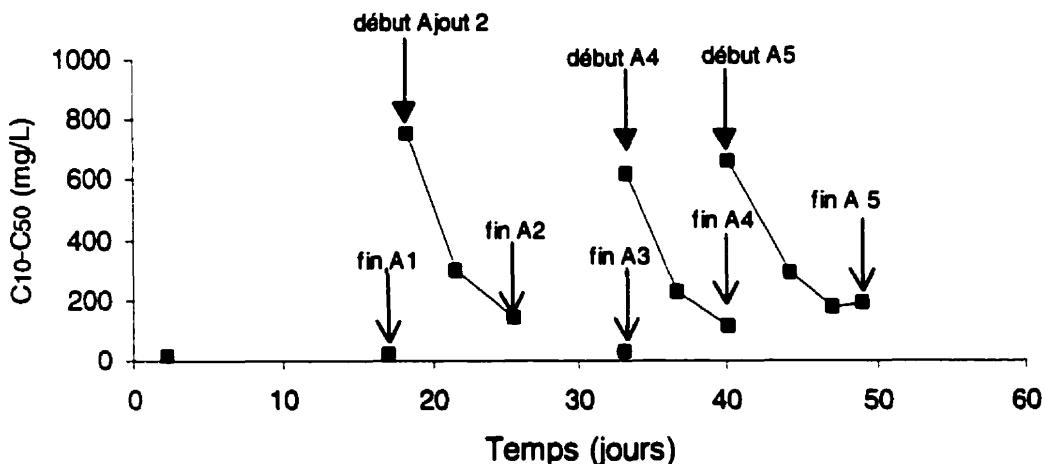


Figure 2.7 Concentration de C₁₀-C₅₀ dans le réacteur alimenté à la solution de préservation de bois

Un bilan de masse effectué entre les jours 0 et 59 (échantillonnage représentatif, fait de 5 fois 2 ml prélevés à 5 hauteurs différentes) indiquent que 92,5% des C₁₀-C₅₀ ajoutés au réacteur ont été dégradés . En effet, 4 400 mg des 58 900 mg de C₁₀-C₅₀ ajoutés ont été récupérés au jour 59.

2.3.3.3 Activité de biodégradation du PCP et de l'hexadécane

Les essais de minéralisation du PCP en microcosmes (Figure 2.8) montrent clairement une augmentation de l'activité de minéralisation au cours de l'acclimatation de la flore microbienne dans les deux réacteurs. Les résultats de minéralisation du PCP obtenus pour les deux réacteurs sont comparables. D'abord, les périodes de LAG diminue de 15 jours à moins de 1 jour dès la dégradation du premier ajout (courbe *ajout 1*), puis restent stables entre 0,2 et 1,5 jours. De plus, le %MAX est passé d'une valeur initiale au temps 0 de 58% pour le réacteur NaPCP et 0% pour le réacteur SPB, à 80% pour les échantillons prélevés des deux réacteurs suite à la dégradation du premier ajout

(courbes *ajout 1*). Le pourcentage maximal de minéralisation est ensuite demeuré stable entre 75 et 82% pour tous les autres échantillons prélevés des deux réacteurs jusqu'à la fin de l'activation (résultats présentés à l'annexe II, PE 16E version2). Des courtes périodes de latence et de pourcentages élevés de minéralisation caractérisent d'une biomasse très active (Millette *et al.*, 1995). Les valeurs de RMAX se sont toutes situées entre 13 et 32 %/j sauf pour les ajouts 5 dans les deux réacteurs. Les RMAX ont alors atteint des valeurs de 112 et 126 %/j dans le réacteur NaPCP et le réacteur SPB respectivement.

L'activité de minéralisation de l'hexadécane a augmenté significativement durant l'activation dans le réacteur SPB. Les résultats des essais en microcosmes utilisant de l'hexadécane radiomarqué ont montré que le pourcentage de minéralisation après 25 jours d'incubation est passé de 12% à 60% du jour 0 au jour 60. Les performances de minéralisation de l'hexadécane sont inférieures dans le réacteur NaPCP puisque le pourcentage de minéralisation atteint en 25 jours est passé de 5% à seulement 22%. De plus, une période de latence de 4 jours était observée lors de la minéralisation de l'hexadécane au jour 60 du réacteur NaPCP. Aucune période de latence n'était visible dans les échantillons du réacteur SPB prélevés après le jour 15. Les taux de minéralisation ne peuvent être comparés d'un ajout à l'autre puisque les concentrations en hydrocarbures pétroliers dans les échantillons prélevés variaient. En effet, les hydrocarbures pétroliers ont été ajoutés dans des proportions plus importantes que le PCP. Les échantillonnages pour les microcosmes se faisaient quand le PCP n'était plus détecté dans les réacteurs, par contre, il restait encore des hydrocarbures pétroliers.

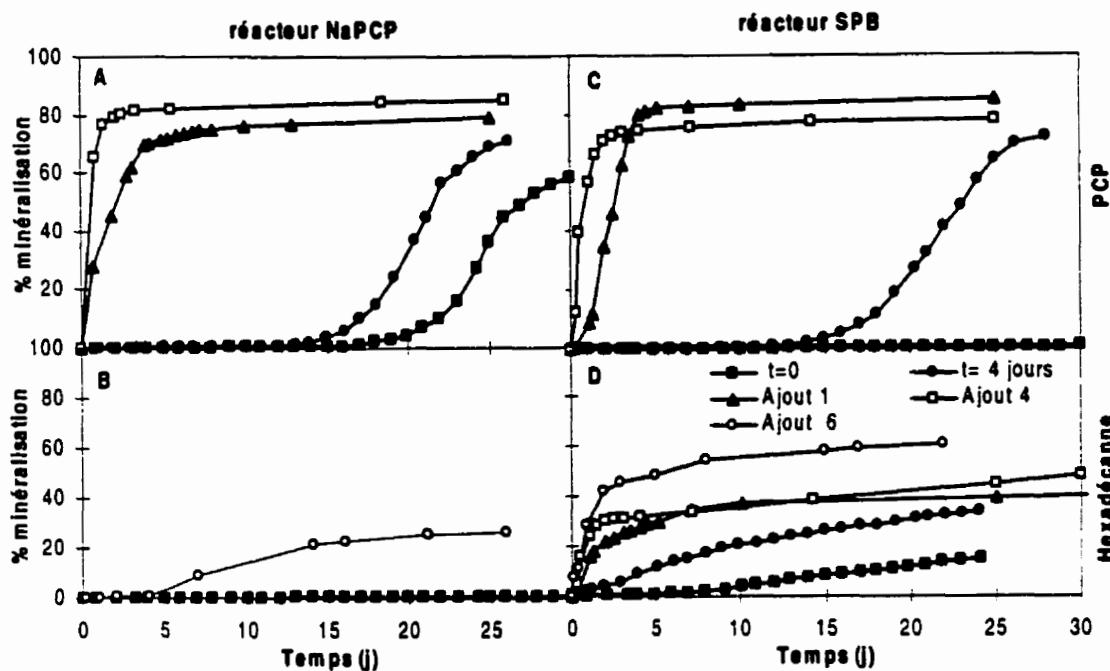


Figure 2.8 Minéralisation du PCP dans le réacteur alimenté (A) au NaPCP, (B) à la SPB. Minéralisation de l'hexadécane dans le réacteur alimenté (C) au NaPCP, (D) à la SPB.

2.3.3.4 Croissance microbienne

Les comptes bactériens (Figure 2.9) ont montré que le procédé d'activation augmente significativement la densité bactérienne dans les deux réacteurs. Par contre, la densité des populations est plus importante dans le réacteur SPB. La population d'hétérotrophes totaux est passée de 10^3 bactéries/mL à 10^9 bactéries/mL dans le réacteur SPB et à seulement 10^7 bactéries/mL dans le réacteur NaPCP. Les comptes sélectifs indiquent que la population de dégradeurs de PCP a augmenté de 4 log dans les premiers 18 jours d'activation dans les deux réacteurs. Les concentrations de dégradeurs de PCP se sont ensuite stabilisées à 10^5 bactéries/mL dans le réacteur NaPCP et 10^6 bactéries/mL dans le réacteur SPB.

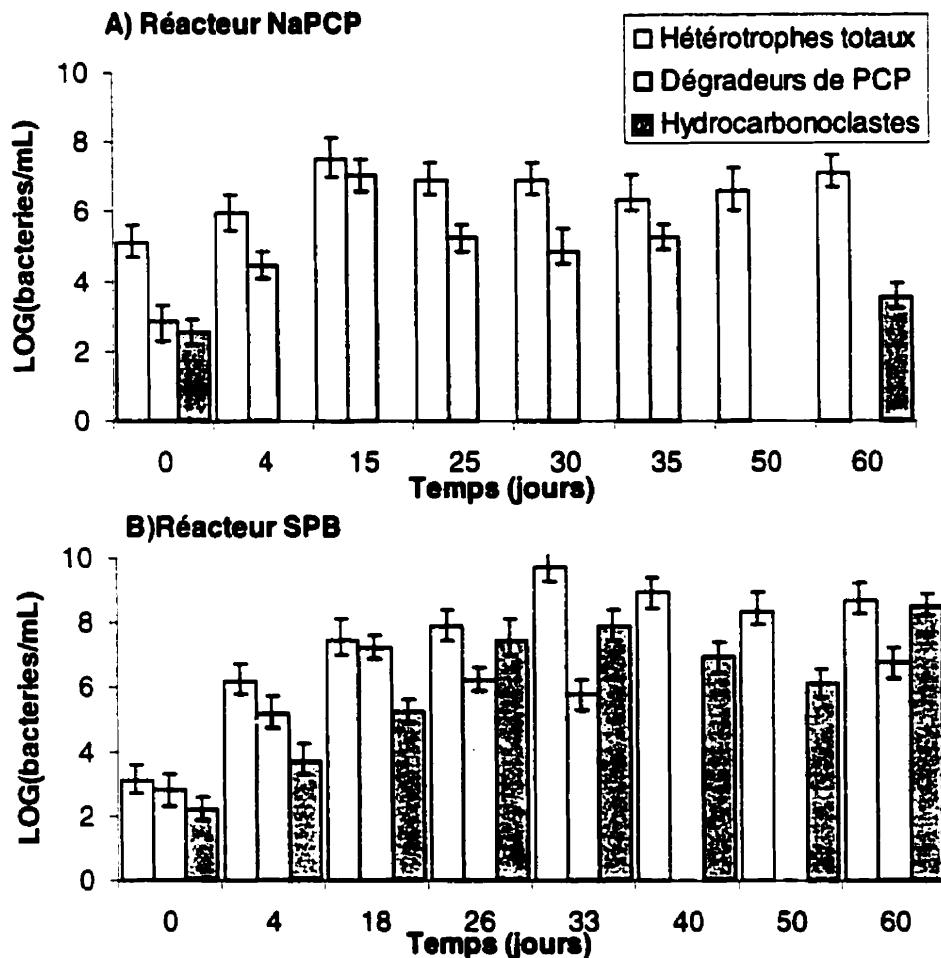


Figure 2.9 Comptes bactériens MPN dans le réacteur alimenté (A) au NaPCP, (B) à la SPB

La différence entre les deux types d'alimentations est plus marquée en ce qui concerne la population de bactéries hydrocarbonoclastes puisqu'elle a augmenté de 6 log dans le réacteur SPB comparativement à seulement 1 log dans le réacteur NaPCP. La proportion de dégradeurs de PCP semble chuter dans les deux réacteurs au jour 25

(ajout 3). En effet, l'écart entre la densité de la population de dégradeurs de PCP et la population d'hétérotrophes totaux augmente après le troisième ajout.

2.3.3.5 Bilans de masse sur les dibenzo-p-dioxines et dibenzofurannes polychlorées

Dans le but d'évaluer le devenir des PCDD et PCDF ajoutés aux sols activés, des échantillons ont été prélevés et analysés des deux réacteurs au jour 61, tout de suite après l'ajout de 300 mg/L de PCP. Les analyses ont été effectuées sur un seul échantillon de chacun des réacteurs. Selon le Tableau , 52% et 60% des PCDD et PCDF en équivalence toxique ajoutés au réacteur NaPCP et au réacteur SPB respectivement, ont été récupérés au jour 61 des activations. Les analyses indiquent que les isomères des PCDD/DF à 7 et 8 atomes de chlore étaient initialement majoritaires et représentaient 90% des PCDD/DF totaux en équivalence toxique (EQT)(Tableau 2.9). Leur disparition ne peut donc être attribuée à la volatilisation considérant la faible pression de vapeur et le haut coefficient de partage Log K_{ow} de ces isomères (pression de vapeur ~10⁻¹¹ Torr et log K_{ow} >7, (Dy, 1985)).

Tableau 2.9 Bilan de masse des PCDD/DF dans les deux réacteurs en équivalence toxique

	t = 0 jour		t = 61 jours	
	réacteur alim. NaPCP	réacteur alim. SPB	réacteur alim. NaPCP	réacteur alim. SPB
PCDD et PCDF résiduels	ppt EQT	22.2	22.2	518
PCDD et PCDF ajoutés	ppt EQT	0	0	1050.5
PCDD et PCDF récupérés	%	-	-	52
				60

Le Tableau 2.10 présente la composition détaillée des PCDD et PCDF récupérés au jour 61, ainsi que la proportion de chaque groupe d'isomères représente. Si ces

résultats sont comparés avec la composition des solutions d'activation (Tableau 2.6), il est tout de suite apparent que les proportions que chacun des groupes d'isomères représentent sont semblables. En effet, les isomères Hepta et Octa représentent encore 90% de la composition. Par contre, dans le réacteur SPB la proportion de OctaCDD a augmenté de 18 à 57% et les proportions de TétraCDD et HeptaCDD ont diminué d'un facteur de 10. De plus, la proportion de PCDF comparativement au PCDD est moins importante dans le réacteur SPB que dans la solution d'activation SPB.

Tableau 2.10 Composition détaillée des PCDD et PCDF récupérés dans les deux réacteurs au jour 61 et représentation de la proportion des groupes d'isomères

Isomères	Réacteur NaPCP		Réacteur SPB	
	concentration ng/L	proportion %	concentration ng/L	proportion %
2,3,7,8-TCDD	ND	0	1,5	0,0003
Tétra CDD totaux	1,6	0,0001	3,7	0,0006
Penta CDD totaux	15	0,006	11	0,002
Hexa CDD totaux	3 600	1,6	1 200	0,22
Hepta CDD totaux	48 000	21,4	37 000	6,8
Octa CDD	150 000	67,6	310 000	56,9
Tétra CDF totaux	67	0,03	430	0,1
Penta CDF totaux	140	0,06	69	0,02
Hexa CDF totaux	1 800	0,8	4 200	0,7
Hepta CDF totaux	9 000	4,0	61 000	11,2
Octa CDF totaux	11 000	4,9	130 000	23,9

2.3.3.6 Effet des périodes de famine sur la minéralisation du PCP

Lorsqu'il n'y a plus de PCP disponible dans les réacteurs, la flore de dégradeurs est en période de famine jusqu'à ce que du PCP soit rajouté. Cet effet fut étudié en analysant

2.3.3.6 *Effet des périodes de famine sur la minéralisation du PCP*

Lorsqu'il n'y a plus de PCP disponible dans les réacteurs, la flore de dégradeurs est en période de famine jusqu'à ce que du PCP soit rajouté. Cet effet fut étudié en analysant les courbes de minéralisation du PCP à l'aide de la méthode mise au point par Millette *et al.* (1995). Les courbes de minéralisation des jours 25 à 60 des deux réacteurs, démontrent que l'activité de minéralisation du PCP est inhibée par les périodes de famine. En effet, la partie A de la Figure 2.10 montre que lorsque les périodes de famine dépassent une journée, le paramètre RMAX représentant le taux maximal de minéralisation du PCP de la biomasse acclimaté, passe de 120%/jour à 30%/jour. Les deux autres paramètres, soit le LAG et le %MAX ne semblent pas influencés par des périodes de famine de 3 jours et moins. L'étude de la partie B de la Figure 2.10, semble indiquer qu'étonnamment qu'il n'y a pas de relation entre le temps de famine et la concentration de dégradeurs de PCP.

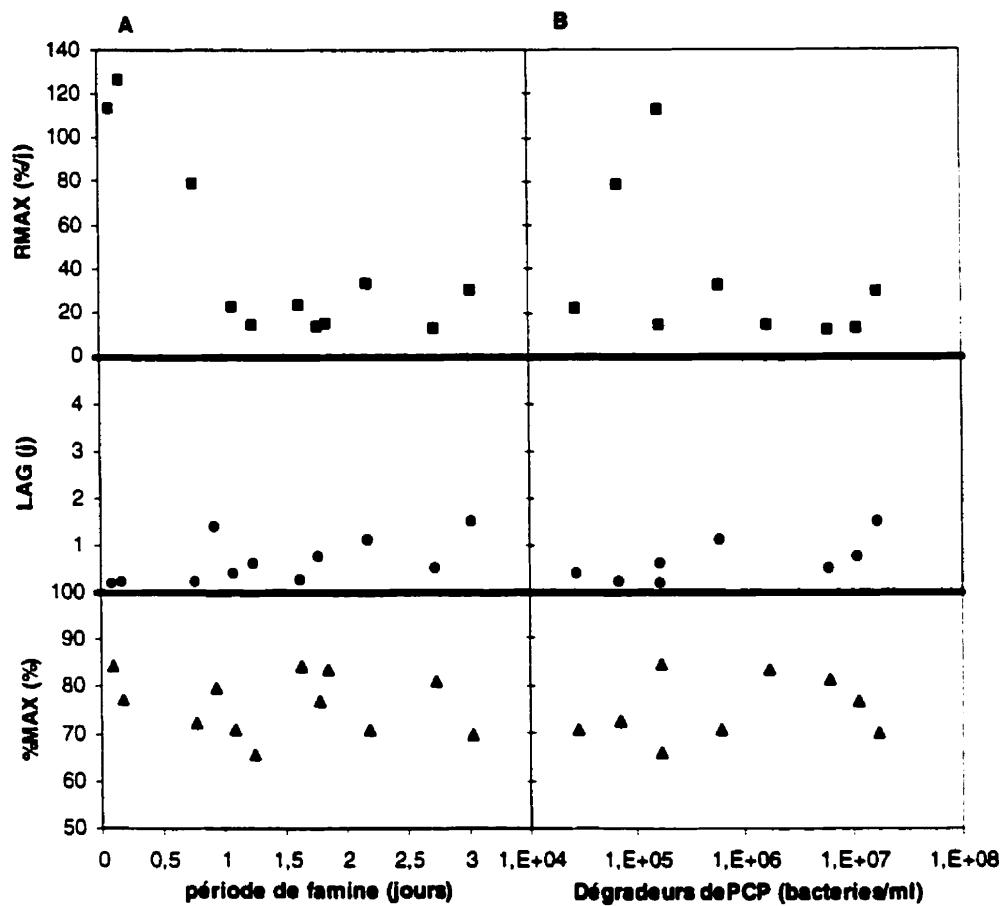


Figure 2.10 Effets des périodes de famine sur l'activité de minéralisation du PCP (A). Relation entre la concentration de dégradeurs de PCP et la minéralisation du PCP(B).

2.3.4 Activation 3 : Production de biomasse active pour bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois

2.3.4.1 Dégradation du PCP

Le seuil de toxicité a été atteint lors de la production précédente. Il fallut produire de nouvelles biomasses active afin de pouvoir les tester en bioaugmentation. L'activation 3 a été faite à partir du sol AES. Le sol BSL ayant séjourné plus de 10 mois à 4°C, il était préférable d'utiliser du sol frais afin d'obtenir de bons résultats. Ce sol contenait peu de PCP et aucun hydrocarbure pétrolier. La production de la biomasse activée au NaPCP selon les paramètres d'alimentation fixés a duré 25 jours. La Figure 2.11 présente l'évolution de la consommation du PCP en fonction des ajouts de substrat. Le taux moyen de disparition du PCP a grimpé de 8,6 mg /L·j jusqu'à 25 mg /L·j ce qui est légèrement supérieur aux valeurs obtenues lors de la deuxième activation. La biomasse n'a subi aucune période de famine et le pH a été maintenu constant entre 7,2 et 7,6. La concentration en ions chlorures a augmenté avec la dégradation du PCP pour atteindre une valeur de 6,5 mM.

La production de la biomasse activée à la SPB a duré 15 jours de plus et le taux de dégradation moyen du PCP n'a atteint que 7,13 mg /L j. Par rapport aux objectifs fixés, on observe deux erreurs lors de l'alimentation du réacteur. Premièrement, le deuxième ajout s'est fait avant que la biomasse n'ait montré une activité de dégradation. Deuxièmement, le dernier ajout s'est fait après une période d'un peu plus de 3 jours de famine. Les répercussions de ces erreurs de manipulations sur l'activité de consommation du PCP sont très visibles, elles ont ralenti le processus d'activation et de longues périodes de latences ont été observées. L'ajout de 100 mg de PCP /l aux 50 autres déjà présent dans le réacteur alimenté à la solution de préservation en début d'activation, a ralenti l'activité des dégradeurs, se traduisant en une période de latence de 9 jours. Le nombre de points sur les courbes n'est pas assez élevé pour calculer des

taux de dégradation significatifs. La dégradation des hydrocarbures pétroliers n'a pas été suivie puisque les activations précédentes ont montré qu'elle était stimulée par l'utilisation de SPB.

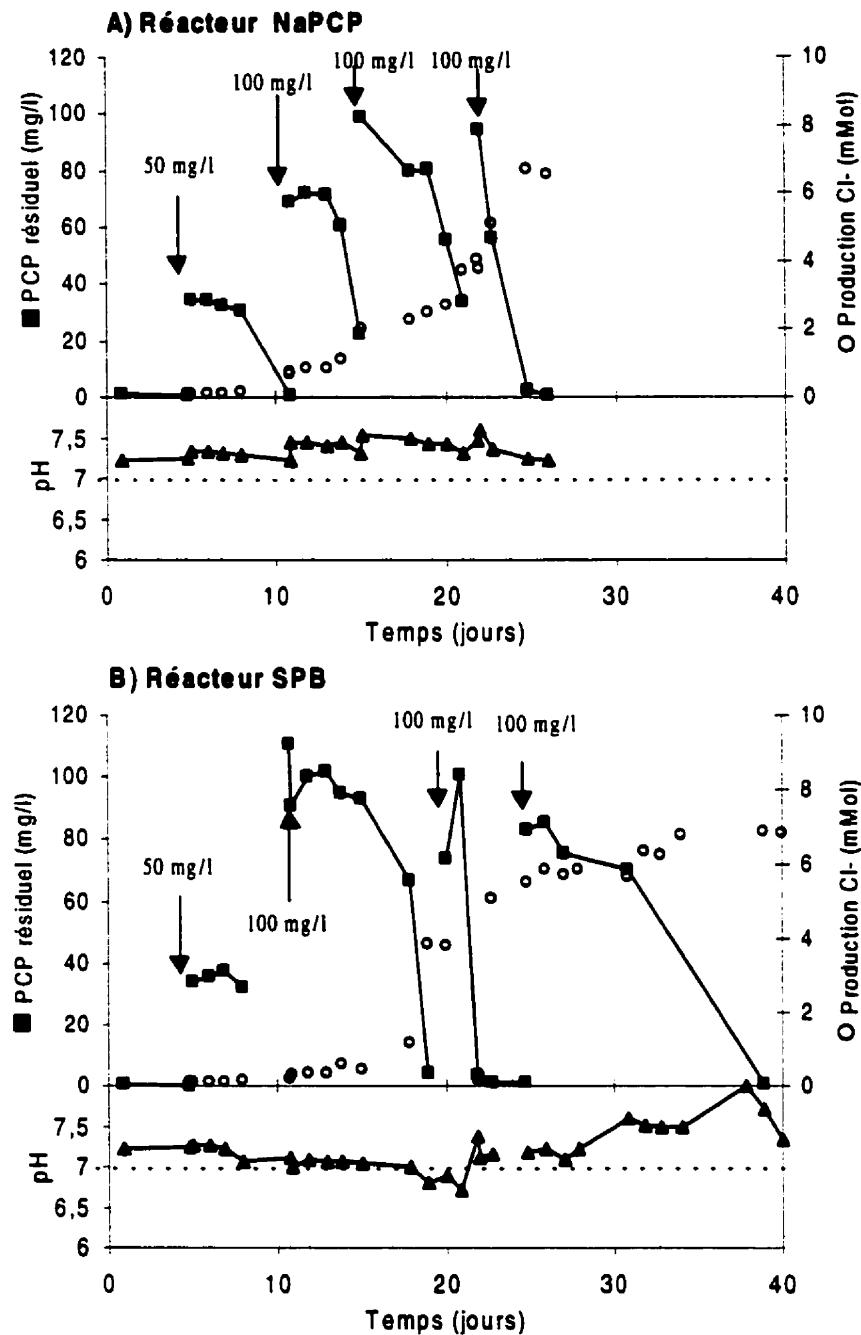


Figure 2.11 Consommation du PCP, production d'ions chlorures et pH dans le réacteur alimenté A) au NaPCP et B) à la solution de préservation. Troisième activation (sol AES).

Des bilans de masse sur le PCP et les C₁₀-C₅₀ ont permis de vérifier qu'il n'y avait pas d'accumulation de ces contaminants dans les réacteurs. En effet, selon un bilan effectué sur le PCP total 99,8% (début: 3 mg/kg dans sol, fin: 0,29 mg/L sol et 0,39 mg/L liquide) et 99,5% (début: 3 mg/kg dans sol, fin: 1,1 mg/L sol et 0,63 mg/L liquide) des 2800 mg PCP ajoutés ont été dégradés dans le réacteur alimenté au NaPCP et dans le réacteur alimenté à la solution de préservation du bois respectivement. De plus, un bilan effectué sur la production des ions chlorures permet de considérer que 97,4% (6,69 mM de Cl- théorique, 6,52 mM récupérés) du PCP ajouté dans le réacteur alimenté au NaPCP a été minéralisé et 93,4% (7,26 mM de Cl- théorique, 6,86 mM récupérés) du PCP a été minéralisé dans le réacteur SPB. Finalement, seulement 0,2% (3436 mg/L ajoutés, 4,4 mg/L récupérés) des C₁₀-C₅₀ ajoutés ont été récupérés à la fin de l'activation.

2.3.4.2 *Production de Biomasse et activité de minéralisation*

Les capacités de minéralisation du PCP et de l'hexadécane ont été évaluées au début et à la fin des activations (Figure 2.12). Dans le cas de la minéralisation du PCP, un temps de latence de 5 jours est observé dans les échantillons prélevés des deux réacteurs au début de l'activation. À la fin de la production, plus aucune période de latence n'est observée. Par contre, le taux maximal de minéralisation du PCP dans le réacteur SPB à la fin de l'activation est inférieur à la valeur du début.

La minéralisation de l'hexadécane semble aussi avoir été affectée par les erreurs de manipulation lors de l'alimentation du réacteur SPB. En effet, l'allure de la courbe de minéralisation de l'hexadécane à la fin de l'activation à la SPB ne possède pas les caractéristiques d'une biomasse acclimatée telles que rencontrées tout au long de ce projet (voir section 2.3.6), c'est à dire un taux de minéralisation initial élevé suivi d'une augmentation lente du pourcentage de minéralisation. Malgré l'effet apparemment inhibiteur sur la biomasse activée de l'alimentation en substrat SPB, le pourcentage de

minéralisation maximal atteint en 25 jours est de 12% supérieur dans le réacteur SPB que dans le réacteur alimenté NaPCP. L'activation du sol contaminé à l'aide de la solution de NaPCP a diminué les performances de minéralisation de l'hexadécane puisque le pourcentage de minéralisation maximal atteint est de 10% après activation alors qu'il était de 30% avant activation.

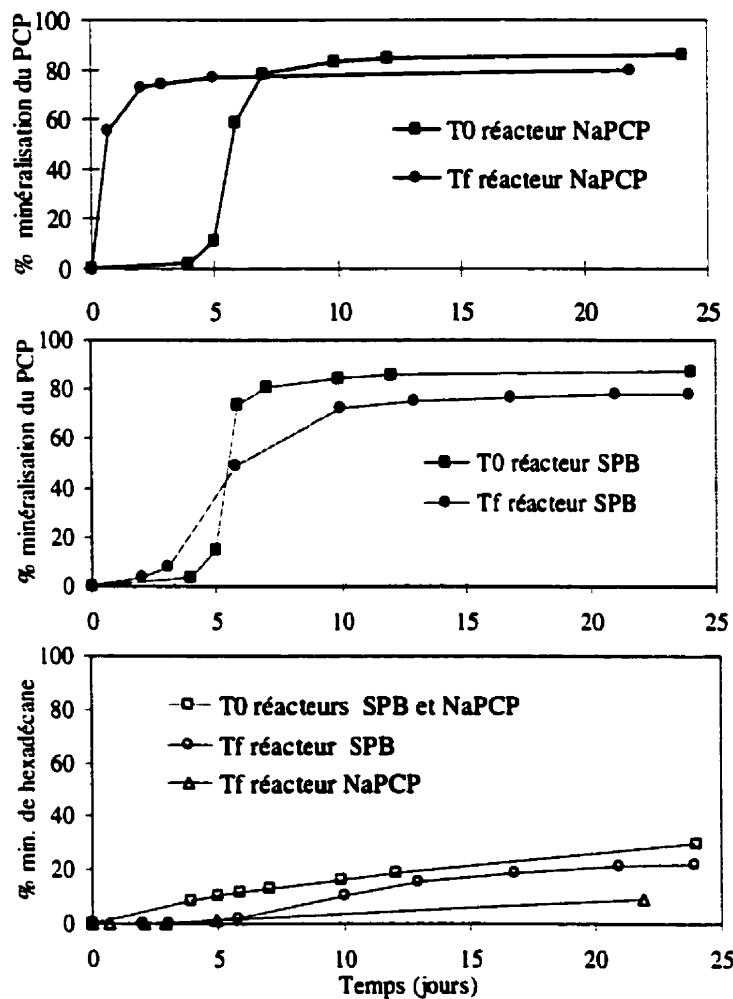


Figure 2.12 Minéralisation du ^{14}C -PCP et de ^{14}C -hexadécane, activation 3

Les résultats des dénombremens microbiens du début et de la fin de l'activation, indiquent que le sol activé à la solution de préservation du bois contient une concentration plus faible de bactéries hétérotrophes totales et dégradeurs de PCP que le sol activé au NaPCP. En effet, la population d'hétérotrophes totaux est passée de 1,3 et 3×10^5 bactéries/mL à 8 et 7×10^6 bactéries/mL dans le réacteur alimenté au NaPCP et à la SPB respectivement. De plus, une concentration de seulement $2,7 \times 10^4$ bactéries/mL de dégradeurs de PCP a été atteinte dans le réacteur alimenté à la solution de préservation alors que la concentration de dégradeurs de PCP atteint 8×10^5 bactéries/mL dans le réacteur alimenté au NaPCP. Malgré les faibles performances de minéralisation de l'hexadécane du sol activé SPB, une bonne concentration de bactéries hydrocarbonoclastes est retrouvée ($2,3 \times 10^6$ bactéries/mL) dans le réacteur après les 41 jours d'activation alors qu'elle était de 1×10^4 bactérie/mL avant l'activation.

2.3.5 Comparaison des résultats obtenus pour les trois activations

Les principaux résultats caractérisant les biomasses produites lors des trois activations sont présentés au Tableau 2.11. Rappelons que les deux premières activations ont été faites à partir du même sol et la troisième à partir d'un sol très similaire mais ne contenant pas d'hydrocarbures pétroliers. Selon les résultats obtenus, la biomasse la plus active (i.e. possédant les plus hauts taux de conversion et de consommation du PCP) a été produite lors de la première activation en utilisant la solution de préservation de bois comme source de substrat. Ce qui caractérise cette production est l'absence de périodes de famine et les ajouts initiaux de plus faible concentration en PCP (30 mg de PCP/L suivis de 60 mg de PCP/L). En opposition, l'activation 3 à la solution de préservation a produit la biomasse la moins performante et elle est caractérisée par une longue période de famine durant la production et des ajouts

initiaux dont les concentrations se sont additionnées dans le réacteur (50 mg de PCP/L additionné à 100 mg de PCP/L).

L'activation 3 par alimentation au NaPCP représente la production de la biomasse la plus performante lorsqu'une solution alcaline ne contenant que du NaPCP grade technique est utilisée. Malgré l'élimination des périodes de latence et les alimentations pendant les phases actives de dégradation, le taux de consommation moyen final obtenu avec le NaPCP est encore inférieur au taux obtenu avec la solution de préservation lors de l'activation 1. Les concentrations de dégradeurs de PCP sont par contre équivalentes pour toutes les productions de biomasse effectuées, excluant l'activation 3 à la solution de préservation

Les bilans de masse indiquent des performances semblables lors des trois activations autant pour la consommation du PCP que des C₁₀-C₅₀. Ces résultats confirment que la disparition du PCP et des C₁₀-C₅₀ dans les réacteurs est bien liée à leur biodégradation et que l'accumulation dans le sol est négligeable. Les concentrations bactériennes se comparent également. La densité des hétérotrophes totaux se situe entre 7 x 10⁶ bactéries/mL pour l'activation 3 à la SPB à 3 x 10⁹ bactéries/mL pour l'activation 1 à la SPB. Les dégradeurs de PCP montrent des concentrations entre 3 x 10⁴ bactéries /mL encore pour l'Activation 3 à la SPB à 6 x 10⁶ bactéries/mL pour l'activation 2 au NaPCP. La concentration de bactéries hydrocarbonoclastes est beaucoup plus importante dans les réacteurs SPB (10⁶ à 10⁸ bactéries/mL) que dans le réacteur NaPCP de l'activation 2

Tableau 2.11 Caractérisation de la biomasse produite lors des trois activations

Paramètres	Activation 1 (sol BSL)		Activation 2 (sol BSL)		Activation 3 (sol AES)	
	NaPCP	SPB	NaPCP	SPB	NaPCP	SPB
Dégradation du PCP	99,6 %	99,3 %	^a 99,6%	^a 99,6%	99,8 %	99,5 %
Conversion PCP en Cl-	96,7 %	99,9%	97,4%	96,9%	97,4 %	93,4 %
Dégradation C ₁₀ -C ₅₀	-	92,5 %	-	99,9%	-	99,8 %
Taux de dégradation moyen final du PCP (mg/L·j)	16	31	21	22	25	7,1
Densité hétérotrophes totaux finale (bact./mL)	2 x 10 ⁸	3 x 10 ⁹	1 x 10 ⁷	5 x 10 ⁸	8 x 10 ⁶	7 x 10 ⁶
Densité de dégradeurs de PCP finale(bact./mL)	3 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	^b 2 x 10 ⁵	6 x 10 ⁶	8 x 10 ⁵	3 x 10 ⁴
Densité hydrocarbonoclastes finale(bact./mL)	-	7 x 10 ⁶	3 x 10 ³	4 x 10 ⁸	-	3 x 10 ⁶

^a Bilan phase aqueuse seulement^b concentration au jour 35.

2.3.6 Acclimatation des microorganismes indigènes à l'hexadécane

La littérature contient peu d'exemples de minéralisation de l'hexadécane. Il faut pourtant avoir des points de comparaison pour interpréter et comprendre les résultats obtenus au cours du projet. Une trentaine de courbes de minéralisation de l'hexadécane à des conditions différentes ont été produites pendant les deux phases expérimentales du projet, l'activation et la bioaugmentation. La comparaison de ces courbes peut aider à comprendre les principaux facteurs influençant leur apparence. À la section 2.3.4.2, il est écrit que l'allure de la courbe de minéralisation de l'hexadécane à la fin de l'activation dans le réacteur alimenté à la solution de préservation lors de la troisième

production de biomasse, n'est pas caractéristique d'une biomasse acclimatée. Afin de déterminer les caractéristiques d'une flore acclimatée et en particulier l'allure d'une courbe de minéralisation de l'hexadécane, différents résultats obtenus au cours du projet sont illustrés à la Figure 2.13 . Le sens du terme "flore acclimatée" est restreint pour le moment à une flore ayant été en contact et ayant dégradé une concentration importante de contaminants.

Les courbes représentant une flore non-acclimatée sont celles du sol BSL (10% (w/v) sol-MSM), du sol AES (10%(w/v) sol-MSM), du sol activé au NaPCP (activation 2) et du $t=4$ jours du réacteur SPB (activation 2, aucun ajout d'hydrocarbures n'avait été fait). Les courbes représentant une flore acclimatée sont celles obtenues au long de l'activation 2 dans le réacteur alimenté à la SPB et la courbe de la semaine 5 du témoin biotique des essais de bioaugmentation (chapitre 3). Dans chacun des cas, les concentrations de C₁₀-C₅₀ ainsi que les concentrations en bactéries hydrocarbonoclastes sont illustrés au Tableau 2.11. Peu importe la concentration de C₁₀-C₅₀ retrouvée dans les microcosmes, l'allure des courbes de minéralisation de l'hexadécane au cours de l'activation 2 restent semblables et se comparent à celle du témoin biotique de la bioaugmentation. Il en est de même pour les flores n'ayant jamais été en contact avec des concentrations élevées d'hydrocarbures pétroliers. En effet, les courbes de flores non-acclimatées sont caractérisées par une lente augmentation du pourcentage de minéralisation alors que les courbes de flores acclimatées sont caractérisées par un taux de minéralisation initial élevé suivi d'une lente augmentation du pourcentage de minéralisation.

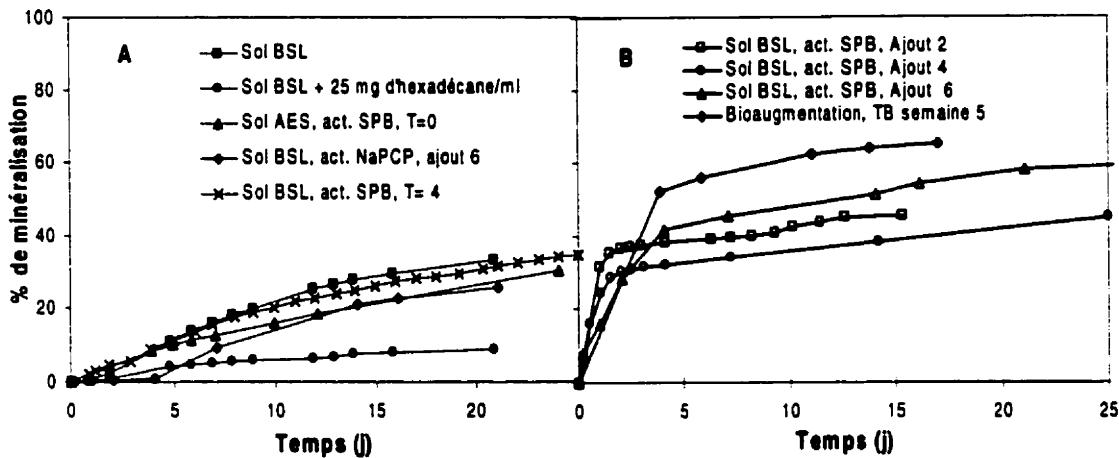


Figure 2.13 Allures des courbes de minéralisation de l'hexadécane. A) biomasses non acclimatées (sol initial utilisé pour les activations 1 et 2, mélange 10% (p/v) sol-MSM), B) biomasses acclimatées (Activation 2 et bioaugmentation chapitre 3)

Tableau 2.12 Concentration en C₁₀-C₅₀ et en bactéries hydrocarbonoclastes des flores non-acclimatées et acclimatées représentée à la figure 2.13

Nom de l'échantillon	État	Concentration C ₁₀ -C ₅₀	Concentration bactéries hydrocarbonoclastes
Sol BSL	N-A	6,8 mg/L	2,1 x 10 ² bact./mL
Sol BSL + 25 mg/L	N-A	32 mg/L	2,1 x 10 ² bact./mL
Sol AES act. SPB, t=0	N-A	>1 mg/L	1,1 x 10 ⁴ bact./mL
Sol BSL activé au NaPCP	N-A	>1 mg/L	3,4 x 10 ³ bact./mL
Sol BSL act. à la SPB, t=4	N-A	16 mg/L	5 x 10 ³ bact./mL
Sol BSL act. à la SPB, ajout 2	A	31 mg/L	1,7 x 10 ⁵ bact./mL
Sol BSL act. à la SPB, ajout 4	A	190 mg/L	9 x 10 ⁶ bact./mL
Sol BSL act. à la SPB, ajout 6	A	550 mg/L	3,4 x 10 ⁸ bact./mL
Sol Bell, essais bio-augmentation, témoin biotique, semaine 5 (chapitre 3)	A	~690 mg/kg	1,1 x 10 ⁵ bact./g sol sec

N-A = non-acclimatée A = acclimatée

Les concentrations de bactéries hydrocarbonoclastes ne sont pas les mêmes d'une flore acclimatée à une flore non-acclimatée, ce qui est normal puisque la flore non-acclimatée n'a pas été en présence d'hydrocarbures pétroliers et n'a jamais pu croître. Le tableau 2.12 présente la concentration en C₁₀-C₅₀ contenu dans les sols qui ont été utilisés pour les essais en microcosmes illustrés à la figure 2.13. Les sols contenant des flores non-acclimatées montrent une concentration en dégradeurs d'hydrocarbures pétroliers de 5 x 10³ bactéries/mL et moins et les flores acclimatées de 10⁵ bactéries/mL et plus.

2.4 Discussion

2.4.1 Production de biomasse active

2.4.1.1 Activité de dégradation du PCP et des hydrocarbures pétroliers

La présence des autres composés constituant la solution de préservation n'a pas influencé la dégradation du PCP. Les performances de dégradation étaient comparables dans les deux réacteurs lors des deux premières activations. Les taux de dégradation maximums obtenus sont comparables à ceux de Barbeau *et al.* (1997) qui rapportent un taux de dégradation maximal du PCP (pente maximale) de 90 mg/L·j lors de la production d'un sol activé au NaPCP. Le seuil de toxicité a été atteint pendant l'activation 2, lors de l'ajout de 300 mg/L de PCP qui a eu pour effet d'inhiber toute activité de dégradation du PCP par la suite. Ce seuil de tolérance est comparable à celui atteint par Barbeau *et al.* (1997) puisqu'une inhibition de la dégradation a été notée à une concentration de 300 mg/L. De plus, les concentrations en ions chlorures, de moins de 20 mM, atteintes ne devraient pas avoir causées d'effet inhibiteur puisque Otte *et al.* (1994) rapportent qu'aucune inhibition due aux ions chlorures n'a été enregistrée avant d'atteindre une concentration de 133 mM. Gonzalez et Hu (1991) ont pour leur part observés l'effet inhibiteur d'une concentration de 80 mM en ions chlorures sur la dégradation du PCP par *Flavobacterium* sp.

Le faible contenu en carbone organique total et en argile du sol a limité l'adsorption du PCP aux particules. De ce fait, des pourcentages élevés de dégradation et minéralisation du PCP ont pu être atteints. Les résultats d'études précédentes, ayant utilisées des sols plus argileux et possédant de plus importantes concentrations de COT, ont montré de plus faibles performances. En effet, Barbeau *et al.* (1997) ont observé une concentration de 120 mg/kg de PCP adsorbé aux particules de sol et Otte *et al.* une adsorption de 188 mg/kg. Il ne faut cependant pas oublier les avantages des capacités

d'adsorption d'un sol puisque celles-ci permettent d'augmenter le seuil de toxicité des micro-organismes en diminuant la quantité de contaminant disponible dans la phase aqueuse (voir 2.4.4).

Les bilans de masse ainsi que les analyses en C₁₀-C₅₀ ont montré que l'utilisation de la solution de préservation de bois en tant que contaminant cible lors de l'activation d'un sol stimule la dégradation des hydrocarbures pétroliers. Aucune accumulation de C₁₀-C₅₀ n'a été détectée lors des trois production de biomasse active.

La croissance des dégradeurs de PCP ne semble pas avoir été influencée par la présence des autres constituants de la solution de préservation du bois. En effet, les concentrations de dégradeurs de PCP sont comparables dans les deux réacteurs et se maintiennent entre 10⁵ et 10⁶ bactéries/mL pour toutes les productions de sol activé (mis à part l'activation 3 à la SPB). De plus, les concentrations de bactéries hydrocarbonoclastes se sont révélées très supérieures lorsque la solution de préservation de bois était utilisée. La croissance de dégradeurs d'hydrocarbures était très stimulée lors des activation à la solution de préservation du bois.

Ces résultats démontrent clairement que l'utilisation de la solution de préservation du bois comme solution activante, permet non seulement d'augmenter les performances de dégradation du PCP du consortium mais aussi stimule la dégradation des hydrocarbures pétroliers.

2.4.1.2 Activation 3 à la solution de préservation de bois: périodes de famine.

De toutes les productions de biomasse, la troisième activation à la solution de préservation de bois est la moins performante. En effet, les taux de dégradation du PCP sont faibles (7 mg/L·j), la concentration de bactéries dégradeurs est basse (3×10^4 bactéries/mL) et les courbes de minéralisation du PCP ne démontre aucun signe de stimulation de l'activité de dégradation. Par contre, les résultats ne sont tous aussi concordant en ce qui à trait à la dégradation des hydrocarbures pétroliers. La

concentration de bactéries hydrocarbonoclastes est relativement élevée (3×10^6 bactéries/mL), un bilan de masse indique que 99,8% des hydrocarbures ajoutés ont été dégradés, il ne reste que 5 mg/L de C₁₀-C₅₀ dans le réacteur, par contre la courbe de minéralisation de l'hexadécane ne correspond pas à une courbe de flore acclimatée de cette concentration bactérienne. En effet, la section 2.3.6 présente les caractéristiques de flores acclimatés et non-acclimatées. À des concentrations de dégradeurs de 10^5 bactéries/mL et plus, la minéralisation de l'hexadécane était caractérisée par un taux de minéralisation initial élevé suivie d'une augmentation faible mais constante du pourcentage de minéralisation. La biomasse produite lors de la troisième activation à la SPB présentait une densité de dégradeurs de 3×10^6 bactéries/mL mais une lente minéralisation de l'hexadécane. Les résultats répertoriés à la section 2.3.6 indiquent clairement que la concentration de C₁₀-C₅₀ dans les microcosmes n'influence pas l'allure de la courbe de minéralisation.

L'absence d'hydrocarbures pétroliers dans le sol AES, peut suggérer que la flore indigène n'a jamais été en contact avec des C₁₀-C₅₀, avant l'activation du sol. Mais les comptes d'hydrocarbonoclastes au début de l'activation montrent qu'une flore importante (10^4 bactéries/mL) de dégradeurs d'hydrocarbures est présente.

Par contre, l'hypothèse d'une période de famine chez les bactéries hydrocarbonoclastes pourrait expliquer ces résultats discordants. Le manque de substrat pourrait avoir influencé la façon dont les bactéries ont utilisé le substrat alimenté sans pour autant avoir eu une influence sur la densité de la population de dégradeurs. Simkins et Alexander (1984) ont décrit la minéralisation du benzoate selon les variables: concentration de substrat initial et densité bactérienne initiale. Ils ont modélisé la minéralisation du composé selon 6 modèles cinétiques en fonction de différentes concentrations initiales de substrat et de bactéries. Ils ont clairement montré que la façon dont les bactéries utilisaient le benzoate, dépendait de ces deux variables. Ils ont

aussi souligné le fait que plusieurs autres facteurs environnementaux peuvent avoir une influence sur la minéralisation du substrat.

Plusieurs publications traitent de la survie des bactéries en mode "famine", impliquant des périodes de manque de substrat beaucoup plus longues que celles observées lors des activations. De plus, ces publications sont centrées sur les réactions cellulaires et non sur les effets de la famine sur l'activité de la flore microbienne. Morita (1993) affirme dans un document traitant de stratégies de survie de bactéries affamées, que lorsqu'une cellule affamée est alimentée en énergie, elle consomme immédiatement cette énergie, et que plus la période de famine est longue, plus la période de latence sera longue pour les micro-organismes. Il ajoute que le nombre de cellules ne diminue pas nécessairement en temps de famine, ce qui correspond bien aux résultats obtenus dans cette étude.

2.4.1.3 Devenir des dioxines et furannes dans le procédé d'activation

Seulement 52% (réacteur alimenté au NaPCP) et 60% (réacteur alimenté à la SPB) des PCDD/DF ajoutés aux réacteurs lors de l'activation 2 ont été récupérés après 61 jours d'activation. La perte par volatilisation de ces composés est une hypothèse qui a été écartée puisque les pressions de vapeur des isomères majoritaires étaient plutôt élevées. La méthode d'extraction utilisée étant très agressive, la disparition de PCDD/DF ne peut être attribuée à une adsorption aux particules de sol. Les profils des isomères retrouvés dans les sols activés sont similaires aux profils des solutions d'activation. Par contre, de petites différences peuvent être observées, mais elles sont reliées aux limites de détection de la méthode qui changent avec l'ordre de grandeur des concentrations des échantillons. Les composés de moins de 4 chlores ne faisant pas parti des isomères analysés, aucune hypothèse ne peut être avancée sur la dégradation possible des PCDD/DF. En effet, la littérature ne rapporte que la dégradation aérobie des composés mono-, di-, tri- et tétrachlorés (Fiedler et Van den Berg, 1996; Parson et Storm, 1989;

Quensen et Matsumura, 1983; Wilkes, 1996). De plus, le bilan a été fait en se servant des valeurs d'équivalence toxique ciblant les composés les plus toxiques, une diminution de la toxicité a donc été observée.

Un des avantages de l'utilisation de la solution de préservation peut être souligné, puisque la présence d'une phase huileuse devrait augmenter la disponibilité des dioxines et furannes. En effet, Umbreit *et al.* (1986) ont observé que la présence d'huile augmentait la biodisponibilité des PCDD/DF dans les sols et ont utilisé une solution d'hydrocarbures pour désorber des dioxines et furannes d'un sol contaminé.

2.4.1.4 Effet de l'activation sur la biodiversité microbienne d'un sol

Le suivi de trois flores bactériennes a permis de tracer un portrait de l'évolution de la population indigène du sol au cours de son activation. En regardant l'évolution de chacune des flores; hétérotrophes totaux, dégradeurs de PCP et bactéries hydrocarbonoclastes, séparément puis les unes par rapport aux autres, quelques indices concernant les changements dans la biodiversité microbienne ressortent clairement.

Une analyse globale des deux premières activations effectuées permet de séparer l'évolution des populations microbiennes en deux phases. Dans un premier temps, les trois flores observées croissent et se multiplient. De plus, l'écart entre la densité de la population d'hétérotrophes totaux et la densité des populations de dégradeurs sélectifs diminue. La croissance de dégradeurs spécifiques aux substrats est favorisée et une sélection microbienne est observée. Ce genre de pression sélective a déjà été rapportée en ce qui concerne les dégradeurs de PCP. Les résultats de comptes bactériens d'hétérotrophe totaux et de bactérie tolérante au PCP fait par Watanabe (1977), sur un sol régulièrement contaminé au PCP, indiquaient une augmentation du ratio de bactéries tolérantes au PCP sur les bactéries totales après chaque ajout de contaminant.

Dans un second temps, l'écart entre la densité des hétérotrophes totaux et la densité des dégradeurs augmente et la concentration de chacune des flores semble atteindre un

plateau. Ceci indiquerait un changement dans le patron de la biodiversité. La concentration de biomasse atteinte permettrait la croissance de bactéries tolérantes au PCP utilisant les bactéries mortes comme source de carbone (Alexander, 1994).

Y a-t-il une différence de l'impact sur la biodiversité entre les deux types de substrats alimentés. Théoriquement, l'utilisation de la solution de préservation de bois, contenant une plus grande variété de sources de carbone que la solution alcaline de NaPCP, devrait monter une moins grande pression sélective sur la flore indigène. En effet, les analyses sur la diversité de l'ADN des sols activés produits au cours de la deuxième activation, rapportés par Bécaert *et al.* (1999) ont montré que la biodiversité microbienne dans le sol activé à la solution de préservation est beaucoup plus importante que dans le sol activé au NaPCP.

D'après ces observations, il devient évident que le mode d'activation d'un sol a une influence sur la biodiversité de la flore indigène. Par contre, la réapparition de non-dégradeurs au cours de l'activation montre que le procédé d'activation produit un consortium de diversité importante. Les résultats obtenus par l'analyse de la diversité de l'ADN tout au long des activations vont permettre une meilleure compréhension des effets du procédé d'activation sur la flore microbienne du sol (Beaulieu, projet de M. Sc. INRS IAF). Des études supplémentaires seront par contre nécessaires afin déterminer si ces influences sont réversibles.

2.4.2 Influence de la méthode d'alimentation

L'alimentation des réacteurs par ajouts ponctuels a été retenue parce qu'elle offre plusieurs avantages quant à son application sur le terrain. Elle demande un équipement moins sophistiqué et un suivi moins exigeant que la méthode d'alimentation continue, et ainsi devient une technologie de biorestauration moins coûteuse. Les travaux effectués par Otte *et al.* (1994) ainsi que par Karamanev *et al.* (1998) sur l'activation d'un sol avec une alimentation en PCP continue ont donné des taux de dégradation du

PCP supérieurs (500 mg/L·j et 9000 mg/L·j respectivement) à ceux obtenus par Barbeau *et al.*(1997) et ceux obtenus au cours du présent projet. L'alimentation en continu permet d'obtenir des taux de dégradation du PCP supérieurs. L'idéal serait donc de rassembler le meilleur des deux types d'alimentation. Par contre, cette conclusion doit être accompagnée d'un bémol. L'alimentation en continu ne permet pas nécessairement de produire une flore de dégradeurs dense et résistante. Barbeau (1996) a comparé les performances de deux flores produites selon deux modes d'alimentation (continu et par ajouts) et n'a pas observé de différence significative (analyses statistiques, 95% de confiance).

Au cours de ce projet, trois caractéristiques majeures de la méthode d'alimentation par ajouts ponctuels ont été identifiées comme influençant particulièrement la dégradation du PCP. La première, est l'effet des temps de famine le second est l'effet d'une alimentation pendant une phase active de dégradation et le troisième est l'effet d'ajouts successifs de concentrations égales.

2.4.2.1 Effet de périodes de famine sur l'activité de minéralisation.

La minéralisation d'un composé est sa transformation en CO₂ et en H₂O par une cellule utilisant le carbone de composé comme source d'énergie de maintenance. Le pourcentage de substrat qui est minéralisé ou incorporé à la biomasse dépend de la souche, de la nature du substrat, de sa concentration, de la température et bien d'autres facteurs environnementaux (Alexander, 1994).

L'étude de l'effet de périodes de famine sur la minéralisation du PCP à l'aide de la méthode d'analyse mise au point par Millette *et al.* (1995) a permis de montrer que les périodes de famine de 3 jours et moins ralentissent la minéralisation du PCP dans les deux réacteurs. Plus précisément, elles n'ont eu d'influence que sur le taux maximal de minéralisation représenté par la variable RMAX selon la méthode d'analyse. En effet, les flores acclimatées de dégradeurs de PCP de 10⁴ bactéries/mL et plus, privées de

PCP pour une période de 3 jours et moins, étaient toutes capables d'atteindre les mêmes %MAX et ne présentaient pas de LAG significatif (moins de 1,5 jours). Des travaux précédents ont permis d'observer les effets inhibiteurs importants des périodes de famine. Buitron et Capdeville (1994) ont observé une influence négative de périodes de famine sur l'activité d'une biomasse acclimatée au 4-chlorophénol alors qu'une baisse de 80% de l'activité enzymatique était notée après seulement 6 heures de famine. Megharaj *et al.* (1997) ont démontré que la densité d'une population de *Sphingomonas* RW1 acclimatée au dibenzo-furanne, diminuait sous les limites de détection après avoir été affamée, pour réapparaître dès l'ajout de dibenzo-furanne frais.

Les résultats indiquent aussi que les paramètres de minéralisation du PCP des flores acclimatée, ne sont pas fonction de la densité de dégradeurs. Puisqu'il s'agit de minéralisation, il est juste d'affirmer que les périodes de famine de 3 jours et moins ont influencé, la façon dont le PCP a été utilisé par les micro-organismes. À concentration de dégradeurs semblable, l'ajout d'une quantité de substrat n'a pas engendré la même réponse d'une flore affamée que d'une flore n'ayant pas manqué de substrat. Dans le cas de flore acclimatée, les périodes de famines ont eu plus d'influence sur la minéralisation du PCP que la concentration de dégradeurs de PCP.

Par ailleurs, des problèmes analytiques rencontrés ont permis de découvrir un aspect important de l'alimentation par ajouts ponctuels. Les taux de dégradation atteints dans le réacteur SPB lors de l'activation 1, sont supérieurs d'un facteur de 2 à tous les autres taux obtenus. En effet, un taux de dégradation moyen de 63 mg PCP/L·j a été atteint. Le facteur le plus susceptible d'expliquer ces résultats est le fait d'avoir alimenté la flore en contaminants lorsque son activité de dégradation était à son maximum. En effet, les premiers ajouts dans le réacteur SPB ont été effectués bien avant de ne plus détecter de PCP dans le réacteur, alors que les taux de dégradation étaient à leurs maximums. En fait, c'est ce principe qui permet d'obtenir des taux de dégradation si élevés par alimentation en continu. Tant qu'aucun facteur ne vient inhiber la croissance

bactérienne (pas de carence en substrat ou en nutriments, pH adéquat etc.) l'activité métabolique des microorganismes est intense et la population atteindra ultimement une densité maximale telle que le milieu de culture peut le supporter (VanDemark et Batzing, 1987). Par contre, une flore n'ayant jamais "souffert" ne peut développer les défenses nécessaires pour survivre aux stress d'un changement de milieu.

2.4.2.2 Effet d'ajouts successifs de concentrations similaires

L'effet des ajouts successifs de concentration égale sur l'efficacité de l'activation comparativement à l'effet des ajouts de concentration supérieure peut être étudiée en analysant les taux moyens de dégradation du PCP. Le Tableau 2.7 présentait les taux moyens de dégradation du PCP en fonction des ajouts lors de l'activation 1. Le Tableau 2.8 présentait les taux moyens de dégradation du PCP lors de l'activation 2. Seulement les résultats du réacteur alimenté au NaPCP seront étudiés afin de limiter les variables pouvant influencer les taux de dégradation, tel que la présence d'huile et l'alimentation pendant les périodes actives de dégradation. Les deux activations au NaPCP se sont faites de façon similaires. Les périodes de famine ne semblent pas avoir eu d'effet inhibiteur sur le taux moyen de dégradation du PCP. En effet, les périodes de famine les plus longues ont eu lieu entre les ajouts 1 et 2 de l'activation 1, et entre les ajouts 2 et 3 de l'activation 2, et une augmentation des taux a été observée dans les deux cas.

Lors de l'activation 1, les taux de dégradation moyens du PCP des trois ajouts successifs de 110 mg/L sont passés d'une valeur de 22 mg de PCP/L·j au premier ajout à 33 mg/L·j pour les deux autres ajouts. Lors de l'activation 2, les taux de dégradation moyens du PCP des trois ajouts successifs de 100 mg/L sont passés d'une valeur de 13 mg/L·j à 18 mg/L·j, à 24 mg/L·j. Les périodes de latences diminuent quand des ajouts de concentrations égales se suivent. Karamanev *et al.*(1998) obtient le même genre de résultats lors de l'alimentation d'un réacteur à sol immobolisé. En effet, l'ajout

successif de PCP à des concentrations différente à fait augmenter le taux de dégradation rapidement au début puis a atteint un plateau.

Dans le cas d'ajouts de concentrations supérieures, on observe lors de l'activation 1, qu'un 230 mg/L a fait chuter le taux de dégradation moyen à 16 mg de PCP/L·j et une période de latence était observable. Le pH élevé a pu être responsable de cette diminution mais le même phénomène est observé pour l'activation 2. En effet, le taux de dégradation moyen a chuté à 15 mg/L·j suite au premier ajout de 200 mg/L, mais est remonté à 21 mg/L·j suite à un second ajout de 200 mg/L.

En fait, il semble que des ajouts successifs permettent de réduire les temps de latente et ainsi augmenter les taux moyens de dégradation. Le taux de dégradation atteint un genre de plateau correspondant à l'atteinte d'un régime permanent de consommation du substrat. Un ajout de concentration supérieur permet à la flore d'augmenter son niveau de tolérance au contaminant jusqu'à un seuil de toxicité propre au système utilisé (flore, sol, contaminant). Augmenter la concentration de substrat permet de supporter la croissance et la maintenance d'une flore plus dense ou plus active (VanDemark, 1987).

2.4.2.3 *Alimentation idéale*

Selon les résultats obtenus, la biomasse la plus active , i.e. possédant les plus hauts taux de conversion et de consommation du PCP a été produite lors de la première activation en utilisant la solution de préservation de bois comme source de substrat. Ce qui caractérise cette production est l'absence de périodes de famine et une alimentation de substrat pendant les périodes actives de dégradation. En opposition, l'activation 3 à la solution de préservation est la biomasse la moins performante et elle est caractérisée par une longue période de famine durant la production et des ajouts initiaux dont les concentrations se sont additionnées dans le réacteur.

Plusieurs facteurs concernant l'alimentation des réacteurs doivent être surveillés lors de la production d'une biomasse active sous forme de sol activé. Au début des

expériences, il fut montré que le pH ne devait pas descendre sous une valeur de 7 afin de favoriser la solubilisation du PCP. Edgehill *et al.* (1982) ayant déterminé que des pH de plus 7,5 inhibaient la croissance de la souche *Arthrobacter* (reclassifiée *Sphingomonas* sp. nov. en 1995), et Valo *et al.* (1985) ont observés que au dessus de 7,2 la minéralisation du PCP par une souche mixte, était inhibée. Il faut donc garder le pH entre ces deux valeurs. La sensibilité des dégradeurs de PCP au pH du milieu est probablement reliée à la nature toxique du PCP. Le PCP affectant la perméabilité des membranes cellulaires aux protons (Mc Allister *et al.*, 1996), les bactéries sont plus sensibles aux pH s'éloignant de la neutralité. D'après l'étude des courbes de minéralisation du PCP, l'élimination des périodes de famine devrait augmenter les performances des biomasses produites. Les ajouts devraient donc se faire avant d'atteindre la limite de détection du PCP. De plus, l'alimentation en PCP frais (sous forme de NaPCP ou de solution de préservation du bois) devrait se faire pendant les périodes les plus actives de la dégradation afin de stimuler le plus possible les dégradeurs de PCP. Cependant, cette option d'alimentation peut résulter en une accumulation d'hydrocarbures pétroliers, dans le cas de l'alimentation à la solution de préservation du bois, puisque leur vitesse de dégradation pourrait être plus lente que celle du PCP.

Suite aux problèmes analytiques rencontrés, il devient clair que la principale contrainte à une alimentation adéquate et donc une production optimale de sol activé, est la rapidité à laquelle une indication est disponible sur la concentration de PCP résiduel. Une méthode de suivi rapide et précise est nécessaire. Les analyses de PCP en phase liquide demandent une extraction préalable ce qui allonge le temps de manipulation et augmente les coûts de production. Gagnon *et al.* (soumis 1999) ont mis au point un système permettant de suivre en temps réel la concentration de PCP par spectrophotométrie. Malheureusement, cette technique peut être difficilement appliquée à un mélange contenant des hydrocarbures. Le suivi du pH est délicat

puisque pour s'assurer d'une production efficace, il faut le maintenir entre 7 et 7,5. Le suivi des ions chlorures en solution par potentiométrie ou titration semble le moyen le plus rapide et le moins coûteux. Il faut par contre s'assurer que les constituants de la solution de préservation du bois ne font pas d'interférences dans les lectures.

Ensuite, l'étude des courbes de minéralisation a montré que des périodes de famine nuisaient à l'activité de minéralisation du PCP. Il faudra donc éviter de laisser la biomasse sans substrat. Finalement, les taux de conversion supérieurs obtenus lors de la première activation à la solution de préservation du bois démontrent qu'une alimentation en substrat durant une période active de dégradation favorise l'activité de dégradation. Les ajouts de substrats devraient donc être fait quand la concentration en PCP résiduel dans le réacteur commence à chuter.

2.4.3 Effet de l'huile diésel sur la dégradation du PCP

L'échantillonnage rapproché fait lors de la seconde production de biomasse a permis de constater que l'allure du début des courbes de dégradation de chacun des ajouts dans le réacteur SPB est différente de celle retrouvée dans le cas du réacteur NaPCP. La cinétique de disparition du PCP semble différente au début de la dégradation des ajouts de PCP entre les deux réacteurs. L'effet est marquant à partir du jour 25. Dans le réacteur NaPCP une courbe typique de dégradation tel qu'Alexander (1994) la décrit est observée, avec un plateau de latence au début puis une inflexion convexe qui indique le début de la phase active de dégradation jusqu'à disparition complète du substrat. Dans le réacteur alimenté SPB, une légère inflexion concave est observée au début des courbes du réacteur au lieu d'un plateau. Le phénomène de partage du PCP entre la phase aqueuse et le diésel serait responsable de cette différence. Le diésel influencerait la consommation du PCP en absorbant une partie de celui-ci puis en le relargant lentement dans la phase aqueuse avec la dégradation du PCP et des hydrocarbures pétroliers, selon un équilibre de partage du PCP entre la phase aqueuse et la phase

organique. Le coefficient de partage octanol-eau ($\text{Log } K_{ow}$) quantifie l'hydrophobicité des contaminants organiques, plus les valeurs du $\text{Log } K_{ow}$ sont élevées plus le contaminant préférera la phase organique. Kaiser and Valdmanis (1982) ont enregistré une valeur de $\text{Log } K_{ow}$ pour le PCP de 3.20 à un pH 7.2 et Nowosielsky (1998) une valeur de 3,69 à pH 7,2. Ces valeurs élevées impliquent qu'une portion du PCP dans le réacteur se retrouvera dans la phase organique, en l'occurrence le diésel.

Ce phénomène de partage peut aussi influencer le seuil de tolérance au PCP des microorganismes, abaissant sa concentration en phase aqueuse. La partition du PCP entre la phase aqueuse et le diésel expliquerait en partie, les performances supérieures de la première production de sol activé à l'aide de la SPB. En effet, les valeurs de concentration de PCP obtenues alors, ne tiennent pas compte du PCP contenu dans la phase organique puisqu'aucune extraction du PCP de la phase organique n'avait été faite. Les valeurs obtenues représentent la concentration réelle de PCP dans la phase aqueuse. Des analyses de PCP par extraction acide/base et GC-MS ont montré une concentration 30% supérieure aux concentrations en PCP obtenus par une simple analyse par HPLC après filtration sans extraction (voir Annexe II PE 16 H). Les valeurs de PCP résiduel de la Figure 2.6 sont inférieures aux valeurs réelles, ce qui implique que les taux maximums (pentes maximums) seraient supérieures. Par contre, les taux moyens ont été calculés avec les valeurs théoriques des ajouts et le temps requis au consortium pour consommer tout le PCP. Ils sont donc représentatifs.

2.4.4 Influence des caractéristiques physico-chimiques du sol sur sa bioactivation

Les sections précédentes indiquent que la méthode d'alimentation en substrat et la présence d'huile ont une influence non négligeable sur la qualité du consortium actif produit, mais les caractéristiques du matériau de base utilisé sont aussi déterminantes. Si la méthode d'alimentation est une variable manipulable, les caractéristiques du sol ne le sont pas. L'influence du support solide lors de la production d'une biomasse

acclimatée est malheureusement souvent négligée. Par exemple, lorsque Crawford et Mohn (1985) ou Colores *et al.* (1995) discutent des performances de dégradation d'une culture de *Sphingomonas* en bioaugmentation, ils ne considèrent pas l'influence de la matrice solide utilisée. Les travaux de recherche de Otte (1998) ont montré l'importance de la matrice poreuse pour un consortium de dégradeurs de PCP. Lors d'une première étude sur la production de sol activé, Otte *et al.* (1994) ont déterminé que la présence de 5% (p/v) de sol favorisait la dégradation du PCP. Une étude subséquente démontrait l'importance de la présence d'une partie organique au support solide lors de la dégradation de 100 mg/L de PCP (Otte *et al.*, 1999). Lorsque de la comparaison de taux de dégradation ou de seuils de toxicité, il est important de mentionner les caractéristiques du sol ou du support utilisé.

Les résultats des deux premières activations se comparent bien puisqu'elles ont été effectuées à partir du même sol. Le seul facteur les différenciant est l'entreposage du sol. En effet, avant la deuxième activation, le sol dû être entreposé pendant six mois à 4°C, ce qui correspondrait sur le terrain, à un hiver québécois. L'entreposage du sol a influencé l'état de la biomasse du sol. En effet, la dégradation de 50 mg de PCP/L a nécessité 4 jours de plus après l'entreposage du sol et la production de biomasse active a été beaucoup plus lente lors de la deuxième activation. Il faudra donc s'attendre sur le terrain à des délais plus longs pour la production de sol activé après une période de froid prolongé.

Le Tableau 2.4 présente un résumé de la caractérisation physico-chimique des sols utilisés lors des trois activations. Aucun des sols ne contenait une proportion importante de matière organique (1,4 et 1,3 % de COT). L'effet de protection de la flore bactérienne contre la toxicité du PCP par son adsorption aux particules de sol est donc faible. Barbeau *et al.* (1997), ont utilisé un sol contenant 11% de matière organique lors de la production de sol activé à l'aide d'une solution alcaline de PCP. Ils ont observé une diminution importante du PCP en solution 5 minutes après chaque

ajout, un signe que le sol a protégé la flore de chocs toxiques lors des ajouts de PCP en adsorbant celui-ci.

Les travaux de Otte *et al.*(1999) ont permis de vérifier l'importance de l'adsorption du PCP à la fraction organique d'un support solide. En effet, selon les résultats de tests d'adsorption-désorption, les supports ne contenant pas ou peu de matière organique s'avérait de mauvais adorbant. De plus, les résultats d'essais de minéralisation du PCP effectués par Otte *et al* (1998) laissent croire que les propriétés favorables d'un sol à la biodégradation du PCP se séparent ainsi: la fraction organique serait responsable de l'adsorption du contaminant et de son relargage continu, la fraction minérale servirait de support à la biomasse. L'argile est un cas particulier car bien que ce soit un support minéral, ses capacité d'adsorption sont importantes (Domenico et Schawrtz, 1998). Le pourcentage de minéralisation maximal du PCP obtenus lors des essais avec de l'argile de Otte *et al.* (1998) n'était que de 5%. L'argile a tendance à adsorber les contaminants organiques et moins à les désorber, empêchant leur dégradation (Domenico et Schawrtz, 1998). Le haut coefficient d'adsorption à la matière organique du PCP ($\text{Log } K_{oc} = 4.8$) permet de considérer la fraction organique d'un sol à faible teneur en argile comme étant la principale responsable de l'adsorption du PCP au sol.

2.4.5 Proposition d'un modèle mathématique de consommation du PCP

Dans un système tel que retrouvé dans les bioréacteurs utilisés pour la production de biomasse activée, le devenir du PCP de chacun des ajouts peut s'illustrer par un bilan de matière comme présenté à la Figure 2.14. Le bilan peut se séparer en deux sections, reliées à la variable centrale; le PCP biodisponible. L'hypothèse de base sous ce bilan est extrêmement simplificatrice puisqu'elle est de considérer que le PCP biodisponible est le PCP dissous dans la phase aqueuse. On peut ensuite considérer que d'un côté, des cinétiques d'équilibre régissent les transferts de PCP d'une phase à l'autre et que de l'autre côté, le PCP est utilisé par les microorganismes selon une cinétique de Haldane.

Harm et Zehnder (1995) ont déterminé que le taux auquel le substrat (3-chlorodibenzofuran) devenait disponibles aux micro-organismes (*Sphingomonas* sp.) était influencé par l'habileté des organismes à réduire la concentration du substrat en phase aqueuse.

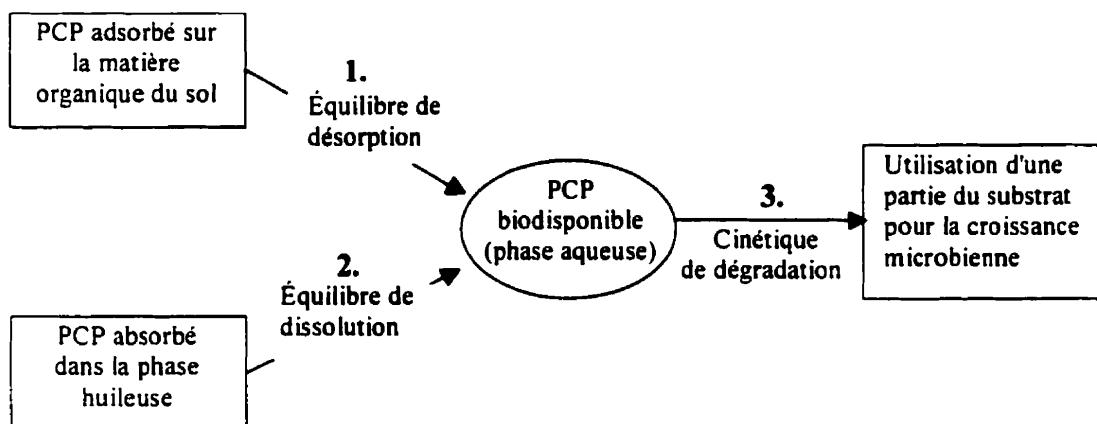


Figure 2.14 Représentation du bilan de matière du PCP dans un sol activé

Le PCP étant un acide faible, sa solubilité, ses coefficients de partage ainsi que son caractère toxique sont intimement reliés au pH. Le bilan de la figure 2.14 est valide à condition que le pH du milieu soit contrôlé et maintenu constant.

Deux types de biomasses ont été produites au cours du projet. Le premier type est une biomasse en milieu diphasique (eau-sol) alimentée au NaPCP. Le second, est une biomasse en milieu triphasique (eau-sol-huile) alimentée en diésel et en PCP.

2.4.5.1 Cinétique de dégradation

Des travaux de biologie moléculaire réalisés en collaboration avec l'institut Armand Frappier visant à identifier les dégradeurs de PCP dans les consortiums, ont montré que la plupart des souches s'apparentaient à l'espèce *Sphingomonas* (séquences des acides

nucléiques à l'annexe I). Le modèle de cinétique de dégradation de Monod avec inhibition qui est connue sous le nom de modèle de Haldane, peut être utilisé dans ce cas, si on fait l'hypothèse que le consortium de dégradeurs de PCP se conduit comme une souche pure étant donné sa faible diversité.

Edgehill *et al.* (1982), Moos *et al.* (1983) ainsi que Gonzalez et Hu (1995) ont montré que la dégradation du PCP suivait bien une cinétique de Monod, amendée d'un terme décrivant l'inhibition par excès de substrat (faisant intervenir la constante K_i) et que la toxicité du PCP diminue avec l'augmentation de la densité microbienne (plus X est grand, plus le S_{bd} risque d'être négligeable et donc l'effet d'inhibition par excès de substrat ne tient plus). Ces observations se traduisent ainsi :

$$\mu = \frac{\mu_0 S_{bd}}{K_s + S_{bd} + \frac{S_{bd}^2}{K_i}} \quad (1)$$

où μ est le taux de croissance microbienne

μ_0 est une constante reliée à la croissance

S_{bd} est la concentration de PCP biodisponible

K_s est la constante de saturation du PCP

et K_i est la constante d'inhibition du PCP

En tenant compte du taux de décès, la variation de la concentration microbienne dans le temps s'écrit ainsi :

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - K_d) X \quad (2)$$

où X est la concentration microbienne

et K_d la constante de décès

La croissance microbienne est fonction du rendement de l'utilisation du substrat biodisponible pour la croissance microbienne $Y_{x/s}$:

$$\frac{dX}{dt} = Y_{x/s} \frac{dS_{bd}}{dt} \quad (3)$$

Ces trois équations décrivent la croissance de la flore de dégradeurs en fonction du substrat biodisponible.

2.4.5.2 Cinétique d'équilibre

Afin de décrire les interactions entre le substrat et la phase aqueuse, deux cinétiques d'équilibre doivent être utilisées. En premier lieu et pour les deux types de biomasses produites, un équilibre d'adsorption du PCP aux particules de sol influence la concentration de substrat en phase aqueuse. Une hypothèse doit être posée en ce qui concerne l'équilibre d'adsoption du sol. En effet, suite aux conclusions de la section 2.4.3, la disponibilité du PCP peut être posée comme étant fonction de la fraction organique du sol (f_{oc}).

Dans le réacteur alimenté à la solution de préservation de bois, un équilibre de dissolution entre la phase aqueuse et la phase huileuse vient se rajouter au bilan (section 2 du bilan). La fraction de PCP biodisponible est fonction de la concentration de diésel dans le réacteur (f_d) et de la fraction organique du sol. La fraction de diésel est quant à elle, est affectée par le taux de dégradation des hydrocarbures pétroliers, ce qui veut dire qu'ilustrer l'équilibre de dissolution du PCP fait intervenir une cinétique de dégradation.

Si le PCP biodisponible est considéré comme étant le PCP dissous dans la phase aqueuse et que le pH est maintenu à 7,2 afin de maintenir constante les conditions de solubilisation ainsi que les coefficients de partage et d'adsorption du PCP, la

consommation du PCP total d'un ajout de solution activante (NaPCP ou SPB) dans le réacteur peut s'exprimer ainsi:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS_{bd}}{dt} + \boxed{A} + \boxed{B} \quad (4)$$

A

$f_{oc} K_{oc} \frac{dS_{bd}}{dt}$

B

$f_{dw}(t) K_{dw}(t) \frac{dS_{bd}}{dt}$

où S est la concentration totale de PCP

f_{oc} est un facteur multiplicatif relié à la fraction de matière organique dans le sol

K_{oc} est la constante d'adsorption du PCP à la matière organique

f_{dw} est un facteur multiplicatif relié à la concentration de diésel dans le réacteur

K_{dw} est le coefficient de partage du PCP entre le diésel et le MSM

La partie A de l'équation 4 est reliée à l'influence du sol sur la disponibilité du PCP et la partie B est spécifique à l'utilisation de la solution de préservation du bois puisqu'elle concerne l'influence de la présence du diésel sur la disponibilité du PCP. Le PCP total contenu dans les réacteurs ainsi que la croissance des dégradeurs peuvent être mesurés dans le temps. Un modèle précis pourrait être développé en déterminant les valeurs des différentes constantes énoncées (K_{dw} , K_s , K_d , Yx/s , K_i , μ_o). Des hypothèses simplificatrices pourront être posées selon les conditions d'opérations des réacteurs. L'influence de la phase huileuse devra être approfondie puisque plusieurs facteurs sont impliqués, dont la cinétique de dégradation des hydrocarbures pétroliers en présence de PCP, qui n'a pas encore été étudiée. De plus, l'hypothèse principale devra être vérifiée puisqu'elle néglige plusieurs phénomènes régissant l'interaction entre la bactérie, le support et le substrat.

2.4.5.3 Interactions sol-diésel-PCP

Un autre facteur peut influencer la biodisponibilité du PCP: un équilibre entre le PCP adsorbé aux particules de sol et absorbé dans le diésel. En effet, le PCP qui est adsorbé au sol peut être désorbé par la présence d'huile selon un équilibre de désorption diesel-

sol. Plusieurs techniques de lavage ont recours à une phase organique pour désorber un maximum de PCP tel Kodadoust *et al.* (1999) qui utilisaient de l'éthanol pour traiter une contamination âgée au PCP.

Ce phénomène peut-il influencer la cinétique des équilibres décrite plus haut ? La quantité d'huile et son contact avec les particules de sols ne sont probablement pas suffisants pour considérer ce phénomène. En effet, l'huile est présente en faible quantité (au plus 5g/L) et a tendance à se maintenir en surface puisque plus légère que l'eau. Les particules de sol sont au contraire plus dense que l'eau et sont attirés vers le fond des réacteurs. Le contact entre ces deux phases est donc limité. Toutefois, ce facteur sera à considéré lors de la validation du modèle proposé.

2.5 Conclusion

Les résultats obtenus lors de cette phase expérimentale au laboratoire permettent d'affirmer que l'utilisation de la solution de préservation à base de diésel #2 et de PCP comme contaminant cible lors de la production d'un sol activé, augmente non seulement les capacités de dégradation du PCP de la flore indigène mais aussi stimule la dégradation des hydrocarbures pétroliers. De plus, la présence de sol et d'une phase huileuse peut protéger les bactéries de la toxicité du PCP en réduisant sa concentration en phase aqueuse. L'affinité du PCP vers les composés organiques fait en sorte qu'une partie de celui-ci se retrouvera adsorbé aux particules de sol ou solubilisé dans le diésel.

Une analyse des résultats de comptes microbiens a permis de déterminer que le procédé d'activation avait une influence sur la biodiversité de la flore indigène. En effet, dans les deux réacteurs, la sélection microbienne, due à la spécificité du substrat, a commencé par favoriser les dégradeurs pour ensuite atteindre un second équilibre où d'autres souches tolérantes au PCP ont pu croître grâce au carbone provenant des bactéries mortes.

Plusieurs facteurs influençant la production de sol activé ont été abordés. En effet, la comparaison des trois productions de biomasse active a permis de déterminer que la méthode d'alimentation influence l'activité de dégradation du PCP. Les périodes de famine sont à éviter puisqu'elles inhibent la minéralisation du PCP et potentiellement celle des hydrocarbures. Afin d'augmenter les performances de dégradation et de se rapprocher des caractéristiques d'une alimentation en continue, les ajouts de PCP devraient se faire lorsque l'activité de dégradation est à son maximum. Il faut par contre éviter l'accumulation d'hydrocarbures lorsque la solution de préservation de bois est utilisée comme solution activante. Suite aux observations faites, un modèle

mathématique a été proposé. Plusieurs facteurs devront être évalués, mais la modélisation de la dégradation du PCP en réacteur permettrait de vérifier si les hypothèses posées sont valables.

Maintenant qu'il est connu que l'utilisation d'une huile de préservation permet l'activation efficace d'un sol, il serait intéressant de suivre l'évolution des hydrocarbures pétroliers au jour le jour afin de déterminer les stratégies d'alimentation à adopter afin d'optimiser les performances des deux flores bactériennes stimulées. De plus, suite aux résultats prometteurs des bilans sur les PCDD et PCDF, une attention particulière devrait être apportée au devenir de ces contaminants lors d'activation et pourquoi pas tenter d'activer une flore de dégradeurs de dioxines et furannes.

Chapitre 3 Bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de préservation du bois

3.1 Introduction

Il existe deux méthodes pour augmenter le taux de dégradation d'un composé dans un sol, la stimulation de la flore indigène (biostimulation) ou l'addition de micro-organismes adaptés (bioaugmentation) (Walter, 1995). La bioaugmentation est utile mais n'est pas nécessairement appropriée pour toutes les situations. Généralement elle est applicable dans le cas de composés très lents à dégrader même dans des conditions optimales. Des sols fortement contaminés au PCP (plus de 100 mg/L) font parti de cette catégorie (Mc Allister *et al.*, 1996).

Le principal objectif de cette dernière phase expérimentale était de déterminer l'efficacité des inoculums produits lors de la troisième bioactivation. Afin de pouvoir être comparables, tous les essais de bioaugmentation (avec témoins biotiques et abiotiques) devaient se faire en parallèle. Le sol activé à la solution produit lors de l'activation 3 a été utilisé pour ces essais malgré ses faibles performances. Les résultats de minéralisation et de comptes bactériens de cette activation ont été obtenus qu'une fois les essais de bioaugmentation commencés.

Les performances en bioaugmentation des deux sols activés ont été comparées afin de déterminer les qualités des deux biomasses produites. Les essais de bioaugmentation ont entre autre permis d'évaluer le temps nécessaire à l'atteinte du critère C du MEF, vérifier l'effet de bioaugmentations successives sur la décontamination du sol et de vérifier les effets d'un traitement par bioaugmentation sur l'activité des dégradeurs de PCP et d'hydrocarbures.

3.2 Matériels et Méthodes

3.2.1 Caractérisation du sol

Le sol utilisé pour les essais de bioaugmentation en réacteurs a été prélevé à un site d'entreposage de poteaux de bois de Bell Canada. Le sol mis en place par Bell pour un essai pilote est un sable moyen uniforme (classification USCS). Le sol a été tamisé à 4 mm et homogénéisé sur place. La concentration initiale en PCP, le contenu en eau et le pH ont été déterminés. Les méthodes utilisées ont été les mêmes qu'au chapitre précédent (section 2.2.1). La capacité de rétention au champ du sol a été déterminée selon le protocole décrit par Trevors (1984), recommandé pour les sables, utilisant seulement la force de gravité. Les concentrations en chrome, cuivre, arsenic et plomb ont été déterminées par ICP en se basant sur les méthodes Menviq.89.12/304-mét.1.3 et 90.05/304-mét.1.2. SM 3030K et 3120. Un essai de minéralisation du PCP en microcosme a été effectué sur 20 g de sol contaminé sans aucun ajout de nutriment ou d'eau.

3.2.2 Montage expérimental

Les essais de bioaugmentation en laboratoire visaient à améliorer les conditions de bioaugmentation afin de diminuer le temps de traitement. Quatre séries de réacteurs ont été mis en opération afin d'étudier les effets de l'inoculation des différents sols activés. Chaque traitement est suivi en triplicatas, pour un total de 12 réacteurs :

1. Témoin stérile (ajout de 16 g/kg d'azoture de sodium), sans bioaugmentation mais avec ajouts de nutriments (MSM).
2. Témoin biotique sans bioaugmentation, seulement biostimulation (ajout de nutriments, MSM).
3. Bioaugmentation avec sol activé au NaPCP et avec ajout de nutriments (MSM).

4. Bioaugmentation avec sol activé à la solution de préservation de bois, avec ajout de nutriments (MSM).

Les bioréacteurs, des contenants de verre de 4 litres, ont reçu 2,5 kg de sol sec à traiter. L'ensemencement des réacteurs a été fait afin d'atteindre une concentration finale en micro-organismes dégradeurs de PCP de 10^5 bactéries/g de sol sec soit 250 mL des deux réacteurs (valeur non atteinte par sol activé à la SPB). Selon Weber et Corseuil (1994), l'ajout de microorganismes en concentration de 10^5 bactéries/g de sol contaminé est suffisant pour améliorer la dégradation d'un sol non-saturé. Ils affirment aussi qu'une concentration de 10^5 à 10^6 bactéries/g de sol n'affecte pas la perméabilité du sol. La teneur en eau du sol visée était de 80% de sa capacité de rétention au champ (CRC). Le volume de sol activé nécessaire était ajusté avec une solution nutritive de MSM (200 mL) afin d'obtenir le contenu en eau désiré.

3.2.3 Suivi du traitement par bioaugmentation

La température, le contenu en eau et le pH ont été mesurés une fois par semaine pour les 8 premières semaines puis 3 fois entre les semaines 9 et 19. La teneur en eau des réacteurs a été maintenue constante à 80% de la capacité de rétention au champ et leur température entre 22 et 24°C. Six analyses de PCP et de C₁₀-C₅₀ ont été faites selon la grille expérimentale présentée en Annexe II (PE 16 L). Des essais de minéralisation en microcosmes de PCP radiomarqué et d'hexadécane radiomarqué ont été effectués aux semaines 0, 5, 9, 13 et 19. Le suivi du traitement a duré 19 semaines pour tous les réacteurs. Les protocoles d'analyse sont détaillés à la section 2.2.4.

3.2.4 Bioaugmentations successives

Une seconde bioaugmentation des séries 3 et 4 (séries bioaugmentées) a été effectuée lorsqu'une baisse de l'activité de minéralisation du PCP était observée. Cette seconde bioaugmentation a eu lieu à la semaine 13 pour la série bioaugmentée au sol activé au

NaPCP et à la semaine 12 pour la série bioaugmentée au sol activé à la solution de préservation du bois. L'ajout de sol activé a été de même concentration (sol activé /sol contaminé) que lors du premier ajout. Avant l'inoculation, les sols activés entreposés à 4°C, ont été remis à la température de la pièce. Ils ont ensuite été mélangés et aérés puis alimentés avec 3 ajouts de 20 mg de PCP/l en 10 jours pour le réacteur NaPCP et 5 ajouts de 20 mg/L en 28 jours pour le réacteur SPB, afin de stimuler les dégradeurs de PCP. Des comptes microbiens d'hétérotrophes totaux ont été effectués sur les biomasses avant leur inoculation.

Afin de ne pas augmenter la teneur en eau des réacteurs au-dessus de 80% de la CRC, les sols activés ont été centrifugés à 7500 RPM pendant 20 min afin de concentrer la biomasse dans le culot. La biomasse recueillie dans le culot d'un volume de 20% du volume initial de sol activé a été mélangée au sol des réacteurs.

3.3 Résultats

3.3.1 Caractérisation du sol

Le Tableau 3.1 décrit les principales caractéristiques du sol qui a été utilisé pour les essais de bioaugmentation. La caractérisation préliminaire du sol a démontré que le sol était assez contaminé en PCP pour tester l'efficacité d'un traitement de bioaugmentation. En effet, une concentration de 110 mg/kg de PCP est bien au-dessus du critère C du MEF de 5 mg/kg. Le sol étant un sable à faible concentration en matière organique (1,6%), le PCP devait être très biodisponible aux micro-organismes (Mc Allister *et al.*, 1996). Le sol utilisé provenait d'un site d'entreposage de poteaux traités au PCP et de poteaux traités aux métaux lourds (cuivre, chrome et arsenic). La concentration de ces métaux a donc été évaluée afin de vérifier si le sol contenait de ces métaux. La présence de métaux peu inhiber l'activité bactérienne (Providenty *et al.*, 1993). Les concentrations en chrome, cuivre et arsenic sont de beaucoup sous le critère

B du MEF (qui est de 30 mg/kg d'arsenic, 250 mg/kg de chrome, 100 mg/kg de cuivre et 500 mg/kg de plomb). Aucune inhibition de la part des métaux n'est donc attendue. La capacité de rétention au champ correspond à 22% (p/p) d'eau. Les résultats de minéralisation en microcosmes (sans ajout de nutriments) ont montré un faible potentiel de dégradation du PCP sans aucune stimulation puisque 40% du PCP radiomarqué ajouté a été récupéré en ^{14}C -CO₂ au bout de 45 jours. Le pH de 6,9 et le contenu en eau ont été modifiés suite à l'ajout de sol activé et de MSM.

Tableau 3.1 Caractérisation du sol utilisé pour les essais de bioaugmentation

Paramètres	Valeurs
PCP	110 mg/kg
pH	6,9
TOC	1,6 g/kg
Contenu en eau	3%
Capacité de rétention au champ	22% (p/p)
Granulométrie	Sable
Arsenic	1,4 mg/kg
Chrome	11 mg/kg
Cuivre	7,4 mg/kg
Plomb	3 mg/kg

3.3.2 Biodégradation du PCP et des C₁₀-C₅₀

Les résultats des analyses de PCP dans les réacteurs sont présentés à la Figure 3.1 selon un ratio de concentration de PCP récupéré (C) sur la concentration initiale (C_0) en fonction des semaines écoulées. Dans les deux cas de bioaugmentation, la majorité de la dégradation du PCP s'est faite pendant les 4 premières semaines. En effet, la concentration en PCP résiduel dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP est passée de 107 à 11 mg/L (moyenne des triplicatas) durant cette période et de 114 à 9 mg/L (moyenne des triplicatas) dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la SPB. La dégradation du PCP semble un peu moins rapide dans le cas de la biostimulation (témoin biotique) car la concentration de PCP résiduel est passée de 92 à 39 mg/L (moyenne des triplicatas) dans ces réacteurs.

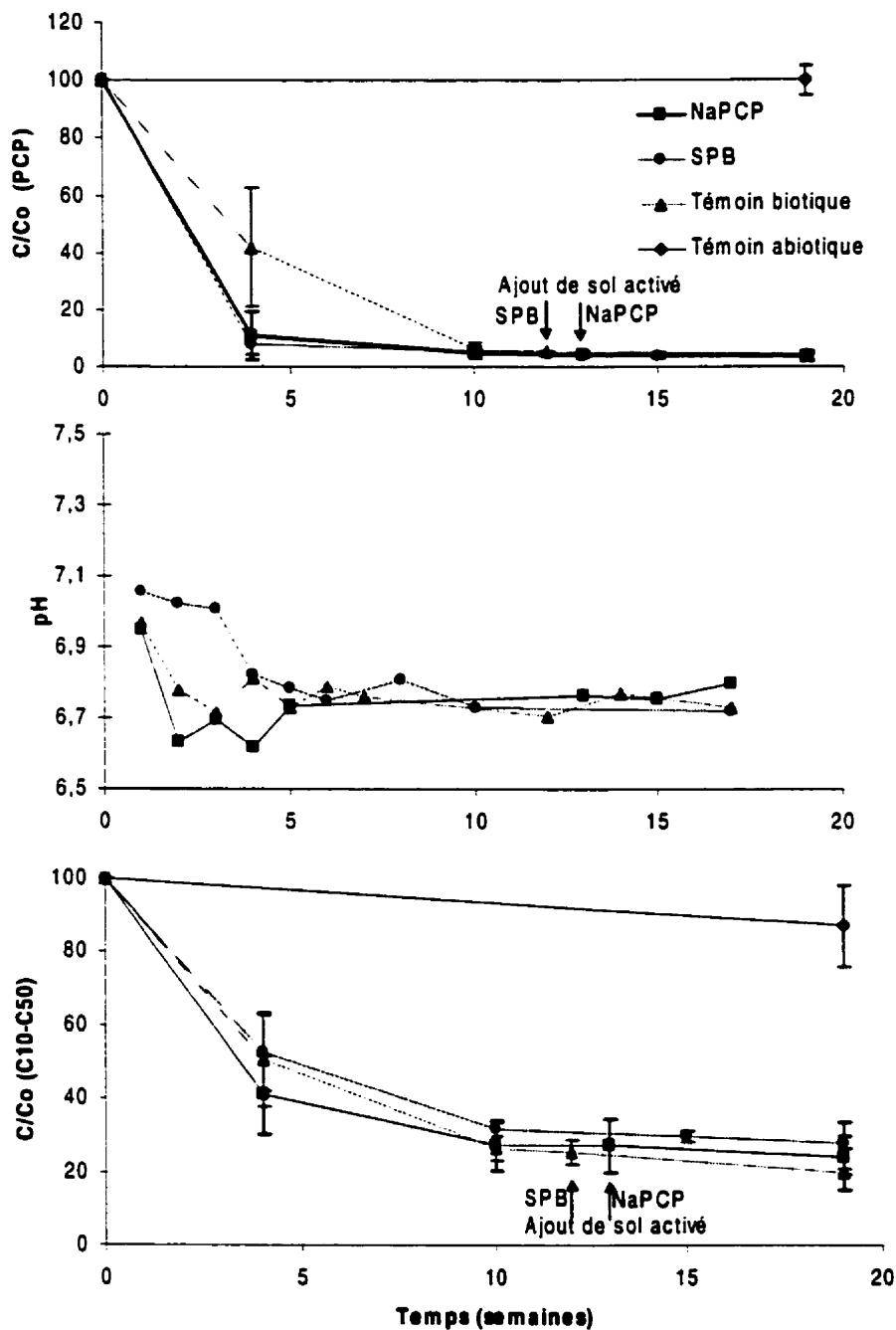


Figure 3.1 Dégradation du PCP et des $\text{C}_{10}-\text{C}_{50}$ et suivi du pH dans les réacteurs.
(moyenne des triplicatas avec erreur relative)

Le critère C du MEF a été atteint à la semaine 10 dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP, à la semaine 12 dans les réacteurs traités par biostimulation et à la semaine 15 dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la SPB. Le second ajout de biomasse fraîche n'a pas réussi à abaisser la concentration résiduelle du PCP au-dessous de 4 mg/kg. Aucune diminution de la concentration de PCP n'a été observée dans les témoins biotiques.

Le pH a été suivi jusqu'à la semaine 17 dans tous les réacteurs. Il est demeuré au-dessus de 6,5 et en dessous de 7 sans aucun ajustement. La Figure 3.1 montre que dans le cas de la biostimulation (témoin biotique) et dans le cas de la bioaugmentation au sol activé au NaPCP, une baisse de pH a été observée dès la première semaine, puis le pH est resté constant après la semaine 5. Le pH dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la SPB s'est maintenu au-dessus de 7 pendant trois semaines puis a chuté à 6,8 à la 4^{ième} semaine. Bien que les valeurs de pH mesurées soient très rapprochées, la Figure 3.1 suggère que la dégradation du PCP a majoritairement eu lieu avant la 4^{ième} semaine, tel qu'observé par les analyses de PCP, puisque la dégradation du PCP induit une baisse de pH par la production de HCl.

La concentration initiale moyenne des réacteurs en C₁₀-C₅₀ était de 1350 mg/kg de sol sec. Dans le cas de la dégradation des hydrocarbures pétroliers C₁₀-C₅₀, les résultats obtenus ne sont pas ceux attendus. En effet, la dégradation des C₁₀-C₅₀ semble plus faible dans le cas de la bioaugmentation au sol activé à la solution de préservation puisque la concentration finale est de 100 mg/L supérieure à la concentration finale retrouvée dans les réacteurs traités par biostimulation et se retrouve dans la partie supérieure de l'erreur relative des réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP. Le sol activé à la solution de préservation ajouté au sol contaminé ne présentait pas de bonne capacité de minéralisation de l'hexadécane mais a dû être utilisé à cause de contrainte de temps (voir section 3.3.3). Son ajout semble avoir, en quelque sorte,

inhibé les capacités de dégradation des hydrocarbures pétroliers de la flore indigène. La diminution de C₁₀-C₅₀ dans le témoin abiotique suggère qu'une certaine proportion (environ 10%) des hydrocarbures a pu se volatiliser avec le temps et les manipulations. L'azoture de sodium ajouté pour la stérilisation du sol agit en "supprimant" l'oxygène de l'air, des micro-organismes n'ayant pas besoin d'oxygène pour métaboliser les hydrocarbures auraient pu survivre.

Tous les traitements ont réussi à abaisser la concentration de C₁₀-C₅₀ sous le critère B du MEF (700 mg/kg) dès la semaine 4. Selon les résultats de la semaine 13 à 19, la seconde bioaugmentation n'a pas vraiment stimulé la dégradation des hydrocarbures pétroliers.

3.3.3 Effet de la bioaugmentation sur l'activité de minéralisation

L'étude des courbes de minéralisation du PCP et de l'hexadécane donne un aperçu de l'activité microbienne au long du traitement par bioaugmentation. Elle permet aussi de comparer les effets des différents traitements du sol, c'est à dire la biostimulation (témoins biotiques), la bioaugmentation avec un sol activé au NaPCP et la bioaugmentation avec un sol activé à la SPB, sur l'activité de minéralisation de la flore microbienne. Trois valeurs seront utilisées lors de la description des courbes : le pourcentage atteint en 5 jours d'incubation (qui reflète la vitesse de minéralisation), et le pourcentage maximal de minéralisation atteint en 25 jours d'incubation (qui reflète un pourcentage maximum). La Figure 3.2 présente les courbes de minéralisation du PCP et la Figure 3.3, les courbes de minéralisation de l'hexadécane avant le deuxième ajout de sol activé, c'est à dire avant la seconde bioaugmentation. Pour tous les traitements, une diminution du temps de latence et une augmentation du pourcentage maximal de minéralisation sont observées entre la semaine 0 et la semaine 5. En effet, le pourcentage de minéralisation atteint en 5 jours, est passé de 2 à 75% de la semaine 0

la semaine 5 dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP, de 0 à 40% dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la SPB et de 0 à 65% dans les réacteurs biostimulés. Cette période (semaines 0 à 5) correspond selon les résultats des analyses chimiques, aux semaines d'activité de dégradation les plus actives. Par la suite, les pourcentages de minéralisation atteints en 5 jours diminuent de la semaine 5 à la semaine 9. Le pourcentage de minéralisation diminue à une valeur de 55% pour le sol bioaugmenté au sol activé au NaPCP, 30% pour le sol bioaugmenté au sol activé à la SPB et 50% pour le sol biostimulé. Selon les résultats d'analyses chimiques, la biodégradation du PCP et des C₁₀-C₅₀ lors de cette seconde période était moins importante. Le pourcentage de minéralisation atteint en 5 jours à la semaine 13, juste avant la seconde de bioaugmentation de sol activé au NaPCP, avait encore diminué pour n'atteindre qu'une valeur de 15%. Par contre, la baisse n'est pas aussi importante dans le cas de la biostimulation puisque à la semaine 13, le pourcentage atteint en 5 jours d'incubation est de 59%. La seconde bioaugmentation ayant été effectuée à la semaine 12 dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la SPB, la courbe de minéralisation de la semaine 13 est présentée à la section 3.3.4.2. Aucune activité de minéralisation n'a été observée en 25 jours d'incubation dans les microcosmes contenant du sol des témoins abiotiques.

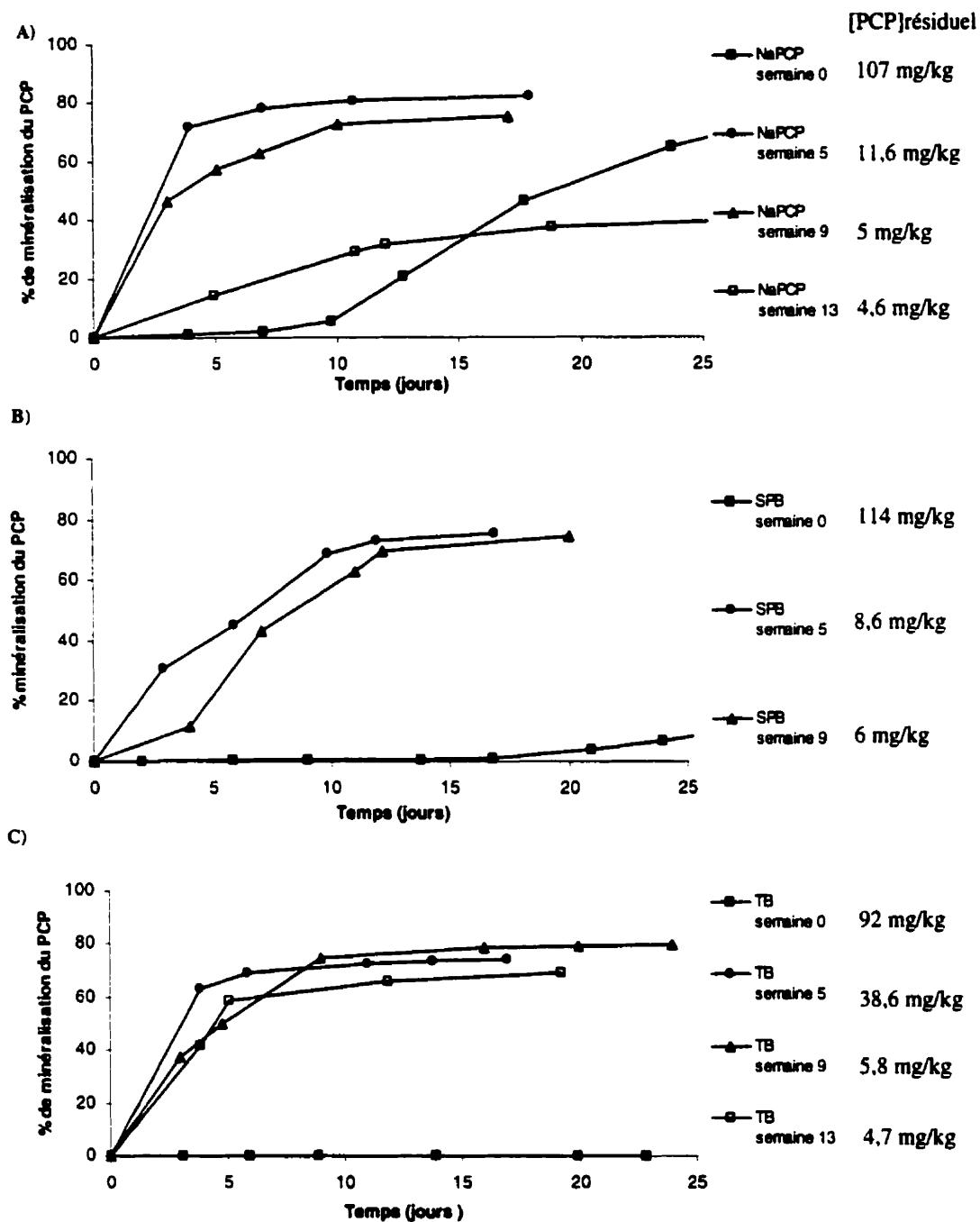


Figure 3.2 Courbes de minéralisation du PCP A) dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP, B) dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la solution de préservation C) dans les réacteurs biostimulés (moyenne des séries de 3 réacteurs et des triplicatas des microcosmes pris avant la seconde bioaugmentation).

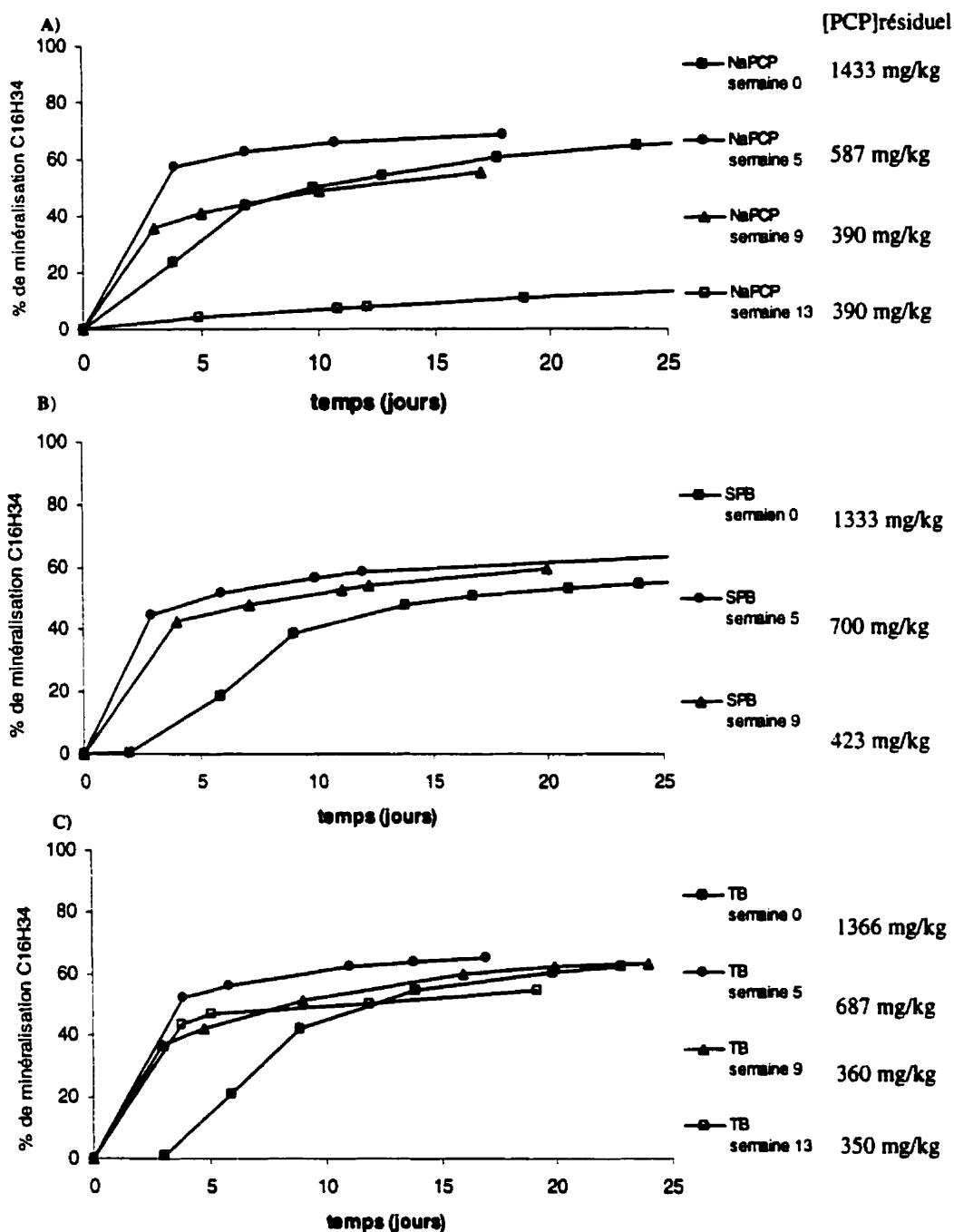


Figure 3.3 Courbes de minéralisation de l'hexadécane A) dans les réacteurs bioaugmenté au sol activé au NaPCP, B) dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la solution de préservation C) dans les réacteurs biostimulés. (moyenne des séries de 3 réacteurs et des triplicatas des microcosmes pris avant la seconde bioaugmentation).

Pour ce qui est de la minéralisation de l'hexadécane, les trois traitements donnent des courbes très similaires, les trois présentant entre 50 et 60 % de minéralisation en 5 jours pour la semaine 5 et entre 40 et 45 % de minéralisation en 5 jours pour la semaine 9. Encore une fois, une baisse importante du pourcentage atteint en 5 jours d'incubation est observée pour le sol bioaugmenté au sol activé au NaPCP, puisque seulement 5% de minéralisation de l'hexadécane est atteint. De plus, l'allure de cette dernière courbe est différente des autres, aucun point d'inflexion n'est visible et le pourcentage de minéralisation atteint en 25 jours d'incubation ne dépasse pas 20%. Par contre, un point d'inflexion à 4 jours d'incubation est visible sur la courbe de minéralisation de la semaine 13 des réacteurs biostimulés mais le pourcentage maximal atteint en 5 jours d'incubation a baissé à 35%.

3.3.4 Bioaugmentations successives

3.3.4.1 Densité microbienne des sols activés inoculés lors de la seconde bioaugmentation

Une seconde bioaugmentation a été effectuée sur chacun des triplicatas des réacteurs bioaugmentés. Étant donné les faibles performances de minéralisation du PCP dans les réacteurs bioaugmentés avec du sol activé à la SPB, la deuxième bioaugmentation a été faite 1 semaine plus tôt dans ces réacteurs que dans le ceux de la bioaugmentation avec du sol activé au NaPCP. Les comptes microbiens totaux effectués indiquent que le sol activé au NaPCP contenait $1,7 \times 10^6$ bactérie/mL et que le sol activé à la solution de préservation contenait 8×10^7 bactérie/mL.

3.3.4.2 Minéralisation suite à la seconde bioaugmentation

La Figure 3.4 présente la courbe de minéralisation du PCP et de l'hexadécane suite à la seconde bioaugmentation de biomasse fraîche. Les courbes obtenues les semaines 13 et 19 pour la biostimulation sont aussi présentées à titre de comparaison. L'activité de minéralisation dans chacun des cas était à la baisse avant la seconde inoculation, c'est à dire que les taux de minéralisation maximums ainsi que les pourcentages de minéralisation maximum diminuaient avec le temps. L'effet de l'ajout de biomasse fraîche est beaucoup plus marqué dans le cas de l'ajout de sol activé au NaPCP. En effet, le pourcentage maximal de minéralisation est passé de 40% à 84% dans le cas du PCP et de 10% à 42% dans le cas de l'hexadécane entre la semaine 13 et la semaine 19. Puis, les pourcentages maximums (atteint en 25 jours d'incubation) ont diminué à 40% pour le PCP et 15% pour l'hexadécane à la semaine 19.

L'effet de la seconde bioaugmentation avec le sol activé à la SPB se caractérise par une diminution de la période de latence lors de la minéralisation du PCP, puisque le pourcentage de minéralisation après 5 jours est passé de 19 à 57% de la semaine 9 à la semaine 13 et que le pourcentage maximal de minéralisation est resté le même à 75%. Dans le cas de la minéralisation de l'hexadécane, le pourcentage maximal de minéralisation a baissé de 60% à 51 % entre les semaines 9 et 13.

Pour ce qui est de biostimulation, les taux maximums de minéralisation du PCP diminuent tout au long du traitement et passent de 60% en 5 jours d'incubation à 15% entre les semaines 13 et 19, et le pourcentage de minéralisation de l'hexadécane passe de 46%en 5 jours à 35%, toujours entre les semaines 13 et 19. Les pourcentages maximums atteints en 25 jours d'incubation restent semblables à 65% pour la minéralisation du PCP et 55% pour la minéralisation de l'hexadécane.

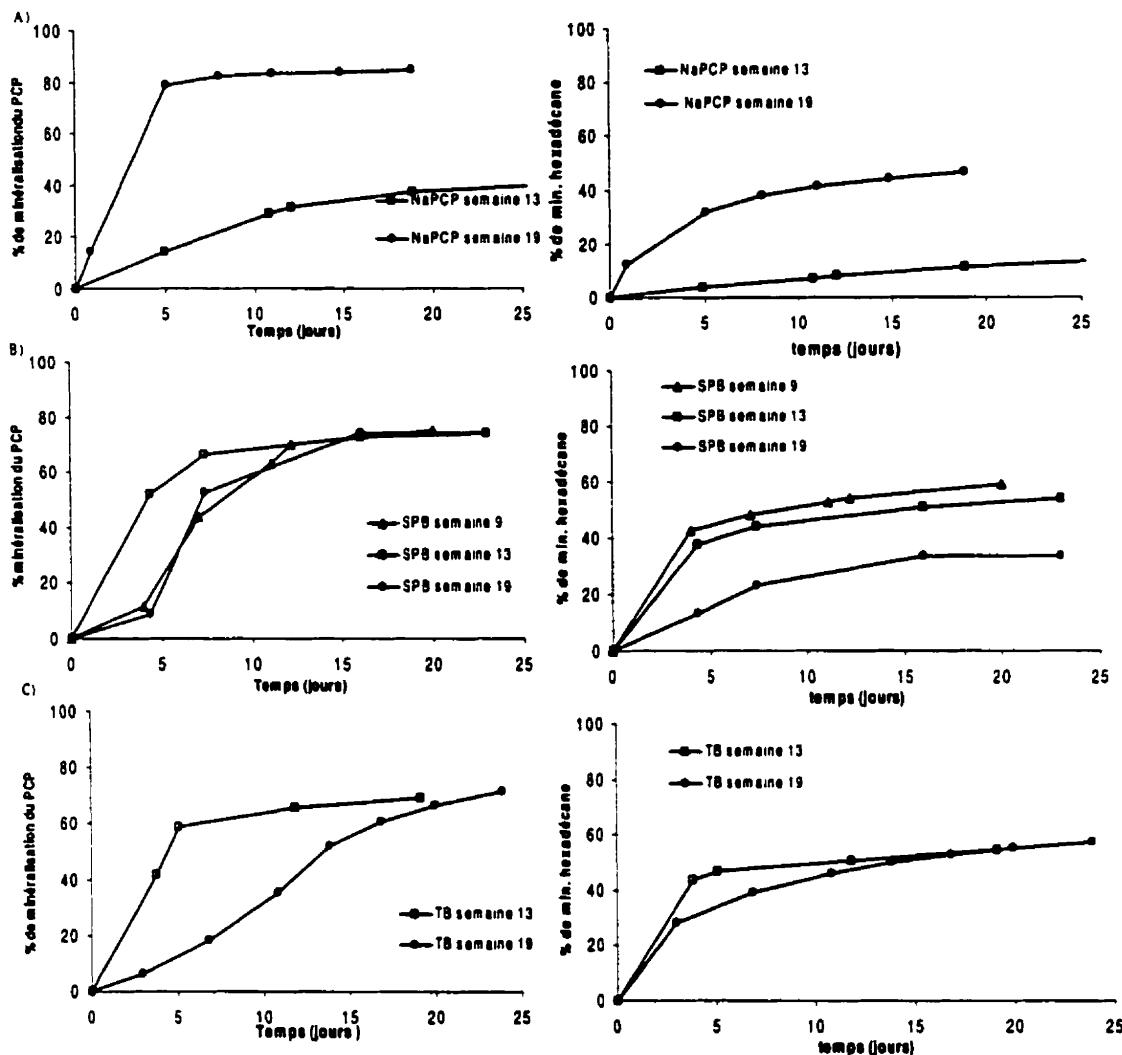


Figure 3.4 Courbes de minéralisation du PCP et de l'hexadécane suite à la seconde bioaugmentation qui a eu lieu à la semaine 13 pour le sol activé au NaPCP et à la semaine 12 pour le sol activé à la SPB.

3.4 Discussion

Selon les résultats des analyses de PCP et C₁₀-C₅₀, la majorité de l'activité de dégradation s'est effectuée pendant les quatre premières semaines de traitement. Le suivi du pH suggère d'ailleurs que la majeur partie du PCP a été dégradé entre la semaine 0 et la semaine 2 dans le cas des traitements de bioaugmentation au sol activé au NaPCP et de la biostimulation, et entre la semaine 0 et la semaine 3 pour le traitement par bioaugmentation au sol activé à la SPB. Il est en fait difficile de déterminer si le traitement par bioaugmentation a été plus rapide que la biostimulation. Toutefois, les concentrations finales de PCP et C₁₀-C₅₀ atteintes au bout de 19 semaines sont équivalentes pour tous les traitements et varie entre 4,2 et 3,8 mg/kg de PCP et entre 273 et 373 mg/kg de C₁₀-C₅₀.

La flore indigène et les caractéristiques physico-chimiques du sol Bell ont permis une réponse efficace à la contamination. Barbeau *et al* (1997) avaient observé une différence importante entre le traitement par bioaugmentation avec sol activé et le traitement par biostimulation, lors de la décontamination d'un sable contaminé à 500 mg/kg de PCP. En effet, la bioaugmentation avait permis d'atteindre une concentration de 5 mg/kg en 130 jours alors que la concentration en PCP était demeurée à 400 mg/kg après un traitement par biostimulation. La nature fortement contaminée du sol était responsable des faibles performances de la flore indigène puisque aucun dégradeurs de PCP n'y avait été détecté. Leavitt et Brown (1993) soulignent le fait que les études de comparaisons entre les performances de la bioaugmentation versus la biostimulation sont rares. Ils font part aussi de trois études comparant les deux traitements pour la décontamination d'huiles et graisses et arrivent à la conclusion que bien que la bioaugmentation ait sa niche d'application, certaines applications conventionnelles ne requièrent pas de bioaugmentation. La flore indigène

n'ayant pas été intoxiquée par la concentration de 110 mg/kg de PCP, un ajout de nutriment a suffit à la stimuler.

La mauvaise qualité de la biomasse produite lors de la troisième activation à l'aide de la SPB a été soulignée au chapitre précédent. Bien que les concentrations de contaminants à la semaine 4 étaient similaires pour les deux types de bioaugmentation, les résultats des essais de minéralisation montrent une plus faible performance pour le sol bioaugmenté au sol activé à la SPB. En effet, à la semaine 5 seulement 40% de minéralisation est atteint en 5 jours d'incubation dans le cas du sol bioaugmenté avec du sol activé à SPB alors que le sol biostimulé atteint 70% de minéralisation du PCP et le sol bioaugmenté avec du sol activé au NaPCP atteint 75% de minéralisation en 5 jours. Les observations sont semblables pour la semaine 9. L'ajout de sol activé à la solution de préservation semble avoir inhibé l'activité des dégradeurs indigènes puisque les taux de minéralisation du PCP sont plus faibles quand du sol activé à la SPB est ajouté au sol contaminé.

L'addition de biomasse fraîche lors du second ajout de sol activé, n'a pas contribué à diminuer la concentration de contaminant. En effet, la dégradation du PCP et des C₁₀-C₅₀ atteint les même valeurs dans le cas de la biostimulation et de la bioaugmentation, des semaines 12 à 19. Les contaminants étaient fort probablement adsorbés au peu de matière organique du sol et ainsi n'étaient pas biodisponibles. La biomasse des sols activés n'a donc pas montré de capacités supérieures en ce qui attire à la dégradation de contaminants adsorbés.

L'étude des courbes de minéralisation soulève plusieurs points intéressants. Premièrement, l'ajout de sol activé au sol contaminé n'augmente pas significativement ses capacités de minéralisation. Dans le cas du PCP, les résultats de la semaine 0 laissent présumer qu'un temps d'acclimatation plus long est nécessaire aux bactéries indigènes qu'aux bactéries inoculées. Dans le cas des hydrocarbures pétroliers, il n'y a pas vraiment de différence. Otte *et al.* (1994) ont suivi la minéralisation du [¹⁴C]pyrène

et du [¹⁴C]phénanthrène en microcosmes en ajoutant une fraction de sol activé à un sol contaminé à la créosote. Ils ont observé une diminution du temps de latence lors de la minéralisation du phénanthrène et du pyrène de 30 et 81 (respectivement) fois inférieure dans le sol activé que dans le sol d'origine. Ce qui correspond aux résultats des essais de la semaine 0.

Deuxièmement, les différences marquées entre les courbes du sol bioaugmenté au sol activé à la SPB et du sol biostimulé pourrait signifier que la biomasse inoculée ait pris le dessus sur la biomasse indigène. En effet, le seul facteur différentiant les deux sols est la biomasse ajoutée. Les concentrations de PCP, de dioxines et furannes polychlorés contenus dans les inoculums ajoutés au sol sont faibles (concentration maximale finale ajouté aux réacteurs 0,16 ng/kg de PCP et 2,8 ng/kg EQT de dioxines et furannes respectivement). De plus, ces concentrations sont les mêmes pour les réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP. La concentration des hydrocarbures pétroliers ajoutés au sol traité lors de l'ajout du sol activé SPB, n'est que de 0,4 mg/kg et représente 0,03% de la contamination initiale. Ces ajouts ne peuvent donc pas être responsables des inhibitions de la minéralisation observées. De plus, le pH et la concentration en ions chlorures étaient les mêmes pour tous les sols.

Troisièmement, l'activité de minéralisation diminue avec la diminution de la concentration de substrat dans le sol, pour les trois traitements. Par ailleurs, cette tendance est encore plus prononcée pour les traitements par bioaugmentation (un autre indice suggérant que la biomasse inoculée ait pris le dessus sur la biomasse indigène). Cette baisse d'activité pourrait être associée à une baisse de densité de la population des dégradeurs. Barbeau *et al.* (1997) ont observé une diminution de la population d'hétérotrophes totaux de l'ordre de 2 log avec la disparition de 300 mg/kg de substrat. Leavitt et Brown (1995) ont eux observés une diminution dans la population des dégradeurs d'hydrocarbures avec la disparition du substrat lors de traitements par biostimulation et bioaugmentation de sols contaminés aux huiles et graisses.

3.5 Conclusion

Les trois traitements étudiés ont permis d'atteindre le critère C du MEF pour la concentration en PCP après 10 semaines dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé au NaPCP, 12 semaines dans les réacteurs traités par biostimulation et 13 semaines dans les réacteurs bioaugmentés au sol activé à la SPB. Le second ajout de biomasse fraîche n'a pas réussi à abaisser la concentration résiduelle du PCP au-dessous de 4 mg/kg. Tous les traitements ont réussi à abaisser la concentration de C₁₀-C₅₀ sous le critère B du MEF (700 mg/kg) dès la semaine 4. Selon les résultats de la semaine 13 à 19, la seconde bioaugmentation n'a pas vraiment stimulé la dégradation des hydrocarbures pétroliers.

Les résultats obtenus lors des essais de bioaugmentation soulignent deux facteurs importants, à considérer lors du choix d'un traitement par ajout de biomasse acclimatée. Premièrement, la bioaugmentation étant une solution plus coûteuse que la simple biostimulation, les capacités de dégradation de la flore indigène du sol doivent être bien établies avant de considérer l'ajout de biomasse. En effet, un sol dont la contamination et les caractéristiques ne nuisent pas au développement d'une flore de dégradeurs efficaces, peut être traité par l'ajout de nutriments et l'apport d'oxygène nécessaire. En second lieu, le caractère inhibiteur observé de l'ajout du sol activé à la SPB soulève une problématique nouvelle dans le domaine de la décontamination des sols qui est le devenir de la biodiversité microbienne de la flore indigène d'un sol lors d'un traitement biologique tel que la bioaugmentation par sol activé. L'écologie des sols fait partie du cycle de la vie de la planète et son déséquilibre peut se répercuter à des niveaux trophiques supérieurs. Ce genre de questionnement doit donc se faire à ce stade-ci des recherches.

Recommandations

A titre de recommandations, les études suivantes sont suggérées afin de pouvoir utiliser cette technologie et d'élargir les applications du concept de sol activé.

Au niveau de la bioactivation:

- Étudier les cinétiques de dégradation des hydrocarbures pétroliers lors de l'activation de sol à l'aide d'une solution d'activation.
- Mettre au point une méthode de suivi de la concentration de PCP résiduel en présence d'hydrocarbures.
- Étudier la dégradation des HAP par le concept de sol activé afin de pouvoir traiter les contaminations à la crésote.
- Valider le modèle mathématique proposé.

Au niveau de la bioaugmentation

- Faire des essais de bioaugmentation pour traiter des sols possédant une faible activité intrinsèque.
- Tester la bioaugmentation sur des sols de granulométries différentes.

Dans le but de pouvoir appliquer la technique sur le terrain (à l'aide d'un réacteur de bioactivation de 10 m³ et de plusieurs biopiles de 50 m³):

Vérifier l'innocuité environnementale de la technologie :

- Suivis de la biodiversité microbienne au cours de l'activation et de la bioaugmentation.
- Étude taxonomique des souches produites dans le but de :
 1. vérifier l'absence de souches pathogènes,
 2. de confirmer l'hypothèse faite à la section 2.4.5.1 sur la faible biodiversité des souches de dégradeurs.
- Étude écotoxicologique dans le but de confirmer la diminution de la toxicité de sol avec la dégradation du PCP et des hydrocarbures pétroliers, et la disparition des dioxines et furannes.

RÉFÉRENCES

- AISLABIE, J., MCLEOD, M. ET FRASER, R. (1998). Potential for biodegradation of hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology, 49, 210-214.
- ALEXANDER, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego, 500 Pages.
- ANGELOVA, B. ET SCHMAUDER, H.-P. (1999). Lipophilic compounds in biotechnology- interactions with cells and technological problems. Journal of Biotechnology, 67, 13-32.
- APAJALAHTI, J. H. A. ET SALKINOJA-SALONEN, M. S. (1984). Absorption of pentachlorophénol (PCP) by Bark Ships and its role in microbial PCP degradation. Microbiology and Ecology, 10, 359-367.
- APAJALAHTI, J. H. A. ET SALKINOJA-SALONEN, M. S. (1986). Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 25, 62-67.
- APHA, AWWA et WEF (1992). Standard Methods for the examination of water and wastewater, 2650 Pages.
- ARCAND, Y., HAWARY, J. ET GUIOT, S. R. (1995). Solubility of pentachlorophenol in aqueous solutions : the pH effect. Water Resources, 29(1), 131-136.
- ARSENAULT, R. D. (1976). Pentachlorophenol and contained chlorinated dibenzodioxins in the environment. Annual Meeting, Washington.
- ASTM (1988). Test method for organic matter content. Designation D 2974, Philadelphia, Pa.
- ASTM (1989). Standard test method for pH in soil. Designation D 4972, Philadelphia, Pa.

- ASTM (1990). Test method for particles-size analysis of soil. Designation D 422, Philadelphia, Pa.
- ATLAS, R. M. (1988). Biodegradation of Hydrocarbons in the environment. Basic Life Science, 45, 211-222.
- BAKER, K. H. ET HERSON, D. S. (1994). Bioremediation. McGraw-Hill, Harrisburg, Pennsylvania, 432 Pages.
- BARBEAU, C., L., D., KARAMAREV, D., COMEAU, Y. ET SAMSON, R. (1997). Bioremediation of Pentachlorophenol-Contaminated Soil by Bioaugmentation Using Activated Soil. Applied Microbiology and Biotechnology, 48(6), 745-752.
- BARKOVSKII, A., ADRIENS, P. (1996). Microbial dechlorination of historically present and freshly spiked chlorinated dioxins and diversity of dioxin-dechlorinating population. Applied and Environmental Microbiology, 62(12), 4556-4562.
- BÉCAERT, V., BEAULIEU, M., GAGNON, J., VILLEMUR, R., DESCGENES, L. ET SAMSON, R. (1999). Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of soil contaminated with wood-preservation compounds. 5th International In Situ and on Site Bioremediation Symposium, San Diego, Batelle press.
- BOLLAG, J. M. (1992). Decontaminating soil with enzymes. Environmental Science and Technology, 26(10), 1876-1881.
- BOLLAG, J. M. ET STOTSKY, G. (1993). Soil biochemistry, New York, 210 Pages.
- BRIGLIA, M., NUSMIALIO-LASSILA, E.-L., VALLINI, G. ET SALKINOJA-SALONEN, M. (1990). The survival of the pentachlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Flavobacterium* sp. in natural soil. Biodegradation, 1, 273-381.
- BROWN, E. J., PIGNATELLO, J. J., MARTINSON, M. M. ET CRAWFORD, R. L. (1986). Pentachlorophenol degradation: a pure culture and epilithic microbial consortium. Applied and Environmental Microbiology, 52(1), 92-97.

BUTTRON, G., CAPDEVILLE, B. ET HONY, P. (1994). Improvement and control of the microbial activity of a mixed population for degradation of xenobiotic compounds. Water Science and Technology, 29(7), 317-326.

CENTRE DE TECHNOLOGIE ENVIRONNEMENTALE (1999).
<http://www.etcentre.org/database/spills>, Environnement Canada.

CHACONAS, J. D. J., VAN DEINSE, H., GRASMICK, D., MAJOR, W. R. ET CHAUDHRY, T. (1997). Bioremediation of diesel-contaminated soils at navy national test site. In Situ and On-Site Bioremediation, New Orleans, Louisiane, Batelle Press.

CHRISTODOULATOS, C., KORFIATIS, G. P., TALIMCIOGLU, N. M. ET MOHIUDDIN, M. (1994). Adsorption of pentachlorophenol by natural soils. Journal of Environmental Science and Health, 29(5), 883-898.

CHRISTODOULATOS, C. ET MOHIUDDIN, M. (1996). Generalized models for prediction of pentachlorophenol adsorption by natural soils. Water Environmental Ressources, 68(3), 370-378.

COLORES, G. M., RADEHAUS, P. M. ET SCHMIDT, S. K. (1995). Use of a pentachlorophenol degrading bacterium to bioremediate highly contaminated soil. Applied Biochemistry and Biotechnology, 54, 271-275.

COOKSON, J. T. J. (1995). Bioremediation Engineering. Mc Graw-Hill, New York, 357 Pages.

CRAWFORD, R. L. ET MOHN, W. W. (1985). Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. Enzyme Microbiology and Technology, 7, 617-620.

CYR, G. G. ET SPIELES, P. R. (1997). Enhance biopile aeration using a wind powered ventilation system - case study. In Situ and On-Site Bioremediation, New Orleans, Louisiane, Batelle Press.

DOMENICO, P. A. ET SCHAWRTZ, F. W. (1998). Physical and Chemical Hydrogeology. John Wiley and Sons, 889 Pages.

DY, N. (1985). La problématique des dioxines et furannes. Québec, Ministère de l'environnement du Québec: 73.

EDERER, M. M., CRAWFORD, R. L., HERWING, R. P. ET ORSER, C. S. (1997). PCP degradation is mediated by closely related strains of genus *Sphingomonas*. Molecular Ecology, **6**, 39-49.

EDGEHILL, R. U. ET FINN, R. K. (1982). Isolation, characterisation and growth kinetics of bacteria metabolizing pentachlorophenol. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, **16**, 179-184.

EDGEHILL, R. U. ET FINN, R. K. (1983). Microbial treatment of soil to remove pentachlorophenol. Applied and Environmental Microbiology, **45**, 1122-1125.

EKSCHMITT, K. ET GRIFFITHS, B. S. (1998). Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment. Applied Soil Ecology, **10**, 201-215.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. (1990). International evaluation of in-situ bioremediation of contaminated soil and groundwater. Cincinnati, Ohio, EPA.

ENVIRONNEMENT CANADA. (1992) Reference method for the polychlorinated dibenzo-para-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in pulp and paper mill effluents, Environmental Protection Series, 8-15.

FIEDLER, H. ET VAN DEN BERG, M. (1996). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and related compounds. Environmental Science and Pollution Research, **3(3)**, 122-128.

FORSYTH, J. V., TSAO, Y. M. ET BLEAM, R. D. (1995). Bioremediation: When is augmentation needed? Third International in situ and on-site bioreclamation symposium, San Diego, Batelle Press.

FORTNAGEL, P. (1990). Metabolism of Dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the Mixed Culture HH27. Applied and Environmental Microbiology, **56(4)**, 1148-1156.

FRANKENBERGER, W. T., EMERSON, K. D. ET TURNER, D. W. (1989). In situ bioremediation of an underground diesel fuel spill: a case story. Environmental Management, 13, 325-332.

FRISBIE, A. J. ET NIES, L. (1997). Aerobic and Anaerobic biodegradation of Aged Pentachlorophenol by Indigenous Microorganisms. Bioremediation Journal, 1(1), 65-75.

FUKUI, S. ET TANAKA, A. (1981). Metabolism of alkanes by yeasts. Advance Biochemical Engineering 19, 217-237.

GAGNON, J. BRETON, J., COMEAU, Y., GREER, C.W., AND SAMSON, R. (submitted 1999). Continuous tangential microfiltration of soil slurries with an automatic backpulsing device for on-line sampling.

GILLER, K. E., BEARE, M. H., LAVELLE, P., IZAC, A.-M. N. ET SWIFT, M. J. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. Applied Soil Ecology, 6, 3-16.

GONZALEZ, J. F. ET HU, W.-S. (1995). Pentachlorophenol biodegradation: simple models. Environmental Technology, 16, 287-293.

GONZALEZ, J. F. ET HU, W. S. (1991). Effect of glutamate on the degradation of pentachlorophenol by *Flavobacterium* sp. Applied Microbiology and Biotechnology, 35, 100-104.

GOUVERNEMENT DU CANADA, ENVIRONNEMENT CANADA ET CANADA, S. (1999). Déclaration des produits biotechnologiques. Brochure Loi canadienne sur la protection de l'environnement.

GOUVERNEMENT DU CANADA (1990). Canadian Environmental Protection Act - Priority Substances List Assessment Report no. 1: Polychlorinated Dibenzodioxins and polychlorinated Dibenzofurans, Beauregard printers ltd.

GRAVES, D., RICKERSON, C. G., DENNIS, D., WATKINS, T., GARRET, W. ET MORRIS, D. (1997). Mineral insulating oil biodégradation. In Situ and On-Site Bioremediation, New Orleans, Louisiane, Batelle Press.

GREER, C. W., HAWARI, J. ET SAMSON, R. (1990). Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* Isolated from Peat. Arch. Microbiology, 154, 317-322.

HAFERBURG, D. (1986). Extracellular microbial lipids as biosurfactants. Advance Biochemical Engineering and Biotechnology, 33, 53-94.

HAGVAR, S. (1994). Preserving the natural heritage: The process of developing attitudes. Ambio, 23(8), 515-518.

HAGVAR, S. (1998). The relevance of the Rio-Convention on biodiversity to conserving the biodiversity of soils. Applied Soil Ecology, 9, 1-7.

HALDEN, R. U. ET DWYER, D. F. (1997). Biodegradation of dioxin-related Compounds: a review. Bioremediation Journal, 1(1), 11-25.

HARMS, H. (1990). Transformation of Dibenzo-p-dioxin by *Pseudomonas* sp. Strain HH69. Applied and Environmental Microbiology, 56(4), 1157-1159.

HARMS, H. ET ZEDHNDER, A. J. B. (1995). Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. Applied and Environmental Microbiology, 61(1), 27-33.

HARVEY, R. W., SMITH, R. L. ET GEORGE, L. (1984). Effect of organic contamination upon microbial distributions and heterotrophic uptake in a Cape Cod, Mass., aquifer. Applied Environmental Microbiology, 48, 1197-1202.

HENNING ENVIRONMENTAL CONSULTANTS ET LTD, E. C. (1984). Characterisation and assessment of wood preservation facilities in British Columbia. Vancouver, Environmental Protection Services, pacific region, Environment Canada: 206.

HOMMEL, R. K. (1990). Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. Biodegradation, 1, 107-119.

HOWARD, P. H., BOETHLING, R. S., JARVIS, W. F., MEYLAN, W. M. ET
MICHALENKO, E. M. (1991). Handbook of environmental degradation rates. Lewis
publishers,Chelsea, 2330 Pages.

KARAMANEV, D., CHAVARIE, C. ET SAMSON, R. (1998). Soil Immobilisation: A
New Concept for biotreatment of Soil Contaminants. Biotechnology and
Bioengineering, 57(4), 471-476.

KARLSON, U., ROJO, F., VAN ELSA, J. D. ET MOORE, E. (1995). Genetic and
serological evidence for the recognition of four pentachlorophenol-degrading bacterial
strains as a species of the genus *Sphingomonas*. System Applied Microbiology, 18,
539-548.

KASUGA, K., NOJIRI, H., YAMANE, H. ET OMORI, T. (1997). Genesn of enzymes
involved in the biodegradation of carbazole, dibenzofuran, fluorene, and bibenzo-p-
dioxine by bacteria. Water Science and Technology, 36(10), 9-16.

KEITH, L. H., ED. (1996). Compilation of EPA's sampling and analysis methods,
Lewis Publisher.

KHODADOUST, A.P., SUIDAN,M.T., ACHESON, C.M., BRINNER, R.C. (1999).
Remediation of soil contaminated with wood preserving wastes : crosscurrent end
countercurrent solvent washing. Journal of Hazardous Materials, B64, 167-179.

KLECKA, G. (1980). Metabolism of Dibenzo-p- Dioxins and Chlorinated Dibenzo-p-
Dioxins by Beijerinckia Spieces. Applied and Environmental Microbiology, 39(2),
288-296.

KLUG, M. J. ET MARKOVETZ, A. J. (1971). Utilisation of aliphatic hydrocarbons by
micro-organisms. Advance Microbiology and Physiology, 5, 1-34.

- KWORK, E., AREY, J. ET ATKINSON, R. (1996). Gas-Phase Atmospheric Chemistry of Dibenzo-p-dioxin and Dibenzofuran. Environmental Science and Technology, 28(3), 528-533.
- LAINÉ, M. M., HAARIO, H. ET JORGENSEN, S. (1997). Microbial functional activity during composting of chlorophenol-contaminated sawmill soil. Journal of Microbiological Methods, 30, 21-32.
- LAINÉ, M. M. ET JORGENSEN, K. S. (1996). Straw Compst and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of chlorophenol-contaminated Soil. Applied and Environmental Microbiology, 62(5), 1507-1513.
- LANGE, C. C., SCHNEIDER, B. J. ET ORSER, C. S. (1996). Verification do role du PCP-4-monoxygénase in chlorine elimination from pentachlorophenol by *flavobacterium* sp. Strin ATCC3923. Biochemical and Biophysical Research Communication, 219, 146-149.
- LEAVITT, M. E. ET BROWN, K. L. (1993). Biostimulation versus bioaugmentation - Three case studies. Second International In situ and On-Site Bioremediation Symposium, San Diego, Lewis Publishers.
- LYMAN, W. J., REIDY, P. J. ET LEVY, B. (1992). Mobility and degradation of organic contaminants in subsurface environement. CDM Inc.,Chealsea, MI, 250 Pages.
- MC ALLISTER, K., LEE, H. ET TREVORS, J. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegradation, 1-40.
- MEF (1998). Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Québec, Canada, Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec.
- MEF (1995). Méthodes d'analyse des milieux environnementaux - sols - dosage des hydrocarbures pétroliers (C10 à C50). Québec, Canada, Ministère de l'environnement et de la faune du Québec.
- MEGHARAJ, M., WITTICH, R.-M., BLASCO, R., PIEPER, D. H. ET TIMMIS, K. N. (1997). Superior survival and degradation of dibenzo-dioxin and dibenzofuran in soil

by soil-adapted *Sphingomonas* sp. strain RW1. Applied Microbiology and Biotechnology, **48**, 109-114.

MENVIQ (1988). Guide standard de caractérisation de terrains contaminés. Québec, Ministère de l'Environnement du Québec, direction des substances dangereuses.

MENVIQ (1989). L'industrie du traitement chimique (préservation et protection) du bois au Québec en 1987. Québec, Environnement Québec: 58.

MILLETTE, D., BARKER, J. F., COMEAU, Y., BUTLER, B. J., FRIND, E. O., CLEMENT, B. ET SAMSON, R. (1995). Substrate Interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds: a factorial batch experiment. Environmental Science and Technology, **29**, 1944-1952.

MILLS, A. L., BREUIL, C. ET COLWELL, R. R. (1978). Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. Canadian Journal of Microbiology, **24**, 552-557.

MONA, L. (1993). Microbial Degradation of Dibenzofuran, Fluoren and Dibenzo-p-dioxin by *Staphilococcus auriculans* DBF63. Applied and Environmental Microbiology, **59**(1), 285-289.

MOOS, L. P., KIRSH, E. J., WUKASCH, R. F. ET GRADY, P. L. (1983). Pentachlorophenol biodegradation - 1 Aerobic. Water Ressources, **17**(11), 1575-1584.

MORITA, R. Y. (1993). Starvation-survival strategies in bacteria. Handbook of methods in aquatic microbial ecology. P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr and J. J. Cole. USA, Lewis Publisher: 441-445.

MORRIS, P. J., SHELTON, M. E. ET CHAPMAN, P. J. (1995). Co-Contaminated Sites: Biodegradation of fossil fuels in the presence of PCBs. Bioremediation of recalcitrant organics, Batelle Press.

MORRISON, J. M., HICKMAN, G. T., STEFANOFF, J. G., DIAZ, J. A. ET HERBST, J. (1997). Evaluation of aerated biopile treatment options. In Situ and On-Site Bioremediation, New Orleans, Louisiane, Batelle Press.

- MUELLER, J. G., LANTZ, S. E., BLATTMANN, B. O. ET CHAPMAN, P. J. (1991). Bench-scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol and creosote contaminated materials: Solid-phase bioremediation. Environmental Science and Technology, 25, 1045-1055.
- MUELLER, J. G., LANTZ, S. E., BLATTMANN, B. O. ET CHAPMAN, P. J. (1991). Bench-Scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol and creosote-contaminated materials: slurry-phase biodegradation. Environmental Science and Technology, 25, 1055-1061.
- NILSSON, C. A., NORSTROM, A., ANDERSSON, K. ET RAPPE, C. (1978). Impurities in the commercial products related to pentachlorophenol. Pentachlorophenol - Chemistry, pharmacology, and environmental toxicity. K. Ranga Rao. NY, Plenum Press: 313-325.
- NOHYNEK, L. J., SUHONEN, E. L., NURMIAHO-LASSILA, E. L., HANTULA, J. ET SALKINOJA-SALONEN, M. (1995). Description of four pentachlorophenol-degrading bacterial strains as *Sphingomonas chlorophenolica* sp. nov. System. Appl. Microbiol., 18, 527-538.
- NOWOSIELSKI, B. E. ET FIEN, J. B. (1998). Experimental study of octanol-water partition coefficients for 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol: Derivation of an empirical model of chlorophenol partitioning behaviour. Applied Geochemistry, 13(7), 893-904.
- O'REILLY, K. T., KADAKIA, R., KORUS, R. A. ET CRAWFORD, R. L. (1988). Utilization of immobilized-bacteria to degrade aromatic compounds common to wood-treatment wastewater. Water Science and Technology, 20(11), 95-100.
- ORSER, C. S., C.C., L., XUN, L., ZAHRT, T. C. ET SCHNEIDER, B. J. (1993). Cloning, sequence analysis, and expression of the *Flavobacterium* pentachlorophenol-4-monooxygenase gene in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 175(2), 411-416.

OTTE, M.-P. (1998). Le sol activé: optimisation de l'activité d'un consortium indigène dégradant le pentachlorophénol. Science de l'Environnement. Montréal, Université du Québec à Montréal: 119.

OTTE, M. P., COMEAU, Y., SAMSON, R. ET GREER, C. W. (1999) Enhancement of pentachlorophenol biodegradation using organic and inorganic support. Bioremediation Journal, 3,1, 35-45.

OTTE, M. P., COMEAU, Y., SAMSON, R. ET GREER, C. W. (soumis 1998). Role of native soil on pentachlorophenol mineralisation activity in mixed culture activation for bioaugmentation. Applied Microbiology and Biotechnology.

OTTE, M.-P., GAGNON, J., COMEAU, Y., N., M., GREER, C. ET SAMSON, R. (1994). Activation of an Indigenous Microbial Consortium for Bioaugmentation of Pentachlorophenol/creosote Contaminated Soils. Applied Microbial Biotechnology, 40, 926-932.

PARSON, J. R. ET STORM, M. C. (1989). Biodegradation of chlorinated dibenzo-p-dioxins in batch and continuous cultures of strain JB1. Chemosphere, 19, 8-9.

PROVIDENTY, M., LEE, H. ET TREVORS, J. (1993). Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. Journal of Industrial Microbiology, 12, 379-395.

QUENSEN, J. F. I. ET MATSUMURA, F. (1983). Oxidative degradation of n2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by microorganisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 2, 261-268.

RUTGERS, M., VAN BOMMEL, S., BREURE, A. M., VAN ANDEL, J. G. ET DUETZ, W. A. (1998). Effect of pH on the toxicity and biodegradation of pentachlorophenol by *Sphingomonas* sp. strain P5 in nutritive culture. Environmental Toxicology and Chemistry, 17, 792-797.

SABOO, V. M. ET GEALT, M. A. (1998). Gene Sequences of the *pcpB* Gene of Pentachlorophenol-Degrading *Sphingomonas Chlorophenolica* Found in Nondegrading Bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 44(7), 667-675.

- SALMINEN, J. ET HAIMI, J. (1998). Response of the soil decomposer community and decomposition processes to the combined stress of pentachlorophenol and acid precipitation. Applied Soil Ecology, 9, 475-481.
- SAMSON, R. ET ZALOUM, R. (1989). La détoxification des sols et des sédiments par l'utilisation de méthodes biologiques et non-biologiques. 12ième Symposium sur le traitement des eaux usées et lier atelier sur l'eau potable, Montréal.
- SHIMIZU, Y., YAMAZAKI, S. ET TERASHIMA, T. (1992). Sorption of anionic pentachlorophenol (PCP) in aquatic environments: the effect of pH. Water Science and Technology, 25(11), 41-48.
- SIMKINS, S. ET ALEXANDER, M. (1984). Models for mineralization kinetics with variables of substrate concentration and population density. Applied Environmental Microbiology, 47(6), 1299-1306.
- TAMBURINI, D., PORTA, A., AMBERT, J. ET DI LUISE, G. (1997). Evaluation of optimum hydrocarbon degradation conditions: a biotreatability study. In Situ and On-Site Bioremediation, New Orleans, Louisiane, Batelle Press.
- TRUDELL, M. R., MAROWITCH, J. M., THOMSON, D. G., FULTON, C. W. ET HOFFMANN, R. E. (1994). In situ bioremediation at wood-preserving site in cold, semi-arid climate: feasibility and field pilot design, CRC Press Inc.
- TSEZOS, M. ET WANG, X. (1991). Study on the kinetics of hazardous pollutants adsorption and desorption by biomass: Mechanistic considerations. Journal Chemistry Technology and Biotechnology, 50, 507-521.
- UMBREIT, T. H. (1986). Bioavailability of dioxin in soil from a 2,3,5-T manufacturing site. Science, 32, 497-499.
- VALLAEYS, T., PERSELLO-CARTIEAUX, F., ROUARD, N., LORS, C., LAGUERRE, G. ET SOULAS, G. (1997). PCR-RFLP analysis of 16S rRNA, *tfdA* and *tfdB* genes reveals a diversity of 2,4 D degraders in soil aggregates. FEMS Microbiology Ecology, 24, 269-278.

- VALO, R., APAJAHALATI, J. ET SALKINONA-SALONEN, M. (1985). Studies on the physiology of microbial degradation of pentachlorophenol. Applied Microbiology and Biotechnology, 21, 313-319.
- VALO, R. ET SALKINOJA-SALONEN, M. (1986). bioreclamation of chlorophenol-contaminated soil by composting. Applied Microbiology and Biotechnology, 25, 68-75.
- VAN ELSAS, J. D., DUARTE, G. F., RUSADO, A. S. ET SMALLA, K. (1998). Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. Journal of Microbiological Methods, 32, 133-154.
- VANDEMARK, P. J. ET BATZING, B. L. (1987). The microbes: an introduction to their nature and importance. Benjamin/Cummings, 4555 Pages.
- WALTER, M. V. (1995). Bioaugmentation. Manual of environmental microbiology. C. Hurst. Washington, ASM Press: 753-757.
- WATANABE, I. (1977). Pentachlorophenol-decomposing and PCP-tolerant bacteria in field soil treated with PCP. Soil Biol. Biochem., 9, 99-103.
- WEAST, R. C., ASTLE, M. J. ET BEYER, W. H., Eds. (87-88). Handbook of chemistry and physics, CRC Press.
- WHYTE, L. G., HAWARI, J., ZHOU, E., BOURBONNIÈRE, L., INNIS, W. E. ET GREER, C. W. (1998). Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperature by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. Applied and Environmental Microbiology 64(7), 2578-2584.
- WIGGINS, B. A. ET ALEXANDER, M. (1988). Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. Applied and Environmental Microbiology, 54, 2803-2807.
- WILKES, H. (1996). Degradation of Chlorinated DD/F by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. Applied and Environmental Microbiology, 62(2), 367-371.

WITTICH, R. (1992). Metabolism of Dibenzo-p-Dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. Applied and Environmental Microbiology, **58**(3), 1005-1010.

WONG, A. S. ET CROSBY, D. (1978). Photolysis of pentachlorophenol in water. Pentachlorophenol, Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology. K. Ranga Rao. NY, Plenum Press.

WORLD HEALTH ORGANISATION (1988). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. Genève, World Health Organisation: 410.

WRENN, B. A. ET VENOSA, A. D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by most-probable-number procedure. Canadian Journal of Microbiology, **42**, 252-258.

ANNEXE I

Séquençage d'une souche provenant de réacteur NaPCP lors de l'activation II

Amino acids sequence of *pcpB* gene

clone # 32 compared to *Sphingomonas clorophenolica*
strain ATCC 33790

1	GFTNFENTDAKPIILDF	17
		.	
51	QTSKACTIHARSMEMMEHIGIAARYIETGVRCNGFTFNFENADANAMLDF		100
18	STLPGRFPFIMIYNQNETERVLRQHLDATFNFRPEWGTQLLTLKQGESGI		67
	:: : :.. . .		
101	SVLPGKYPFITIYNQNETERVLRQHLEATYSFQPEWGTQLLACTQDENG	I	150
68	EVGLRLADGSKETIRPRWVIGADGVRSRVRECMGIAYDGEDYEENVLQMM		117
	. . : : : :		
151	RADLRLKDGTQQTINPRWVIGADGVRSRVRECLGIAYEGEDYEENILQMM		200
118	DVG.....		120
201	DVGIQDFDAGDDWIHYFIGQDKFVFVTKLPGTNYRVIISDLGGANKENLE		250

Identity : 75.9%

Sequences analysis

pcpB clones: all PCP degraders

#4	<i>Flavobacterium</i> sp.	a.n. : 92%
#32	<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> strain ATCC 33790	a.a. : 75.9% a.n. : 77.5%
#532	<i>Sphingomonas</i> sp. UG30	a.a. : 98.3% a.n. : 97.8%

16S clones:

#R1	<i>Sphingomonas</i> sp. strain CF06	a.n. : 98%
#R3	Uncultured bacterium (environmental)	a.n.: 95%
#R17	<i>Sphingomonas</i> sp. strain CF06	a.n.: 94%
#R119	Filamentous bacterium (environmental)	a.n.: 96%

ANNEXE II**Protocoles Expérimentaux 16**

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16 A	Pages: 4
Version: Officielle du mémoire	Date Début: 24/04/97
	Date fin : 24/05/97
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par: Josée Gagnon	Signatures:  _____ _____ Date: 99 / 06 / 09

Titre: Caractérisation préliminaire pour le choix du sol à Bioactiver

Mots clés: PCP, microcosmes, hexadécane

1. OBJECTIF(S)

Déterminer parmi les 5 sols reçus, lequel possède le meilleur potentiel de bioactivation au PCP. Deux analyses permettent ce choix: Concentration en PCP et minéralisation du PCP en microcosme.

2. MATÉRIEL

1. Analyses extérieures :

Petite Pelle ,

5 bocaux de verres,

une glacière ,

les formulaires demandés dans le PSO G

2. Minéralisation :

30 Bouteilles à microcosmes avec bouchons en caoutchouc et métal

30 petits tubes

15g de sol tamisé (2mm) de chacun des cinq barils à analyser

750ml de MSM

Solutions de ^{14}C -PCP, ^{14}C -Hexadecane

Solvants : Toluène et hexane

Seringue de 50 μL

Papier d'aluminium

NaN_3

Solution KOH 1N

3. MÉTHODOLOGIE

1. Analyses extérieures :

Les sols des chaudières sont mélangées avec une petites pelles et mis dans un bocal de 350 ml identifiés de S6T0 à S7T0. Ils sont ensuite envoyés aux Laboratoires ECO selon le PSO G8

2. Microcosmes :

La méthodologie suivie est celle du PSO A10 voici les points particuliers à notre expérience:

Préparation des solutions radioactives

U- ^{14}C -PCP lot 35H9202 Vial 1 1 μL =1261857 dpm

HEXADÉCANE-1- ^{14}C Vial mère 50 μL =1000 000 dpm

L'ajout de solution pour chacun des cas (PCP et HEXADÉCANE) sera de 25 μL , aucune seringue plus petite que 50 μL n'étant disponible. La dilution sera alors faite afin d'atteindre 100 000 dpm /25 μL . Les solutions filles finales sont vérifiées avec le protocole 01 du compteur à scintillation.

Préparation des microcosmes:

Boues de 10% tel que le mélange qui sera fait lors de la Bioactivation. Les microcosmes seront inoculés avec 25 μl des solutions radiomarqués pour un total de 100 000 dpm par microcosme. Sur 30 microcosmes 6 contrôles seront fait, un au début, au milieu et à la fin de chaque série de 15. La feuille de travail sera la suivante

Feuilles de travail :

No	Identification	T°	Jour 0	sol(g)	eau (ml)	NaN ₃
1	slurry1-A	PCP	20°C	2.5	25	-
2	slurry1-B	PCP	20°C	2.5	25	-
3	témoin-1	PCP	20°C	2.5	25	0.005g
4	slurry2-A	PCP	20°C	2.5	25	-
5	slurry2-B	PCP	20°C	2.5	25	-
6	témoin-2	PCP	20°C	2.5	25	0.005g

Agitation: agitateur giratoire à 125 RPM. Couvrir de papier d'aluminium. Bouchons: anneaux de métal et caoutchouc gris

Suivit de la minéralisation 30 jours avec un échantillonnage par jour.

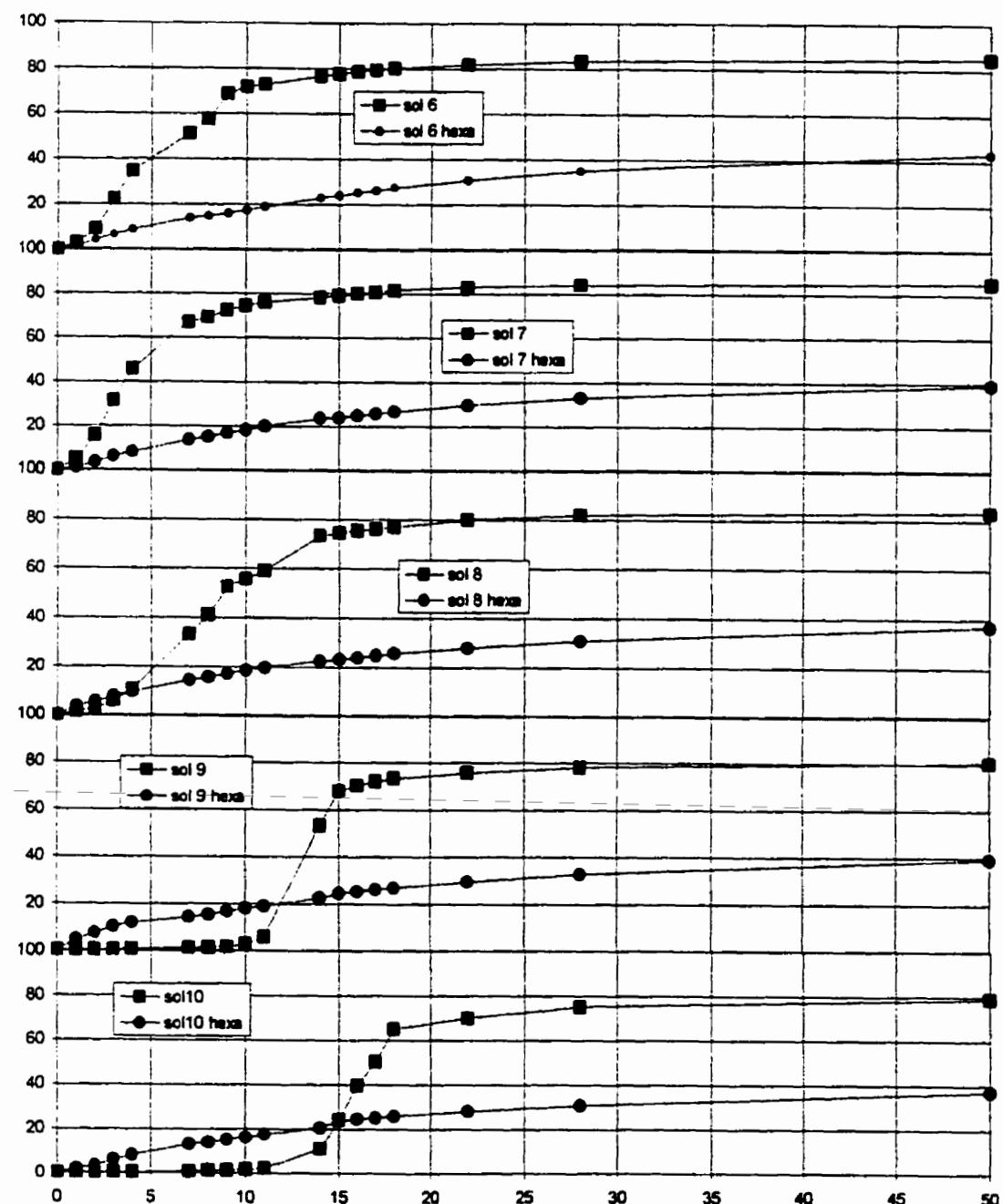
4. RÉFÉRENCES

PSO A10 et PSO G8

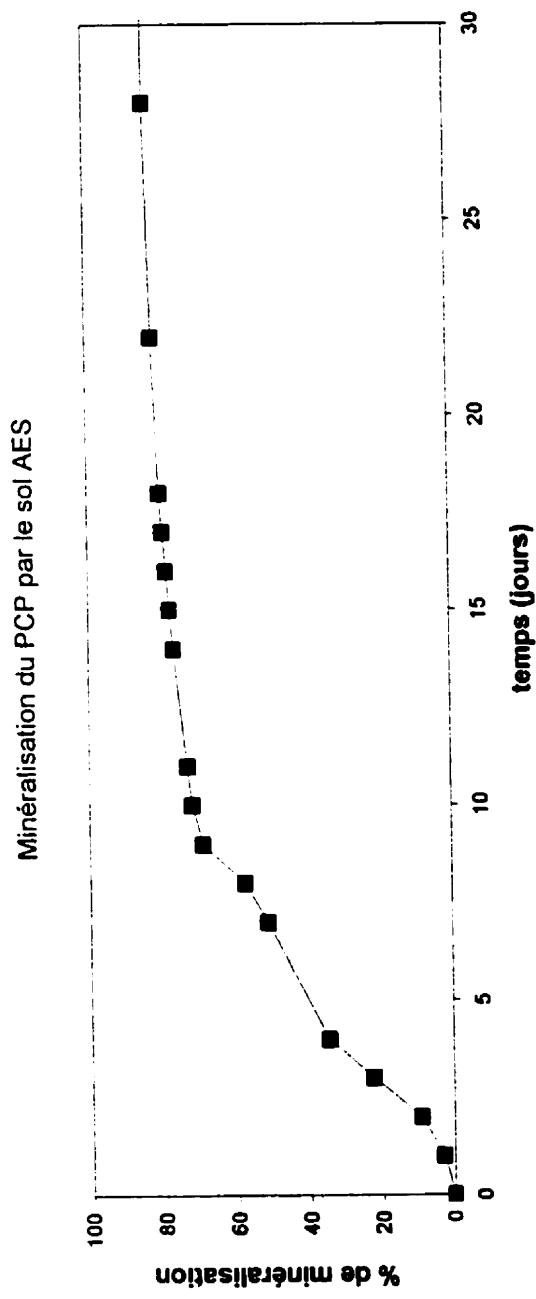
5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

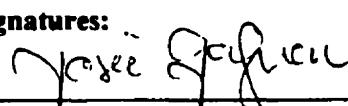
Les résultats conservés sont ceux des sol 7 à 10.

Minéralisation des échantillons de St-Anaclet, Caractérisation préliminaire juin 1997



6. ANNEXES: MODIFICATIONS



PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16 B	Pages: 6
Version: Officielle du mémoire	Date Début: 24/04/97
	Date fin :
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par: Josée Gagnon	Signatures:  _____ _____ Date: 27/06/97
Titre: Comparaisons de deux méthodes (NNP tube et NPP marqué) de Comptes bactériens Totaux et sélectifs (PCP et Hexadécane)	
Mots clés: NPP, PCP, Hexadécane, hétérotrophe totaux	

1. OBJECTIF(S)

Afin de vérifier la fiabilité de la méthode de détection de dégradeurs et de déterminer si les résultats qui seront obtenus pour les différentes flores seront comparables, des dénombremens NPP en tubes ont été comparés à des dénombrement NPP utilisant des radio-isotopes. L'utilisation de radio-isotopes permet de quantifier la microbiota responsable de la minéralisation du contaminant ciblé. En effet, une petite quantité de contaminant radiomarqué est ajouté à chacune des dilutions successives, et un trappe à CO₂ permet de capter le ¹⁴CO₂ produit par la minéralisation du contaminant. Parce que le mode de détection du ¹⁴CO₂ est sensible, cette technique permet de dénombrer de faible quantité de microorganismes. Cette technique est également hautement sélective car la seule source de ¹⁴CO₂ provient de la minéralisation du contaminant radio-marqué.

2. MATÉRIELS

Dilutions:

- Solution saline 8,5g de NaCl par litre d'eau distillée
- 8 bouteilles à dilution
- Pipette stérile de 100ml
- 30 billes de verres (3mm)
- 10 g de sol tamisé (2mm)

Pipettes stériles (enveloppées) de 10 ml
cupules d'aluminium et four à 105°C

Non-radiomarqués (N-Rad):

Dispensette 10 ml

40 tubes de verre à bouchon vissé par type de compte effectué (40 x 3)

Micropipette 1000µL

Embouts bleus stériles

Hétérotrophes totaux :

500ml Nutrient Broth 8g/L (BSL, Becton Dickinson)

Sélectifs PCP :

500 ml des solution 20mg de PCP /Litre de MSM non tamponné (voir PE 16D) (solution de PCP concentré: 14g/L dans NaOH 0.25N)

Sélectifs Hexadécane :

500 ml Solution minérale SM(par litre d'eau distillée) : MgSO₄·7H₂O, 0,1g ; KCl, 0,7g ; K₂HPO₄, 3,7g ; NH₄NO₃, 1g.

50µL d'hexadécane filtré à 0,5 microns, par tube.

Radiomarqués (Rad):

KOH 1N

Cocktail à scintillation Opti-phase Hisafe-3 (Wallac, Montréal)

Compteur à scintillation Wallac Modèle 1409.

Pipette piston de 100µl et 1000µl (calibrées)

Milieu salin minéral de croissance microbienne (MSM) stérile

43 Vial stérile par type de compte (3x43)

40 tubes de 4ml stérile par type de compte (40x3)

Embouts bleus et jaunes stériles.

Hétérotrophes totaux :

Solution radioactive [¹⁴C]Glucose dilué dans de l'eau distillée à 20 000dpm/10µL

Sélectifs PCP :

Solution radioactive [^{14}C]PCP dilué dans du toluène à 20 000dpm/10 μL

Sélectifs Hexadécane :

Solution radioactive [^{14}C]Hexadécane dilué dans de l'hexane à 20 000dpm/10 μL

3. MÉTHODOLOGIE

Stérilisation par autoclavage:

Autoclavage à 121°C et 103,4 kPa pendant 20 min

Préparation des dilutions en séries : (elles serviront pour tous les comptes)

1. Déterminer la teneur en eau du sol (PSO A7)
2. Remplir une bouteille pour dilution primaire (10^0) à 95ml de solution saline NaCl (y ajouter 30 billes de verre) et 8 autres de 90 ml
3. *Autooclaver, laisser refroidir à la température du sol*
4. Sous la hotte biologique préalablement stérilisée avec UV pendant 20 minutes: laver spatule et dessus de la balance avec de l'éthanol
5. Sous la hotte: Pesar environ 10g de sol dans la bouteilles 95ml
6. Agiter 30 min au Wrist action
7. Dilutions successive : Sous la hotte biologique et avec flamme
 - Ouvrir bouteille 10^{-1} et passer le goulot à la flamme
 - Mélanger manuellement la bouteille 10^0 , ouvrir et passer à la flamme
 - Pipetter avec pipette propre et stérile 10 mL de la bouteille 10^0 et les placer dans la bouteille 10^{-1}
 - Passe les goulets à la flamme et fermer. La bouteille 10^{-1} est préparée
 - Répéter le point 7 en utilisant la nouvelle dilution préparée comme inoculum jusqu'à la dernière dilution voulue.

Non-radiomarqués :

Préparation des tubes :

1. 5 tubes par dilution plus les témoins, 6 tubes par dilution pour les compte de dégradeurs PCP

2. Placer 9ml de la solution correspondantes aux comptes désiré (Nutrient Broth, PCP/MSM, SM) avec la dispensette (calibrer la dispensette préalablement)
3. *Autoclaver*
4. Rajouter les 50µL dans chaque tubes d'hexadécane pour les comptes sélectifs à hexadécane.
5. Inoculation des tubes selon le protocole PSO A12
6. Incubation à 30°C à la noirceur
 - 7 jours Hétérotrophes totaux
 - 30 jours hexadécane
 - 30 jours PCP
7. Suite à l'incubation compter les tubes positifs: Hétérotrophes totaux: Turbité. Dégradeurs de PCP: baisse de pH. Hydrocarboboclaste: émulsion (PSOA12, PE16D, PE8A)
8. Calculs selon le protocole PSOA12

Radiomarqués :

En condition stérile (hotte biologique + flamme)

1. Mettre 1ml de KOH dans les 120 vials à scintillation, les boucher et les identifier les dilutions
2. Poser les vials de 4 ml dans les vials à scintillation identifiés.
3. Dans des vials de 4ml pipetter 5 fois 900µL de MSM, puis rajouter 10µL de la bouteille de dilution 10^0 , ceci constitue les réplicats de la dilution 10^{-1} .
4. Dans des vials de 4ml pipetter 5 fois par type de compte 900µL de MSM, puis rajouter 10µL de la bouteille de dilution 10^{-1} , ceci constitue les réplicats de la dilution 10^{-2} .
5. Et ainsi de suite jusqu'à une dilution finale désirée
6. Faire 5 témoins par type de compte en pipetant 1ml de MSM dans 5 vials.
7. Ne pas oublier d'agiter les bouteilles de dilution régulièrement.
8. Sous la hotte radioactive, ajout des éléments radioactifs :

Hétérotrophe totaux : dans chaque vial de 4ml servant au compte totaux ajouter 10µL de solution de glucose radiomarqué.

Sélectifs PCP : dans chaque vial de 4ml servant au compte sélectif PCP ajouter 10µL de solution de PCP radiomarqué.

Sélectifs Hexadécanes : dans chaque vial de 4ml servant au compte sélectif Hexadécane

- ajouter 10 μ L de solution d'hexadécane radiomarqué.
9. Faire 3 contrôles par type de compte en pipetant 10ul de solution radioactive dans 1ml de MSM.
 10. Incubation à 30°C à la noirceur pendant 15 jours
 11. Tubes positifs: turbidité pour hétérotrophes totaux, émulsion pour hydrocarbonoclastes et baisse du pH pour dégradeurs de PCP. Plus de précisions dans PE16D, PSO12 et PE8
 12. Calculs selon le protocole PSO A12

4. RÉFÉRENCES

PSO A7 et A12

PE 8A

PE 16 D (méthode pour dégradeurs de PCP)

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

Lehmicke, L. G., Williams, R. T. et Carlson, R. E. (1985). 14C-Most-probable-number method for enumeration of active heterotrophic microorganisms in natural waters. Applied Environmental Microbiology **38**, 644-649.

Mills, A. L., Breuil, C. et Colwell, R. R. (1978). Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. Canadian Journal of Microbiology **24**, 552-557.

Valo, R. et Salkinoja-Salonen, M. (1986). Bioreclamation of chlorophenol-contaminated soil by composting. Applied Microbiology and Biotechnology **25**, 68-75.

Zajic, J. E., Supplisson, B. et Volesky, B. (1974). Bacterial degradation and emulsification of n06 Fuel Oil. Environmental Science and Technology **8**(7), 664-668.

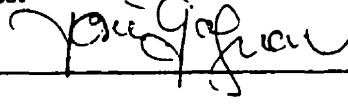
5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Voici les résultats obtenus jusqu'à ce jour (23/07/97)

		radiomarqué	non-radiomarqué
		cellules/g de sol sec	cellules/g de sol sec
dégradeurs PCP	sol 5	$9,4 \times 10^4$	aucun résultat
hydrocarbonoclastes	sol 5	$3,4 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$
	réplicat	-	$3,6 \times 10^3$
H. Totaux	sol 5	$1,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
dégradeurs PCP	sol 7	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$
hydrocarbonoclastes	sol 7	$1,85 \times 10^3$	$3,7 \times 10^2$

De façon plus détaillées: annexe

Résultats comptes sélectifs pour sol 7				
18/07/97	PCP		Hexa	
dilution -2	884,7 p		518,6 p	
dilution -2	374,1 p		664,7 p	
dilution -2	475,9 p	5/5	437,9 p	4/5
dilution -2	610 p		468,9 p	
dilution -2	416,7 p		12,7 n	
dilution -3	418 p		225,3 p	
dilution -3	384,4 p		154,3 n	
dilution -3	431,3 p	5/5	369 p	4/5
dilution -3	935,3 p		299,5 p	
dilution -3	439,5 p		266,3 p	
dilution -4	223,1 n		103,4 n	
dilution -4	521,7 p		97,4 n	
dilution -4	348 n	3/5	175 n	1/5
dilution -4	418,8 p		105,7 n	
dilution -4	392,2 p		201,3 p	
dilution -5	177,4 n		129,9 n	
dilution -5	337,8 n		181,7 n	
dilution -5	338 n	1/5	120,3 n	0/5
dilution -5	650 p		139,7 n	
dilution -5	319,3 n		131 n	
dilution -6	281,2 n		11,3 n	
dilution -6	405,3 p		60,9 n	
dilution -6	859,4 p	4/5	57 n	0/5
dilution -6	428,6 p		68,1 n	
dilution -6	784,1 p		81,1 n	
temoin 1	118,8		50,2	
temoin 2	396		64,2	
temoin 3	151,9		1,1	
critere*	372,23	5-3-1	188,50	4-4-1
		$1,10 \times 10^5$		$3,4 \times 10^3$
* que trois temoins donc +150				

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16C	Pages: 3
Version: Officielle du mémoire	Date Début: 3 juin 1997
	Date fin
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par: Josée Gagnon	Signatures:  _____ _____ Date: 97/06/09

Titre: Détermination de la concentration en ions Cl⁻ dans un sol par potentiomètre

Mots clés:

Cl⁻, potentiométrie.

1. OBJECTIF(S)

Déterminer la concentration en ions Cl⁻ dans un échantillon de sol en utilisant un potentiomètre

2. MATÉRIELS

Électrode combinée sélective en ions chlorures

pH/ion meter

ISA (ionic strength adjuster, NaNO₃ 5M)

Solutions standards

10 g de sol

100ml d'eau distillée

Mélangeur wrist action

Bouteille de plus de 100ml

3. MÉTHODOLOGIE

Peser 10 ± 0.01 g de sol (humide, en sachant le contenu en eau on pourra rajuster les calculs) dans une bouteille de plus de 100ml et rajouter 100ml d'eau distillée et 2ml de ISA, mettre à secouer sur le wrist action pendant 30 min. Pendant ce temps, mesurer la conductivité des standards (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} molaire). Une courbe de calibration peut alors être obtenue (voir instruction de l'électrode).

Prendre la lecture de l'échantillons.

4. RÉFÉRENCES

Mémoire de maîtrise de Carole Barbeau

Manuel d'instruction de l'électrode

Manuel d'instruction du pH/ion meter

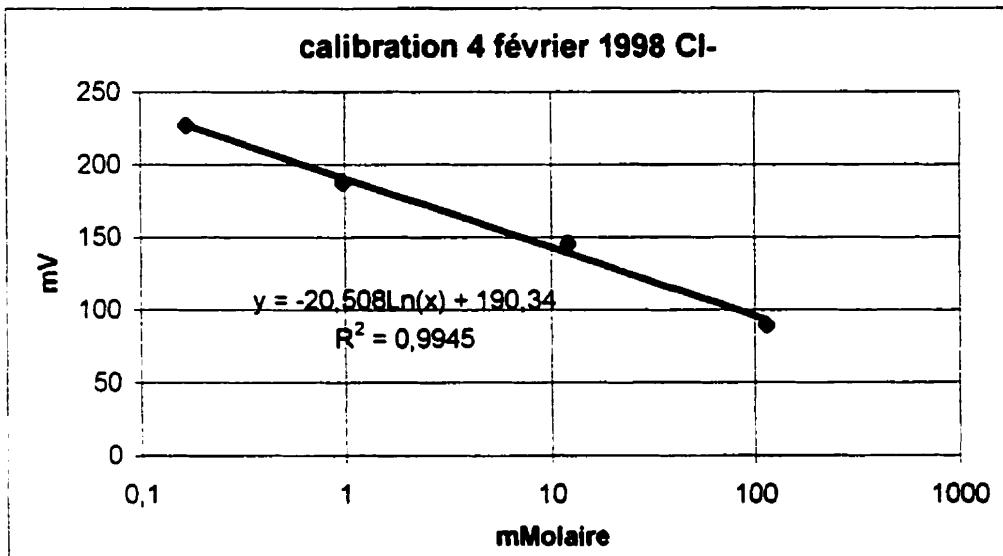
5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Suite à une analyse des standards par un HPLC ionique, une courbe de calibration de l'électrode combinée peut être faite. Un exemple est disponible en annexe.

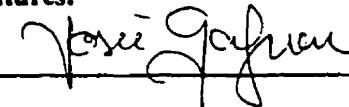
Il est à noter que la présence d'ions tels OH^- , S_2O_3 , vont interférer avec les lectures de l'électrode, pour plus de détails, se référer au manuel d'utilisation de l'électrode en annexe.

Courbe de calibration faite avec des nouvelles solutions standard 4 février

mMol	mV
114	90
12	145,5
0,97	188
0,167	227,1



6. ANNEXES:

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16 D	Pages: 4
Version: officielle du mémoire	Date Début: 4/06/97
	Date fin
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par: Josée Gagnon	Signatures:  _____ _____ Date: 99/06/09

Titre: Décompte des micro-organismes dégradeurs du PCP dans un sol selon la méthode des NPP

Mots clés:

PCP, compte bactériens, NPP

1. OBJECTIF(S)

Évaluer le nombre de micro-organismes pouvant dégrader le PCP dans un sol, en utilisant comme indice de dégradation la variation du pH causée par la biodégradation du PCP.

2. MATÉRIELS

Dilution : Solution saline 8,5g de NaCl par litre d'eau distillée

8 bouteilles à dilution

Pipette stérile de 100ml

Pipettes stériles (enveloppées) de 10 ml

cupules d'aluminium et four à 105°C

Pour échantillons de sol:

10 g de sol tamisé à 2mm

30 billes de verre 3mm

Pour échantillon de slurry:

10ml de slurry (représente la dilution 10⁰)

Solutions nutritives : MSM modifié pour en diminuer le pouvoir tampon (pour 1 litre):

8.33ml (NH₄)SO₄ (1M)/L

0.39ml MgSO₄.7H₂O (1M)/L

11.79 ml NaNO₃ (1M)/L

1 ml Métaux traces (1M)/L

19.4 ml K₂HPO₄ (1.5 fois la quantité habituellement utilisée, car aucun ajout de NaH₂PO₄.H₂O).

2,2 ml de solution de 14g/l de PCP pur dans du NaOH 0,25N

Ajuster le pH du milieu à 7,2 à l'aide de H₂SO₄ 1N

Attention, l'eau distillée peut avoir a être bullée à l'air afin de ramener son pH à 7.

Préparation des tubes :

- de Solution MSM modifiée au PCP par tube
- Série de 6 tubes par dilution
- Micropipette 1ml
- pH-mètre

3. MÉTHODOLOGIE

Stérilisation par autoclavage:

Autoclavage à 121°C et 103,4 kPa pendant 20 min

Préparation des dilutions en séries :

1. Déterminer la teneur en eau du sol (PSO A7)
2. Pour du sol: Remplir une bouteille pour dilution primaire (10⁰) à 95ml de solution saline NaCl (y ajouter 30 billes de verre) et les autres de 90 ml.
Pour un slurry: remplir seulement des bouteilles avec 90 ml de saline. La dilution 10⁰ est le slurry
3. Autoclaver, laisser refroidir à la température du sol

4. Sous la hotte biologique préalablement stérilisée avec UV pendant 20 minutes: laver spatule et dessus de la balance avec de l'éthanol
5. Sous la hotte: Peser environ 10g de sol dans la bouteilles 95ml
6. Agiter 30 min au Wrist action
7. Dilutions successive : Sous la hotte biologique et avec flamme
 - Ouvrir bouteille 10^{-1} et passer le goulot à la flamme
 - Mélanger manuellement la bouteille 10^0 , ouvrir et passer à la flamme
 - Pipetter avec pipette propre et stérile 10 mL de la bouteille 10^0 et les placer dans la bouteille 10^1
 - Passe les goulots à la flamme et fermer. La bouteille 10^1 est préparée
 - Répéter le point 7 en utilisant la nouvelle dilution préparée comme inoculum jusqu'à la dernière dilution voulue.

Préparation des tubes

- 1- Remplir les tubes de 9ml de solution au PCP
- 2- Autoclaver : bouteille avec solution saline, tubes remplis, embouts
- 3- Inoculation des tubes en condition stérile (sous la hotte biologique +flamme), 6 tubes par dilution (un des tubes servira de témoin du pH).
- 4- Prendre un tube de chaque dilution et les placer au congélateur à la noirceur
- 5- Incubation des autres tubes à la noirceur à 30°C pendant 30 jours
- 6- Placer tous les tubes (y compris ceux provenant du congélateur) et des solutions standards pour calibration du pH-mètre (4,7,10) dans un bain thermostaté à la température de la pièce jusqu'à ce que tous les tubes soient à la même température.
- 7- Calibrer le pH-mètre et prendre le pH de chaque tube
- 8- Selon le pH du témoin, calculer le pH théorique liée à la dégradation du PCP sur le graph1. Noter les tubes positifs
- 9- Faire les calculs requis par la méthode NPP (protocole PSO 12)

4. RÉFÉRENCES

PSO 12

5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Journal de bords de la mise au point de la méthode

TubesPositifs :

04/06/97 La solution MSM B modifié à 50 mg/l de PCP a été titré afin de suivre le pouvoir tampon de celle-ci (voir graph1)

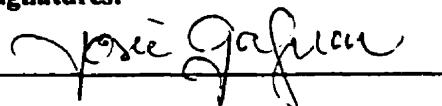
23/07/97 Les tubes positifs (jusqu'ici) sont ceux dont tout le PCP est disparu. La lecture du pH n'est pas assez précise jusqu'ici pour que l'on puisse s'y fier. Elles servent d'indice de disparition de PCP, et nous indique, lorsque l'on assiste à une légère baisse du pH des dilutions contrôles par rapport aux témoins, quand les tubes sont prêts à être lu au HPLC. Une augmentation du pH des solutions est observable après autoclavage. Ceci est dû à l'acide carbonique contenu dans l'eau distillée qui doit s'échapper avec l'air lors de l'autoclavage. Il faut donc faire buller de l'air dans l'eau distillée avant de l'utiliser.

05/08/97 Tous les essais effectués à une concentration de 50mg/l de PCP avec le MSM modifié, ne permettent pas de suivre le pH, les analyses au HPLC donnent de meilleurs résultats. Il faut descendre à des concentration de moins de 20 mg/l pour avoir des réponses satisfaisantes. Un écart de 0.3 avec les témoins identifie les tubes positifs.

Un essai effectué avec le sol 7 à l'aide d'une solution MSM modifiée avec 20mg/L de PCP en analysant le pH des tube puis son contenu en PCP (avec HPLC) donne des résultats semblables (voir p54 et 55 du cahier de laboratoire 53)

04/09/97 Cette méthode fut suivie tout au long d'une production de consortium bactérien (protocole PE 16E) et les résultats obtenus sont très satisfaisant en utilisant une solution de MSM B à une concentration de 20mg/l de PCP. Un écart de 0.25 avec les témoins identifie les tubes positifs.

6. ANNEXES: MODIFICATIONS

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16 E	Pages: 6
Version: Officielle pour mémoire	Date Début: 4 juillet 1997
Activation 1	Date fin
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par: Josée Gagnon	Signatures:  _____ _____ Date: 9/10/01 09

Titre: Production de sol activé pour la biodégradation du PCP, activation préliminaire

Mots clés:

Bioactivation, PCP, consortium indigène

1. OBJECTIF(S)

Augmenter la masse et l'activité de dégradation d'un consortium bactérien indigène d'un sol légèrement contaminé au PCP par la technique des sols activés.

2. MATERIELS

Réacteurs

Marmite de 10 litres de stainless steal

Couvercle troué pour l'air, les agitateurs et l'échantillonnage

Condensuer en verre du lab de Gino

Humidificateur : erlenmeyer de 4 litre avec bouchon de caoutchouc et entrée et sortie d'air

Diffusuer : tube de stainless troué

Mélange initial dans les réacteurs :

1,6 kg de sol 7 tamisé à 2mm

16 litres de solution MSM

6,4 ml NaH₂PO₄ (1M)

12,99ml K₂HPO₄ (1M)

8,33 ml (NH₄)₂SO₄ (1M)

0,78 ml MgSO₄·7H₂O (1M)

11,79 ml NaNO₃ (1M)

1ml Métaux traces

(0,29g/L Co(NO₃)₂·6H₂O, 0,47 g/L AlK(SO₄)₂·12H₂O, 0,16 g/L CuSO₄, 0,29 g/L ZnSO₄·7H₂O, 2,78 g/L FeSO₄·7H₂O, 1,69 g/L MnSO₄·H₂O, 0,48 g/L Na₂MoO₄·2H₂O)

Comptes microbiens :

Solution Nutrient Broth (8g/l)

Solution saline pour hexadécane + 50 µl d'hexadécane

Solution de 25 ppm de PCP dans du MSM

Essais de minéralisation en microcosmes :

12 microcosmes par ajout:

4 microcosmes par essai de minéralisation et trois essais par ajout (2 en PCP et 1 en Hexadécane)

Besoins en ¹⁴C-PCP: 48 microcosmes de 100 000dpm, plus les contrôles = 5 200 000 dpm

Besoins en ¹⁴C-Hexadécane: 24 microcosmes de 100 000dpm, plus les contrôles = 2 800 000 dpm

Solutions activantes :

Réacteur 1, solution de NaPCP 16,g de PCP/litre de NaOH 0.25N

Réacteur 2, solution de préservation du bois avec ajout de NaOH 0,25N afin d'atteindre la même concentration dans les deux solutions.

Prise du pH :

pH-mètre et électrode

Oxygène dissous:

Sonde à oxygène

Concentration en ions chlorures :

Petite bouteille de 2 ml à échantillon du HPLC

seringue et unité filtrante avec filtre Téflon de 0.5µl

Électrode combinée pour ions chlorure

ISA (solution stabilisante) (NaNO₃ 5M)

Concentration en PCP :

HPLC

et petite bouteille de 2ml pour échantillons

seringue et unité filtrante avec filtre Téflon de 0.5µl

Concentration en C10-C50 :

Bouteille à échantillonnage pour envoi à l'extérieur

3. METHODOLOGIE

Mélange initial dans les réacteurs :

La concentration en sol dans les réacteurs sera de 10% w/v, 0.8kg de sol préalablement tamisé à 2 mm sera mélangé à 8 litres de milieu salin minéral (MSM). Dès le mélange fait, un échantillon de 5ml sera pris afin de déterminer la concentration en PCP du slurry ainsi que son pH et sa concentration en ions chlorures. Des comptes microbiens et des essais en microcosmes ont été fait dans les essais préliminaires (PE 16A,B,D)

Identification des échantillons : VALPCP(jour).(mois).(réacteur).(dup)

VALPCP(jour).(mois).(réacteur).(dup)

Protocole(s) utilisé(s) : PE 16C, PSOAS

Comptes microbiens :

Des comptes microbiens seront effectués avant chaque Ajout, mais un peu avant que la concentration de PCP n'ait atteint zéro.

Réacteur 1 : Hétérotrophes totaux et dégradeurs de PCP

Réacteur 2 : Hétérotrophe totaux , hydrocarbonoclastes et dégradeurs de PCP

Identification des échantillons : hétérotrophes totaux: VALNPPT(jour).(mois).(réacteur)

sélectifs PCP: VALNPPP(jour).(mois).(réacteur)

sélectifs Hexadécanne: VALNPPH(jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé(s) : PSO A12, PE 16D, PE 8A

Minéralisation en microcosmes :

Des essais de minéralisation en microcosmes seront fait aussi avant chaque ajout, au même moment que les compte afin de pouvoir faire des parallèles. Les microcosmes seront constitués, de 10 ml de la solution slurry des réacteurs, du contaminant radioactif (75 000 dpm par microcosme) ainsi que du PCP non radiomarqué à 100mg/l. Le réacteur 1 sera l'objet d'essai avec le ¹⁴C-PCP et le réacteur 2 avec le ¹⁴C-PCP et le ¹⁴C-Hexadécanne. L'échantillonnage des microcosmes sera fait trois fois par jour.

Identification des échantillons : sélectifs PCP: VALMICP(jour).(mois).(réacteur)

sélectifs Hexadécanne: VALMICH(jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé (s) : PSO A10, PE 16G

Ajout des Solutions activantes :

Les ajouts de solutions activantes se feront chaque fois que la concentration en PCP dans la phase aqueuse sera de zero. La concentration en PCP rajouté sont les suivantes , la première sera de 50mg/l puis les autres seront 3 ajouts de 100mg/l, puis deux de 200mg/l et un dernier de 250mg/l. Avant le premier ajout, on laissera le slurry redescendre à zero par lui-même.

Réacteur 1 (solution NaPCP) :

Réacteur 2 : La quantité de PCP dans la solution de préservation n'étant pas connue, elle sera analysé au HPLC. Cette quantité sera probablement élevée . Afin de limiter la variation du ratio poid/volume, du NAOH 0,25N sera rajouté dans la solution, le volume des ajouts sera donc le même.

Moins de 5 minute après l'ajout, un échantillon sera pris afin de mesurer la concentration en PCP dans le réacteur et ainsi déterminer l'importance de l'adsorption.

Echantillon principal journalier:

Un échantillon de 20 ml sera prélevé tous les jours pour y effectuer les analyses journalières.

Le reste de l'échantillon sera conservé au congélateur (<4°C) afin de prévenir les problème d'appareillage et de pouvoir refaire les analyses manquées.

Identification des échantillons : Bioactivation VAL (jour).(mois).(réacteur)

Prise du pH :

Le pH sera suivi de façon journalière en plongeant l'électrode par l'embout d'échantillonage des réacteurs, après avoir calibré le pH-mètre.

Identification des échantillons : VALpH (jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé(s) : PSO A5

Oxygène dissous:

L'oxygène dissous sera mesuré une fois par jour afin de vérifier si le mélange est saturé en oxygène. Le même échantillon servira à la lecture de la concentration en ion chlorure au potentiomètre.

Identification de l'échantillon: VALO2 (jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé(s): PE 16H

Concentration en ions chlorures :

Un échantillon de 1ml dans une petite bouteille pour HPLC sera envoyé pour fin d'analyse au , les échantillons seront pris chaque jour et entreposés dans la chambre à 4°C afin d'en envoyer plusieurs à la fois.

En parallèle une lecture sera prise avec l'électrode disponible au A-682 dans un échantillon de 5 ml.

Identification des échantillons : VALCl-(jour).(mois).(réacteur)

avec électrode VALCl-ELEC(jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé(s) : PE 16C

Concentration en PCP :

Suivi pluri-journalier de la concentration en PCP dans la phase aqueuse, 3 échantillonage par jour sera nécessaire afin de bien suivre son évolution. Un échantillon de 3ml prélevé à la seringue de l'échantillon principal (15ml) puis filtré sur 0.45 microns , est passé dans le HPLC suivant le protocol PCPLONG pour les premiers échantillons puis PCPCOURT si on

ne voit pas l'influence de certains contaminants ayant un temps de rétention dans la colonne semblable à celui du PCP.

Identification des échantillons : VALPCP(jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé (s) : PE 16C, PSO G10

Concentration en C10-C50 :

Envoyé à l'extérieur

Identification des échantillons : VALC10-C50 (jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé (s) : PE 16A

4. REFERENCES

PSO A5

PSO A10

PSO A12

PSO G10

PE 16 A,B,C,D,F,G,H

Barbeau, C. (1996). Bioaugmentation de sols contaminés au pentachlorophénol par la méthode des sols activés. École Polytechnique, Génie civil. Montréal, Université de Montréal.

Otte, M.-P., Gagnon, J., Comeau, Y., N., M., Greer, C. et Samson, R. (1994). Activation of an Indigenous Microbial Consortium for Bioaugmentation of Pentachlorophenol/creosote Contaminated Soils. Appl. Microbial Biotechnol **40**, 926-932.

5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

Les principaux résultats de cette expérimentation se retrouvent en annexe sous forme de feuilles de calculs

Le sol alimenté à la solution de préservation encrasse la colonne du HPLC il faut trouver une solution

6. ANNEXES: MODIFICATIONS

Réacteur 1	heures	ppm HPLC	ppm labo		PCP ajouté	Jours	pH
5.8/15h45	0	0,00	0,34			0,00	7,30
6.8/12h15	20,5	0,85	0,786		50 ppm	0,85	7,28
7.8/10h15	42,5	1,77	0		dans 7 litres	1,77	7,25
7.8/15h21	47,85	1,99	51,118	Ajout 1	350	1,99	7,42
8.8/10h30	66,75	2,78	49,13	53		2,78	7,42
8.8/14h35	70,75	2,95	50,69			2,95	7,42
9.8/10h30	90,75	3,78	46,409			3,78	7,43
10.8/11h30	115,75	4,82	45,708			4,82	7,43
11.8/9h35	137,83	5,74	47,141			5,74	7,44
12.8/10h00	162,33	6,76	45,706			6,76	7,35
13.8/10h00	186,33	7,76	46,91			7,76	7,40
13.8/18h10	194,53	8,11	37,348			8,11	7,36
14.8/9h35	209,83	8,74	28,279			8,74	7,36
14.8/12h45	213,08	8,88	20,638			8,88	7,36
15.8/9h20	233,88	9,75	20,038			9,75	7,36
15.8/12h00	236,58	9,86	0,35058			9,86	7,26
16.8/10h30	259,08	10,80	0		57 ppm	10,80	7,26
17.8/12h30	285,08	11,88	0		dans 7 litres	11,88	7,30
17.8/12h55	285,58	11,90	59,805	Ajout 2	399	11,90	7,45
17.8/22h00	294,58	12,27	57,973			12,27	7,41
18.8/10h30	307,08	12,80	56,631			12,80	7,42
18.8/16h05	312,58	13,02	56,038			13,02	7,42
19.8/10h	330,58	13,77	57,96			13,77	7,40
19.8/16h	336,58	14,02	43,172			14,02	7,36
20.8/10h30	355,08	14,80	7,155		116 ppm	14,80	7,25
20.8/15h30	360,08	15,00	2,2652		dans 7 litres	15,00	7,13
20.8/18h35	363,08	15,13	105,81	Ajout 3	812	15,13	7,56
21.8/10h30	379,08	15,80	107,6	130		15,80	7,56
21.8/16h00	384,58	16,02	103,71			16,02	7,57
22.08 10h15	402,83	16,78	102,92			16,78	7,55
23.8/9h45	426,33	17,76	72,189		116 ppm	17,76	7,49
25.8/10h45	475,33	19,81	1,2639	1,8	dans 7 litres	19,81	7,30
25.8/15h00	479,58	19,98	98,191	Ajout 4	812	19,98	7,65
26.8/10h30	499,08	20,80	61,3317			20,80	7,50
26.8/15h00	503,58	20,98	46,25			20,98	7,44
27.8/10h15	522,83	21,78	1,0407		116 ppm	21,78	7,36
28.8/11h	547,58	22,82	0,58213		dans 7 litres	22,82	7,32
28.8/14h30	551,08	22,96	100,85	Ajout 5	812	22,96	7,72
29.8/11h	571,58	23,82	84,789		233 ppm	23,82	7,62
31.8/22h	630,58	26,27	1,5621		dans 7 litres	26,27	7,31
1.9/16h30	649,08	27,05	185	Ajout 6	1631	27,05	8,43
2.9/10h00	666,58	27,77	201,5			27,77	8,11
3.9/9h45	690,33	28,76	208			28,76	8,06
4.9/11h	715,58	29,82	217			29,82	8,04
5.9/9h00	737,58	30,73	219,428			30,73	8,03
8.9/9h45	810,33	33,76	191,84			30,90	7,53
9.9/12h30	837,08	34,88	187,45			33,76	7,45
11.9/13h30	886,08	36,92	163,45			34,88	7,52
16.09/13h30	1006,3	41,93	2,1951			37,92	7,48
				total	4816	41,92	7,01
				mg de PCP			

Réacteur 2	heures	jours	ppm HPLC	ppm labo		PCP ajouté	C10-C50	Jours	pH
5.8/15h45	0	0,00	1,436					0,00	7,30
6.8/14h30	22,75	0,95	0					0,85	7,29
7.8/10h15	42,5	1,77	0,2632					1,77	7,28
7.8/15h21	47,65	1,99	32,718		Ajout 1	336		1,99	7,32
8.8/10h30	66,75	2,78	30,752	39				2,78	7,31
8.8/14h35	70,75	2,95	30,42					2,95	7,31
9.8/10h30	90,75	3,78	27,787				46,4	3,78	7,35
10.8/11h30	115,75	4,82	28,448					4,82	7,33
11.8/9h35	137,83	5,74	28,256					5,74	7,28
12.8/10h00	162,33	6,76	24,673					6,76	7,21
13.8/10h00	186,33	7,76	4,4685					7,76	7,24
13.8/11h45	188,08	7,84	4,2329					8,11	7,18
13.8/14h10	190,53	7,94	60,318		Ajout 2	686		8,74	6,94
13.8/18h10	194,53	8,11	53,342					8,88	7,01
14.8/9h35	209,83	8,74	4,0406				461	8,99	7,13
14.8/12h45	213,08	8,88	0,38009					9,73	6,84
14.8/15h33	215,83	8,99	70,334		Ajout 3	959		9,85	6,86
14.8/17h35	217,83	9,08	67					10,78	6,75
15.8/9h20	233,63	9,73	41	67				11,87	6,64
15.8/12h00	236,33	9,85	27					11,89	6,69
15.8/13h48	238,08	9,92	109,028		Ajout 4	1302		12,26	6,52
15.8/17h10	241,53	10,06	84,707					12,78	6,33
16.8/10h30	253,83	10,78	65,498	120				13,01	6,51
17.8/12h30	284,83	11,87	25,5	56				13,76	6,14
17.8/12h55	285,33	11,89	64,686		Ajout 5	1211		14,01	7,17
17.8/22h00	294,33	12,26	40,384					14,78	6,91
18.8/10h30	306,83	12,78	23,862				178	14,99	6,92
18.8/11h23	307,83	12,83	81,48		Ajout 6	2240	798	15,12	6,95
18.8/16h05	311,33	12,97	23,32					15,78	6,97
19.8/10h	329,33	13,72	35,616				791	16,01	7,05
19.8/16h	335,33	13,97	114,106					16,77	7,09
20.8/10h30	353,83	14,74	115,146					17,75	7,11
20.8/15h30	358,83	14,95	111,61					19,80	7,15
21.8/10h30	377,83	15,74	123,4				426	20,78	6,89
21.8/16h00	383,33	15,97	129					20,97	6,91
22.08 10h15	401,58	16,73	128,13	280				21,77	6,95
23.8/9h45	425,08	17,71	87,774					21,95	7,18
25.8/10h45	474,08	19,75	56,212					22,81	7,10
26.8/10h30	497,83	20,74	1,7				186	22,95	7,10
27.8/10h15	521,58	21,73	0,2					23,81	7,12
27.8/14h30	525,83	21,91	123		Ajout 7	2240		26,26	6,93
28.8/11h	546,33	22,76	44,3						
29.8/11h	570,33	23,76	14,7						
31.8/22h	629,33	26,22	3,7						

Total

8974

Réacteur 2 données de labo Zenon pour graph

8.8/10h30	2,78	39
15.8/9h20	9,73	67
16.8/10h30	10,78	120
17.8/12h30	11,87	56
22.08 10h15	16,73	280

RÉACTEUR 1

Bilan molaire sur le Cl- versus le PCP ajouté

	PCP ajouté	PCP total	Cl- theo	Cl- trouvé	fact diff	Cl- en trop	PCP résiduel
	mg/l	mg/l	mMol	mMol		mMol	mg/L
R1 A1	50	50	1,34	1,03	0,77	-0,31	16,48
A2	57	107	2,41	2,00	0,83	-0,41	21,87
A3	116	223	4,59	5,19	1,13	0,60	-31,84
A4	116	339	6,77	7,79	1,15	1,02	-54,17
A5	116	455	8,95	8,51	0,95	-0,44	23,52
A6	233	688	13,33	12,91	0,97	-0,43	22,70

Selon le bilan de chlore,

96,70 % du PCP est minéralisé

RÉACTEUR 2

Bilan molaire sur le Cl- versus le PCP ajouté

	PCP ajouté	PCP total	Cl- theo	Cl- trouvé	fact diff	Cl- en trop	PCP résiduel
	mg/l	mg/l	mMol	mMol	trou/theo	mMol	mg/L
R2 A1	30	30	1,34	0,52	0,39	-0,82	43,61
A2	60	90	2,09	2,07	0,99	-0,02	1,15
A3	120	210	4,35	2,81	0,65	-1,54	81,78
A4	120	330	6,60	5,24	0,79	-1,36	72,49
A5	120	450	8,86	6,30	0,71	-2,56	136,10
A6	240	690	13,33	12,64	0,95	-0,73	38,80
A7	240	930	17,88	17,87	1,00	-0,01	0,55

Selon le bilan de chlore,

99,94 % du PCP est minéralisé

Bilan

valeurs obtenue par laboratoire philip

	Réacteur 2		Réacteur 1		contaminant	contaminant
	début	fin	début	fin	ajouté R1	ajouté R2
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Cl- (aq)						
C10-C50 (aq)	6,8	190	-	-	6774,55	
PCP sol	0,23	2	0,23	0,16	688	930
PCP liq		0,67		0,39		

R1 R2

Bilan disparition PCP

99,66

99,27

Bilan disparition C10-C50

97,20

Taux disparition PCP moyen final

15,46

48,49

O2				Cl-			
Réacteur 1		Jours	O2	Réacteur 1		resultat	mMol/L
				Jours	mV	potentiomètre	
6.8/12h15	20,5	0,85	100	6.8/12h15	20,5	0,85	0,10
7.8/10h15	42,5	1,77	99,65	7.8/10h15	42,5	1,77	0,05
7.8/15h21	71,65	2,99	99,00	8.8/10h30	66,75	2,78	0,03
8.8/10h30	90,75	3,78	96,33	9.8/10h30	90,75	3,78	0,07
8.8/14h35	94,75	3,95	99,00	11.8/9h35	113,83	4,74	0,13
9.8/10h30	114,75	4,78	100,00	12.8/10h00	138,33	5,76	0,14
10.8/11h30	139,75	5,82	95,79	13.8/10h00	162,33	6,76	0,18
11.8/9h35	161,83	6,74	97,16	13.8/18h10	170,53	7,11	0,65
12.8/10h00	186,33	7,76	92,89	14.8/9h35	185,83	7,74	0,45
13.8/10h00	210,33	8,76	72,02	14.8/12h45	189,08	7,88	0,73
13.8/18h10	218,53	9,11	95,24	14.8/17h30	194,08	8,09	0,75
14.8/9h35	233,83	9,74	87,02	15.8/9h20	209,88	8,75	1,03
14.8/12h45	237,08	9,88	99,36	15.8/12h00	212,58	8,86	0,97
14.8/17h30	242,08	10,09	94,55	16.8/10h30	235,08	9,80	1,00
15.8/9h20	257,88	10,75	87,94	17.8/12h30	281,08	10,88	1,03
15.8/12h00	260,58	10,86	86,00	17.8/12h55	261,58	10,90	1,17
16.8/10h30	283,08	11,80	85,53	18.8/10h30	283,08	11,80	1,08
17.8/12h30	309,08	12,88	93,01	18.8/16h05	288,58	12,02	1,10
17.8/12h55	309,58	12,90	94,00	19.8/10h	306,58	12,77	1,31
17.8/22h00	318,58	13,27	95,00	19.8/16h	312,58	13,02	1,45
18.8/10h30	331,08	13,80	100,00	20.8/10h30	331,08	13,80	2,00
18.8/16h05	336,58	14,02	95,00	21.8/10h30	355,08	14,80	2,32
19.8/10h	354,58	14,77	83,89	22.8/10h15	378,83	15,78	2,61
19.8/16h	360,58	15,02	80,00	23.8/9h45	402,33	16,76	3,23
20.8/10h30	379,08	15,80	77,72	25.8/10h45	451,33	18,81	5,19
20.8/15h30	384,08	16,00	80,00	26.8/10h30	475,08	19,80	6,08
20.8/18h35	387,08	16,13	85,00	27.8/10h15	498,83	20,78	6,98
21.8/10h30	403,08	16,80	91,63	28.8/11h	523,58	21,82	7,79
21.8/16h00	408,58	17,02	92,00	29.8/11h	547,58	22,82	8,51
22.08 10h15	426,83	17,78	92,44	2.9/10h00	642,58	26,77	9,17
23.8/9h45	450,33	18,76	94,00	3.9/9h45	666,33	27,76	11,85
25.8/10h45	499,33	20,81	95,10	4.9/11h	691,58	28,82	10,37
25.8/15h00	503,58	20,98	94,00	8.9/9h45	786,33	32,76	13,41
26.8/10h30	523,08	21,80	87,42	11.9/13h30	862,08	35,92	132,9
26.8/15h00	527,58	21,98	87,50	16.09/13h30	982,08	42,92	12,39
27.8/10h15	546,83	22,78	87,87				
28.8/11h	571,58	23,82	97,06				
28.8/14h30	575,08	23,96	96,00				
29.8/11h	595,58	24,82	86,62				
31.8/22h	654,58	27,27	89,00				
2.9/10h00	690,58	28,77	91,07				
3.9/9h45	714,33	29,76	100,00				
4.9/11h	739,58	30,82	98,62				
5.9/9h00	761,58	31,73	96,96				
8.9/9h45	834,33	34,76	96,62				
9.9/12h30	861,08	35,88	87,92				
11.9/13h30	910,08	37,92	86,90				
12.9/13h15	933,83	38,91	80,53				
16.09/13h30	1030,08	42,92					

Selon le HPLC ionique il y a en fin d'expérience 157,0268716
4816

nom	Jours	mM
		HPLC ionique
VB-6.8.1 - B01	0,85	0,248235
VB-7.8.1 - B02	1,77	0,123849
VB-8.8.1 - B03	2,78	0,0862369
VB-9.8.1 - B04	3,78	0,171166
VB-10.8.1 - B0	4,78	0,190674
VB-11.8.1 - B0	4,74	0,286312
VB-12.8.1 - B0	5,76	0,280139
VB-13.8.1 - B0	6,76	0,519237
VB-14.8.1 - B0	7,74	0,679216
VB-15.8.1 - B1	7,74	1,25638
VB-16.8.1 - B1	9,80	1,37244
VB-17.8.1 - B1	10,88	1,30286
VB-18.8.1 - B1	11,80	1,37366
VB-19.8.1 - B1	12,77	1,57058
VB-20.8.1 - B1	13,80	2,53673
VB-21.8.1 - B1	14,80	2,84974
VB-23.8.1 - B1	16,76	4,52852
VB-28.8.1 - B1	21,82	9,45382
VB-29.8.1 - B2	22,82	9,74553
VB-31.8.1 - B2	24,82	13,271
VB-1.9.1 - B2	25,82	12,8639
VB-2.9.1 - B2	26,77	12,8407
VB-3.9.1 - B2	27,76	12,7819
VB-4.9.1 - B2	28,82	14,9893
VB-5.9.1 - B2	29,82	11,5237
VB-6.9.1 - B2	32,76	11,7272
VB-9.9.1 - B2	33,76	13,6926
VB-11.9.1 - B2	35,92	13,9155
VB-16.9.1 - B3	40,92	18,3254

mMol de Cl- dans le réacteur 1
mg de PCP ajouté

Réacteur 2	Cl-			mMolaires	comptes externes	O2	Réacteur 2			Heures	Jours
	Heures	Jours	mVolts	potentiomètre							
6.8/12h15	20,5	0,85	229,2		0,11						
7.8/10h15	42,5	1,77	231,8		0,09						
8.8/10h30	66,75	2,78	262,9		0,02						
9.8/10h30	90,75	3,78	240,3		0,06						
11.8/9h35	137,83	5,74	227,3		0,12		6.8/12h15	20,5	0,85	100,00	
12.8/10h00	162,33	6,76	217,3		0,19		7.8/10h15	42,5	1,77	95,10	
13.8/10h00	186,33	7,76	197		0,52	0,5	8.8/10h30	66,75	2,78	86,01	
13.8/18h10	194,53	8,11	180		1,21		9.8/10h30	90,75	3,78	100,00	
14.8/9h35	209,83	8,74	167,4		2,25		10.8/11h30	115,75	4,82	64,39	
14.8/12h45	213,08	8,88	169,1		2,07		11.8/9h35	112,83	4,70	97,36	
14.8/17h30	218,08	9,09	168,8		2,10		12.8/10h00	137,33	5,72	83,71	
15.8/9h20	233,88	9,75	163,2		2,77		13.8/14h10	165,33	6,89	72,02	
15.8/12h00	236,58	9,86	162,9		2,81		13.8/18h10	169,53	7,06	75,40	
16.8/10h30	259,08	10,80	161,7		2,98		14.8/9h35	184,83	7,70	16,03	
17.8/12h30	285,08	11,88	153,3		4,52		14.8/12h45	188,08	7,84	76,28	
17.8/12h55	285,58	11,90	150,3		5,24		14.8/17h30	193,08	8,05	22,44	
18.8/10h30	307,08	12,80	145,6		6,81		15.8/9h20	208,88	8,70	26,47	
18.8/16h05	312,58	13,02	146,6		6,30		15.8/12h00	211,58	8,82	44,86	
19.8/10h	330,58	13,77	145,8		6,55		16.8/10h30	234,08	9,75	44,86	
19.8/16h	336,58	14,02	145,3		6,71		17.8/12h30	260,08	10,84	53,76	
20.8/10h30	355,08	14,80	145,8		6,55		18.8/10h30	281,58	11,73	52,10	
21.8/10h30	379,08	15,80	142,8		7,60		19.8/10h	299,58	12,48	8,25	
22.08 10h15	402,83	16,78	141		8,30		20.8/10h30	324,08	13,50	3,16	
23.8/9h45	426,33	17,76	138,4		9,44	7,61	21.8/10h30	348,08	14,50	17,60	
25.8/10h45	475,33	19,81	136,3		10,48		22.08 10h15	371,83	15,49	35,37	
26.8/10h30	499,08	20,80	131,1		13,55		25.8/10h45	444,83	18,53	58,50	
27.8/10h15	522,83	21,78	132,5		12,64	13,25	26.8/10h30	468,58	19,52	62,12	
28.8/11h	547,58	22,82	129		15,03		27.8/10h15	492,33	20,51	61,11	
29.8/11h	571,58	23,82	125,5		17,87		29.8/11h	541,33	22,56	45,15	

Si on suit les valeurs du laboratoire Zénon, il y a en fin d'expérience

125,082768 mMol de Cl- dans le réacteur 2

Les taux sont calculés ainsi:

taux moyen: quantité de PCP dégradé en un ajout sur le temps temps requis

taux maximum: pente maximale calculée à la main sur graphique excel

Réacteur 1

TAUX Moyens

	PCP ajouté	temps	Taux moyen
	mg/l	jours	mg/l/jour
Ajout 1	50	8,81	5,68
Ajout 2	60	3,1	19,35
Ajout 3	105	4,68	22,44
Ajout 4	98	2,98	32,89
Ajout 5	101	3,04	33,22
Ajout 6	230	14,88	15,46

Réacteur 2

TAUX Moyens

	PCP ajouté	temps	Taux moyen
	mg/l	jours	mg/l/jour
Ajout 1	26,00	5,85	4,44
Ajout 2	60,00	0,94	63,83
Ajout 3	43,00	0,86	50,00
Ajout 4	84,00	1,95	43,08
Ajout 5	47,00	0,89	52,81
Ajout 6	130,00	8,17	15,91
Ajout 7	123,00	4	30,75

Réacteur alimenté au NaPCP

R1 COMPTES PCP

NOM	ECHANTILLON	séquence	Indice	Min	Max	dilution	jours	Degradeur	min	max	+	-
A1R1	7-8-97	5-1-1	4	1	15	1,00E-04	2,00	4,00E+02	1,00E+02	1,50E+03	1,10E+03	3,00E+02
A2R1	17-8-97	5-5-2	500	200	2000	1,00E-05	12,00	5,00E+05	2,00E+05	2,00E+06	1,50E+06	3,00E+05
A3R1	20-8-97	4-1-2	26	12	63	1,00E-05	15,00	2,60E+04	1,20E+04	6,30E+04	3,70E+04	1,40E+04
A4R1	25-8-97	4-4-0	34	16	80	1,00E-05	20,00	3,40E+04	1,60E+04	8,00E+04	4,60E+04	1,80E+04
A6R1	1-9-97	5-1-0	30	10	120	1,00E-06	27,00	3,00E+05	1,00E+05	1,20E+06	9,00E+05	2,00E+05

R1 COMPTES TOTAUX

Indice	Min	Max	dilution	jours	Hétérotropes	min	max	+	-
900	300	1300	1,00E-06	12,00	9,00E+06	3,00E+06	1,30E+07	4,00E+06	6,00E+06
27	12	67	1,00E-07	15,00	2,70E+06	1,20E+06	6,70E+06	4,00E+06	1,50E+06
14	6	35	1,00E-08	20,00	1,40E+07	6,00E+06	3,50E+07	2,10E+07	8,00E+06
8	3	24	1,00E-09	27,00	8,00E+07	3,00E+07	2,40E+08	1,60E+08	5,00E+07
									1-9-97

Réacteur alimenté à la SPB

R2 COMPTES PCP

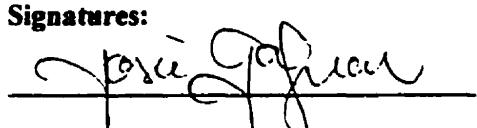
NOM	ECHANTILLON	séquence	Indice	Min	Max	dilution	jours	degradeurs de	LIM INF	LIMSUP	+	-
A1R2	7-8-97	5-3-3	170	80	410	1,00E-02	2,00	1,70E+02	8,00E+01	4,10E+02	2,40E+02	9,00E+01
A2R2	13-8-97	5-4-2	220	100	580	1,00E-05	8,00	2,20E+05	1,00E+05	5,80E+05	3,60E+05	1,20E+05
A3R2	14-8-97	5-4-2	220	100	580	1,00E-05	9,00	2,20E+05	1,00E+05	5,80E+05	3,60E+05	1,20E+05
A4R2	15-8-97	4-2-0	22	9	56	1,00E-05	10,00	2,20E+04	9,00E+03	5,60E+04	3,40E+04	1,30E+04
A5R2	17-8-97	4-1-0	17	7	46	1,00E-05	12,00	1,70E+04	7,00E+03	4,60E+04	2,90E+04	1,00E+04
A6R2	18-8-97	1-1-0	4	1	15	1,00E-05	13,00	4,00E+03	1,00E+03	1,50E+04	1,10E+04	3,00E+03
A7R2	27-8-97	5-0-0	23	9	86	1,00E-06	22,00	2,30E+05	9,00E+04	8,60E+05	6,30E+05	1,40E+05

R2 COMPTES TOTAUX

NOM	ECHANTILLON	Hétérotropes	LIM INF	LIMSUP	+	-	JOURS AU FRIGO	JOURS D'INC
A2R2	13-8-97	7,00E+06	3,20E+06	1,64E+07	9,40E+06	3,80E+06	2	69
A3R2	14-8-97	3,20E+09	1,20E+09	1,06E+10	7,40E+09	2,00E+09	1NUIT	69
A4R2	15-8-97	6,00E+08	2,00E+08	2,60E+09	2,00E+09	4,00E+08	5	64
A5R2	17-8-97	1,80E+09	6,00E+08	5,80E+09	4,00E+09	1,20E+09	3	64
A6R2	18-8-97	1,80E+09	6,00E+08	5,80E+09	4,00E+09	1,20E+09	2	64
A7R2	27-8-97	3,40E+09	1,40E+09	9,60E+09	6,20E+09	2,00E+09	8	49

R2 COMPTE HYDROCARBONOCLASTE

NOM	ECHANTILLON	Indice	Min	Max	dilution	Hydrocarbone	+	-	LIM INF	LIMSUP
A1R2	7-8-97	350	160	820	1,00E-02	3,50E+02	4,70E+02	1,90E+02	1,60E+02	8,20E+02
A2R2	13-8-97	1600	600	5300	1,00E-04	1,60E+05	3,70E+05	1,00E+05	6,00E+04	5,30E+05
A3R2	14-8-97	170	70	480	1,00E-06	1,70E+06	3,10E+06	1,00E+06	7,00E+05	4,80E+06
A4R2	15-8-97	9	3	24	1,00E-07	9,00E+05	1,50E+06	6,00E+05	3,00E+05	2,40E+06
A7R2	27-8-97	12	5	29	1,00E-07	1,20E+06	1,70E+06	7,00E+05	5,00E+05	2,90E+06

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16 E version 2	Pages:
Version: Officielle du mémoire, pour activation 2	Date Début: 13 novembre 1997
	Date fin
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par: Josée Gagnon	Signatures: 
	Date: 01/06/101
Titre: Production de sol activé pour la biodégradation du PCP, avec suivi intensif du pH Mots clés: Bioactivation, PCP, consortium indigène	

1. OBJECTIF(S)

Augmenter la masse et l'activité de dégradation d'un consortium bactérien indigène d'un sol légèrement contaminé au PCP par la technique des sols activés. En faire un suivi exhaustif.

2. MATÉRIELS

Mélange initial dans les réacteurs

1.6kg de sol 7 tamisé à 2mm

16 litres de solution MSM: Pour un litre se solution

6,4 ml NaH₂PO₄ (1M)

12,99ml K₂HPO₄ (1M)

8,33 ml (NH₄)₂SO₄ (1M)

0,78 ml MgSO₄·7H₂O (1M)

11,79 ml NaNO₃ (1M)

1ml Métaux traces

(0,29g/L Co(NO₃)₂·6H₂O, 0,47 g/L AlK(SO₄)₂·12H₂O, 0,16 g/L CuSO₄, 0,29 g/L ZnSO₄·7H₂O, 2,78 g/L FeSO₄·7H₂O, 1,69 g/L MnSO₄·H₂O, 0,48 g/L Na₂MoO₄·2H₂O)

Solutions activantes :

Réacteur 1, solution de NaPCP 16 g de PCP/litre de NaOH 0,25 N

Réacteur 2, solution de préservation du bois diluée à 11g de PCP par litre avec du NaOH 0,25N

Comptes microbiens :

Solution Nutrient Broth (8g/l)

Solution saline pour hexadécane (recette dans le PE 8A) + 50 µl d'hexadécane

Solution de 20 mg/l de PCP dans du MSM

Essais de minéralisation en microcosmes :

Réacteur 1:

4 microcosmes par essai de minéralisation. Un essai de minéralisation du PCP sera fait avant chaque ajout (donc 7 essais au PCP), puis deux essais de minéralisation de l'hexadécane seront effectués au court de l'activation (un au début, puis un à la fin).

Réacteur 2 :

Un essai de minéralisation du PCP et un de hexadécane sera fait avant chaques ajouts, donc deux fois 7 essais.

Besoins en ¹⁴C-PCP : 56 microcosmes de 100 000 dpm, plus les contrôles = 7 000 000 dpm

Besoins en ¹⁴C-Hexadécane : 36 microcosmes de 100 000 dpm, plus les contrôles = 4500000 dpm

Prise du pH :

pH-mètre et électrode

Oxygène dissout :

Sonde à oxygène

Concentration en ions chlorures :

Appareils: HPLC ionique, potentiomètre

Petite bouteille de 2 ml à échantillon du HPLC

seringue et unité filtrante et filtre de Teflon de 0.5µm

Électrode combinée pour ions chlorures

ISA (solution stabilisante) (NaNO₃ 5M)

Concentration en PCP :

Dichlorométhane (HPLC grade)

Méthanol (HPLC grade)

H₂SO₄ 1N

NaOH 1N

Vial de 20 ml en verre avec bouchon aliminium

Pipette pasteur

Agitateur Wrist Action

HPLC Spectra- Physics SP AS 3000 détecteur UV réglé à 214 nm

Petite bouteille de 2ml pour échantillons

Seringue et unité filtrante avec filtres de Téflon de 0.5µm

Volume des boues

Bâton gradué que l'on introduit par le port d'échantillonnage indiquant la hauteur du liquide.

Concentration en C₁₀-C₅₀:

Bouteille à échantillonnage pour envoi à l'extérieur

3. MÉTHODOLOGIE

Mélange initial dans les réacteurs :

La concentration en sol dans les réacteurs sera de 10% w/v, 0.8 kg de sol préalablement tamisé à 2 mm sera mélangé à 8 litres de milieu salin minéral (MSM). Dès le mélange fait, un échantillon de 5ml sera pris afin de déterminer la concentration en PCP du slurry ainsi que son pH, sa concentration en ions chlorures. Puis des échantillons de 10ml seront pris afin d'effectuer des comptes cellulaires et des essais de minéralisation.

Protocole(s) utilisé(s) :PE 16C, PSOAS, PE 16D

Ajout des Solutions activantes :

Les ajouts de solutions activantes se feront chaque fois que la concentration en PCP dans la phase aqueuse sera près de 0,5mg/L. Les concentrations en PCP rajoutées sont les suivantes, la première sera de 50mg/L puis les autres seront 3 ajouts de 100mg/L, puis deux de 200mg/l et un dernier de 250mg/L. Avant le premier ajout, on laissera la concentration en PCP dans le mélange initial redescendre à zéro avant de procéder au premier ajout.

La préparation des mélanges contenant le PCP devra être vérifiée en mesurant la concentration en PCP et en ions chlorures du mélange avant les ajouts par HPLC en triplicatas.

Réacteur 1, le réacteur sera activé par une solution de NaPCP à 16g/litre dans du NaOH 0,25N, les différentes mesures dans le temps seront effectuées afin de vérifier les possibilités de précipitation, l'hétérogénéité etc.

Réacteur 2 L'activation à l'huile de préservation de bois se fera à l'aide d'une solution diluée de la solution d'origine. La solution d'origine (40 g/L) a été amenée à 11 g/L par dilution dans du NaOH (0,25 N)

La présence de la phase organique de l'huile de préservation interfère avec la lecture au HPLC et est dommageable pour la colonne, une étape de pré-traitement des échantillons devra être effectuée avant la lecture au HPLC. Se référer au PE16H.

Moins de 5 minutes après l'ajout, un échantillon sera pris afin de mesurer la concentration en PCP dans le réacteur et ainsi déterminer l'importance de l'adsorption.

Afin de garder un pH constant, du NaOH 0.25N sera rajouté chaque fois que le pH du réacteur sera en dessous de 7.

Tableau des quantités d'ajouts pour les deux réacteurs:

	Concentration désirée (mg/l)	Volume rajouté (ml) NaPCP	Volume ajouté (ml) SPB
Ajout 1	50	30	35
Ajout 2	100	60	70
Ajout 3	100	60	70
Ajout 4	100	60	70
Ajout 5	200	120	140
Ajout 6	200	120	140
Ajout 7	250	180	210

Attention les volumes devront être révisé avec le changement de volume de slurry dans les réacteurs

Comptes microbiens :

Des comptes microbiens seront effectués avant chaque ajout, mais un peu avant que la concentration de PCP n'ait atteint zéro. Important: les comptes devront être effectués le jour même ou le lendemain de l'échantillonnage afin de ne pas modifier l'échantillon. Les solutions de croissance pourront être préparées d'avance du moment qu'elles soient autoclavées tout de suite après leur préparation.

Réacteur 1 : Hétérotrophes totaux et dégradeurs de PCP, 2 points des dégradeurs d'hexadécane (début et fin)

Réacteur 2 : Hétérotrophes totaux, hydrocarbonoclastes et dégradeurs de PCP

Identification des échantillons :

hétérotrophes totaux : A (no de l'ajout)T(jour).(mois).(réacteur)

sélectifs PCP: A(no Ajout)P(jour).(mois).(réacteur)

sélectifs hexadécane: A(no Ajout)H(jour).(mois).(réacteur)

*Idée : sur un des comptes, prendre deux mesures, une de la façon traditionnelle et une après avoir laissé décanté le slurry. Afin de vérifier la différence de densité bactérienne avec et sans les particules de sol.

Protocole(s) utilisé(s) : PSO A12, PE 16D, PE 8A

Minéralisation en microcosmes :

Des essais de minéralisation en microcosmes seront faits aussi avant chaque ajout, au même moment que les comptes afin de pouvoir relier la croissance et la minéralisation. Les microcosmes seront constitués, de 10 ml de la solution boueuse des réacteurs, du contaminant radioactif (100 000 dpm par microcosme). Du PCP non radiomarqué (mélange 14gPCP NaOH 0.25N) sera ajouté aux microcosmes qui contiendront du ¹⁴C-PCP à une concentration de 20 mg/L. Des concentrations supérieures (50 mg/L) ont inhibé la minéralisation dans les essais antérieurs. Les échantillons prélevés pour effectuer les essais de minéralisation ne sont pas des boues 10% p/v mais de concentration inférieure, les ajouts de PCP ne sont donc pas autant adsorbés par les particules de sol et provoque un choc toxique.

Le réacteur 1 sera l'objet d'essai de minéralisation avec le ¹⁴C-PCP ainsi que de deux essais avec de l'hexadécane radiomarqué (début et fin). Le réacteur 2 contenant de l'huile de préservation sera sujet à deux types d'essai en microcosme, avec le ¹⁴C-PCP et le ¹⁴C-Hexadécane. L'échantillonnage des microcosmes se fera deux fois par jour ou selon la rapidité de la minéralisation dans le but d'obtenir le taux de minéralisation maximum le plus précis possible.

Identification des échantillons :

sélectifs PCP: A(no de l'ajout)P(jour).(mois).(réacteur)

sélectifs hexadécane: A(no de l'ajout)H (jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé (s) : PSO A10, PE 16G

Échantillonnages :

- Un échantillon de 10 ml sera prélevé dans des vials à scintillation tous les jours et congelé (-20°C). Ces échantillons serviront aux analyses externes ou comme échantillons de secours si le besoin d'analyses supplémentaires se fait sentir.
- Deux échantillons de 5 à 10 ml sont prélevés (vials à scintillation) chaque jour afin de permettre la mesure des différents paramètres suivis.

Mesures journalières :

Plusieurs analyses seront effectuées à partir d'un même échantillonnage (5 ml dans un vial à scintillation ordre très important):

1. L'oxygène dissout sera tout de suite mesuré,
2. Puis le pH mesuré par potentiométrie
3. Le chlore mesuré par potentiométrie. (après ajout de 0,2ml de ISA par 10 ml de slurry)
4. De 1 à 2 ml seront ensuite prélevé au vial du réacteur 1 pour fin d'analyse de la concentration en PCP par HPLC. Ce genre d'échantillonnage pourra être effectué plusieurs fois par jour, notamment à la suite d'un ajout de solution activante.
5. Puis, dans le cas du réacteur 1, 1 ml de ce même échantillon sera filtré sur 0,5 microns pour fins d'analyse des ions Cl- au HPLC ionique.
6. Pour le réacteur 2, 2 fois 3ml de slurry seront prélevé et soumis à l'extraction décrite au PE 16H.

Oxygène dissout :

L'oxygène dissout sera mesuré une fois par jour afin de vérifier si le mélange est saturé en oxygène. La calibration se fait avant la lecture des échantillons, en faisant bulle de l'air pendant 20 minutes dans un bêcher d'eau distillée en laissant la sonde dans l'eau jusqu'à ce que la lecture se stabilise. Cette lecture correspond à une saturation de 100% en air (et non oxygène). Le zéro est vérifié en débranchant la sonde du lecteur.

Le débit d'air dans les réacteurs sera ajusté au fur et à mesure, en fonction des besoins du mélange. Concentration visée > 2 mg/L correspond, à 23°C, à ~>50 %

Prise du pH :

Le pH sera suivi plusieurs fois par jour puisqu'il pourra nous servir d'indicateur de la concentration en PCP dans les réacteurs. Le pH influence directement la dissolution du PCP. Se référer au PE 16J.

Le contrôle du pH se fera, au besoin, par ajout de NaOH 1N ou de H₂SO₄ 1N

Protocole(s) utilisé (s) : PSO A5

Concentration en ions chlorures :

Un échantillon de 1ml du réacteur 1 sera envoyé pour fin d'analyse au HPLC ionique dans une petite bouteille pour HPLC, les échantillons seront pris chaque jour et entreposés dans la chambre à 4°C afin d'en envoyer plusieurs à la fois. L'huile ne pouvant être introduite dans le HPLC ionique, des échantillons congelés du réacteur 2 seront envoyés dans un laboratoire extérieur.

En parallèle une lecture sera prise avec l'électrode disponible au A-682 dans un échantillon de 5 ml tel que mentionné précédemment.

Identification des échantillons : Cl-(jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé (s) : PE 16C, PSO G

Concentration en PCP :

Suivi pluri-journalier de la concentration en PCP dans la phase aqueuse, de 2 à 3 échantillonnages par jour seront nécessaires afin de bien suivre l'évolution de la disparition du PCP. Un échantillon de 3ml prélevé à la seringue de l'échantillon principal (5ml) puis filtré sur filtre Téflon de 0,5µm , est passé dans le HPLC suivant le protocole PCPcourt de 1998 (voir cahier du HPLC). Un pré-traitement des échantillons pouvant endommager la colonne devra être fait.

Pré-traitement des échantillons. PE16H

Identification des échantillons : VALPCP(jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé (s) : PE 16C, PSO G10

Volume des boues

La hauteur du liquide sera mesurée dans chaque réacteur tous les jours et avant et après chaque ajout afin d'en connaître la variation du volume et ainsi faire un bon bilan de masse. Un bâton de verre gradué sera introduit dans le port d'échantillonnage afin de mesurer la hauteur du liquide.

Concentration en C₁₀-C₅₀ :

Envoyé à l'extérieur selon les échantillons disponibles ainsi que la limitation du budget.

Identification des échantillons : VALC10-C50 (jour).(mois).(réacteur)

Protocole(s) utilisé (s) : PSO G

3.1 Bilans

À la fin de la période d'activation, une analyse du sol du fond des réacteurs sera faite afin de déterminer sa contamination par rapport à celle du début de l'activation. Concentrations en PCP, C₁₀-C₅₀, et Cl-. De plus des échantillons de 10 ml composé de 5 fois 2ml pris à des

hauteur s et des endroits différents des réacteurs seront prélevés afin de faire des analyses de C₁₀-C₅₀ et de PCDD/DF. Ces informations supplémentaires permettront de faire un bilan de masse complet sur l'ensemble de chacun des réacteurs.

4. RÉFÉRENCES

PSO A5, PSO A10, PSO A12, PSO G10, PE 16 A, B, C, D, F, H, K

Barbeau, C. (1996). Bioaugmentation de sols contaminés au pentachlorophénol par la méthode des sols activés. École Polytechnique, Génie civil. Montréal, Université de Montréal.

Otte, M.-P., Gagnon, J., Comeau, Y., N., M., Greer, C. et Samson, R. (1994). Activation of an Indigenous Microbial Consortium for Bioaugmentation of Pentachlorophenol/creosote Contaminated Soils. Appl. Microbial Biotechnol 40, 926-932.

5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Les modifications au protocole ont été faites à la lumière des résultats de la première activation. Les points importants qu'il faudra suivre sont le pH, la minéralisation et les comptes microbiens. Il faudra aussi s'assurer des concentrations en ions chlorures contenues dans tous les ajouts faits aux réacteurs afin de pouvoir produire un bilan molaire satisfaisant.. Les principaux résultats de cette expérimentation se retrouvent en annexe sous forme de feuilles de calculs.

6. ANNEXES:

Résultats Activation 2

Réacteur 1 Activation au NaPCP

jour	heure	jours	pH	PCP
02-avr	11h00	0,00	0,0	A 0
02-avr	13h00	0,17	7,08	0,0
03-avr	10h00	1,04	7,11	0,0
04-avr	16h00	2,29	7,12	0,0
05-avr	19h00	3,42	7,12	0,0
06-avr	12h00	4,13	7,13	0,0
06-avr	14h00	4,21	7,26	36,1 A 1
07-avr	10h00	5,13	7,23	37,6
08-avr	10h15	6,13	7,29	37,6
08-avr	17h00	6,42	7,21	31,7
09-avr	10h30	7,15	7,19	34,2
09-avr	17h00	7,42	7,19	30,5
10-avr	10h30	8,15	7,18	39,4
10-avr	17h00	8,42	7,18	31,7
11-avr	14h30	9,31	7,18	38,6
12-avr	14h	10,29	7,19	35,5
13-avr	10h30	11,15	7,18	34,3
14-avr	11h30	12,19	7,17	31,3
14-avr	17h30	12,44	7,16	28,7
15-avr	10h30	13,15	7,17	22,1
16-avr	13h30	14,27	7,12	0,0
17-avr	11h30	15,15	7,15	0,0
17-avr	16h30	15,35	7,27	121,7 A 2
18-avr	11h00	16,13	7,23	107,2
19-avr	9h00	17,04	7,36	87,5
19-avr	23h00	17,63	7,28	84,5
20-avr	10h00	18,08	7,38	101,0
20-avr	17h30	18,40	7,22	83,4
21-avr	10h00	19,08	7,26	73,4
21-avr	17h	19,38	7,21	73,4
22-avr	10h	20,08	7,22	85,3
22-avr	21h	20,54	7,25	73,6
23-avr	10h	21,08	7,23	60,1
23-avr	21h	21,54	7,18	47,9
24-avr	10h30	22,06	7,12	5,6
24-avr	21h30	22,52	7,13	0,3
25-avr	12h00	23,13	7,14	0,0
26-avr	15h	24,25	7,12	0,0
26-avr	16h15	24,30	7,24	88,2 A 3
27-avr	11h30	25,10	7,27	101,0
27-avr	22h30	25,56	7,24	83,9
28-avr	10h30	26,06	7,23	77,3
29-avr	10h	27,04	7,25	92,0
29-avr	21h30	27,52	7,22	70,3
30-avr	10h	28,04	7,19	50,3
30-avr	21h30	28,52	7,21	16,5
01-mai	9h30	29,02	7,2	0,7
02-mai	9h	30,00	7,13	0,0
02-mai	15h30	30,27	7,24	111,0 A 4
03-mai	12h30	31,15	7,21	72,3
03-mai	22h30	31,56	7,21	83,2
04-mai	11h30	32,10	7,21	62,9
04-mai	20h30	32,48	7,15	61,8
05-mai	10h	33,08	7,16	30,1
05-mai	22h30	33,48	7,25	26,2
06-mai	9h30	34,06	7,24	9,9
06-mai	22h30	34,48	7,22	0,0

jour	heure	jours	pH	PCP
07-mai	10h	35,08	7,22	0,0
07-mai	14h	35,25	7,44	175,2 A 5
08-mai	9h30	36,06	7,43	189,1
08-mai	23h30	36,65	7,42	195,4
09-mai	13h30	37,23	7,42	205,2
10-mai	1h15	37,70	7,41	190,8
10-mai	19h15	38,45	7,42	203,4
11-mai	1h	39,10	7,42	162,5
12-mai	22h30	40,58	7,42	162,4
13-mai	9h45	41,05	7,4	182,7
13-mai	23h30	41,60	7,43	159,5
14-mai	10h	42,06	7,43	148,6
14-mai	22h30	42,58	7,4	140,1
15-mai	11h	43,10	7,39	144,2
16-mai	13h	44,27	7,39	158,9
17-mai	11h	45,10	7,35	143,4
17-mai	23h	45,60	7,37	131,3
18-mai	21h	46,52	7,35	115,7
19-mai	9h30	47,04	7,33	113,3
19-mai	21h	47,52	7,31	102,0
20-mai	9h30	48,04	7,27	82,9
20-mai	21h30	48,54	7,23	43,0
21-mai	9h30	49,04	7,21	17,3
22-mai	9h30	50,04	7,19	0,4
22-mai	9h35	50,06	7,42	166,5 A 6
22-mai	18h	50,40	7,42	177,3
23-mai	9h30	51,04	7,42	180,9
23-mai	23h30	51,63	7,41	170,7
24-mai	13h	52,19	7,41	164,6
24-mai	22h30	52,58	7,41	138,8
25-mai	9h30	53,04	7,38	153,9
25-mai	20h30	53,50	7,36	151,1
26-mai	9h15	54,04	7,35	176,1
27-mai	9h30	55,04	7,33	124,1
27-mai	18h	55,40	7,34	115,4
28-mai	10h	56,06	7,31	113,6
28-mai	18h	56,40	7,3	113,0
29-mai	9h30	57,04	7,3	95,2
29-mai	18h	57,40	7,25	69,8
30-mai	11h30	58,17	7,21	59,5
30-mai	20h30	58,54	7,18	10,5
31-mai	11h	59,15	7,19	3,2
31-mai	21h30	59,58	7,19	0,0
01-juin	9h30	60,08	7,18	0,7
01-juin	9h45	60,09	7,55	264,9 A 7
02-juin	9h30	61,08	7,54	296,6
03-juin	10h	62,10	7,51	277,3
03-juin	17h30	62,42	7,5	280,7
04-juin	10h	63,10	7,51	293,0
04-juin	19h30	63,50	7,5	279,5
05-juin	10h	64,10	7,5	241,0
05-juin	20h30	64,54	7,5	239,2
06-juin	12h30	65,21	7,51	283,0
07-juin	16h30	66,38	7,49	271,6
08-juin	9h30	67,04	7,48	303,2
08-juin	18h30	67,42	7,48	310,1
09-juin	10h	68,10	7,5	302,5

Réacteur 2 Activation à l'huile de présel					jour	heure	jours	pH	PCP	jour	heure	jours	pH	PCP
					08-mai	23h30	36,63	7,06	69,9	11-juin	18h	70,42	7,39	224,0
					09-mai	13h30	37,21	7,07	55,1	12-juin	10h	71,08	7,41	182,7
					10-mai	1h15	37,68	7,05	39,1	12-juin	18h	71,42	7,41	
					10-mai	19h15	38,43	7,02	3,7	13-juin	16h	72,06	7,36	234,8
					11-mai	11h	39,08	7,05	2,0	15-juin	9h30	73,75	7,37	
					12-mai	10h	40,04	6,96	1,3	15-juin	17h30	74,08	7,39	
					12-mai	10h30	40,06	7,1	182,3	16-juin	10h	74,77	7,39	
					12-mai	22h30	40,58	7,12	180,8	16-juin	18h	75,11	7,38	
					13-mai	9h45	41,05	7,12	173,2	17-juin	10h	75,77	7,39	
					13-mai	23h30	41,60	7,13	156,8	17-juin	17h30	76,08	7,4	
					14-mai	10h	42,06	7,15	148,4	18-juin	10h	76,77	7,39	
					14-mai	22h30	42,58	7,16	141,2	19-juin	10h	77,77	7,38	
					15-mai	11h	43,08	7,16	137,0	21-juin	18h	80,11	7,39	
					16-mai	13h	44,25	7,18	128,8	22-juin	10h	80,77	7,37	224,5
					17-mai	11h	45,08	7,16	130,8	23-juin	9h30	81,75	7,37	254,5
					17-mai	23h	45,58	7,17	124,8	23-juin	18h	82,11	7,35	218,5
					18-mai	21h	46,50	7,17	114,0	24-juin	13h	82,81	7,33	242,6
					19-mai	9h30	47,02	7,15	81,5	25-juin	10h	83,86	7,26	
					19-mai	21h	47,50	7,11	60,7	26-juin	10h	84,69	7,24	
					20-mai	9h30	48,02	7,06	27,7	29-juin	10h	86,71	7,24	
					20-mai	21h30	48,52	7,03	6,4					
					21-mai	9h30	49,02	7,05	2,7					
					21-mai	14h45	49,20	7,16	158,3					
					22-mai	9h30	50,02	7,07	139,8					
					22-mai	18h	50,38	7,16	137,2					
					23-mai	9h30	51,02	7,16	138,7					
					23-mai	23h30	51,60	7,18	131,2					
					24-mai	13h	52,17	7,2	126,5					
					24-mai	22h30	52,56	7,22	107,6					
					25-mai	9h30	53,02	7,21	102,2					
					25-mai	20h30	53,48	7,18	93,6					
					26-mai	9h15	54,02	7,2	92,0					
					27-mai	9h30	55,02	7,2	72,0					
					27-mai	18h	55,38	7,2	38,3					
					28-mai	10h	56,04	7,17	10,9					
					28-mai	18h	56,38	7,14	4,2					
					29-mai	9h30	57,02	7,15	3,4					
					29-mai	18h	57,38	7,16	3,1					
					30-mai	11h30	58,15	7,14	3,4					
					30-mai	20h30	58,52	7,11	3,5					
					31-mai	11h	59,13	7,21	257,1					
					31-mai	11h30	59,56	7,35	255,9					
					31-mai	21h30	60,06	7,25	231,9					
					01-juin	9h30	60,07	7,31	249,7					
					02-juin	9h30	61,06	7,36	242,5					
					03-juin	10h	62,08	7,38	227,6					
					03-juin	17h30	62,40	7,38	219,9					
					04-juin	10h	63,08	7,39	235,9					
					04-juin	19h30	63,48	7,37	227,5					
					05-juin	10h	64,08	7,4	211,8					
					05-juin	20h30	64,52	7,38	233,4					
					06-juin	12h30	65,19	7,38	186,1					
					07-juin	16h30	66,35	7,39	209,3					
					08-juin	9h30	67,02	7,39	233,7					
					08-juin	18h30	67,40	7,41	210,6					
					09-juin	10h	68,08	7,42	209,4					
					09-juin	18h	68,38	7,4	218,2					
					10-juin	10h	69,08	7,41	209,2					
					10-juin	17h30	69,40	7,41	217,2					
					11-juin	9h30	70,06	7,41	209,0					

Réacteur 1 Activation au NaPCP

jour	heure	jours	Cl-	Cl-	HPLC
02-avr	11h00	0,00	,mV	mMol	mMol
02-avr	13h00	0,17	191,5	0,87	0,72
03-avr	10h00	1,04	185,1	1,16	0,95
04-avr	16h00	2,29	192,1	0,85	0,70
05-avr	19h00	3,42			
06-avr	12h00	4,13	172,8	1,99	1,63
06-avr	14h00	4,21			
07-avr	10h00	5,13	181	1,39	1,14
08-avr	10h15	6,13	175,5	1,77	1,45
08-avr	17h00	6,42	149,4	5,59	4,58
09-avr	10h30	7,15	174,7	1,83	1,50
09-avr	17h00	7,42			
10-avr	10h30	8,15	200,8	0,58	0,47
10-avr	17h00	8,42	200,9	0,58	0,47
11-avr	14h30	9,31	181	1,39	1,14
12-avr	14h	10,29	200,6	0,58	0,48
13-avr	10h30	11,15	212,7	0,34	0,28
14-avr	11h30	12,19	172	2,06	1,69
14-avr	17h30	12,44			
15-avr	10h30	13,15	197,1	0,68	0,56
16-avr	13h30	14,27	179,1	1,51	1,24
17-avr	11h30	15,15	181,3	1,37	1,12
17-avr	16h30	15,35	166,7	2,61	2,14
18-avr	11h00	16,13	176,7	1,68	1,37
19-avr	9h00	17,04	176,8	1,67	1,37
19-avr	23h00	17,63	163,6	2,99	2,45
20-avr	10h00	18,08	179,5	1,48	1,21
20-avr	17h30	18,40	165,4	2,76	2,26
21-avr	10h00	19,08	170,9	2,16	1,78
21-avr	17h	19,38	162	1,33	1,09
22-avr	10h	20,08	171	2,16	1,77
22-avr	21h	20,54	171,2	2,14	1,75
23-avr	10h	21,08	168,9	2,36	1,94
23-avr	21h	21,54	153	4,77	3,91
24-avr	10h30	22,06	153,2	4,73	3,87
24-avr	21h30	22,52	146,6	6,32	5,18
25-avr	12h00	23,13	154	4,56	3,74
26-avr	15h	24,25	149	5,69	4,86
26-avr	16h15	24,30	152	4,98	4,09
27-avr	11h30	25,10	151,7	5,05	4,14
27-avr	22h30	25,56	147	6,21	5,09
28-avr	10h30	26,06	149	5,69	4,86
29-avr	10h	27,04	150	5,44	4,46
29-avr	21h30	27,52	143,8	7,15	5,86
30-avr	10h	28,04	158	3,82	3,14
30-avr	21h30	28,52	142,3	7,64	6,27
01-mai	9h30	29,02	143,2	7,34	6,02
02-mai	9h	30,00	141	8,09	6,64
02-mai	15h30	30,27	139,2	8,76	7,18
03-mai	12h30	31,15	142,7	7,51	6,16
03-mai	22h30	31,56	140,4	8,31	6,81
04-mai	11h30	32,10	137,5	9,44	7,74
04-mai	20h30	32,48	139,5	8,65	7,09
05-mai	10h	33,08	137,4	9,48	7,78
05-mai	22h30	33,48	137,7	9,36	7,68
06-mai	9h30	34,06	136	10,09	8,27

Ajout 1

Ajout 2

Ajout 3

Ajout 4

jour	heure	jours	mV	mMol	HPLC
06-mai	22h30	34,48	134,9	10,59	8,68
07-mai	10h	35,08	133,8	11,12	9,12
07-mai	14h	35,25	135,2	10,45	8,57
08-mai	9h30	36,06	134,3	10,87	8,92
08-mai	23h30	36,65	133	11,52	9,44
09-mai	13h30	37,23	134,9	10,59	8,68
10-mai	1h15	37,70	133,8	11,12	9,12
10-mai	19h15	38,45	135,5	10,31	8,46
11-mai	11h	39,10	136	10,09	8,27
12-mai	10h	40,06	135,6	10,27	8,42
12-mai	22h30	40,58	135,6	10,27	8,42
13-mai	9h45	41,05	134,3	10,87	8,92
13-mai	23h30	41,60	136,2	10,00	8,20
14-mai	10h	42,06	135,6	10,27	8,42
14-mai	22h30	42,58	136,9	9,70	7,95
15-mai	11h	43,10	137,2	9,57	7,85
16-mai	13h	44,27	135,7	10,22	8,38
17-mai	11h	45,10	136,7	9,78	8,02
17-mai	23h	45,60	137	9,65	7,92
18-mai	21h	46,52	136,2	10,00	8,20
19-mai	9h30	47,04	133,3	11,36	9,32
19-mai	21h	47,52	133,7	11,17	9,16
20-mai	9h30	48,04	134,2	10,92	8,96
20-mai	21h30	48,54	130,5	12,86	10,54
21-mai	9h30	49,04	130,2	13,03	10,68
22-mai	9h30	50,04	130	13,14	10,78
22-mai	9h35	50,06	128,9	13,80	11,31
22-mai	18h	50,40	129,2	13,62	11,17
23-mai	9h30	51,04	128,3	14,17	11,62
23-mai	23h30	51,63	127,3	14,81	12,14
24-mai	13h	52,19	128,2	14,23	11,67
24-mai	22h30	52,58	128,6	13,98	11,47
25-mai	9h30	53,04	128,9	13,80	11,31
25-mai	20h30	53,50	125,6	15,96	13,09
26-mai	9h15	54,04	128,1	14,29	11,72
27-mai	9h30	55,04	128	14,36	11,77
27-mai	18h	55,40	129	13,74	11,26
28-mai	10h	56,06	127,8	14,48	11,88
28-mai	18h	56,40	125,7	15,89	13,03
29-mai	9h30	57,04	126,3	15,47	12,69
29-mai	18h	57,40	125,5	16,03	13,14
30-mai	11h30	58,17	124	17,13	14,04
30-mai	20h30	58,54	123,5	17,51	14,36
31-mai	11h	59,15	123,9	17,20	14,11
31-mai	21h30	59,58	124,2	16,98	13,92
01-juin	9h30	60,08	124,2	16,98	13,92
01-juin	9h45	60,09	123,4	17,59	14,42
02-juin	9h30	61,08	123,5	17,51	14,36
03-juin	10h	62,10	123,7	17,35	14,23
03-juin	17h30	62,42	121,5	19,12	15,68
04-juin	10h	63,10	123,6	17,43	14,29
04-juin	19h30	63,50	121,4	19,21	15,75
05-juin	10h	64,10	121,5	19,12	15,68
05-juin	20h30	64,54	124,3	16,90	13,86
06-juin	12h30	65,21	124,2	16,98	13,92
07-juin	16h30	66,38	123,4	17,59	14,42
08-juin	9h30	67,04	123,1	17,82	14,61

Ajout 5

Ajout 6

Ajout 7

Réacteur 1 Activation au NaPCP (suite)

jour	heure	jours	mV	mmol	HPLC
08-juin	18h30	67,42	120	20,43	16,75
09-juin	10h	68,10	122,1	18,62	15,27
09-juin	18h	68,40	123,5	17,51	14,36
10-juin	10h	69,10	122,8	18,06	14,81
10-juin	17h30	69,42	119,7	20,70	16,98
11-juin	9h30	70,08	121,8	18,87	15,47
11-juin	18h	70,44	123,7	17,35	14,23
12-juin	10h	71,10	121,5	19,12	15,68
12-juin	18h	71,44	123,6	17,43	14,29
13-juin	16h	72,08	121,4	19,21	15,75
15-juin	9h30	73,77	121,5	19,12	15,68
15-juin	17h30	74,11	124,3	16,90	13,86
16-juin	10h	74,79	124,2	16,98	13,92
16-juin	18h	75,13	123,4	17,59	14,42
17-juin	10h	75,79	123,1	17,82	14,61
17-juin	17h30	76,11	120	20,43	16,75
18-juin	10h	76,79	122,1	18,62	15,27
19-juin	10h	77,79	123,5	17,51	14,36
21-juin	18h	80,13	122,8	18,06	14,81
22-juin	10h	80,79	122,1	18,62	15,27
23-juin	9h30	81,77	123,5	17,51	14,36
23-juin	18h	82,13	122,8	18,06	14,81
24-juin	13h	82,83	119,7	20,70	16,98
25-juin	14h	83,88	121,8	18,87	15,47
26-juin	10h	84,71	123,7	17,35	14,23
29-juin	10h	86,71	121,5	19,12	15,68
30-juin	17h30	88,02	123,6	17,43	14,29
01-juil	14h	88,88	121,4	19,21	15,75
02-juil	11h	89,88	121,4	19,21	15,75

Réacteur 2 Activation à l'huile de préservation

jour	heure	jours	Cl-	mMol	
02-avr	11h00	0,00		0,9	Ajout 0
02-avr	13h00	0,17	182,8	1,05	
03-avr	10h00	1,04	182,3	1,07	
04-avr	16h00	2,29	186,3	0,90	
05-avr	19h00	3,42			
06-avr	12h00	4,13	187,7	0,85	Ajout 1
06-avr	14h00	4,21	168,1	2,01	
07-avr	10h00	5,13	173	1,62	
08-avr	10h15	6,13	176,8	1,37	
08-avr	17h00	6,42	173,6	1,58	
09-avr	10h30	7,15	177,4	1,33	
09-avr	17h00	7,42			
10-avr	10h30	8,15	193,1	0,67	
10-avr	17h00	8,42	209,1	0,33	
11-avr	14h30	9,31	214	0,27	
12-avr	14h	10,29	217	0,23	
13-avr	10h30	11,15	213	0,28	
14-avr	11h30	12,19	205,6	0,38	
14-avr	17h30	12,44			
15-avr	10h30	13,15	203,3	0,43	
16-avr	13h30	14,27	213	0,28	
17-avr	11h30	15,15	190,9	0,73	
17-avr	17h00	15,38	178,3	1,28	
18-avr	11h00	16,13	176,7	1,37	
19-avr	9h00	17,04	176,1	1,41	
19-avr	23h00	17,63	183,1	1,04	
20-avr	10h00	18,08	160,1	1,18	Ajout 2
20-avr	14h30	18,40	165,4	2,28	
21-avr	10h00	19,08	176	1,42	
21-avr	17h	19,38	170	1,85	
22-avr	10h	20,08	172	1,69	
22-avr	21h	20,54	171,9	1,70	
23-avr	10h	21,08	167,6	2,05	
23-avr	21h	21,54	167,8	2,04	
24-avr	10h30	22,06	160,3	2,83	
24-avr	21h30	22,52	162	2,63	
25-avr	12h00	23,13	158	3,14	
26-avr	15h	24,25	153	3,91	
27-avr	11h30	25,10	151,8	4,12	
27-avr	22h30	25,56	146	5,32	
28-avr	10h30	26,06	150,6	4,35	
28-avr	11h30	26,10	151	4,27	Ajout 3
29-avr	10h	27,04	152,5	4,00	
29-avr	21h30	27,52	152,3	4,03	
30-avr	10h	28,04	157,6	3,19	
30-avr	21h30	28,52	151	4,27	
01-mai	9h30	29,02	152,8	3,94	
02-mai	9h	30,00	146,6	5,18	
03-mai	12h30	31,13	139,5	7,09	
03-mai	22h30	31,54	143	6,08	
04-mai	11h30	32,08	139,9	6,97	
04-mai	20h30	32,46	140,2	6,87	
05-mai	10h	33,06	142,1	6,32	Ajout 4
05-mai	16h00	33,31	142,1	6,32	
05-mai	22h30	33,46	141,4	6,52	
06-mai	9h30	34,04	141,7	6,43	

jour	heure	jours	Cl-	mMol	
06-mai	22h30	34,46	139,6	7,06	
07-mai	10h	35,06	140,5	6,78	
08-mai	9h30	36,04	138,3	7,47	
08-mai	23h30	36,63	139,5	7,09	
09-mai	13h30	37,21	138,9	7,28	
10-mai	1h15	37,68	137,6	7,71	
10-mai	19h15	38,43	136,8	7,99	
11-mai	11h	39,08	134,9	8,68	
12-mai	10h	40,04	134,5	8,84	
12-mai	10h30	40,06	135	8,65	Ajout 5
12-mai	22h30	40,58	134,3	8,92	
13-mai	9h45	41,05	134,8	8,72	
13-mai	23h30	41,60	136,7	8,02	
14-mai	10h	42,06	137,7	7,68	
14-mai	22h30	42,58	134,6	8,80	
15-mai	11h	43,08	137,1	7,88	
16-mai	13h	44,25	136,4	8,13	
17-mai	11h	45,08	136,4	8,13	
17-mai	23h	45,58	137	7,92	
18-mai	21h	46,50	135,3	8,53	
19-mai	9h30	47,02	134,8	8,72	
19-mai	21h	47,50	133	9,44	
20-mai	9h30	48,02	131,1	10,27	
20-mai	21h30	48,52	127,9	11,82	11,83
21-mai	9h30	49,02	129,4	11,07	
21-mai	14h45	49,20	129,5	11,02	Ajout 6
22-mai	9h30	50,02	128,1	11,72	
22-mai	18h	50,38	129,5	11,02	
23-mai	9h30	51,02	126,7	12,47	
23-mai	23h30	51,60	125,9	12,91	
24-mai	13h	52,17	126,3	12,69	
24-mai	22h30	52,56	127,7	11,93	
25-mai	9h30	53,02	127,1	12,25	
25-mai	20h30	53,48	126,1	12,80	
26-mai	9h15	54,02	127,6	11,98	
27-mai	9h30	55,02	126,7	12,47	
27-mai	18h	55,38	125,3	13,26	
28-mai	10h	56,04	124,3	13,86	
28-mai	18h	56,38	124,2	13,92	
29-mai	9h30	57,02	122,6	14,94	
29-mai	18h	57,38	122,8	14,81	
30-mai	11h30	58,15	121,8	15,47	
30-mai	20h30	58,52	122,1	15,27	
31-mai	11h	59,13	123,2	14,55	Ajout 7
31-mai	11h30	59,56	123,2	14,55	
31-mai	21h30	60,06	123,6	14,29	
01-juin	9h30	60,07	122,9	14,74	
02-juin	9h30	61,06	122,6	14,81	
03-juin	10h	62,08	122,6	14,94	
03-juin	17h30	62,40	122,3	15,14	
04-juin	10h	63,08	122,7	14,87	
04-juin	19h30	63,48	121,1	15,96	
05-juin	10h	64,08	120,2	16,61	
05-juin	20h30	64,52	123,1	14,61	
06-juin	12h30	65,19	123,1	14,61	
07-juin	16h30	66,35	121,7	15,54	
08-juin	9h30	67,02	121	16,03	

Réacteur 2 Activation à la solution de préservation (suite)

jour	heure	jours	Cl-	mMol
08-juin	18h30	67,40	120,7	16,24
09-juin	10h	68,08	120,6	16,32
09-juin	18h	68,38	121,6	15,61
10-juin	10h	69,08	121,7	15,54
10-juin	17h30	69,40	120,1	16,68
11-juin	9h30	70,06	121,1	15,96
11-juin	18h	70,42	120	16,75
12-juin	10h	71,08	121	16,03
12-juin	18h	71,42	122,3	15,14
13-juin	16h	72,06	122,7	14,87
15-juin	9h30	73,75	121,1	15,96
15-juin	17h30	74,08	120,2	16,61
16-juin	10h	74,77	123,1	14,61
16-juin	18h	75,11	123,1	14,61
17-juin	10h	75,77	121,7	15,54
17-juin	17h30	76,08	121	16,03
18-juin	10h	76,77	120,7	16,24
19-juin	10h	77,77	120,6	16,32
21-juin	18h	80,11	121,6	15,61
22-juin	10h	80,77	121,7	15,54
23-juin	9h30	81,75	120,1	16,68
23-juin	18h	82,11	121,1	15,96
24-juin	13h	82,81	120	16,75
25-juin	10h	83,86	121	16,03
26-juin	10h	84,69	122	15,34
29-juin	10h	86,71	120	16,75

RÉACTEUR 1Bilan molaire sur le Cl⁻ versus le PCP ajouté

	PCP ajouté	PCP total	Cl ⁻ theo	Cl ⁻ trouvé	fact diff.	Cl ⁻ en trop	PCP résiduel
	mg/l	mg/l	mMol	mMol		mMol	mg/L
R1 A1	50	50	1,64	1,12	0,68	-0,52	27,54
A2	100	150	3,52	4,66	1,32	1,14	-60,83
A3	100	250	5,40	6,64	1,23	1,24	-65,78
A4	100	350	7,28	8,57	1,18	1,29	-68,67
A5	200	550	11,04	10,78	0,98	-0,26	13,82
A6	200	750	14,80	14,42	0,97	-0,38	20,09

Selon le bilan de chlore, 97,4% du PCP est minéralisé

0,02679

RÉACTEUR 2Bilan molaire sur le Cl⁻ versus le PCP ajouté

	PCP ajouté	PCP total	Cl ⁻ theo	Cl ⁻ trouvé	fact diff.	Cl ⁻ en trop	PCP résiduel
	mg/l	mg/l	mMol	mMol	trou/theo	mMol	mg/L
R2 A1	50	50	1,84	1,18	0,64	-0,66	34,94
A2	100	150	3,72	4,35	1,17	0,63	-33,29
A3	100	250	5,60	6,32	1,13	0,72	-38,42
A4	100	350	7,48	8,84	1,18	1,36	-72,33
A5	200	550	11,24	11,07	0,98	-0,17	9,08
A6	200	750	15,00	14,55	0,97	-0,45	23,94

Selon le bilan de chlore, 96,9% du PCP est minéralisé

0,031915

Les taux sont calculés ainsi:

taux moyen: quantité de PCP dégradé en un ajout sur le temps temps requis

taux maximum: pente maximale calculée à la main sur graphique excel

Réacteur 1

TAUX MAXIMUMS

	point A		point B		Taux max	PCP ajouté	temps	Taux moyen
	mg/l	jours	mg/l	jours	mg/l/jour	mg/l	jours	mg/l/jour
Ajout 1	22,12	13,15	0	14,27	19,75	50	10,06	4,97
Ajout 2	60	21	5,613	22,06	51,31	100	7,78	12,85
Ajout 3	50,32	28,04	16,49	28,52	70,48	100	5,7	17,54
Ajout 4	62	32,5	30	33	64,00	100	4,21	23,75
Ajout 5	82,86	48,04	43	48,54	79,73	200	14,79	13,52
Ajout 6	59,5	58,17	10,46	58,54	132,54	200	9,52	21,01

Réacteur 2

TAUX MAXIMUMS

	point A		point B		Taux max	PCP ajouté	temps	Taux moyen	Taux max* ajusté
	mg/l	jours	mg/l	jours	mg/l/jour	mg/l	jours	mg/l/jour	mg/l/jour
Ajout 1	15,48	15,15	5,99	15,38	41,26	50	12,83	3,90	41,26
Ajout 2	49,89	22,52	20,57	23,13	48,07	100	5,85	17,09	64,89
Ajout 3	58,1	30	1,88	31,13	49,75	100	5,03	19,88	67,17
Ajout 4	39,12	37,68	3,66	38,43	47,28	100	5,12	19,53	63,83
Ajout 5	60,7	47,5	27,6	48,02	63,65	200	8,96	22,32	85,93
Ajout 6	71,95	55,02	38,31	55,32	112,13	200	7,82	25,58	151,38

*avec ajustement de 35% récupération a partir du moment où il y de l'huile (ajout 2)

	Réacteurs 2	jours	Brut	dilution	Indice	Min	Max	Résultat	min	max
Temps 0	Totaux	0,00	4-4-0	1,00E-04	13	5	38	1,30E+03	5,00E+02	3,80E+03
	PCP	0,00	2-1-0	1,00E-04	7	2	21	7,00E+02	2,00E+02	2,10E+03
	Hexa	0,00	5-3-3	1,00E-02	170	80	410	1,70E+02	8,00E+01	4,10E+02
Ajout 0	Totaux	4,21	5-5-4	1,00E-05	1600	600	5300	1,60E+06	6,00E+05	5,30E+06
	PCP	4,21	5-5-4	1,00E-04	1600	600	5300	1,60E+05	6,00E+04	5,30E+05
	Hexa	4,21	5-2-0	1,00E-04	50	20	170	5,00E+03	2,00E+03	1,70E+04
Ajout 1	somme PCP hexa							1,65E+05		
	Totaux	18,40	5-5-1	1,00E-07	300	100	1300	3,00E+07	1,00E+07	1,30E+08
	PCP	18,40	5-3-3	1,00E-07	170	80	410	1,70E+07	8,00E+06	4,10E+07
Ajout 2	Hexa	18,40	5-3-3	1,00E-05	170	80	410	1,70E+05	8,00E+04	4,10E+05
	somme PCP hexa							1,72E+07		
	Totaux	26,10	5-3-0	1,00E-08	80	30	250	8,00E+07	3,00E+07	2,50E+08
Ajout 3	PCP	26,10	5-3-2	1,00E-06	170	80	410	1,70E+06	8,00E+05	4,10E+06
	Hexa	26,10	5-5-1	1,00E-07	300	100	1300	3,00E+07	1,00E+07	1,30E+08
	Totaux							5,00E+09	2,00E+09	1,70E+10
Ajout 4	PCP	33,30	1-1-1	1,00E-07	6	2	18	6,00E+05	2,00E+05	1,80E+06
	Hexa	33,30	5-3-0	1,00E-08	80	30	250	8,00E+07	3,00E+07	2,50E+08
	Totaux							9,00E+08	3,00E+08	2,40E+09
Ajout 5	PCP	40,10								
	Hexa	40,10	2-2-0	1,00E-08	9	3	24	9,00E+06	3,00E+06	2,40E+07
	Totaux							2,30E+08	9,00E+07	8,60E+08
Ajout 6	PCP	49,20								
	Hexa	49,20	4-0-0	1,00E-07	13	5	38	1,30E+06	5,00E+05	3,80E+06
	Totaux							5,00E+08	2,00E+08	1,70E+09
Ajout 6	PCP	59,50	1-2-0	1,00E-08	6	2	18	6,00E+06	2,00E+06	1,80E+07
	Hexa	59,50	4-4-3	1,00E-09	34	16	80	3,40E+08	1,60E+08	8,00E+08

Comptes Bactériens Résultats

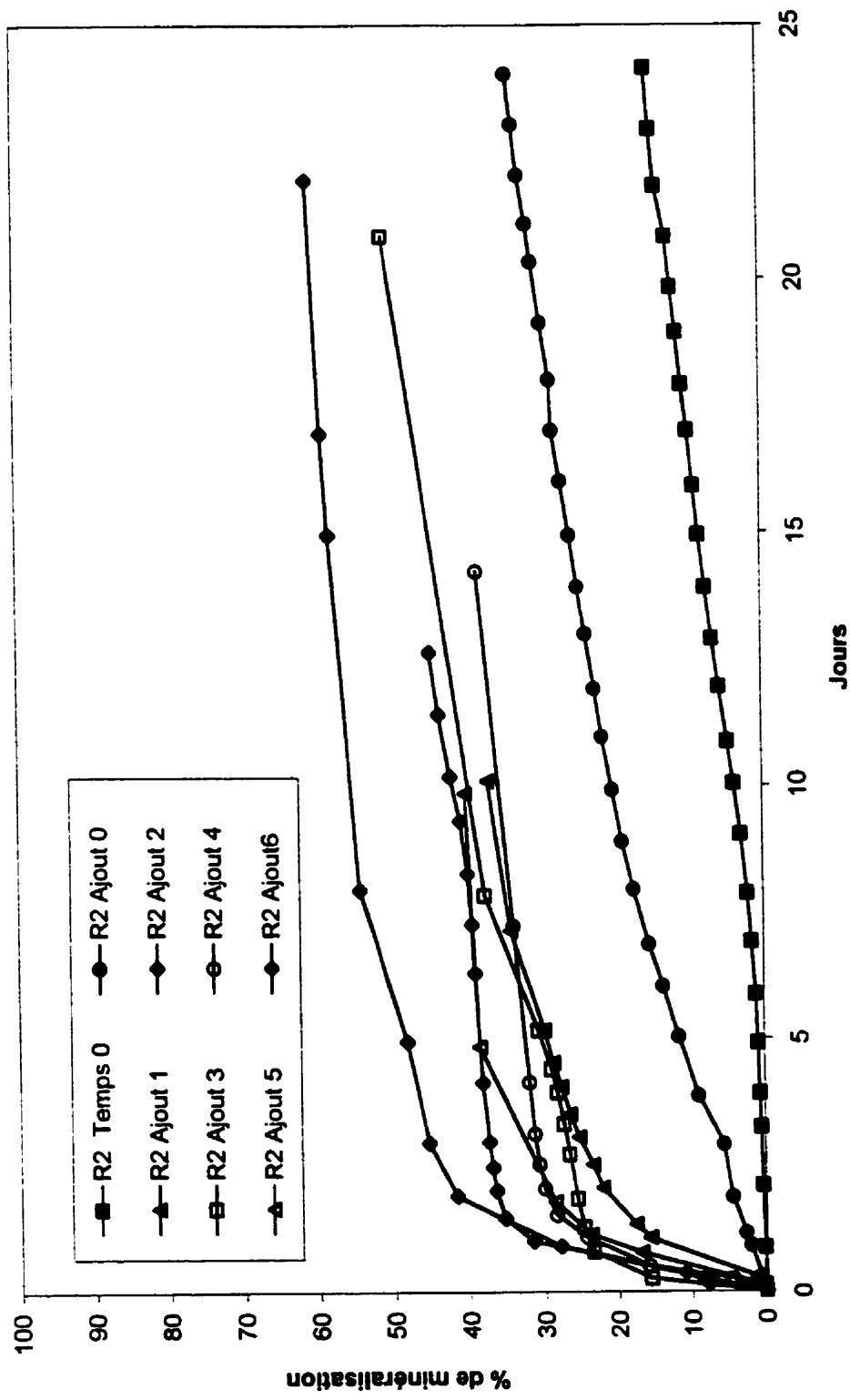
Réacteur 1		jours	Brut	dilution	Indice	Min	Max	Résultat	min	max
Temps 0	Totaux	0,00	5-4-0	1,00E-05	130	50	390	1,30E+05	5,00E+04	3,90E+05
	PCP	0,00	2-1-0	1,00E-04	7	2	21	7,00E+02	2,00E+02	2,10E+03
	Hexa	0,00	4-4-0	1,00E-03	34	16	80	3,40E+02	1,60E+02	8,00E+02
Ajout 0	Totaux	4,21	5-5-3	1,00E-05	900	300	2900	9,00E+05	3,00E+05	2,90E+06
	PCP	4,21	5-4-3	1,00E-04	280	120	690	2,80E+04	1,20E+04	6,90E+04
Ajout 1	Totaux	15,35	5-5-1	1,00E-07	300	100	1300	3,00E+07	1,00E+07	1,30E+08
	PCP	15,35	5-3-1	1,00E-07	110	40	300	1,10E+07	4,00E+06	3,00E+07
Ajout 2	Totaux	24,30	3-0-0	1,00E-08	8	3	24	8,00E+06	3,00E+06	2,40E+07
	PCP	24,30	3-2-1	1,00E-06	17	7	40	1,70E+05	7,00E+04	4,00E+05
Ajout 3	Totaux	30,27	3-0-0	1,00E-08	8	3	24	8,00E+06	3,00E+06	2,40E+07
	PCP	30,27	5-2-1	1,00E-05	70	30	210	7,00E+04	3,00E+04	2,10E+05
Ajout 4	Totaux	35,25	1-0-0	1,00E-08	2	1	11	2,00E+06	1,00E+06	1,10E+07
	PCP	35,25	5-3-3	1,00E-05	170	80	410	1,70E+05	8,00E+04	4,10E+05
Ajout 5	Totaux	50,06	2-2-0	1,00E-08	4	1	17	4,00E+06	1,00E+06	1,70E+07
	PCP	50,06								
Ajout 6	Totaux	60,09	4-0-0	1,00E-08	13	5	38	1,30E+07	5,00E+06	3,80E+07
	PCP	60,09								
	hexa	60,09	4-4-0	1,00E-04	34	16	80	3,40E+03	1,60E+03	8,00E+03

		Jours	C10-C50	PCP	
04-avr	16h00	2,29	16	0	
20-avr	10h00	18,08	24	0,12716	
20-avr	14h30	18,40	750	102,35	Ajout 2
23-avr	21h	21,54	300	63,8	
27-avr	22h30	25,56	140	0,98734	
05-mai	10h	33,06	31	1,32	
05-mai	16h00	33,31	620	93,284	Ajout 4
08-mai	23h30	36,63	230	69,872	
12-mai	10h	40,04	110	1,3125	
12-mai	10h30	40,06	660	182,296	Ajout 5
16-mai	13h	44,25	290	124,424	
19-mai	9h30	47,02	180	27,676	
21-mai	9h30	49,02	190	2,748	
30-mai	20h30	58,52	550	3,5	
31-mai	11h	59,125	1400	257,055	Ajout 7

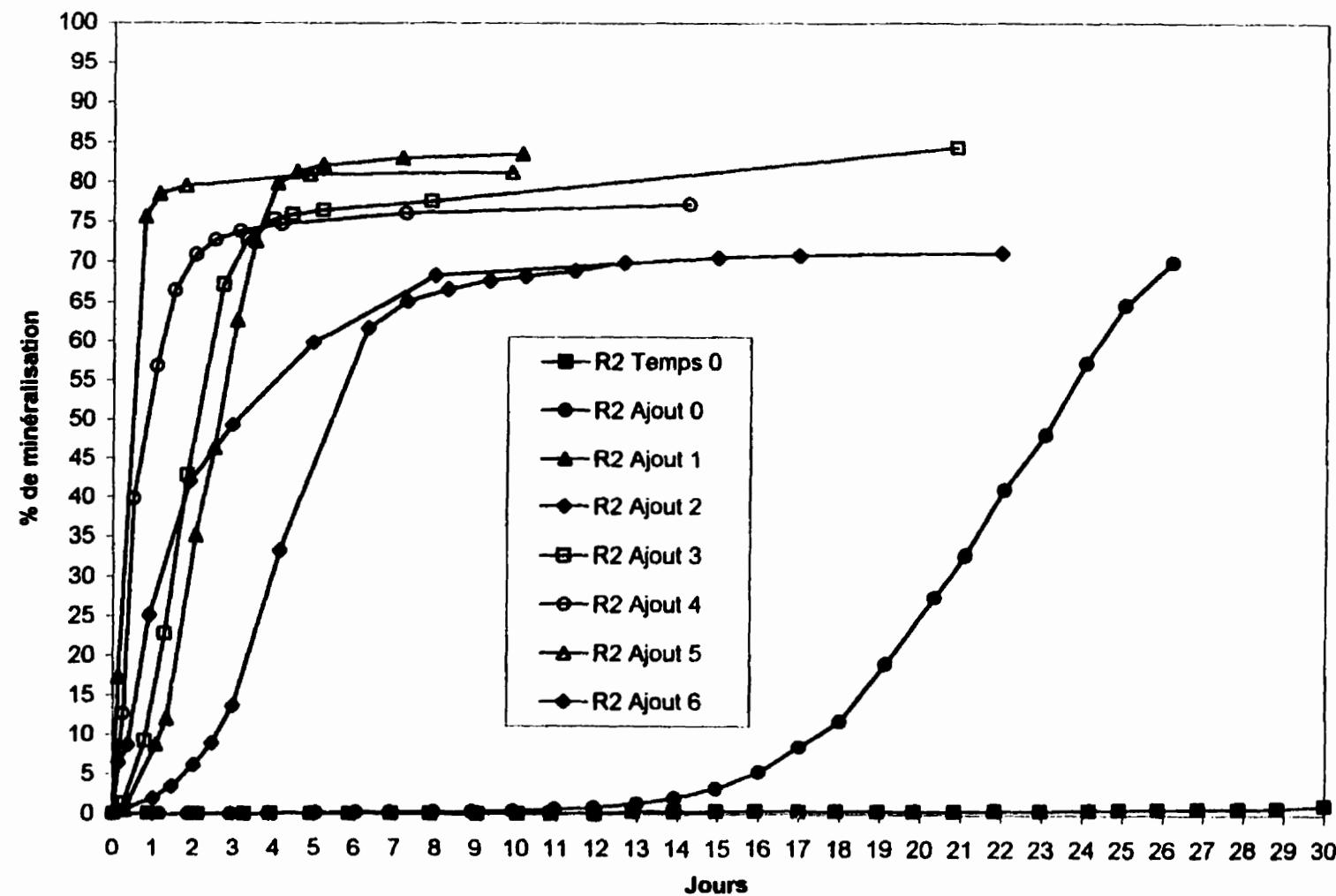
Bilan

Hydr. Rajouté	7363,636
hydr. Fin de A6	550
Hydr. Disparition	92,53086

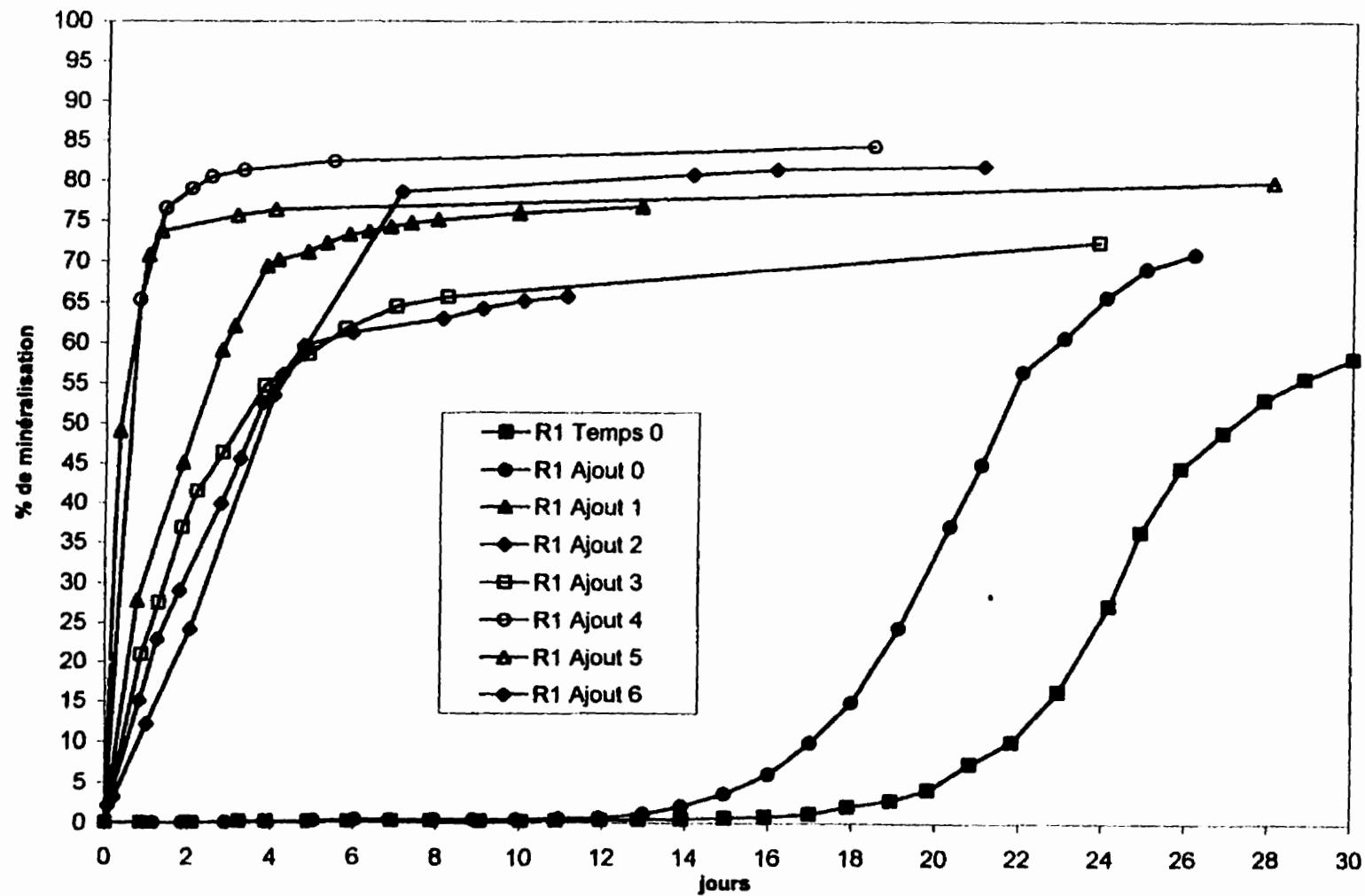
Minéralisation de l'hexadécane dans le réacteur activé à la solution de préservation



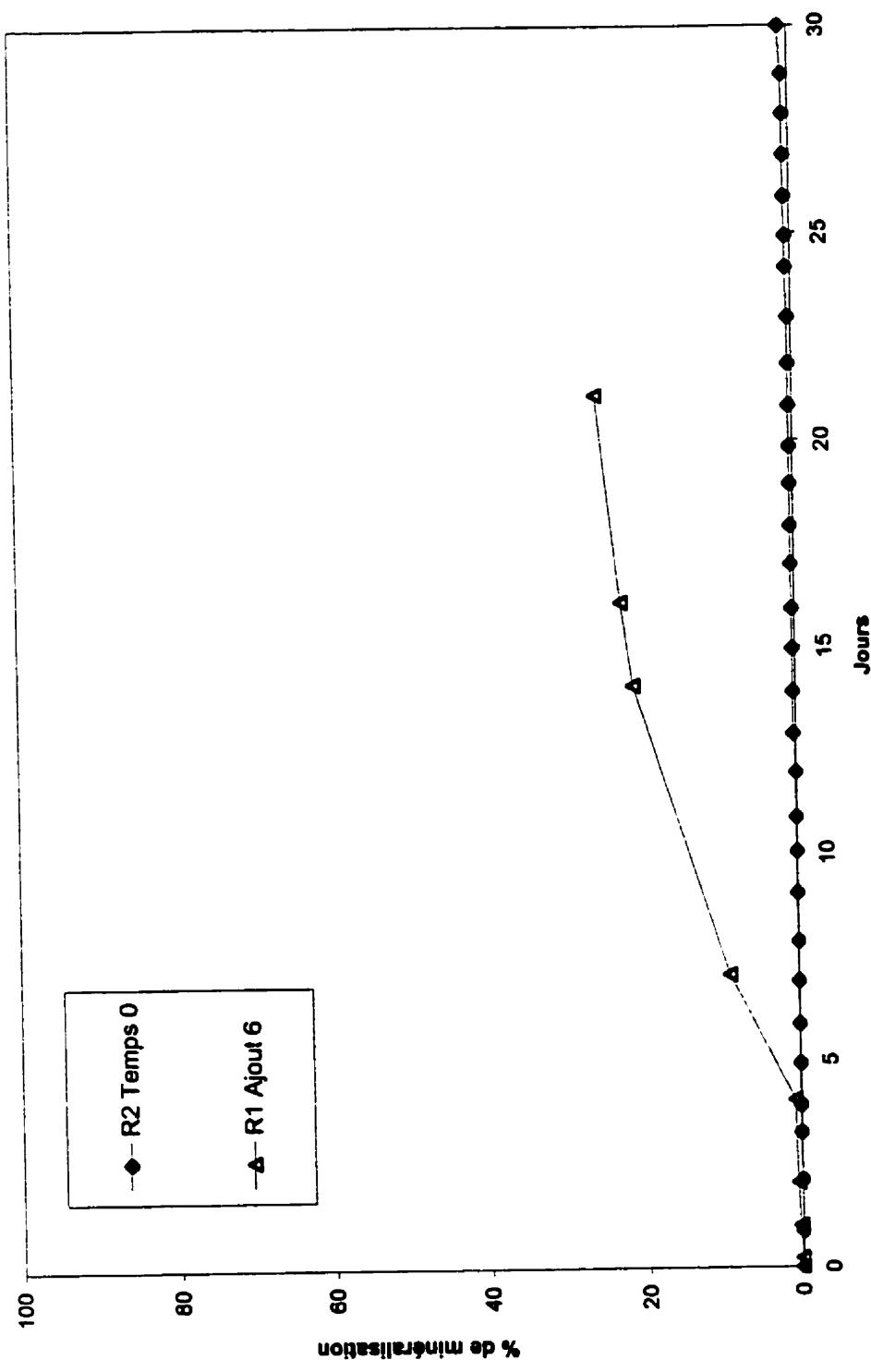
Minéralisation du PCP dans le réacteur activé à la solution de préservation



Minéralisation du PCP dans le réacteur activé au NaPCP



Minéralisation de l'hexadécane dans le réacteur activé au NaPCP



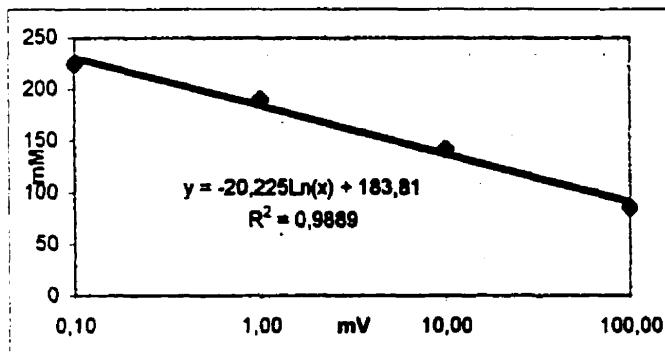
Résultats Activation 3

Réacteur 1

		jours	pH	mV	mMol	PCP	
06-août	14h30	0,00					
07-août	11h30	0,88	7,22	228,8	0,11	1,27	
11-août	10h	4,81	7,24	229,2	0,11	0,66	
11-août	13h45	4,97	7,34	232,5	0,09	34,28	Ajout 1
12-août	14h30	6,00	7,33	231,7	0,09	34,75	
13-août	11h30	6,88	7,32	226,1	0,12	32,79	
14-août	13h30	7,96	7,3	224,2	0,14	30,77	
17-août	10h	10,81	7,23	189,2	0,77	0,64	
17-août	11h	10,85	7,45	191,2	0,69	69,22	Ajout 2
18-août	11h	11,85	7,45	186,8	0,86	72,00	
19-août	14h30	13,00	7,41	187,6	0,83	71,53	
20-août	11h	13,85	7,44	182	1,09	60,75	
21-août	14h30	15,00	7,31	171,2	1,87	22,35	
21-août	17h	15,10	7,54	169,5	2,03	99,06	Ajout 3
24-août	11h15	17,85	7,49	167	2,30	79,90	
25-août	14h00	18,98	7,43	165,2	2,51	80,12	
26-août	15h	20,02	7,43	163,7	2,70	55,26	
27-août	14h	20,98	7,32	157,3	3,71	33,66	
28-août	11h	21,85	7,46	155,6	4,03		
28-août	15h	22,02	7,61	157	3,76	94,60	Ajout 4
30-août	9h30	22,79	7,36	150,9	5,09	56,20	
31-août	11h	24,85	7,24	145,3	6,71	2,78	
01-sept	14h	25,98	7,23	145,9	6,52	0,39	

Calibration Cl-

mMolaire	mV
0,10	224,6
1,00	190,2
10,00	141,8
100,00	85,5



Réacteur 2

		jours	pH	mV	mMol	PCP	
06-août	14h30	0,00					
07-août	11h30	0,88	7,22	237	0,07	0,31	
11-août	10h	4,81	7,24	232,6	0,09	0,04	
11-août	13h45	4,97	7,26	231,4	0,10	33,90	Ajout 1
12-août	14h30	6,00	7,26	232,3	0,09	35,70	
13-août	11h30	6,88	7,22	231,2	0,10	37,23	
14-août	13h30	7,96	7,07	223,6	0,14	32,21	
14-août	14h	10,81	7,11	219,5	0,17	110,89	Ajout 2
17-août	11h	10,85	7	209,1	0,29	90,51	
18-août	11h	11,85	7,08	206	0,33	100,10	
19-août	14h30	13,00	7,06	205,9	0,34	101,80	
20-août	11h	13,85	7,07	195,3	0,57	94,87	
21-août	14h30	15,00	7,05	201,5	0,42	92,79	
24-août	11h15	17,85	6,99	180,4	1,18	66,50	
25-août	14h00	18,98	6,79	156,6	3,84	3,85	
25-août	15h30	20,02	6,89	156,8	3,80	73,78	Ajout 3
26-août	15h	20,98	6,7	147,1		100,64	
27-août	14h	21,85	7,37	144,3		3,66	
28-août	11h	22,02	7,12	147,1		2,21	
30-août	9h30	22,79	7,15	150,9	5,09	1,00	
		24,75				1,00	
31-août	11h	24,85	7,18	149,2	5,54	82,86	Ajout 4
01-sept	14h	25,98	7,23	148,1	5,85	85,24	
02-sept	14h	26,98	7,1	148,5	5,73	75,53	
03-sept	12h30	27,92	7,23	148	5,87		
08-sept	9h30	30,79	7,6	148,7	5,67	70,07	
09-sept	9h30	31,79	7,52	146,5	6,33		
10-sept	10h30	32,83	7,49	146,8	6,23		
11-sept	15h	34,02	7,5	145,1	6,78		
15-sept	10h	37,83	8				
16-sept	11h30	38,88	7,7	144,8	6,88	0,67	
18-sept	14h	40,00	7,33	144,9	6,85		

bilan Cl-

RÉACTEUR 1

Bilan molaire sur le Cl- versus le PCP ajouté

	PCP ajouté	PCP total	Cl- theo	Cl- trouvé	fact diff	Cl- en trop	PCP résiduel
	mg/l	mg/l	mMol	mMol		mMol	mg/L
R1 A1	50	50	1,05	0,77	0,73	-0,28	14,89
A2	100	150	2,93	1,87	0,64	-1,06	56,36
A3	100	250	4,81	4,03	0,84	-0,78	41,44
A4	100	350	6,69	6,52	0,97	-0,17	8,97

Selon le bilan de chlore,

97,44 % du PCP est minéralisé

RÉACTEUR 2

Bilan molaire sur le Cl- versus le PCP ajouté

	PCP ajouté	PCP total	Cl- theo	Cl- trouvé	fact diff	Cl- en trop	PCP résiduel
	mg/l	mg/l	mMol	mMol	trou/theo	mMol	mg/L
R2 A1	50	50	1,62	0,68	0,42	-0,94	50,00
A2	100	150	3,50	3,84	1,10	0,34	-18,12
A3	100	250	5,38	5,09	0,95	-0,29	15,37
A4	100	350	7,26	6,86	0,95	-0,40	21,21

par labo privé

Selon le bilan de chlore,

93,94 % du PCP est minéralisé

Bilan

valeurs obtenue par laboratoire philip

	Réacteur 2		Réacteur 1		contaminant ajouté mg/l
	début	fin	début	fin	
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	
Cl- (aq)	2,4	240			
C10-C50	<0,1	4,4	-	-	3436,36
PCP sol	0,5	1,1	0,5	0,29	350
PCP liq		0,67		0,39	

	R1	R2
Bilan disparition PCP	99,81	99,49

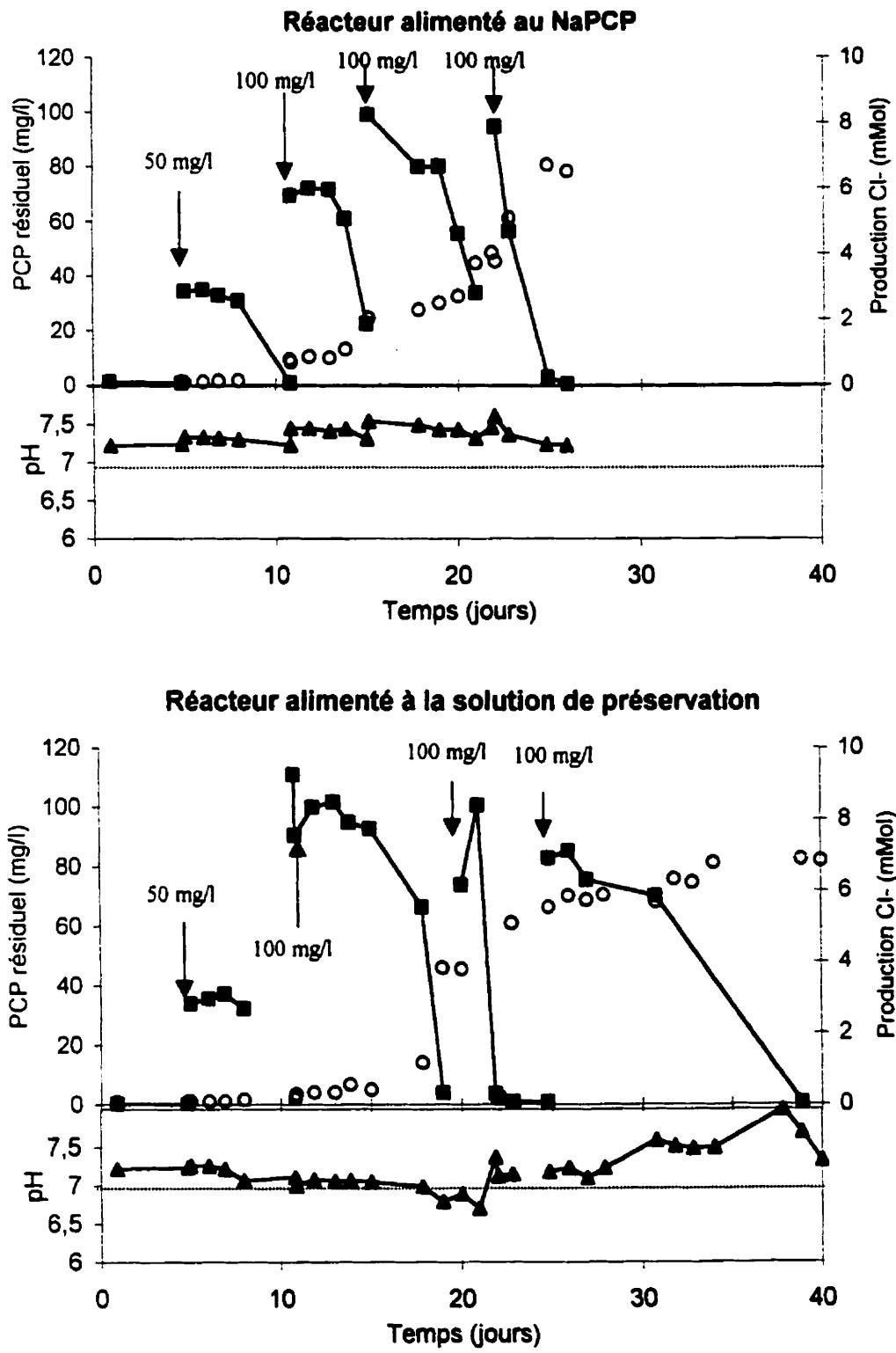
Bilan disparition C10-C50	99,87
----------------------------------	-------

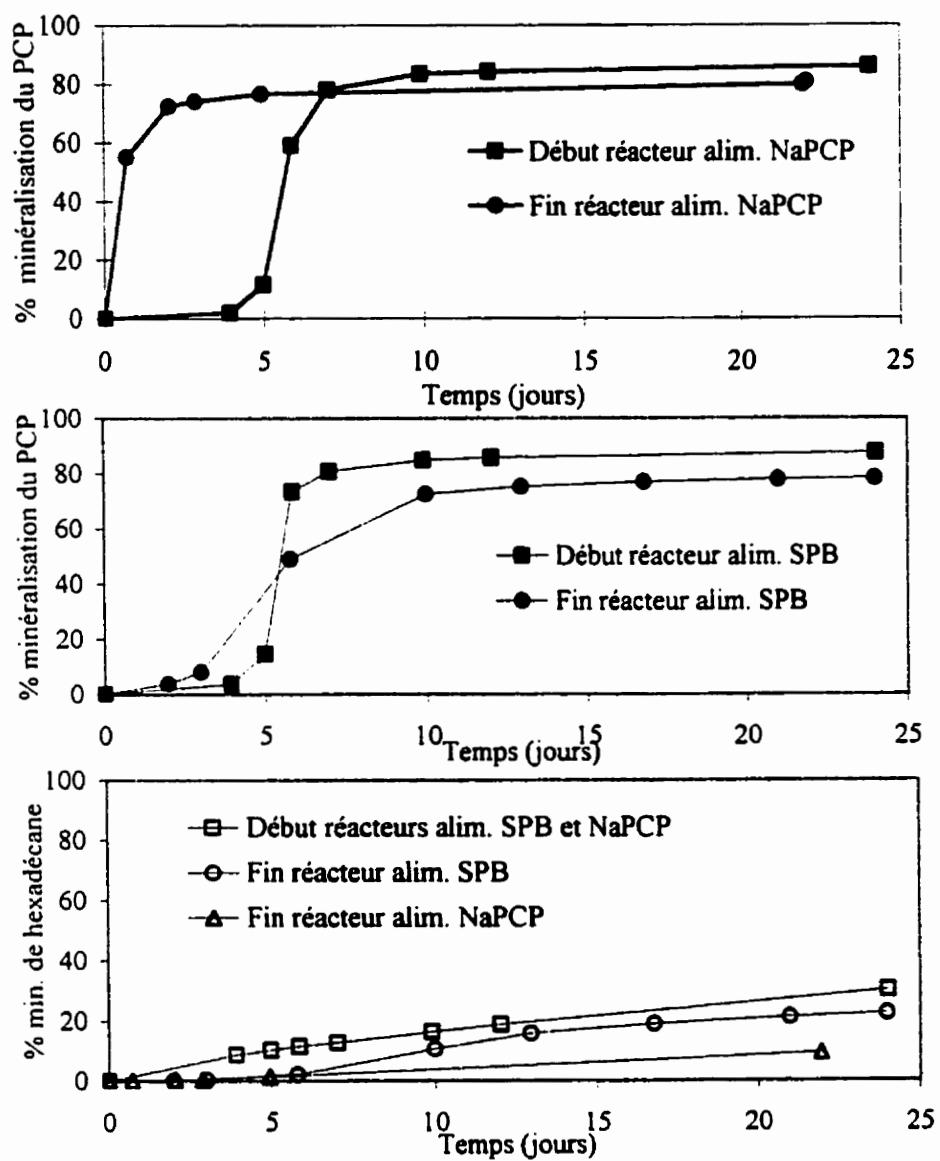
Taux disparition PCP moyen final	25,25	7,13
Taux disparition PCP moyen initial	8,56	-

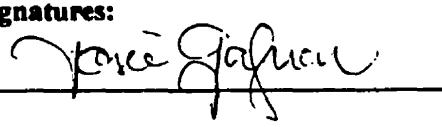
Dioxine et furanne théoriquement ajoutés	3,54375E-05
---	-------------

NPP	totaux		Degradeurs de PCP		hydrocarbonoclastes	
	début	fin	début	fin	début	fin
R1	1,30E+05	8,00E+06		8,00E+05		
R2	3,00E+05	7,00E+06		2,70E+04	1,10E+04	2,30E+06
réactivation R1		1,70E+06				
réactivation R2		8,00E+07				

totaux	Indice	Min	Max	dilution	Résultat
r1 réactivation fin	17			1,00E-07	1,70E+06
r2 réactivation fin	8			1,00E-09	8,00E+07
r1 début	13			1,00E-06	1,30E+05
r2 début	30			1,00E-06	3,00E+05
r1 fin	8			1,00E-08	8,00E+06
r2 fin	70			1,00E-07	7,00E+06
dégradeurs de PCP	Indice	Min	Max	dilution	Résultat
r1 début					
r2 début					
r1 fin	8			1,00E-07	8,00E+05
r2 fin	27			1,00E-05	2,70E+04
hydrocarbonoclastes	Indice	Min	Max	dilution	Résultat
r2 début					
r2 fin	11			1,00E-05	1,10E+04
	23			1,00E-07	2,30E+06





PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16 F	Pages:
Version: Officielle pour mémoire	Date Début: 28/07/97
	Date fin :
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par:	Signatures:  _____ _____ Date: 29/06/09

Titre: Essais de minéralisation en microcosmes d'un sol en phase boueuse en cours de bioactivation

Mots clés: PCP, microcosmes, hexadécane

1. OBJECTIF(S)

Déterminer la variation du potentiel de dégradation des sols des réacteurs 1 et 2 tout au long de leur bioactivation

2. MATÉRIEL

Bouteilles à microcosmes avec bouchons en caoutchouc et métal,,
et petits tubes de 4 ml

Par essais de minéralisation (triplicatats et témoin, trois fois):

10 ml de sol en phase boueuse (10% p/v) pour chaque microcosme

Solutions de ^{14}C -PCP, ^{14}C -Hexadecane

Solvants : Toluène et hexane

Seringue de 50 μL

Papier d'aluminium

NaN₃

Solution KOH 1N

Solution de PCP 15g/litres

Coktail à scintillation (optiphase Hisafe-3)

3. MÉTHODOLOGIE

La méthodologie suivie est celle du PSO A10 voici les points particuliers à notre expérience:

Préparation des solutions radioactives

U-¹⁴C-PCP lot 35H9202 Vial Valérie 104 000dpm/25µL

HEXADÉCANE-1-¹⁴C Vial Valérie 108 000 dpm/ 25µL

L'ajout de solution pour chacun des cas (PCP et HEXADÉCANE) sera de 18 µL, l'ajout total devant être d'environ 75 000 dpm.

Préparation des microcosmes:

Avant chaque ajout de solution activante dans les réacteurs 1 et 2:

Échantillonner 40 ml du réacteur 1 (activé au NaPCP), mettre 10 ml dans quatre bouteilles à microcosme.

Échantillonner 80 ml du réacteur 2 (activé à la solution de préservation), mettre 10ml dans huit bouteilles à microcosme.

Feuilles de travail :

No	Identification	T°	Jour 0	slurry (ml)	NaN ₃
1	VALMICPA(jour).(mois).(réacteur)	20°C		10	-
2	VALMICPB(jour).(mois).(réacteur)	20°C		10	-
3	VALMICPC(jour).(mois).(réacteur)	20°C		10	-
4	VALMICPT(jour).(mois).(réacteur)	20°C		10	0.003g
5	VALMICHA(jour).(mois).(réacteur)	20°C		10	-
6	VALMICHB(jour).(mois).(réacteur)	20°C		10	-
7	VALMICHC(jour).(mois).(réacteur)	20°C		10	-
8	VALMICHT(jour).(mois).(réacteur)	20°C		10	0.003g

Tripliquatats:A,B,C

Témoin: T

Ajout de froid: 66 μ L de PCP 15g/L (pour un total de 100ppm) dans les VALMICP(seulement lors de l'activation 1)

Agitation: agitateur giratoire à 120 RPM

Couvrir: papier d'aluminium

Bouchons: anneaux de métal et caoutchouc gris

Préparation KOH: 1L

Suivit de la minéralisation 25 jours avec deux échantillonnages par jour au début.

4. RÉFÉRENCES

PSO A10 et PSO G8

5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Pour l'activation l'ajout de froid sera uniquement de 20 mg/L parce que la minéralisation du PCP a été inhibée.

6. ANNEXES: MODIFICATIONS

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16 H	Pages: 2
Version: Officielle pour mémoire	Date Début: 6 février
	Date fin
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par:	Signatures:  _____ Date: 07/06/01
Titre: Extraction au chlorure de méthyle du PCP d'un échantillon de boue liquide par la méthode base/acide.	
Mots clés: C10-C50, extraction, HPLC	

1. OBJECTIF(S)

Nettoyer des échantillons de liquide boueux pouvant contenir des hydrocarbures ou des composés susceptibles d'endommager ou de salir la colonne du HPLC, en procédant à une extraction du PCP au chlorure de méthyle.

2. MATÉRIELS

NaOH 1N

H₂SO₄ 1N

Micropipette

CH₂CL₂

Vials à scintillation

Pipette pasteur

Seringue 5ml

Filtre 0,5µm en Téflon et support métallique

Agitateur Wrist action

Méthanol
Pipette 5ml
Papiers indicateur de pH

3. MÉTHODOLOGIE

Mettre 3ml du liquide boueux dans un vial à scintillation. Ajuster le pH à 11 en utilisant la solution de NaOH H₂SO₄, et une micropipette (vérifier avec papier pH, mais le moins souvent possible). Rajouter 3ml de chlorure de méthyle, fermer le vial et mélanger au Wrist Action pour 20 minutes. Laisser décanter, jeter la phase organique. Rajouter à la phase aqueuse 3ml de d'une solution aqueuse ayant un pH en dessous de 2, fermer le vial et mélanger au Wrist Action pour 20 minutes. Laisser décanter et retirer la phase aqueuse, et faire évaporer la phase organique avec un petit jet d'air. Ressolubilier le PCP sec dans le vial avec une quantité de méthanol équivalente à la dilution voulue. Filter sur 0,5µm dan un vial ambré allant au HPLC.

Validation de la méthode:

Afin de vérifier l'efficacité et la répétabilité de cette méthode, les essais suivants devront être faits :

1. 3 fois : 3ml d'eau distillée + 150 mg/l de PCP (pure dans du NaOH 0,25N)
2. 3 fois : 3ml d'eau distillée + 5 mg/l de PCP
3. 3 fois : 3ml d'échantillons du réacteur 2 (congelés, plusieurs mélangés pour utiliser le même échantillon de base pour les essais 3, 4 et 5)
4. 3 fois : 3ml d'échantillons du réacteur 2 + 150 mg/l de PCP (pure dans du NaOH 0,25N)
5. 3 fois : 3ml d'échantillons du réacteur 2 + 5 mg/l de PCP

4. RÉFÉRENCES

EPA Method 625

5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Les résultats de la validation sont dans le cahier de laboratoire Valérie II, dernière pages. Les résultats de contrôles effectués par Phillip lab. démontrent un écart de 30% avec nos résultats. voir en annexe.

6. ANNEXES: MODIFICATIONS

Selon les contrôles fait sur des échantillons du réacteur 2 chez philips avec une meilleure méthode d'extraction:

	Valerie	Philip	écart
	mg/l	mg/l	%
C1	40	41	97,56
C2	131	230	56,96
C3	242	350	69,14
préalable avec restant A1 moyenne 3 échantillons	20,9	31	67,42
	moyenne		64,51 % de récupération

cet échantillon n'a pas été extrait mais seulement filtré

Tout concorde: les valeurs au courant de l'activation et les essai fait en série

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16I	Pages: 3
Version: Officielle pour mémoire	Date Début: 11 décembre 97
	Date fin
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par: Josée Gagnon	Signatures:  <hr/> <hr/>
Titre: Vérification de l'influence du PCP sur la minéralisation de l'hexadécane et vice versa. Mots clés: minéralisation, PCP, hexadécane, microcosmes	

1. OBJECTIF(S)

Vérifier l'influence de la présence d'hexadécane sur la minéralisation du Pentachlorophénol ainsi que l'influence du PCP sur la minéralisation de l'hexadécane par des essais en microcosme.

2. MATÉRIELS

Bouteilles sérologiques avec bouchons en caoutchouc et métal

petits tubes de 5ml

sol tamisé (2mm)

MSM

Solution de 14g de PCP dissous dans du NaOH 0,25N

Hexadécane

Solutions de ^{14}C -PCP, ^{14}C -Hexadecane (à 10 000dpm par μL)

Solvants : Toluène et hexane

Seringue de 25 μL

NaN_3

Solution KOH 1N

3. MÉTHODOLOGIE

La méthodologie suivie est celle du PSO A10 voici les points particuliers à notre expérience:

Préparation des microcosmes:

Le sol qui sera utilisé sera le même que celui que l'on utilisera lors de la bioactivation au mois de janvier c'est à dire la chaudière 7 provenant du centre de traitement de St-Anaclet. Un mélange boueux de 10% tel que celui qui sera fait lors de la Bioactivation (2.5 g de sol et 25 ml de MSM) sera utilisé. Des ajouts de contaminants non-radiomarqués seront faits sur certains microcosmes selon la feuille de travail.

Les microcosmes seront inoculés avec 10µl des solutions radiomarquées pour un total de 100 000 dpm par microcosme. Des triplicatas et témoins abiotiques seront faits pour chacun des essais. Lors des ajouts de radioactivité 6 contrôles (3 hexadécane et 3 PCP) seront faits, un au début, au milieu et à la fin de chaque série de 8. La feuille de travail sera la suivante

Feuille de travail :

No	Identification	hexadécane	PCP	sol(g)	MSM (ml)	NaN ₃
1	PCP + ¹⁴ CPCPA	-	20 mg/l	2.5	25	-
2	PCP + ¹⁴ CPCPB	-	20 mg/l	2.5	25	-
3	PCP + ¹⁴ CPCPC	-	20 mg/l	2.5	25	-
4	PCP + ¹⁴ CPCP Témoin	-	20 mg/l	2.5	25	0.005g
5	hexa + ¹⁴ CPCP A	20 mg/l	-	2.5	25	-
6	hexa + ¹⁴ CPCP B	20 mg/l	-	2.5	25	-
7	hexa + ¹⁴ CPCP C	20 mg/l	-	2.5	25	-
8	hexa + ¹⁴ CPCP Témoin	20 mg/l	-	2.5	25	0.005g
9	¹⁴ C PCP A	-	-	2.5	25	-
10	¹⁴ C PCP B	-	-	2.5	25	-
11	¹⁴ C PCP C	-	-	2.5	25	-
12	¹⁴ C PCP Témoin	-	-	2.5	25	0.005g
13	PCP + ¹⁴ CHexa A	-	20 mg/l	2.5	25	-
14	PCP + ¹⁴ CHexa B	-	20 mg/l	2.5	25	-
15	PCP + ¹⁴ CHexa C	-	20 mg/l	2.5	25	-
16	PCP + ¹⁴ CHexa Témoin	-	20 mg/l	2.5	25	0.005g
17	Hexa + ¹⁴ CHexa A	20 mg/l	-	2.5	25	-
18	Hexa + ¹⁴ CHexa B	20 mg/l	-	2.5	25	-
19	Hexa + ¹⁴ CHexa C	20 mg/l	-	2.5	25	-
20	Hexa + ¹⁴ CHexa Témoin	20 mg/l	-	2.5	25	0.005g
21	¹⁴ C Hexa A	-	-	2.5	25	-
22	¹⁴ C Hexa B	-	-	2.5	25	-
23	¹⁴ C Hexa C	-	-	2.5	25	-
24	¹⁴ C Hexa Témoin	-	-	2.5	25	0.005g

25	Hexa + PCP + ¹⁴ CPCPA	20 mg/l	20 mg/l	2.5	25	-
26	Hexa + PCP + ¹⁴ CPCPB	20 mg/l	20 mg/l	2.5	25	-
27	Hexa + PCP + ¹⁴ CPCPC	20 mg/l	20 mg/l	2.5	25	-
28	Hexa + PCP + ¹⁴ CPCP Témoin	20 mg/l	20 mg/l	2.5	25	0.005g

Les microcosmes seront mis sur plaque agitatrice et à la température de la pièce.

Suivi de la minéralisation 20 jours avec un échantillonnage par jour.

4. RÉFÉRENCES

PSO A10

5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Dans la première version de ce protocole, 16 microcosmes furent suivis pendant trois semaines. Leurs compositions étaient les suivantes, triplicatas et témoins de :

- 1) 50 mg/l de PCP non-radiomarqué + 100 000 dpm de PCP radioactif
- 2) 50 mg/l de PCP non-radiomarqué + 100 000 dpm d'hexadécane radioactif
- 3) 50 mg/l d'hexadécane non-radiomarqué + 100 000 dpm de PCP radioactif
- 4) 50 mg/l d'hexadécane non-radiomarqué + 100 000 dpm d'hexadécane radioactif.

Les résultats obtenus sont annexés :

Certaines informations importantes ressortent de ces résultats :

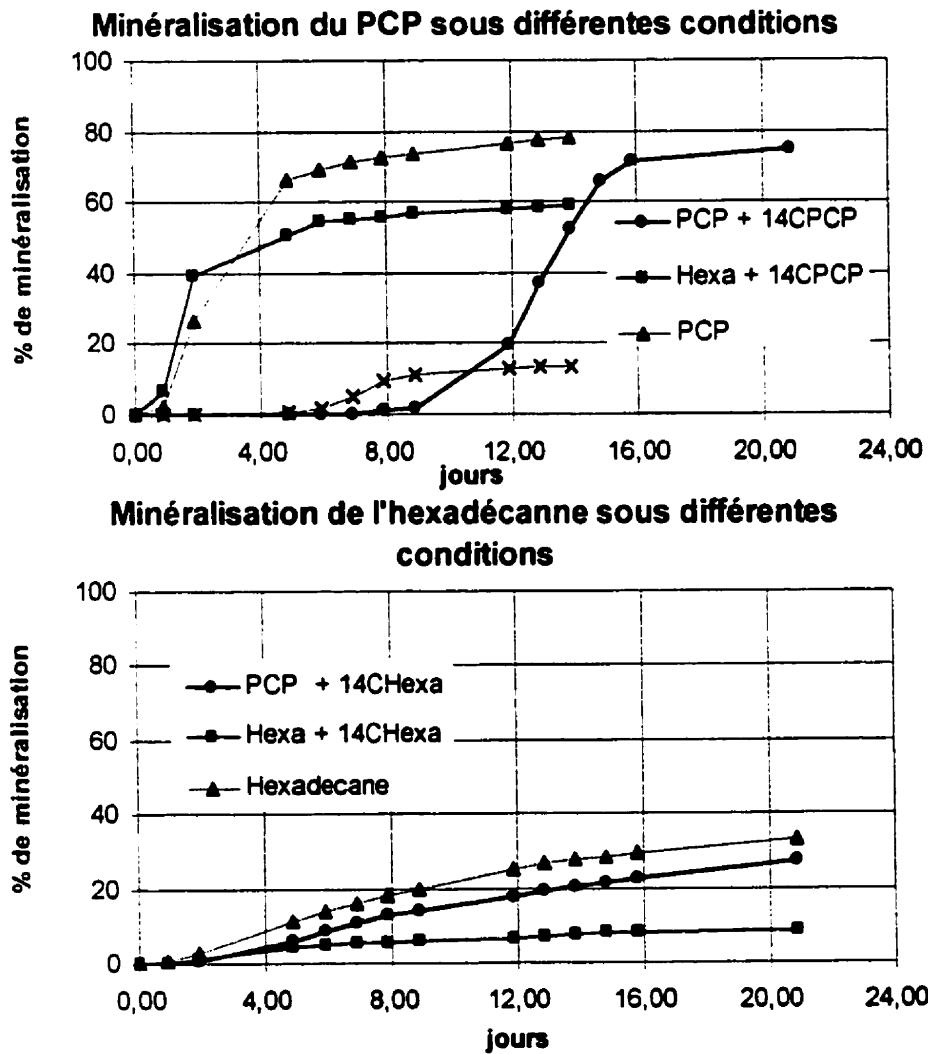
- 1) Les flores dégradant le PCP et l'hexadécane semblent être deux flores différentes, puisque l'on assiste à une minéralisation du composé radiomarqué dans les microcosmes qui ont été injectés avec l'autre composé mais non-radiomarqué (PCP + ¹⁴CHexa et Hexa + ¹⁴CPCP).
- 2) Le temps de latence lors de l'ajout de 50 mg/l de PCP est très long et suggère que les micro-organismes ont subit un choc toxique et ont pris plus de 15 jours à montrer des signes de minéralisation
- 3) L'ajout de 50 mg/litre d'hexadécane est peut-être toxique pour la flore, mais une seringue défectueuse lors des ajouts d'hexadécane radiomarqué pourrait être à l'origine des résultats de faible minéralisation des microcosmes Hexa + ¹⁴CHexa. De mauvais résultats lors des contrôles radioactifs***

Recommandations :

Afin de limiter le choc toxique la concentration de l'ajout des composés non-radiomarqué sera de 20 mg/l. Des essais sans ajout de froid seraient à faire. Étant donné que la cause de la faible minéralisation des microcosmes Hexa + ¹⁴CHexa n'est pas définie (seringue

défectueuse ou choc toxique ?), un ajout de 20 mg/l d'héxadécane pourrait n'avoir aucune influence sur le comportement de micro-organisme puisque l'hexadécane est moins毒 que le pentachlorophénol

6. ANNEXES: MODIFICATIONS



PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE 16 L	Pages:
Version: Officielle pour mémoire	Date Début: 4 septembre 1998
	Date fin 28 février 1999
Auteurs: Valérie Bécaert Approuvé par: Josée Gagnon	Signatures:  _____ _____ Date: 07/06/98

Titre: Bioaugmentation d'un sol contaminé au PCP par un inoculum bactérien sous forme de sols activé

Mots clés: Bioaugmentation, PCP, dioxine, furanne

1. OBJECTIF(S)

Déterminer les performances de biodégradation du PCP, des hydrocarbures pétroliers et des dioxines et furannes de la technique de bioaugmentation d'un sol contaminé aux produits de conservation du bois par un inoculum sous forme de sol activé.

2. MATÉRIELS

- 15 bocaux de 4 litre avec couvercles
- sol contaminé au produit de conservation du bois à base de PCP
- Sol activé au NaPCP, sol activé à la solution de préservation
- ^{14}C -PCP et ^{14}C hexadécane, 54 microcosmes par mois de PCP et 18 microcosmes d'hexadécane.
- Tubes pour comptes NPP bouchons téflon, avec bouteilles de lait
- Vials à scintillation
- matériel pour pH d'un sol (PSO G)

- Cupule d'aluminium et balance analytique
- matériel pour Capacité de rétention au champs (protocole, maîtrise à Olivier Scouef)
- Cuillère en acier inoxydable
- Thermomètre

3. MÉTHODOLOGIE

Choix du sol à traiter:

Certaines analyses doivent être faites sur un sol afin de déterminer s'il est propice à l'essai de bioaugmentation. On doit premièrement s'assurer que sa concentration en PCP est assez élevée (dans les 500 mg/kg serait parfait), que sa granulométrie soit propice à un dégradation (moins de 25% d'argile) et qu'il ne contient pas trop de métaux lourds (puisque ça nuit à l'activité des micro-organismes). Qu'il possède ou non une flore microbienne n'est pas important puisque nous allons lui faire un ajout d'inoculum bactérien sous forme de sol activé. Néanmoins un essai de minéralisation du PCP sera fait.

Caractérisation préliminaire du sol à traiter:

Le sol que l'on traite doit d'abords être tamisé à 4 mm et homogénéisé. Les analyses à effectuer sur ce sol sont les suivantes:

Granulométrie, concentration en Pentachlorophénol, concentration en dioxines et furannes, concentration en hydrocarbure pétroliers, pH, contenu en eau, métaux, carbone organique total et ions chlorures.

Faire un compte bactérien sur les sols que l'on utilise comme inoculum (activé au NaPCP, activé à la solution de préservation et non-activé) juste avant de les utiliser.

Préparation du consortium à inoculer:

Si le sol activé a dû être remisé au frigidaire à 4°C, il faudra réagiter et réaérer les mélanges jusqu'à ce qu'ils soient à la température de la pièce depuis au moins un jour.

Préparation des macrocosmes:

Les bioréacteurs dans lesquels sont effectué les essais de bioaugmentation sont des contenants de verres de 4 litres où sont déposé 2.5kg de sol contaminé au PCP tamisé à 4mm. Chacun des essais se fait en triplicatas (A-B-C). L'ensemencement des bioréacteurs bioaugmentés est effectué afin d'atteindre une concentration microbienne finale (dégradeurs de PCP) de 10^5 bactéries/g de sol sec et un contenu en eau de 80% de la capacité de rétention au champs. Le sol activé sera ajouté sous sa forme agitée et non décanté (tel que dans les réacteurs d'activation pendant la production).

Les préparation initiales selon les macrocosmes se font comme suit:

Tableau des conditions initiales des macrocosmes:

Numérotation des macrocosmes (triplicatas A-B-C)	Composition de départ
1- Témoin stérile sans bioaugmentation	2.5 kg de sol, 16g g d'azoture de, 457ml de MSM
2- Témoin biotique sans bioaugmentation	2.5 kg de sol et environ 457ml de MSM
3- Bioaugmentation unique avec sol activé au NaPCP	2.5 kg de sol, 250ml de slurry 1 et 207ml de MSM
4- Bioaugmentation successive avec sol activé au NaPCP	2.5 kg de sol, 250ml de slurry 1 et 207ml de MSM
5- Bioaugmentation successive avec sol activé à la solution de préservation de bois	2.5 kg de sol, 250ml de slurry 2 et 207ml de MSM

bioaugmentation successive (REVISÉ)

Lorsque les résultats de minéralisation montreront une baisse de l'activité microbienne, une seconde bioaugmentation sera faite. L'ajout de slurry sera le même que précédemment a l'exception qu'il faudra centrifuger les solution afin de réduire la quantité d'eau rajoutée dans les bocaux.

Centrifugation à 7500 rpm pour 20 min correspond à une concentration fois 10.

Ajustement du pH:

Le pH devra être maintenu au dessus de 6,5. Les ajustements se feront avec de la chaud CaCO₃.

Suivis de la bioaugmentation:

Le teneur en eau devra être maintenu, six analyses de PCP et C₁₀-C₃₀ par macrocosme seront effectuées par un laboratoire accrédité selon le plan d'échantillonnage. Des essais de minéralisation du PCP et de l'hexadécane seront effectuée aux semaines 0,5,9,13 et 19. Le pH, la teneur en eau et la température seront suivis toute les semaines

Protocoles utilisés:

PSO G, PSO A12, PSO A8, PE 16A, PE 8, PE16D

Plan des échantillonnages :

semaine -1	caractérisation préliminaire
semaine 0	humidité, pH, temp, microcosmes (15), NPP(15), PCP, C₁₀-C₅₀
semaine 2	humidité, pH, temp
semaine 3	humidité, pH, temp,
semaine 4	humidité, pH, temp, PCP, C₁₀-C₅₀
semaine 5	humidité, pH, temp, microcosmes (12)**, NPP(12)
semaine 6	humidité, pH, temp
semaine 7	humidité, pH, temp, PCP, C₁₀-C₅₀,
semaine 8	humidité, pH, temp
semaine 9	humidité, pH, temp, microcosmes (12), NPP(12)
semaine 10	humidité, pH, temp, PCP, C₁₀-C₅₀,
semaine 11	humidité, pH, temp
semaine 12	humidité, pH, temp
semaine 13	humidité, pH, temp, PCP, C₁₀-C₅₀, microcosmes (12), NPP(12)
semaine 14	humidité, pH, temp
semaine 15	humidité, pH, temp
semaine 19	humidité, pH, temp, PCP, C₁₀-C₅₀, microcosmes (15), NPP(15)

*15 macrocosmes: tous

**12 macrocosme: de 2 à 5 (A-C-B)

Feuille de route :

Premier échantillonnage :

Quoi	Combien	Comment
Microcosme s	duplicatats, témoins	pour mac. 1 à 6 ^{14}C -PCP, pour 2- 5- 6 ^{14}C -hexadécanne 10g de sol par microcosme, spike de 100 000dpm entreposage à l'abris de la lumière et température de la pièce
NPP	24 comptes 5 séries de dilutions Dilutions 0 : 10g de sol dans 95ml de saline	pour mac. 1 à 6 dégradeurs de PCP pour mac. 2-5-6 hydrocarbonoclastes <u>dilutions PCP:</u> <u>dilutions Hydrocarbonoclastes :</u> 1A-B-C- de 10^0 à 10^4 2A-B-C- de 10^0 à 10^5 2A-B-C- de 10^0 à 10^5 4A-B-C- de 10^0 à 10^5 3A-B-C- de 10^2 à 10^7 5A-B-C- de 10^2 à 10^7 4A-B-C- de 10^2 à 10^7 5A-B-C- de 10^2 à 10^7
pH	tous	5g de sol et 5 ml dans tubes plastiques à bouchons bleus, Wrist action 10 min, décantation 30 min, prise de pH
Cl ⁻	tous	Ajout de 2ml par 100ml de ISA, sonde chlorure, filtration pour HPLC ionique
Température	tous	Avec thermomètre attendre stabilisation de la lecture
PCP	tous	Suivre PE 16 M, échantillonnage 10g dans vial à microcosmes. Prendre 5 fois 2g à 5 endroits différents dans le macrocosme. Il faut les mettre au congélateur si l'analyse n'est pas faite tout de suite.
Analyse ext	tous	Échantillonnage de 30g comme pour PCP, C10-C50 et dioxines et furannes, à mettre au congélateur.

4. RÉFÉRENCES

Thèse de doctorat de Louise Deschênes et Mémoire de maîtrise de Carole Barbeau

5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATIONS

Étant donné la faible contamination des sols, la bioaugmentation et la biostimulation semblent donner des résultats semblables. Les analyses de PCP sont faites par Philip et seront envoyées stratégiquement afin de réduire le nombre d'analyse dans le cas où les résultats seraient tous semblables.

Seulement 3 séries de bocaux ont été analysés pour le PCP et les C₁₀-C₅₀, série 2, 4 et 5. Les autres ont été échantillonnés mais pas analysés, les échantillons sont conservé au congélateur. Le sol provenant d'un site d'entreposage de poteaux , comprenant des poteaux traités au métaux cuivre chrome arsenic, les sol a été caractérisé pour ces métaux.

Les témoins biotiques ont été échantillonnées à la semaine 0 et la semaine 19.

Le plan d'échantillonnage effectué lors de l'epérimentation est annexé.

6. ANNEXES: MODIFICATIONS

Série 1

	PCP				C10-C50				D & F			
	A	B	C	moyenne	A	B	C	moyenne	A	B	C	moyenne
semaine 0	90	85	92	89,00	1300	1400	1200	1300,00				Échant.T0
semaine 19	91	89	87	89,00	1100	1100	1200	1133,33				Échant. E4

Série 1

semaine	PCP résiduel %				C10-C50 résiduels %			
	A	B	C	Témoin abiotique	A	B	C	témoin abiotiques
0	100	100	100	100,0	100	100	100	100,0
19	101,1	104,7	94,6	100,00	84,6	78,6	100,0	87,18

écart type	
PCP	C10-C50
0	0
5,14	11,05

Série 4	PCP				C10-C50				D & F			
	A	B	C	moyenne	A	B	C	moyenne	A	B	C	moyenne
série 4 semai	95	130	96	107,00	1800	1300	1200	1433,33				#DIV/0!
semaine 1				#DIV/0!				#DIV/0!				Echant. T0
semaine 2				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 3				#DIV/0!				#DIV/0!				
série 4 semai	6,4	8,4	20	11,60	510	690	560	586,67				
semaine 5				#DIV/0!				#DIV/0!				Echant. E1
semaine 6				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 7				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 8				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 9				#DIV/0!				#DIV/0!				Echant. E2
semaine 10	5,5	4,6	5,1	5,07	350	420	400	390,00				
semaine 11				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 12				#DIV/0!				#DIV/0!				
série 4 semai	3,9	4,7	5,2	4,60	380	420	370	390,00				Echant. E3
semaine 14				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 15				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 16				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 17				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 18				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 19	4	3,4	3,9	3,77	270	380	390	346,67				Echant. E4

Série 4 semaine	PCP résiduel %				C10-C50 résiduels %			
	A	B	C	NaPCP	A	B	C	NaPCP
0	100	100	100	100,0	100	100	100	100,0
4	6,7	6,46	21	10,8	28,3	53,1	46,7	40,9
10	5,8	3,54	5,3	4,7	19,4	32,3	33,3	27,2
13	4,1	3,62	5,4	4,3	21,1	32,3	30,8	27,2
19	4,2	2,62	4,1	3,5	15	29,2	32,5	24,2

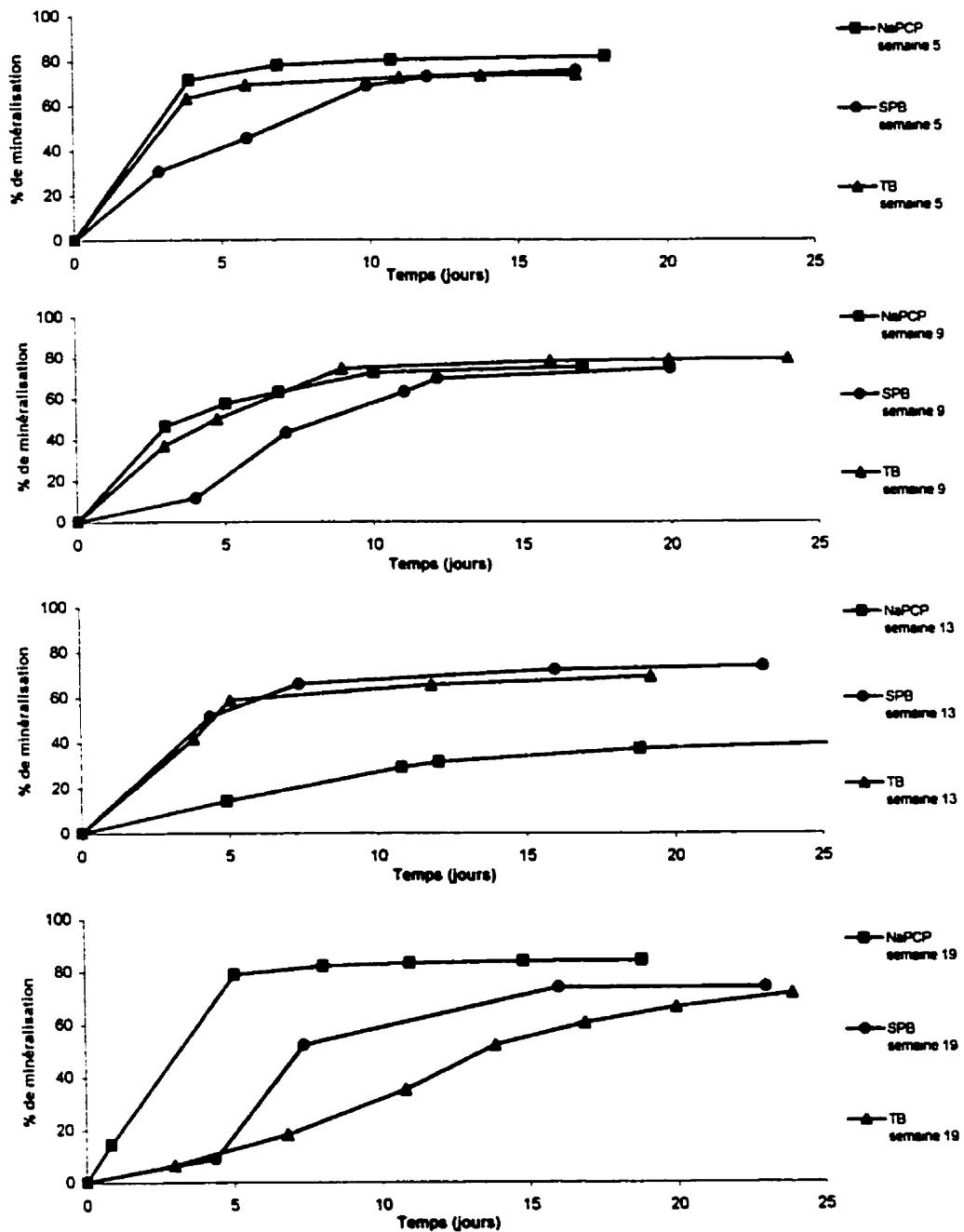
0 0
8,2192 10,622
1,1862 6,9019
0,9313 7,1638
0,8813 9,3046

Série 5	PCP				C10-C50				D & F			
	A	B	C	moyenne	A	B	C	moyenne	A	B	C	moyenne
série 5 semai	160	97	86	114,33	1300	1300	1400	1333,33	0,81	0,69	0,97	0,82
semaine 1				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 2				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 3				#DIV/0!				#DIV/0!				
série 5 semai	8	11	7	8,67	740	650	710	700,00				
semaine 5				#DIV/0!				#DIV/0!				Echant. E1
semaine 6				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 7				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 8				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 9				#DIV/0!				#DIV/0!				Echant. E2
série 5 semai	5,9	5,4	6,7	6,00	430	400	440	423,33				
semaine 11				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 12				#DIV/0!				#DIV/0!				Bioaugmentation
semaine 13				#DIV/0!				#DIV/0!				Echant. E3
semaine 14				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 15	4,5	4,5	3,8	4,27	380	390	420	396,67				
semaine 16				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 17				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 18				#DIV/0!				#DIV/0!				
semaine 19	3,5	3,6	5,4	4,17	390	360	370	373,33				Echant. E4

Série 5	PCP résiduel %				C10-C50 résiduels %			
	A	B	C	SPB	A	B	C	SPB
0	100	100	100	100,0	100	100	100	100,0
4	5	11,3	8,14	7,6	56,9	50	50,7	52,5
10	3,69	5,57	7,79	5,2	33,1	30,8	31,4	31,8
15	2,81	4,64	4,42	3,7	29,2	30	30	29,8
19	2,19	3,71	6,28	3,6	30	27,7	26,4	28,0

0 0
 3,1702 10,526
 2,054 1,9546
 0,9971 1,5037
 2,0679 1,811

Minéralisation du PCP



Minéralisation de l'hexadécane

