

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE EAU TERRE ENVIRONNEMENT

**DEVENIR DES SOUS-PRODUITS DE DÉNITRIFICATION AUTOTROPHE LORS DE
L'ÉPURATION DÉCENTRALISÉE DES EAUX USÉES DOMESTIQUES**

par

Leila GHORBEL

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor, Ph.D. en Sciences de l'Eau

Jury d'évaluation

Président du jury et examinatrice interne	Madame Satinder Kaur Brar INRS-ETE, Université du Québec
Examinatrice externe	Madame Sarah Dorner Département des génies civil, géologique et des mines, Polytechnique Montréal
Examineur externe	Monsieur Frédéric Monette Département de génie de la construction, École de technologie supérieure
Directeur de recherche	Monsieur Jean-François Blais INRS-ETE, Université du Québec
Co-directeur de recherche	Monsieur Guy Mercier INRS-ETE, Université du Québec

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherche, Monsieur Jean-François Blais, pour son encadrement infailible et pour ses nombreux conseils. Il a toujours répondu présent malgré ses nombreux engagements et il a su être rassurant et compréhensif.

Je remercie également mon co-directeur de recherche, Monsieur Guy Mercier, de m'avoir acceptée au sein de son équipe de recherche, pour son encadrement et ses conseils. De par sa façon de faire, il a toujours su attirer mon attention sur l'aspect gestionnaire qu'il entretient très complémentaire à la recherche.

J'adresse ma plus profonde reconnaissance aux professeurs, Satinder Kaur Brar, Sarah Dorner et Frédéric Monette, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Madame Ginette Bélanger, Monsieur Yan Gilbert et Monsieur Pierre Naidier Fanfan de la compagnie Premier Tech Aqua, unité d'affaires de Premier Tech Technologies Ltée, pour leurs précieuses participations à ce projet. Je tiens personnellement à remercier Monsieur André Ouellet, pour sa précieuse aide, sa flexibilité, ses encouragements à chaque fois que je me présentais à la station expérimentale de Bellevue. Son accueil chaleureux et sa bonne humeur me font, à chaque fois, oublier la fatigue du déplacement.

Je tiens aussi à remercier les partenaires à ce projet, PREMIER TECH, le FQRNT et les fonds du Québec Nature, pour leurs contributions financières.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire général pour leur professionnalisme et leur collaboration : Stéfane Prémont, Jean-Francois Dutil, Lise Rancourt.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon équipe de recherche. En particulier, Madame Myriam Chartier, pour sa grande aide, son enthousiasme et son implication au projet.

Mes sincères remerciements vont particulièrement à Madame Lucie Coudert pour son aide, ses conseils et ses encouragements ainsi qu'à Madame Lan Huong Tran pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

Un grand merci à tous mes collègues Sara, Mariam, Alia, Karima, Malika, Rim, Tengfei, Yassine, Oumar, Kulchaya, Catherine, Philippe, Julien, Sanae et Assia.

Une grande pensée à ma famille sans qui, rien n'aurait été pareil, je vous remercie pour vos encouragements et votre amour. Je tiens à remercier personnellement, papa, maman, Mehdi, Hayet, Fayçal, mes neveux Brahim, Mohamed et ma plus belle nièce Emna. Vous m'apportez tellement et je remercie dieu de vous avoir dans ma vie.

Bien évidemment, une attention particulière est apportée à tous mes amis que je connais à travers le monde.

Cette expérience m'a non seulement enrichie, dans le domaine de la recherche mais aussi personnellement ! C'est à travers les bonnes et moins bonnes expériences qu'on apprend. Des leçons, qui sans doute me serviront toute la vie, m'épargneront de refaire à nouveau les mêmes erreurs et me laisseront réagir différemment dans le futur.

AVANT-PROPOS

Cette étude s'est concentrée sur la production potentielle de sulfures lors de l'infiltration d'effluent issu du procédé de dénitrification autotrophe dans un champ de polissage. L'objectif de ce projet de doctorat était de comprendre les mécanismes pouvant mener à la production de sulfures à partir des sulfates présents dans les eaux usées domestiques décentralisées traitées, dans le but d'éviter leur génération et de s'assurer de l'innocuité du procédé de traitement en question. La présente thèse a été structurée en quatre chapitres, dont trois chapitres représentent chacun une publication scientifique, faisant l'objet d'une section des résultats de ce projet de doctorat.

- Le Chapitre 1 présente la synthèse de cette thèse comportant une revue de la littérature, l'approche méthodologique ainsi que les principaux résultats obtenus.
- Le Chapitre 2 présente l'étude réalisée à l'échelle laboratoire sur l'infiltration des eaux usées à travers différents types de sols reconstitués :

Assessment of sulfide production risk in soil during the infiltration of domestic wastewater treated by sulfur-utilizing denitrification process. L. Ghorbel, L. Coudert, Y. Gilbert, G. Mercier, J.F. Blais. *Environmental Science and Pollution Research*, DOI: [10.1007/s11356-016-6979-4](https://doi.org/10.1007/s11356-016-6979-4).

- Le Chapitre 3 présente les résultats obtenus en ce qui concerne l'infiltration dans le sol des effluents à moyenne échelle :

Clogging and sulfide generation during infiltration of denitrified domestic wastewater through soil. L. Ghorbel, L. Coudert, Y. Gilbert, G. Mercier, J.F. Blais. Soumis à *Journal of Environmental Engineering* le 20-09-2016.

- Enfin, le Chapitre 4 décrit les résultats de l'étude portant sur la mise en évidence des conditions critiques à partir desquelles une formation de sulfures peut être observée suite à un procédé de dénitrification autotrophe utilisant du soufre élémentaire :

Determination of critical operational conditions favoring sulfide production from domestic wastewater treated by sulfur-utilizing denitrification process. L. Ghorbel, L. Coudert, Y. Gilbert, G. Mercier, J.F. Blais. Soumis à *Journal of Environmental Management* le 28-09-2016.

RÉSUMÉ

La gestion des eaux usées est généralement prise en charge par des infrastructures municipales desservies par des systèmes de collecte et de traitement. Toutefois, dès lors que la densité urbaine est faible, les habitations doivent être reliées à des systèmes décentralisés de traitement. C'est dans ce cadre que plusieurs compagnies développent et commercialisent des technologies qui répondent aux exigences environnementales prescrites par les autorités gouvernementales. Afin de répondre aux réglementations de plus en plus sévères en matière de rejet des contaminants dans les eaux usées, un procédé de dénitrification autotrophe a été récemment développé. Ce dernier vise à éliminer l'azote présent sous forme de nitrates dans les effluents de la filière de traitement, moyennant un système fonctionnant avec du soufre et du calcaire.

Selon une étude réalisée sur une période d'un an à la station expérimentale de la compagnie, le procédé de dénitrification autotrophe sur soufre et calcaire favorise l'enlèvement des nitrates, permettant d'atteindre des concentrations inférieures à 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$. Le principal inconvénient lié à la mise en place de ce procédé serait la production potentielle de sulfures lors de l'infiltration de l'effluent traité dans un champ de polissage. Agissant comme substrat inorganique oxydable et comme support bactérien dans le procédé de dénitrification autotrophe, le soufre s'oxyde en sulfates. Sous des conditions anaérobies, les sulfates peuvent être potentiellement réduits en sulfures. Pendant que les bactéries sulfato-réductrices (BSR) utilisent les sulfates comme accepteurs d'électrons, le dihydrogène ou la matière organique sont utilisés comme donneurs d'électrons. Les sulfures, ainsi générés, sont connus pour être toxiques pour l'environnement et les êtres humains, corrosifs et générateurs de mauvaises odeurs. Dans le cas de l'infiltration des eaux usées dénitrifiées dans un champ de polissage, les effets concernant les mauvaises odeurs ainsi que la toxicité éventuelle pour l'environnement et les êtres humains sont les effets probables de survenir, dépendamment de la concentration en sulfures dégagés.

L'objectif général de ce projet de recherche porte sur l'étude des sous-produits générés lors du processus de dénitrification autotrophe implanté en aval d'un traitement secondaire des eaux usées en application résidentielle. Dans un premier temps, il est essentiel de vérifier s'il y a génération de sulfures lors de l'infiltration des eaux usées issues du procédé de dénitrification dans des champs de polissage. Sinon, il est primordial d'établir les conditions critiques à partir desquelles la formation de sulfures peut apparaître afin de s'assurer de l'innocuité du procédé de dénitrification développé pour le traitement des eaux usées provenant des résidences isolées. Par conséquent, les travaux réalisés au cours de ce projet de doctorat ont eu pour objectif de déterminer le risque de génération de sulfures à l'échelle laboratoire et à moyenne échelle. Son évaluation a été basée sur le suivi de plusieurs paramètres dont le pH, la température, le potentiel d'oxydo-réduction (POR), l'oxygène dissous (OD), le carbone organique dissous (COD), les sulfates (SO_4^{2-}), les sulfures aqueux ($\text{H}_2\text{S}_{\text{aq}}$) et gazeux ($\text{H}_2\text{S}_{\text{g}}$).

La première étape de ce projet de recherche a été de simuler, à échelle laboratoire, les conditions d'infiltration des eaux usées dans trois sols de perméabilités différentes (très perméable, perméable et peu perméable) et selon deux modes d'infiltration (saturé ou insaturé). Pour cela, la conductivité hydraulique de différents mélanges (sable/silt) a été déterminée, conduisant à la formation d'un sol très perméable ($K_s = 0,028 \text{ cm/s}$), perméable ($K_s = 0,0013 \text{ cm/s}$) et peu perméable ($K_s = 0,00015 \text{ cm/s}$). Par la suite, ces sols ont été caractérisés et introduits dans des colonnes à petite échelle afin d'évaluer leurs capacités à être utilisés en tant que champ d'infiltration. Ces colonnes ont été inoculées par une microflore microbienne apte à réduire les sulfates présents dans les effluents issus d'un procédé de traitement décentralisé des eaux usées. Sur une durée de cent jours, il a été mis en évidence qu'une faible teneur en sulfures a été mesurée dans l'eau ($< 0,25 \text{ mg/L}$) et dans l'air ($< 0,15 \text{ ppm}$). Quelle que soit la perméabilité du sol, les eaux usées domestiques traitées par un système de dénitrification autotrophe ne semblent pas être problématiques en raison de la faible teneur en matière organique (carbone organique dissous). En effet, les eaux usées domestiques traitées par dénitrification autotrophe contiennent en moyenne près de 5 mg/L de demande biologique en oxygène (DBO_5), 7 mg/L de carbone organique dissous (COD) et 100 mg/L de demande chimique en oxygène (DCO).

Dans un deuxième temps, afin d'assurer une longue vie au système de traitement et de maintenir le processus de dénitrification opérationnel pour toute la période requise, les performances hydrauliques de ce dernier et la production de sulfures ont été évaluées. Pour cela, des essais ont été réalisés, à moyenne échelle, dans des réacteurs d'une capacité de 200 L moyennant deux sols de perméabilités différentes (très perméable et perméable). L'infiltration des eaux usées de dénitrification à travers ces deux sols avec un taux hydraulique continu (130 et 70 L/m²/jour pour les sols très perméable et perméable, respectivement) n'a pas conduit à la production d'importantes quantités de sulfures gazeux et/ou aqueux. En effet, durant l'année de suivi, la concentration maximale en sulfure gazeux et aqueux mesurée a été de 2,1 ppm et de 0,7 mg/L, respectivement. Il est important de rappeler que les symptômes les plus graves apparaissent à partir de concentrations dans l'air atteignant près de 100 ppm (perte de l'odorat, irritation des voies respiratoires, irritation des yeux, etc.) (Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 2016).

Selon le suivi des performances hydrauliques, aucune baisse de la capacité d'infiltration n'a été enregistrée pour le sol sablonneux (très perméable), alors qu'un phénomène de colmatage a été observé pour le sol sablo-silteux (perméable) après 37 jours. Deux facteurs ont été reconnus comme potentiellement responsables de l'apparition de ce phénomène de colmatage. Le premier serait la formation d'une couche appelée « biomat » au niveau de la surface d'infiltration. Le deuxième serait lié à la formation d'ocre ferreuse au fond du réacteur contenant le sol sablo-silteux.

Finalement et étant donné les faibles teneurs en sulfures produites lors de l'infiltration des eaux usées dénitrifiées à travers un champ de polissage, il a été jugé important de déterminer les conditions critiques à partir desquelles il y a production de sulfures. L'étude de l'influence de certains paramètres expérimentaux (teneurs en sulfates et en carbone organique dissous, température) sur la production de sulfures aqueux ou gazeux a été effectuée moyennant un plan d'expériences en surface de réponses de type Box-Behnken. Les concentrations maximales enregistrées ont été de 85 ppm pour les sulfures gazeux et de 2,42 mg/L pour les sulfures aqueux. Elles ont été mesurées à une température de 25°C et avec des concentrations de 270 et 90 mg/L en sulfates et en carbone organique dissous, respectivement. Un modèle

mathématique a ainsi été généré traduisant l'influence positive des paramètres choisis sur la production des sulfures aqueux. Suivant un ordre décroissant, il a été démontré que la génération des sulfures est influencée par la concentration en carbone organique dissous suivi de la concentration en sulfates et la température.

Mots clés : Traitement décentralisé, eaux usées domestiques, dénitrification autotrophe, sulfates, sulfures, colmatage, sol.

ABSTRACT

Usually, the management of wastewater is handled by municipal infrastructure served by collection and treatment systems. However, when the urban density is low, the dwellings must be connected to decentralized treatment systems. In this context, many companies develop and commercialize technologies that meet environmental requirements established by governmental authorities. Despite the effectiveness of the various processes developed, some technologies require continuous researches and improvements.

In order to meet the more and more stringent regulations, an autotrophic denitrification process has been recently developed using sulfur and limestone to allow the removal of the nitrate initially present in the effluent.

According to a study carried out over a period of one year at the experimental station of the company, the autotrophic denitrification process using sulfur and limestone allows an efficient removal of nitrate, below 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$. The main disadvantage of the implementation of this process might be the production of sulfide during the infiltration of the denitrified effluent in a polishing field. Indeed, acting as an inorganic substrate and as bacterial support in the process of autotrophic denitrification, elemental sulfur is oxidized into sulfates. Under anaerobic conditions, the sulfates could be reduced into sulfide. While sulfate-reducing bacteria (SRB) use sulfates as electron acceptors, hydrogen or organic matter are used as electron donors. Sulfides are known to be toxic to the environment and humans, to be corrosive and to be responsible of bad odors.

The aim of this research project was to study the potential production of by-products such as sulfides during the infiltration of treated wastewater emerging from a sulfur-utilizing denitrification process located downstream of a secondary treatment in a residential application. Firstly, it would be important to determine if the generation of sulfide occurs during the infiltration of denitrified wastewaters through polishing fields. Otherwise, it is essential to determine the critical conditions related to the formation of sulfide to ensure the

environmental safety of the autotrophic denitrification process developed for the treatment of wastewaters emerging from isolated dwellings.

The research performed during this PhD project aims to determine the risk of sulfide generation at both laboratory and medium scales. Its assessment was based on the monitoring of various parameters including pH, temperature, redox potential (ORP), dissolved oxygen (DO), dissolved organic carbon (DOC), sulfates (SO_4^{2-}), dissolved ($\text{H}_2\text{S}_{\text{aq}}$) and gaseous ($\text{H}_2\text{S}_{\text{g}}$) sulfide.

Firstly, the infiltration of denitrified wastewaters through three soils which have different permeabilities (highly permeable, permeable and lowly permeable) and two modes of infiltration (saturated and unsaturated) was studied at laboratory scale. The hydraulic conductivity of the different mixtures of sand and silt was determined, leading to the formation of highly permeable ($K_s = 0.0280$ cm/s), permeable ($K_s = 0.0013$ cm/s) and lowly permeable ($K_s = 0.00015$ cm/s) soils. Subsequently, these soils were characterized and introduced into laboratory-scale columns to assess their ability to be used as a polishing field. These columns were inoculated with sulfate-reducing bacteria able to reduce the sulfates present in the denitrified wastewaters emerging from a decentralized denitrification process. Over a period of one hundred days, the results highlighted that low sulfide contents were measured in the water (< 0.25 mg/L) and in the air (< 0.15 ppm). Whatever the permeability of the soil studied, the infiltration of denitrified domestic wastewaters did not seem to be problematic due to the low organic matter content (dissolved organic carbon) present in wastewaters. Indeed, domestic wastewaters treated using an autotrophic denitrification process contained approximately 5 mg/L of biological oxygen demand (BOD_5), 7 mg/L of dissolved organic carbon (DOC) and 100 mg/L of chemical oxygen demand (COD).

Secondly, to ensure a long life of the treatment system and to maintain the denitrification process operational for the required period, the hydraulic performance and the production of sulfide were evaluated. Therefore, experiments were performed onto 200-liters capacity reactors to simulate the infiltration of denitrified wastewaters through two different soils (highly permeable and permeable). The infiltration of denitrified wastewaters through these soils with a continuous hydraulic rate (130 and 70 L/m²/day for highly permeable and permeable soils, respectively) did not lead to the production of huge amounts of gaseous

and/or aqueous sulfide. Indeed, the maximum concentration of gaseous and aqueous sulfide measured over a period of one year was estimated at 2.1 ppm and 0.7 mg/L, respectively. For information, the apparition of serious symptoms begins at concentrations higher than 100 ppm (loss of smell, respiratory tract irritation, eye irritation, etc.) (Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 2016).

According to the results related to the hydraulic performance, no decrease in the infiltration capacity was recorded for the sandy soil (highly permeable) over the 365 days period of the experiments, while clogging phenomenon was observed for the sandy-silty soil (permeable) after only 37 days. Two factors were identified as potentially responsible of this clogging phenomenon. The first one might be the formation of a thin layer called “biomat” in the infiltration surface. The second one might be the formation of iron ochre at the bottom of the reactor containing the sandy-silty soil (permeable soil).

Because of the low levels of both gaseous and aqueous sulfides produced during the infiltration of denitrified wastewaters through a polishing field, it was important to identify the critical conditions leading to the production of sulfides. Therefore, the influence of some parameters (contents of sulfates and dissolved organic carbon, temperature) on the production of sulfides was studied using a response surface methodology (Box-Behnken design). The maximum concentrations recorded were estimated at 85 ppm and 2.42 mg/L for both gaseous and dissolved sulfides, respectively. They were measured at a room temperature (25°C) with initial concentrations of 270 mg SO_4^{2-} /L and 90 mg/L of dissolved organic carbon. A mathematical model has been generated reflecting the positive influence of selected parameters on the production of dissolved sulfides. In a decreasing order, it has been shown that the generation of sulfides was firstly influenced by the concentration of dissolved organic carbon followed by the concentration of sulfates and the temperature.

Keywords: Decentralized treatment, domestic wastewater, autotrophic denitrification, sulfates, sulfides, clogging, soil.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
AVANT-PROPOS.....	V
RÉSUMÉ	VII
ABSTRACT	XI
TABLE DES MATIÈRES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XIX
LISTE DES FIGURES	XXI
LISTE DES ÉQUATIONS	XXIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XXV
INTRODUCTION	1
1 CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1.1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	7
1.1.1 <i>Gestion des eaux usées au Canada</i>	<i>7</i>
1.1.2 <i>Règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées issues des résidences isolées (Q2, r.22).....</i>	<i>8</i>
1.1.3 <i>Procédé de dénitrification autotrophe</i>	<i>9</i>
1.1.4 <i>Sous-produits issus de la dénitrification autotrophe sur soufre.....</i>	<i>11</i>
1.1.5 <i>Formation et devenir des sulfures.....</i>	<i>13</i>
1.1.6 <i>Formes et prédominances des sulfures</i>	<i>18</i>
1.1.7 <i>Problématiques liées aux sulfures.....</i>	<i>20</i>
1.1.8 <i>Prédiction de la production de sulfures lors de l'infiltration de l'eau usée dénitrifiée</i>	<i>22</i>
1.1.9 <i>Élimination des sulfures dans l'eau usée dénitrifiée.....</i>	<i>25</i>
1.1.10 <i>Infiltration des eaux usées et devenir des sulfures dans le sol.....</i>	<i>27</i>
1.2 HYPOTHÈSES, OBJECTIFS DE RECHERCHE ET ORIGINALITÉ	31
1.2.1 <i>Hypothèses et objectifs.....</i>	<i>31</i>
1.2.2 <i>Originalité</i>	<i>33</i>
1.3 DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE	35
1.3.1 <i>Caractérisation des sols recomposés et détermination de leurs perméabilités.....</i>	<i>35</i>
1.3.2 <i>Développement de la microflore bactérienne</i>	<i>36</i>
1.3.3 <i>Infiltration dans le sol de l'effluent dénitrifié : essais à petite échelle</i>	<i>38</i>
1.3.4 <i>Infiltration dans le sol de l'effluent dénitrifié : essais à moyenne échelle.....</i>	<i>39</i>
1.3.5 <i>Détermination des conditions critiques pour la génération des sulfures</i>	<i>40</i>
1.3.6 <i>Méthodes analytiques</i>	<i>42</i>

1.4	DISCUSSION DES PRINCIPAUX RÉSULTATS.....	47
1.4.1	<i>Caractérisation des sols</i>	47
1.4.2	<i>Caractérisation des eaux usées</i>	47
1.4.3	<i>Essais à petite échelle</i>	48
1.4.4	<i>Essais à moyenne échelle</i>	55
1.4.5	<i>Détermination des conditions critiques menant à la formation de sulfures</i>	61
1.5	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	67
1.6	RÉFÉRENCES	71
2	CHAPITRE 2	85
2.1	RÉSUMÉ.....	87
2.2	ABSTRACT.....	88
2.3	ABBREVIATIONS	89
2.4	INTRODUCTION	90
2.5	MATERIAL AND METHODS	93
2.5.1	<i>Soil materials</i>	93
2.5.2	<i>Determination of soil sample permeability</i>	95
2.5.3	<i>Experimental set-up</i>	95
2.5.4	<i>Acclimatization of the bacterial microflora</i>	97
2.5.5	<i>System start-up</i>	97
2.5.6	<i>Analytical methods</i>	99
2.6	RESULTS AND DISCUSSION	100
2.6.1	<i>Preparation and characterization of the different soil samples</i>	100
2.6.2	<i>Bacterial microflora acclimatization</i>	104
2.6.3	<i>Treated wastewater characterization</i>	106
2.6.4	<i>Columns experiments</i>	108
2.7	CONCLUSION	118
2.8	ACKNOWLEDGMENTS	118
2.9	REFERENCES	120
3	CHAPITRE 3	125
3.1	RÉSUMÉ.....	127
3.2	ABSTRACT.....	128
3.3	ABREVIATION	129
3.4	INTRODUCTION	130
3.5	MATERIALS AND METHODS	135
3.5.1	<i>Experimental set-up</i>	135

3.5.2	<i>Denitrified domestic wastewater</i>	138
3.5.3	<i>Determination of soil sample permeability</i>	141
3.5.4	<i>Analytical methods</i>	141
3.6	RESULTS AND DISCUSSION	143
3.6.1	<i>Pilot-scale experiments</i>	143
3.6.2	<i>Clogging phenomenon</i>	150
3.7	CONCLUSION	158
3.8	ACKNOWLEDGMENTS	158
3.9	REFERENCES	160
4	CHAPITRE 4	165
4.1	RÉSUMÉ.....	167
4.2	ABSTRACT.....	168
4.3	ABBREVIATIONS	169
4.4	INTRODUCTION	170
4.5	EXPERIMENTAL	172
4.5.1	<i>Undenitrified and denitrified wastewater samples collection and characterization</i>	172
4.5.2	<i>Acclimatization of the bacterial microflora</i>	173
4.5.3	<i>Experimental set-up</i>	173
4.5.4	<i>Preliminary experiments</i>	174
4.5.5	<i>Determination of the influence of DOC and sulfate contents using a Box-Behnken methodology</i>	175
4.5.6	<i>Analytical techniques</i>	177
4.6	RESULTS AND DISCUSSION	177
4.6.1	<i>Wastewater characterizations</i>	177
4.6.2	<i>SRB inoculation</i>	178
4.6.3	<i>Preliminary experiments</i>	178
4.6.4	<i>Prediction of sulfide production using a Box-Behnken design</i>	184
4.7	CONCLUSION	191
4.8	ACKNOWLEDGMENTS	192
4.9	REFERENCES	193
ANNEXE 1	199
ANNEXE 2	201
ANNEXE 3	203
ANNEXE 4	205
ANNEXE 5	207
ANNEXE 6	209

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1	Normes maximales de rejet du système de traitement tertiaire (MDDELCC, 2015)	8
Tableau 1-2	Critère de rejet des eaux usées et de l'eau potable pour les nitrates, sulfates et sulfures (Ministère du Développement durable, 2013)	9
Tableau 1-3	Récapitulatif des sous-produits issus de procédés de dénitrification autotrophe sur du soufre élémentaire	12
Tableau 1-4	Essais complémentaires d'enrichissement d'eau usée en matière organique en contact avec du sol silteux	53
Tableau 1-5	Significativité des facteurs et de leurs interactions	64
Table 2-1	Soil composition and experimental conditions used for the experiments in saturated and unsaturated modes	94
Table 2-2	Determination of the hydraulic conductivity of the different soil mixture produced (mixture of silt and sand).....	102
Table 2-3	Elemental characterization of the different soils studied	103
Table 3-1	Summary of by-products from autotrophic denitrification processes on elemental sulfur	133
Table 3-2	Denitrified wastewater characterization at the beginning of the experiments (n = 1)	140
Table 4-1	Composition of the liquid in different reactors used in the preliminary experiments.....	174
Table 4-2	Selected factors and their levels.....	176
Table 4-3	Characterization of the different wastewaters used.....	178

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Principe de fonctionnement du biofiltre Ecoflo® (PremierTechAquab, 2015b)	2
Figure 1-1	Réactions assimilatrices et dissimilatrices de réduction des sulfates (tiré de Holland et Turekian, 2010; Madigan <i>et al.</i> , 2003)	14
Figure 1-2	Diagramme de Pourbaix des sulfures (T = 25°C, P = 1,013 bar et C = 0,1 mM) (Hulshoff Pol et Lens, 2000)	18
Figure 1-3	Formes de sulfures selon les valeurs de pH (Lens <i>et al.</i> , 1998).....	19
Figure 1-4	Organigramme des différents essais réalisés au cours de ce projet de recherche.....	32
Figure 1-5	Montage mis en place pour le développement de la microflore bactérienne	37
Figure 1-6	Schéma du montage utilisé pour les essais à échelle laboratoire	38
Figure 1-7	Schéma du montage utilisé pour les essais à moyenne échelle (Réacteurs de 200 L).....	40
Figure 1-8	Évolution du POR lors de l'infiltration des eaux usées dans trois types de sols de perméabilité différentes en modes insaturé (a) et saturé (b)	49
Figure 1-9	Réduction des sulfates en sulfures en conditions anaérobies suivie de leur oxydation en soufre élémentaire en conditions aérobies (Odom et Singleton, 1993)	54
Figure 1-10	Profil du rapport DCO/SO_4^{2-} de l'eau dénitrifiée	57
Figure 2-1	Design and composition of the columns used for laboratory-scale experiments during domestic wastewater infiltration through different soil permeabilities: (a.) schematic representation of the experiment and (b.) picture of the equipment used.	96
Figure 2-2	Particle size distribution of three different soil samples (highly permeable, permeable and lowly permeable) determined using a Laser particle size analyzer	101
Figure 2-3	Determination of pH (a.), ORP (b.), concentrations of sulfate (SO_4^{2-}) (c.) and total sulfur (S_{total}) (d.) during bacterial microflora acclimatization with the Postgate B medium.....	105
Figure 2-4	Evolution of pH (a.), ORP (b.) and COD (c.) during domestic wastewater infiltration through three different soil permeabilities (highly permeable, permeable and lowly permeable) in unsaturated mode.....	109
Figure 2-5	Evolution of sulfate (a.) and aqueous sulfide (b.) during domestic wastewater infiltration through three different soil permeabilities (highly permeable, permeable and lowly permeable) in unsaturated mode.....	110
Figure 2-6	Evolution of pH (a.), ORP (b.) and COD (c.) during domestic wastewater infiltration through three different soil permeabilities (highly permeable, permeable and lowly permeable) in saturated mode.....	115

Figure 2-7	Evolution of sulfate (a) and aqueous sulfide (b) during domestic wastewater infiltration through three different soil permeabilities (highly permeable, permeable, and lowly permeable) in saturated mode.....	117
Figure 3-1	Schematic representation of the septic system used (modified from PTA, 2015)	135
Figure 3-2	Experimental design used for pilot scale experiments : a. Schematic representation of the composition of the different reactors, b. Photography of the reactors and c. Photography of the denitrified wastewater distribution system	137
Figure 3-3	Evolution of the temperature (a.), pH (b.), ORP (c.) and Dissolved Oxygen (d.) during the infiltration of denitrified wastewater (feeding solution) through highly permeable soil (R1) and permeable soil (R2)	144
Figure 3-4	Evolution of the concentrations of DOC (a.), SO_4^{2-} (b.), $\text{H}_2\text{S}_{(lq)}$ (c.) and $\text{H}_2\text{S}_{(g)}$ (d.) during denitrified wastewater (feeding solution) infiltration through highly permeable soil (R1) and permeable soil (R2)	145
Figure 3-5	Infiltration rate of treated wastewater through the sandy loam soil (R2) during the clogging period.....	151
Figure 3-6	Investigation of soil sections to explain the clogging phenomenon : Particle size distribution (a.), Humidity content (b.) and Organic carbon content (c.)	153
Figure 3-7	Formation of biomat layer (a.) and iron ochre (b.), responsible of clogging phenomenon	155
Figure 4-1	Schematic representation of the process used in the domestic wastewater treatment station located in Rivière-du-Loup (Québec, Canada).....	173
Figure 4-2	Gaseous (a) and aqueous (b) hydrogen sulfide production and ORP values (c) observed in bioreactors containing different proportions of undenitrified and denitrified domestic wastewaters.....	180
Figure 4-3	Relationships between ORP values after 14 days of incubation measured in the different reactors versus (a) initial DOC concentrations and (b) DOC concentrations after 14 days of incubation	182
Figure 4-4	Relationship between the ORP values and $\log \left(\frac{[\text{H}_2\text{S}_{aq}]}{[\text{SO}_4^{2-}]} \right)$ obtained for reactor 8 every 14 days of incubation	184
Figure 4-5	Variance between the experimental and the predicted dissolved sulfide concentrations: (a) predicted versus actual values and (b) Normal plot of residuals.....	187
Figure 4-6	Response surface contour plot showing the effects of different variables on sulfide generation: (a) effect of the temperature and SO_4^{2-} concentration for a DOC content of 87.3 mg/L; (b) effect of the temperature and the DOC content for a SO_4^{2-} concentration of 371 mg/L and (c) effect of both SO_4^{2-} and DOC at a temperature of 21.5°C	190

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1-1	Réaction de dénitrification en présence de soufre élémentaire et de chlorure d'ammonium (Batchelor et Lawrence, 1978)	10
Équation 1-2	Activation des sulfates par l'ATP en présence de l'ATP-sulfurylase.....	15
Équation 1-3	Phosphorylation de l'APS en PAPS par APS-phosphokinase.....	15
Équation 1-4	Phosphorylation du PAPS en PAP (Phosphoadénosine-5-phosphate) par PAPS-réductase moyennant le NADPH.....	15
Équation 1-5	Réduction des sulfites par des bactéries sulfite-réductases moyennant le NADPH	15
Équation 1-6	Synthèse de la cystéine par O-acétylserine sulfhydrylase	16
Équation 1-7	$SO_4^{2-} + 8 e^- + 10 H^+ \rightarrow H_2S + 4 H_2O$	16
Équation 1-8	$H_2 \rightarrow 2 H^+ + 2 e^-$	16
Équation 1-9	$CH_2O + 2 H_2O \rightarrow HCO_3^- + 5 H^+ + 4 e^-$	16
Équation 1-10	$SO_4^{2-} + 4 H_2 + 2 H^+ \rightarrow H_2S + 4 H_2O$	16
Équation 1-11	$2 CH_2O + SO_4^{2-} \rightarrow 2 HCO_3^- + H_2S$	16
Équation 1-12	$ATP + SO_4^{2-} \rightarrow APS^{2-} + P_i$	17
Équation 1-13	$P_i + H_2O \rightarrow 2 P_i$	17
Équation 1-14	$APS^{2-} + H_2 \rightarrow AMP^{2-} + 2 H^+ + SO_3^{2-}$	17
Équation 1-15	$H_2S \rightarrow H^+ + HS^-$ ($K_1 = 1,0 \times 10^{-7}$)	19
Équation 1-16	$HS^- \rightarrow H^+ + S^{2-}$ ($K_2 = 1,0 \times 10^{-14}$).....	19
Équation 1-17	$H_2S + 2 O_2 \rightarrow H_2SO_4$	20
Équation 1-18	Relation entre le POR et la production de sulfures aqueux	23
Équation 1-19	$2 Fe^{3+} + HS^- \rightarrow 2 Fe^{2+} + S^0 + H^+$	26
Équation 1-20	$Fe^{2+} + HS^- \rightarrow FeS + H^+$	26
Équation 1-22	Détermination du nombre d'essais à réaliser pour un plan de type Box-Behnken	41
Équation 1-23	Détermination de l'équation de second degré permettant de prédire la réponse souhaitée en fonction des facteurs étudiés.....	42
Équation 1-24	$H_2S_g = 0,29 POR + 43 COD - 350$	62
Équation 1-25	$POR = f(\log[H_2S]_{aq}/[SO_4^{2-}])$	62
Équation 1-26	Détermination de la quantité de sulfures aqueux produits.....	63

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
APS	Adénosine-5-phosphosulfate
ATP	Adénosine triphosphate
BM	Bactéries méthanogènes
BOD_5	<i>Biochemical oxygen demand (5 days)</i>
BSR	Bactéries sulfato-réductrices
CEAEQ	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
COD	Carbone organique dissous
<i>COD</i>	<i>Chemical oxygen demand</i>
DBO_5	Demande biochimique en oxygène (5 jours)
$DBOC_5$	Demande biochimique en oxygène carbonée (5 jours)
DCO	Demande chimique en oxygène
DCO/SO_4^{2-}	Ratio des quantités de DCO et sulfates exprimées en mg O_2 / mg SO_4^{2-}
<i>DOC</i>	<i>Dissolved organic carbon</i>
<i>EPS</i>	<i>Extracellular polymeric substances</i>
H_2S_{aq}	Sulfure d'hydrogène aqueux
H_2S_g	Sulfure d'hydrogène gazeux
<i>HRT</i>	<i>Hydraulic retention time</i>
<i>ICP-AES</i>	<i>Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy</i>
<i>IS</i>	<i>Infiltration surface</i>
Ks	Constante de conductivité hydraulique
MDDEFP	Ministère du développement durable, de l'environnement, de la faune et des parcs
MDDELCC	Ministère du développement durable, de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques
MES	Matières en suspension
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH	Forme réduite de NADP
OD	Oxygène dissous
<i>ORP</i>	<i>Oxidation-reduction potential</i>
PAP	Phosphoadénosine-5-phosphate
PAPS	3-phosphoadénosine-5-phosphosulfate
Pi	Phosphate
POR	Potentiel d'oxydo-réduction
PPi	Pyrophosphate

ppm	Partie par million
PTA	Premier Tech Aqua
RESAEU	Règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées
SI	Surface d'infiltration
SO_4^{2-}	Sulfates
SO_3^{2-}	Sulfites
S^{2-}	Sulfures
SOAD	<i>Sulfide-oxidizing autotrophic denitrification</i>
SPE	Substances polymériques extracellulaires
SRB	<i>Sulfate-reducing bacteria</i>
SS	<i>Suspended solids</i>

INTRODUCTION

Aujourd'hui, près d'un million d'habitations au Québec disposent d'un système septique (MDDEFP, 2013). Afin d'éviter une contamination environnementale liée à une gestion inadéquate des eaux usées, une multitude de procédés de traitement ont vu le jour au cours de ces dernières décennies. Le traitement des eaux usées domestiques en provenance des systèmes autonomes ou collectifs devient de plus en plus primordial pour protéger l'environnement et favoriser le développement urbain à proximité de réserves d'eau (sources d'eau potable, lac, rivière) dans différentes régions isolées à travers le monde. Par exemple, le développement urbain au niveau de la région du Lac Saint-Charles (Québec, Qc, Canada) reste très limité en raison du fait que ce lac est une source d'eau potable pour la ville de Québec. Afin de permettre la construction de résidences autour du lac et ainsi favoriser le développement urbain de ce secteur, il est très important de s'assurer que les teneurs en contaminants et/ou nutriments présents dans les effluents en provenance de ces résidences isolées soient très faibles pour ne pas prendre le risque de contaminer cette source d'eau potable. Par conséquent, le développement de traitements secondaires et/ou tertiaires qui permettraient de réduire les teneurs en nitrates et en phosphore devient de plus en plus indispensable dans certaines régions à travers le monde pour favoriser le développement urbain en régions isolées. En effet, il est important que ces procédés permettent de rencontrer les critères de qualité définis par les réglementations ou exigences concernant le rejet des eaux usées selon la nature de ces eaux, le milieu récepteur en cas de rejet direct ou leurs éventuelles utilisations. Généralement, le système de traitement décentralisé comprend une installation septique conventionnelle constituée d'une fosse septique et d'un élément épurateur. La fonction de la fosse septique est de séparer les solides des liquides par décantation des matières en suspension et/ou par flottation des matières les plus légères. Les eaux ainsi clarifiées passent généralement par un pré-filtre pour empêcher que certaines matières en suspension ne rejoignent l'élément épurateur. Assurant le traitement secondaire des eaux usées, l'élément épurateur est constitué de tuyaux perforés permettant d'acheminer les eaux dans le sol afin que les bactéries dégradent les impuretés résiduelles (Bernier et al., 2012). Un traitement

secondaire avancé peut aussi être ajouté à cette filière (exemple du biofiltre Ecoflo commercialisé par PTA) (Figure 1). Les eaux usées en provenance de la fosse septique sont distribuées à travers ce biofiltre moyennant des plaques distributrices. Le milieu filtrant est constitué de matières organiques naturelles (mousse de tourbe de sphaigne et/ou fragments de coco revalorisé) contenu dans un caisson en polyéthylène, en béton ou en fibre de verre. Ce biofiltre permet de retenir plus de 90% des matières en suspension présentes dans les eaux usées et facilite la dégradation de la matière organique biodégradable et la réduction des organismes pathogènes (Ben-Khaled, 2016). Selon Premier Tech Aqua (2015a), le système présente de nombreux avantages tels que sa simplicité, sa fiabilité, son traitement sans énergie, son installation compacte et polyvalente ainsi qu'une durée de vie du milieu filtrant estimée entre 10 et 15 ans.

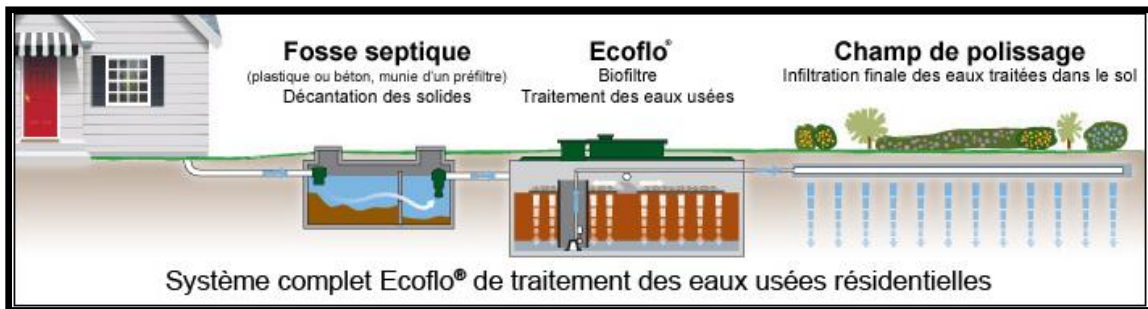


Figure 1 Principe de fonctionnement du biofiltre Ecoflo® (PremierTechAqua, 2015b)

Cependant, lorsque les exigences de rejet d'un site nécessitent des niveaux de traitement plus poussés pour éliminer les éléments nutritifs, il est possible d'ajouter une unité de traitement tertiaire. Les traitements tertiaires comprennent les procédés d'électrocoagulation permettant d'éliminer le phosphore, les procédés de désinfection pour l'élimination des bactéries et le procédé de dénitrification autotrophe sur soufre et calcaire pour l'enlèvement des nitrates. Les eaux usées ainsi traitées peuvent simplement rejoindre un champ de polissage, assurant leur infiltration finale dans le sol.

Dans ce cadre, plusieurs procédés de dénitrification hétérotrophe et/ou autotrophe ont été longtemps testés. Pour plusieurs raisons dont, son faible coût, son autonomie et sa non-dépendance à une source de carbone organique externe, la dénitrification autotrophe sur soufre élémentaire s'est avérée intéressante. En effet, les bactéries responsables de la réduction des nitrates (NO_3^-) en azote moléculaire (N_2) utilisent souvent du dioxyde de carbone (CO_2) en tant que source de carbone et du soufre élémentaire comme donneur d'électrons en l'oxydant en sulfates (SO_4^{2-}). Dépendamment des concentrations de nitrates réduits, différentes teneurs en ions sulfates peuvent être retrouvées dans le milieu.

Le présent projet de recherche porte sur le devenir des sous-produits (sulfates) issus d'un procédé tertiaire au niveau de la chaîne de traitement des eaux usées résidentielles. Plus précisément, il concerne l'étude des risques liés à la présence de sulfates dans les eaux usées domestiques traitées à la sortie d'un procédé de dénitrification autotrophe opéré en aval d'un procédé biologique. Les sulfates présents dans les eaux usées dénitrifiées, placés en conditions anaérobies lors de l'infiltration de ces eaux dans les sols, peuvent potentiellement être réduits en sulfures et générer des problèmes d'odeurs, ainsi que des problèmes pour la santé humaine ou l'environnement (ATSDR, 2006), si les concentrations en sulfure d'hydrogène deviennent trop élevées.

L'objectif de ce doctorat est de s'assurer que cette nouvelle biotechnologie ne présente pas de risque d'ordre environnemental et ce, quel que soit la perméabilité du sol et selon deux modes de saturation en eau. Les conditions pouvant mener à la réduction des sulfates présents dans les eaux usées dénitrifiées en sulfures ont également été déterminées afin d'évaluer la probabilité de rencontrer ces conditions lors de l'infiltration des eaux usées dénitrifiées dans un champ de polissage. Le premier Chapitre présente la synthèse des travaux réalisés incluant le contexte de l'étude, une synthèse bibliographique, la problématique, la méthodologie du projet ainsi que les principaux résultats obtenus, conclusions et recommandations. Le deuxième Chapitre présente l'étude réalisée à l'échelle laboratoire concernant l'infiltration des eaux usées dénitrifiées à travers différents types de sols (sols très perméable, perméable et peu perméable) et modes d'infiltration (modes saturé et insaturé). Le troisième Chapitre présente les résultats obtenus concernant les essais d'infiltration dans le sol des effluents réalisés à

moyenne échelle. Le quatrième Chapitre décrit les résultats de l'étude réalisée afin de prédire le comportement des sulfures en fonction des conditions du milieu et de déterminer les conditions critiques à partir desquelles une formation de sulfures peut être observée.

PARTIE 1 : SYNTHÈSE

1 CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Revue de littérature

1.1.1 Gestion des eaux usées au Canada

En termes de volume, les eaux usées représentent une importante source de pollution pour les eaux de surface au Canada (Gouvernement du Canada, 2016). Il s'avère donc primordial de les traiter efficacement avant de les rejeter dans l'environnement. D'une manière générale, les habitations sont raccordées à un système d'égout municipal. En 2009, près de 2100 stations d'épuration municipales existaient au Canada (Statistique et Division des comptes et de la statistique, 2010). Toutefois, lorsque la densité urbaine n'est pas très importante, les habitations peuvent être raccordées à des systèmes de traitement décentralisé moyennant une fosse septique privée ou collective. Selon Statistiques Canada, 82% des ménages étaient raccordés à un réseau d'égout municipal en 2009, tandis que 13% étaient équipés de fosses septiques privées et 1% seulement utilisait une fosse septique collective (Statistique et Division des comptes et de la statistique, 2010). Selon une autre étude plus récente effectuée par le Canadian Water Network (2015), près de 20% des habitations canadiennes sont connectés à un système de traitement décentralisé dont près de la moitié en Nouvelle-Écosse. En ce qui concerne la province de Québec, près d'un million de demeures ont été connectées en 2013 à ce type de système (MDDEFP, 2013). Tout comme le traitement centralisé où les stations se conforment au règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées (RESAEU) (Ministère de la justice, 2016), aux exigences spécifiques du MDDELCC ainsi qu'à la stratégie pancanadienne sur la gestion des effluents d'eaux usées municipales, les systèmes décentralisés raccordés aux résidences isolées au Québec doivent se conformer au règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées issues des résidences isolées (MDDELCC, 2015).

1.1.2 Règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées issues des résidences isolées (Q2, r.22)

Le règlement Q-2, r.22 qui porte sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées expose les différentes normes qui encadrent la construction des dispositifs de traitement des eaux usées domestiques issues des résidences isolées ainsi que les valeurs maximales de rejet à ne pas dépasser pour les différents systèmes de traitement (MDDELCC, 2015). Généralement, les paramètres suivis sont restreints à la mesure de la demande biochimique en oxygène carbonée sur 5 jours (DBO₅C), des matières en suspension (MES), des coliformes fécaux et du phosphore total. Le [Tableau 1-1](#) présente les exigences de rejet définies par le MDDELCC pour un système de traitement tertiaire des eaux usées.

Tableau 1-1 Normes maximales de rejet du système de traitement tertiaire (MDDELCC, 2015)

Paramètre	Norme selon le type de système de traitement tertiaire		
	Avec déphosphatation	Avec désinfection	Avec déphosphatation et désinfection
DBO ₅ C	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L
MES	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L
Phosphore total	1 mg/L	-	1 mg/L
Coliformes fécaux	50 000 UFC/100 mL après réactivation	200 UFC/100 mL après réactivation	200 UFC/100 mL après réactivation

Contrairement aux normes sur la qualité de l'eau potable et des critères de rejet présentés au [Tableau 1-2](#), la concentration en nitrates présents dans les effluents domestiques n'a pas encore fait l'objet de restriction au Canada, ni au Québec (Gouvernement du Québec, 2016). Cependant, ces éléments nutritifs peuvent représenter une menace pour l'environnement (problèmes d'eutrophisation des cours d'eau et de prolifération des cyanobactéries) s'ils sont

rejetés en trop grandes quantités. Par conséquent, de nombreuses études ont été réalisées au cours de ces dernières années afin de développer des procédés physico-chimiques et biologiques permettant l'enlèvement des nitrates et des nitrites présents dans les eaux usées. Les présents travaux de recherche portent uniquement sur le procédé biologique de dénitrification autotrophe.

Tableau 1-2 Critère de rejet des eaux usées et de l'eau potable pour les nitrates, sulfates et sulfures (Ministère du Développement durable, 2013)

	Concentration Nitrates (mg NO ₃ ⁻ -N/L)	Concentration sulfates (mg SO ₄ ²⁻ /L)	Concentration sulfures (mg S ²⁻ /L)
Rejet dans le réseau d'égout pluvial ou dans un cours d'eau	-	1500	1
Rejet dans le réseau d'égout sanitaire ou unitaire	-	-	5
Prévention de la contamination (eau et organismes aquatiques)	10	500	0,05
Protection de la vie aquatique (effet aigu)	-	500	0,0032
Protection de la vie aquatique (effet chronique)	2,9	500	0,00036
Eau potable	10		<0,05

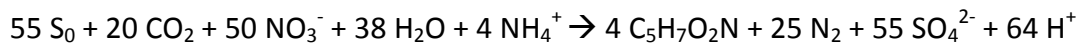
1.1.3 Procédé de dénitrification autotrophe

La dénitrification est un processus biologique qui peut être hétérotrophe ou autotrophe, tout dépendamment de la source de carbone utilisée par les organismes vivants présents dans le milieu. Dans les deux cas, la dénitrification permet de réduire les nitrates en azote gazeux et ce, dans des conditions anoxiques. Lors du procédé de dénitrification autotrophe, qui fera l'objet de ce mémoire, les bactéries utilisent une source de carbone minéral (i.e. CO₂ , HCO₃⁻) et

puisent leur énergie de l'oxydation d'un substrat inorganique (i.e. thiosulfate, soufre) (Chung *et al.*, 2014, Lampe et Zhang, 1996, Zhao *et al.*, 2012). Les principaux avantages et inconvénients des procédés de dénitrification hétérotrophe et autotrophe sont présentés en [Annexe 1](#).

Batchelor et Lawrence (1978) ont été les premiers à établir une réaction stœchiométrique pour exprimer la réaction de dénitrification autotrophe sur soufre élémentaire ([Équation 1-1](#)). Ainsi, des bactéries comme les *Thiobacillus denitrificans* peuvent oxyder le soufre (jouant le rôle de donneur d'électrons) en sulfates. Les nitrates, quant-à-eux, jouent le rôle d'accepteur d'électrons, sont réduits en N₂ (Sengupta et Ergas, 2006).

Équation 1-1 Réaction de dénitrification en présence de soufre élémentaire et de chlorure d'ammonium (Batchelor et Lawrence, 1978)



La dénitrification autotrophe en présence de soufre élémentaire a été employée pour de nombreuses applications (Shao *et al.*, 2010). Le soufre élémentaire est utilisé en raison de son faible coût, sa non-toxicité et son insolubilité dans l'eau (Christianson *et al.*, 2015, Sun, 2012). Toutefois, deux inconvénients liés à la dénitrification autotrophe sur du soufre élémentaire ont été mis en évidence, à savoir la libération de sous-produits tels que les sulfates et l'acidification du milieu (Sahinkaya et Kilic, 2014).

Pour remédier à cette diminution de pH, des études se sont intéressées à des mélanges de matériaux solides. En effet, Sengupta *et al.* (2006) ont testé trois mélanges de soufre élémentaire avec des éclats de marbre, des coquilles d'huîtres écrasées ou encore du calcaire pour le traitement décentralisé des eaux usées domestiques. Le meilleur taux de dénitrification (99%) a été obtenu lors de l'utilisation de coquilles d'huîtres écrasées comme source d'alcalinité avec un temps de contact de 0,67 jours.

Plus récemment, Ben-Khaled (2016) a testé un mélange composé de soufre et de calcaire. Ainsi, ce chercheur a constaté que le pH reste à un niveau satisfaisant, favorisant ainsi la dénitrification bactérienne. Des essais ont été réalisés, sur une période d'un an, moyennant un bioréacteur à lit fixe d'une hauteur de 129 cm et d'un diamètre interne équivalent à 62 cm. Ces essais ont permis de mettre en évidence une dénitrification quasi-totale des nitrates (81 - 99%) pour un temps de rétention hydraulique de 1,4 h (Ben-Khaled, 2016).

1.1.4 Sous-produits issus de la dénitrification autotrophe sur soufre

Lors de la dénitrification autotrophe représentée par l'Équation 1-1, la réduction d'une mole de nitrates produit 1,1 mole de sulfates. En termes de concentration massique, une production de 7,5 mg SO_4^{2-} /L peut être observée lors de la réduction de 1,0 mg NO_3^- -N/L (Liu *et al.*, 2009, Lv *et al.*, 2014, Zhang et Shan, 1999). Ainsi, selon les concentrations en nitrates réduites dans les eaux, des teneurs variables en sulfates peuvent être libérées lors de la dénitrification des eaux utilisant du soufre élémentaire. Lors de l'étude réalisée par (Ben-khaled, 2016), des teneurs en sulfates allant de 100 à 280 mg/L ont été enregistrées dans l'effluent issu du procédé de dénitrification autotrophe sur soufre et calcaire. Ces concentrations restent relativement faibles par rapport aux concentrations de 500 mg/L (Campos *et al.*, 2008), 1600 mg/L (Claus et Klutzner, 1985) et 2000 mg/L (Oh *et al.*, 2000) obtenues dans d'autres études et à partir desquelles un effet inhibiteur de la réaction de dénitrification a été observé.

Nombreux sont les travaux qui évoquent des taux d'élimination satisfaisants des nitrates moyennant un procédé de dénitrification autotrophe ainsi que les concentrations en sulfates produits. Toutefois, rares sont ceux qui s'intéressent de près aux quantités de sulfures produites (Tableau 1-3). Parmi ces études, les travaux de Shan et Zhang (1998) mentionnent une concentration en sulfures variant de 1,5 à 10 mg/L lors du traitement en présence de soufre et de calcaire d'un effluent provenant d'une fosse septique. Sinon, les autres auteurs mentionnent sommairement que les sulfures produits sont très faibles sans même les mesurer (Sierra-Alvarez *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2016). D'autres auteurs, quant à eux, n'ont détecté aucune production de sulfures d'hydrogène lors de l'enlèvement des nitrates présents dans les eaux souterraines (Kimura *et al.*, 2002, Soares, 2002).

Tableau 1-3 Récapitulatif des sous-produits issus de procédés de dénitrification autotrophe sur du soufre élémentaire

Domaine	Matériau utilisé	Taux d'enlèvement des nitrates (%)	Teneur finale en SO_4^{2-} (mg/L)	Teneur finale (mg S^{2-} /L)	Référence
Eau souterraine	Coquille d'œuf	97	350 - 450	Faible	Xu <i>et al.</i> (2016)
Eau usée domestique	Calcaire	81 – 99	100 - 280	NM*	Ben-Khaled (2016)
Eau usée d'aquaculture	Aucun	50	136	0,069	Christianson <i>et al.</i> (2015)
Eau souterraine	Calcaire	96	610	<0,048	Sierra-Alvarez <i>et al.</i> (2007)
Eau souterraine	Aucun	100	640	ND**	Kimura <i>et al.</i> (2002)
Eau souterraine	Aucun	80	320	ND	Soares (2002)
Effluents de fosse septique	Calcaire	90	300 - 400	1,5 - 10	Shan et Zhang (1998)
Eau souterraine	Calcaire	90	130 - 170	10	Van Der Hoek <i>et al.</i> (1992)

NM : Non mentionné ;ND : Non détecté

En tant que sous-produits directs de la réaction de dénitrification autotrophe sur soufre, les sulfates ne sont pas considérés parmi les anions les plus toxiques selon les exigences de qualité définies par le MDDELCC, surtout lorsqu'ils sont présents dans l'eau à de faibles concentrations (Gouvernement du Canada, 1994). Toutefois et dans certaines conditions, ces espèces ioniques peuvent être réduites en sulfures. Les sulfures d'hydrogène sont des composés qui s'avèrent problématiques en raison de leur effet toxique pour la santé humaine, des mauvaises odeurs et de la corrosion qu'ils engendrent (Gouvernement du Canada, 1994, Ivanov, 2011, Su et Zhao, 2012, Su, 2012). Il est, par conséquent, primordial de s'intéresser à leur formation et à leur

devenir pour s'assurer de l'innocuité de l'effluent issu du procédé de dénitrification autotrophe sur soufre et calcaire et ainsi, de prévenir la formation de sulfures lors du rejet des effluents traités dans un champ de polissage.

1.1.5 Formation et devenir des sulfures

Le processus métabolique, composé de différentes réactions d'oxydation et de réduction biochimiques des composés soufrés, constitue le cycle biologique du soufre. Il dépend, d'une part, des états chimique (valence du soufre) et physique (gaz, liquide ou solide) des composés soufrés et, d'autre part, de l'aérobiose et l'anaérobiose du biotope. Les composés soufrés les plus communs sont les sulfates (SO_4^{2-}), les sulfites (SO_3^{2-}), les sulfures (H_2S , HS^- et S^{2-}), les thiosulfates ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), les bisulfites (HSO_3^-) et le soufre élémentaire (S^0). Selon leur degré d'oxydation, ces composés soufrés peuvent être des donneurs ou des accepteurs d'électrons.

Lors de la réduction des sulfates, deux principaux types de réaction entrent en jeu, à savoir les réactions assimilatrices et les réactions dissimulatrices comme l'indique la [Figure 1-1](#) (Colleran *et al.*, 1995, Hulshoff Pol et Lens, 2000, Peck, 1961).

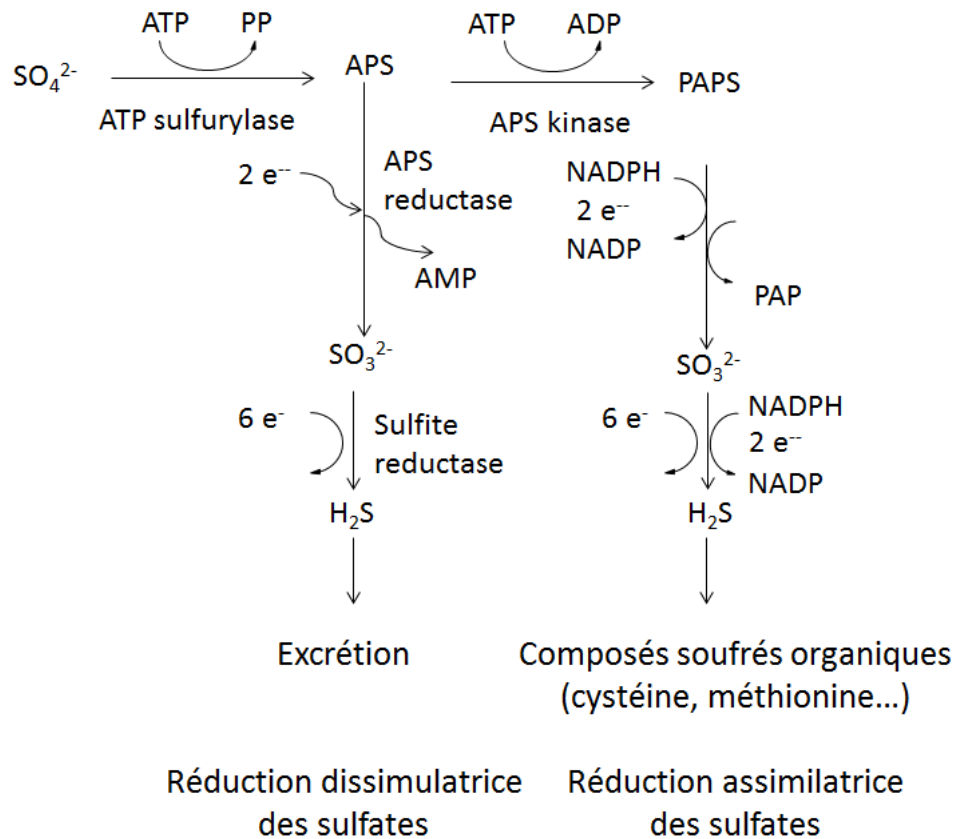


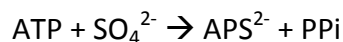
Figure 1-1 Réactions assimilatrices et dissimulatrices de réduction des sulfates (tiré de Holland et Turekian, 2010; Madigan *et al.*, 2003)

1.1.5.1 Réaction assimilatrice des sulfates

L'assimilation du soufre en tant que nutriment par les plantes ou les microorganismes consiste en la réduction des sulfates en sulfures au sein de la cellule (Ibanez, 2007). Cette réaction ne nécessite pas de conditions anaérobies et peut se faire en aérobie ou anaérobie (Lerman et Meybeck, 1988). Une fois formés, les sulfures sont fixés d'une manière intracellulaire et seule une faible quantité est émise sous forme gazeuse (Reddy et Delaune, 2008). Le soufre, ainsi réduit, est incorporé dans les composés organiques, utilisé pour la biosynthèse des cellules et peut servir comme apport d'énergie pour d'autres animaux après ingestion. Ces différents

mécanismes rentrent donc dans les réactions anaboliques des bactéries tels que la synthèse d'acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et celle des protéines (Batzeret Sharitz, 2006, Colleran *et al.*, 1995). Cependant, la réduction des sulfates (en tant qu'ion stable) en sulfures consomme de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) ou de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Reddy et Delaune, 2008). Par exemple, pour les bactéries, l'adénosine-5-phosphosulfate (APS), le 3-phosphoadénosine-5-phosphosulfate (PAPS) et les sulfites (SO_3^{2-}) sont considérés comme des composés intermédiaires (Muyzer *et Stams*, 2008, Peck, 1961). Quant à la voie adoptée par les algues et les végétaux, elle ne met pas en jeu la formation de PAPS. Par conséquent, pour ces organismes, la partie sulfonaté de l'APS est réduite directement en sulfite par l'enzyme APS-réductase (Hulshoff Pol et Lens, 2000). Les réactions d'assimilation des sulfates par les bactéries, les algues et les végétaux sont présentées par les [Équations 1-2 à 1-6](#) (Leboffe et Pierce, 2006).

Équation 1-2 Activation des sulfates par l'ATP en présence de l'ATP-sulfurylase



Équation 1-3 Phosphorylation de l'APS en PAPS par APS-phosphokinase



Équation 1-4 Phosphorylation du PAPS en PAP (Phosphoadénosine-5-phosphate) par PAPS-réductase moyennant le NADPH



Équation 1-5 Réduction des sulfites par des bactéries sulfite-réductases moyennant le NADPH



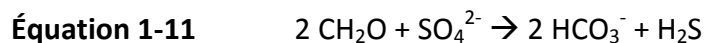
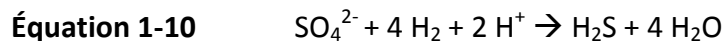
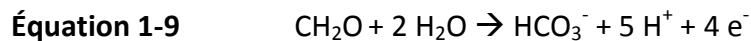
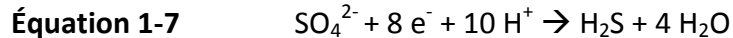
Équation 1-6 Synthèse de la cystéine par O-acétylserine sulfhydrylase



(*PPi* : Pyrophosphate; *ADP* : Adénosine diphosphate; *NADP* : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate)

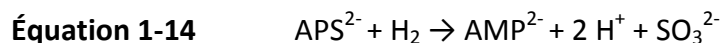
1.1.5.2 Réaction dissimulatrice des sulfates

Contrairement à l'assimilation qui consiste en la génération d'ions sulfures nécessaires au métabolisme de synthèse des organismes, la dissimulation consiste en l'utilisation des sulfates en tant qu'accepteurs finaux d'électrons (Équation 1-7) et d'un donneur d'électrons comme le dihydrogène (Équation 1-8) (Ibanez, 2007) ou la matière organique (Équation 1-9) (Alani *et al.*, 2014). Les Équations 1-10 et 1-11 présentent les réactions finales mettant en jeu les deux demi-réactions de réduction (Équation 1-7) et d'oxydation (Équations 1-8 et 1-9).



Dans des conditions anaérobies, la réduction des sulfates en sulfures est réalisée par les bactéries sulfato-réductrices (BSR) pour l'oxydation des composés carbonés. Une grande variété de bactéries sulfato-réductrices existe. Les deux genres les mieux établis sont les *Desulfotomaculum* (sporulés) et les bactéries *Desulfovibrio* (non sporulées) (DeLong, 2012, Schmidt et Schaechter, 2012). D'autres genres existent également tels que les *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*, etc. (Cervantes et al., 2006).

Le mécanisme enzymatique de la sulfato-réduction consiste, tout d'abord, en une activation des sulfates par l'ATP impliquant l'ATP-sulfurylase (Équation 1-12) et la Pyrophosphatase (Équation 1-13). La réduction de l'APS en sulfite par l'APS-réductase en utilisant l'hydrogène comme donneur d'électrons intervient par la suite (Équation 1-14). Enfin, les sulfites formés sont réduits en sulfures par des sulfite-réductases impliquant trois protéines différentes à savoir, la trithionate synthase, la trithionate réductase et la thiosulfate réductase (Hulshoff Pol et Lens, 2000).



Ces bactéries peuvent utiliser l'hydrogène (H₂) ou encore une variété de molécules organiques à faible poids moléculaires (acétate, lactate, pyruvate, alcool, etc.) comme donneurs d'électrons (Colleran et al., 1995, Leboffe et Pierce, 2006, Velasco et al., 2008). Toutefois, d'autres sources de carbone plus complexes ont été testées, tels que le compost, le fumier de volaille ou de mouton et les feuilles de chêne (Gibert et al., 2004). Les eaux usées issues de la fabrication de mélasse ont également été testées (Hilton et Archer, 1988). Dans ce cas de figure, ces matières organiques complexes doivent être réduites en simples monomères pour que les BSR puissent les métaboliser (Reddy et DeLaune, 2008).

1.1.6 Formes et prédominances des sulfures

La Figure 1-2 présente le diagramme de Pourbaix du système binaire soufre/oxygène. Elle met en évidence la distribution des formes sulfurées présentes en solution selon le pH et le potentiel d'oxydo-réduction (POR).

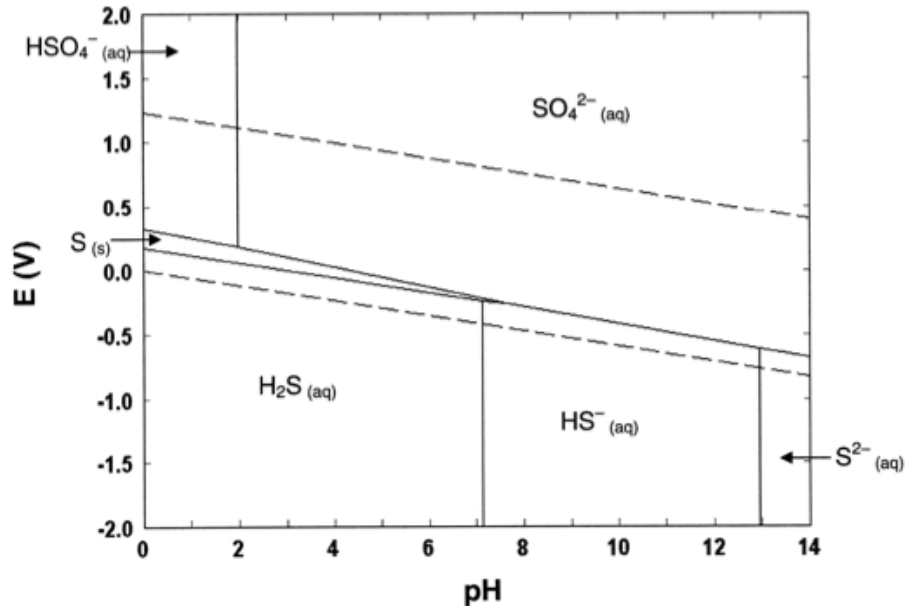


Figure 1-2 Diagramme de Pourbaix des sulfures (T = 25°C, P = 1,013 bar et C = 0,1 mM) (Hulshoff Pol et Lens, 2000)

Les sulfures peuvent se présenter sous diverses formes H₂S, HS⁻ et S²⁻ (Figure 1-3). La dissociation des sulfures dans l'eau est schématisée selon les Équations 1-15 et 1-16 (Colleran *et al.*, 1995). Seule la libération, des eaux usées vers l'atmosphère, de la forme moléculaire H₂S (prédominante à plus de 90% à un pH situé aux alentours de 6) entraîne des problèmes d'odeur. Il n'y a, en effet, aucun problème d'odeur lorsque le H₂S est sous forme dissoute (prépondérant pour un pH supérieur à 8).

Le pH optimal pour la plupart des organismes vivants est de 7. D'ailleurs, à ce pH, les deux formes de sulfures les plus présentes sont le H₂S et HS⁻ dont la distribution est de 50% H₂S et 50 % HS⁻ (Cervantes *et al.*, 2006). La forme sous laquelle les sulfures sont présents dépend à la fois du pH et du potentiel d'oxydo-réduction du milieu (Chou *et al.*, 2003).

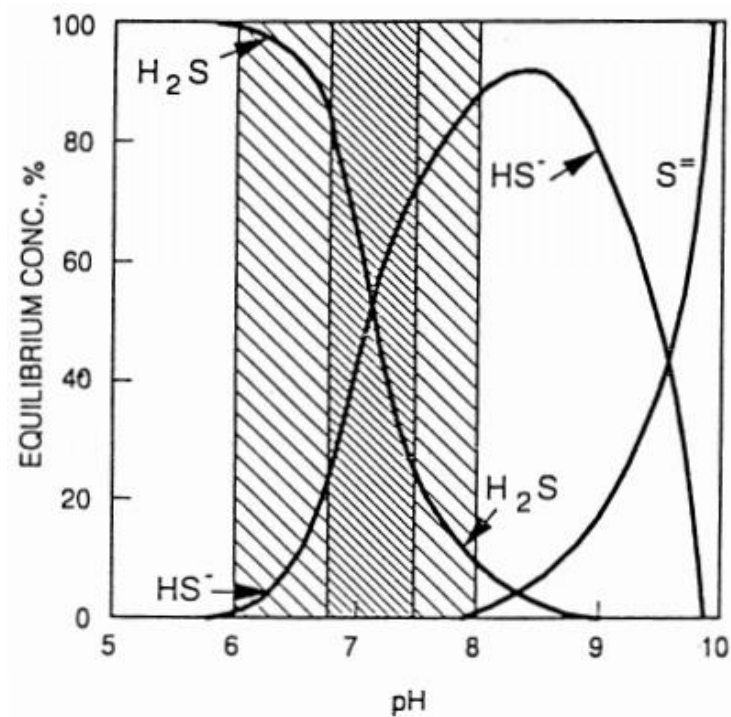
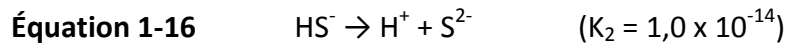
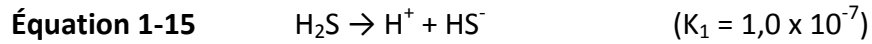


Figure 1-3 Formes de sulfures selon les valeurs de pH (Lens *et al.*, 1998)

1.1.7 Problématiques liées aux sulfures

Bien qu'ils soient considérés comme des composés chimiquement inertes, non volatils, non toxiques et ne présentant pas une menace directe pour l'environnement, des teneurs élevées en sulfates entraînent une perturbation du cycle du soufre dans le milieu récepteur. Le principal problème est la production de sulfures dans des conditions anaérobies (Colleran *et al.*, 1995, Komarnisky *et al.*, 2003, Wei *et al.*, 2007). Ces composés inquiètent toujours les scientifiques, car ils engendrent de réels problèmes en terme de qualité de l'environnement tels que des problèmes d'odeur, de corrosion et/ou de santé (Nielsen *et al.*, 2008, Shao *et al.*, 2010).

1.1.7.1 Problème d'odeur

Les sulfures sont caractérisés par une odeur déplaisante, qui est celle de l'œuf pourri. Elle est perceptible à une concentration de 0,2 ppm (Buisman *et al.*, 1991). Elle devient plus désagréable à des concentrations allant de 3 à 5 ppm. Malgré le fait que les sulfures peuvent être détectés à de très faibles concentrations, il est déconseillé de s'y fier. En effet, le sens de l'odorat est perdu à des concentrations plus élevées se situant aux alentours de 100 - 250 ppm (Chou *et al.*, 2003).

1.1.7.2 Problème de corrosion

La libération de sulfure d'hydrogène (H₂S) dans l'air engendre des problèmes de corrosion au niveau des conduites, des chaudières et des moteurs, entraînant des coûts de prévention de la corrosion lors de la mise en place des installations et des coûts de maintenance élevés. La corrosion est un phénomène microbiologique qui se produit en présence de bactéries du genre *Thiobacillus* découverts par (Parker, 1945). Il s'agit d'une succession de deux étapes dont la réaction globale est présentée par l'Équation 1-17.



La première étape consiste en la libération de sulfures de la phase liquide vers l'atmosphère sous l'action des bactéries sulfato-réductrices en milieu anaérobie. La deuxième étape, qui se fait en milieu aérobie, consiste en l'absorption du sulfure d'hydrogène au niveau des surfaces humides. Il subit deux oxydations donnant lieu à du soufre élémentaire et à l'acide sulfurique, respectivement (Heuer, 1993, Kearns et Little, 1994). Selon l'US EPA (1992), des concentrations en sulfure d'hydrogène aussi faibles que 1 ppm peuvent engendrer de réels problèmes de corrosion.

1.1.7.3 Problèmes de santé

Les sulfures d'hydrogène sont des gaz toxiques et irritants qui peuvent provoquer de nombreux dysfonctionnements chez l'être humain (Eun *et al.*, 2007, Kilburn et Warshaw, 1995). Ces dysfonctionnements peuvent conduire à des problèmes d'ordre respiratoire, oculaire, neurologique, cardiovasculaire et métabolique. Connu aussi sous l'appellation anglaise "knock down gas", il provoque à très fortes concentrations (500 - 1000 ppm) une perte de conscience et la mort de l'individu.

Cependant, l'impact du sulfure d'hydrogène sur la santé humaine dépend non seulement des concentrations en sulfures libérés dans l'atmosphère, mais aussi de la durée d'exposition (Doujaiji et Al-Tawfiq., 2010). En effet, les effets varient de la simple détection olfactive (0,025 - 0,13 ppm), à la sensation d'une odeur offensive et nauséabonde (3 - 5 ppm), à l'irritation de la gorge et des poumons avec troubles digestifs (20 - 50 ppm), à l'irritation sévère du nez, de la gorge et des poumons avec perte de l'odorat (100 - 250 ppm), à l'apparition d'œdème pulmonaire (250 - 500 ppm) ainsi qu'à l'irritation sévère des poumons, l'excitation, des étourdissements et l'effondrement conduisant à la mort dans les 4 à 8 h suivant l'exposition (à partir de 500 ppm). Une exposition prolongée (plusieurs heures ou jours) à des concentrations aussi faibles que 50 - 100 ppm est responsable de la toux, d'enrouement et d'essoufflement. Une exposition à des concentrations plus élevées conduit à des pneumonies et des œdèmes pulmonaires (Beauchamp *et al.*, 1984, Chou, 2003, Chou *et al.*, 2003, Glass, 1990, Partlo *et al.*, 2001, Reiffenstein *et al.*, 1992).

1.1.8 Prédiction de la production de sulfures lors de l'infiltration de l'eau usée dénitrifiée

Liu *et al.* (2014) présentent les BSR généralement retrouvées dans les eaux usées ainsi que leurs propriétés en fonction de leurs origines. Selon leurs études, tous les types d'eaux usées contiennent des BSR. Cependant, plusieurs conditions sont nécessaires pour conduire à la production de sulfure d'hydrogène (Liu *et al.*, 2014). Les modèles mathématiques et les équations empiriques qui ont été établis pour prévoir la production de sulfures sont nombreux (Lens *et al.*, 1998). La plupart dépendent de l'activité bactériologique des BSR (température, oxygène dissous, matières biodégradables, etc.) (Osman, 2013).

1.1.8.1 Effet de la température

Les BSR peuvent tolérer une large gamme de température variant de 0 à 100°C, dépendamment si elles sont psychrophile, mésophile, thermophile ou hyper thermophile (Holland et Turekian, 2010). Des gammes plus restreintes ont tout de même été mentionnées entre 15 et 38°C, avec une augmentation de 7% du taux de production de sulfures pour chaque augmentation de la température d'un degré Celsius (Pomeroy et Bowlus, 1946). Pour des températures plus basses, comme celles rencontrées au Québec (inférieures à 7°C), elles pourraient fortement affecter et retarder la production de sulfures gazeux et aqueux (Huan *et al.*, 2013). Toutefois, une production de sulfures relativement élevée a également été enregistrée entre 5 et 12°C par (Nielsen *et al.*, 1998). Enfin et plus récemment, Liang (2008) souligne que les températures optimales pour une bonne activité des BSR varient entre 28 et 32°C.

1.1.8.2 Effet du pH

Un grand nombre de BSR se développe selon une gamme de pH variant entre 6 et 9 (Holland et Turekian, 2010, Nielsen et Hvitved-Jacobsen, 1998, Pomeroy et Bowlus, 1946). Toutefois, selon l'étude menée par Gutierrez *et al.* (2009) concernant l'effet d'un pH basique sur l'activité des BSR, montre que cette dernière est réduite de 30 et de 50% pour des pH de 8,6 et 9,0 respectivement et ce, par rapport un contrôle ayant un pH de 7,6. Bien que les BSR aient déjà été utilisées pour le traitement de drainage minier à des pH acides (Benedetto *et al.*, 2005), il

reste qu'un pH entre 7,5 et 8,0 serait plus optimal pour un bon fonctionnement de ces bactéries (Cervantes *et al.*, 2006).

1.1.8.3 Effet du potentiel d'oxydo-réduction

Un POR d'au moins -100 mV est nécessaire pour la réduction des sulfates en sulfures (Abhilash *et al.*, 2015, Hao *et al.*, 1996b, Huan *et al.*, 2013). L'étude réalisée par Reddy et DeLaune (2008) montre clairement que plus le POR est faible, plus il y a réduction de sulfates et donc une production de sulfures. Il est donc primordial d'avoir des conditions anaérobies afin que la réduction des sulfates se produise. D'ailleurs, une relation a été établie par Delgado *et al.* (1999) et Huan (2013) mettant en jeu l'influence des valeurs de POR sur la production de sulfures (Équation 1-18).

Équation 1-18 Relation entre le POR et la production de sulfures aqueux

$$POR = A + B \log \left(\frac{[H_2S_{aq}]}{[SO_4^{2-}]} \right)$$

A, B: Constantes empiriques

1.1.8.4 Compétition avec d'autres microorganismes

Autres que les BSR, divers microorganismes existent également dans le milieu et peuvent compétitionner les BSR pour les mêmes donneurs d'électrons. En effet, des études ont mis en évidence que les BSR et les bactéries méthanogènes (BM) peuvent se compétitionner pour la consommation de l'acétate et de l'hydrogène alors que les BSR et les bactéries acétogènes se compétitionnent pour la consommation du propionate et du butyrate (Cervantes *et al.*, 2006).

1.1.8.5 Effet des espèces ioniques

L'utilisation des accepteurs d'électrons dans le milieu se fait dans un ordre précis suivant le potentiel de réduction (E^0) des espèces ioniques dans le milieu. Selon Mackenzie (2005), la respiration aérobie se fait en premier, suivie de la respiration anaérobie moyennant des nitrates, des oxydes de manganèse, des oxydes de fer et des sulfates. Toutefois, la réduction de chacune des espèces citées se fait à un POR bien défini (Reddy *et DeLaune*, 2008). Ainsi, un POR élevé ou la présence d'importantes concentrations de l'une de ces espèces peut inhiber l'activité des BSR et empêcherait ainsi la formation de sulfures (Churchill *et Elmer*, 1999).

1.1.8.6 Effet de la matière organique

Outre la température, le pH, le POR et les accepteurs d'électrons, le milieu dans lequel les BSR prolifèrent dépend étroitement de la composition de ce milieu en termes de matières organiques (quantifiables par la DCO et/ou la DBO₅) présentes (Nielsen *et al.*, 1988). En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'importance du fait de maintenir un rapport théorique DCO/SO₄²⁻ (exprimé en mg O₂/ mg SO₄²⁻) supérieur ou égal à 0,67 pour favoriser le développement des BSR (considérant la stœchiométrie de la réaction de réduction des sulfates). Dans la suite de ce manuscrit, lorsqu'un ratio DCO/SO₄²⁻ sera mentionné, l'unité ne sera pas indiquée mais ce ratio sera par défaut exprimé en mg O₂/ mg SO₄²⁻. À défaut, les bactéries n'auront pas assez de substrat pour se nourrir (Lens *et al.*, 1998, Velasco *et al.*, 2008). Toutefois, selon Neculita *et Zagury* (2008), ce rapport théorique optimal dépend beaucoup du type de substrat utilisé. En effet, en présence d'éthanol, ce rapport peut varier entre 0,55 et 0,84, contrairement à des substrats comme le compost municipal ou les boues activées, pour lesquels le rapport optimal serait de 1,6 à 5,0. Ces différences entre les rapports DCO/SO₄²⁻ en fonction du substrat sont dues à la complexité des substrats en question à être dégradés et au fait que la totalité du carbone ne peut pas être utilisée par les BSR.

1.1.9 Élimination des sulfures dans l'eau usée dénitrifiée

Les méthodes utilisées pour éliminer le problème de sulfures une fois formés sont nombreuses : oxydation chimique ou biologique, précipitation moyennant l'ajout d'un élément métallique, utilisation d'inhibiteur, etc.

1.1.9.1 Oxydation du milieu

L'oxydation des sulfures est parmi l'une des approches les plus répandues pour les éliminer des eaux usées (Nielsen *et al.*, 2005). L'oxydation peut être réalisée par aération (Chaiprapat *et al.*, 2011), ozonation, ou moyennant l'ajout de produits chimiques tels que le permanganate de potassium (KMnO_4), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxyde de chlore (ClO_2) ou le chlorite de sodium (NaClO_2) (US EPA, 1992). Une autre approche utilisant du mgO_2 et un produit commercial comme ORCTM a aussi été testée au laboratoire pour inhiber l'activité des BSR (Chang *et al.*, 2008). D'une manière générale, l'aération peut être coûteuse, car elle nécessite souvent l'utilisation d'énergie et un haut niveau de gestion (Tyler, 2002). Une aération en cascade suivie d'une infiltration à travers du sable ont été suggérées par Sierra-Alvarez *et al.* (2007) et peuvent se présenter comme une solution économique à l'oxydation par voie chimique.

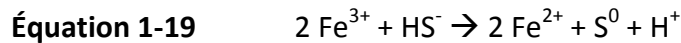
Buisman *et al.* (1991) ont également étudié l'enlèvement des sulfures en les oxydant biologiquement en soufre élémentaire. Selon leurs résultats, près de 90% des sulfures ont été éliminés après un temps de rétention de 19 min seulement en présence de bactéries appelées bactéries du soufre incolores (Colourless sulphur bacteria). L'oxydation biologique possède de nombreux avantages. Il s'agit d'un procédé efficace, ayant un faible coût d'opération, ne nécessitant pas la gestion de boues et ne requérant pas d'énergie.

1.1.9.2 Élimination par précipitation métallique

L'élimination des sulfures par précipitation de métaux est aussi un moyen de prévenir la formation et le dégagement des sulfures sous forme de sulfure d'hydrogène. Parmi les procédés de précipitation des sulfures les plus connus, l'utilisation de l'hydroxyde de fer (II ou

III) permet de précipiter les sulfures sous forme de FeS et de former en plus faibles proportions du soufre élémentaire (Su et Zhao, 2012).

Selon Park (2014), les ions Fe^{3+} sont plus longs à réagir que les ions Fe^{2+} . Les ions ferriques (Fe^{3+}) oxydent en premier lieu les sulfures (HS^-) en soufre élémentaire (S^0) en libérant ainsi les ions Fe^{2+} (Équation 1-19). Par la suite, les ions ferreux (Fe^{2+}) réagissent à leurs tours avec les sulfures aqueux (HS^-) en formant un précipité métallique insoluble (FeS) (Équation 1-20).



Les réactions de précipitation des sulfures métalliques sont souvent rencontrées lors du traitement des drainages miniers en présence de cuivre (Qiu *et al.*, 2009), ou encore, en présence de zinc (Foucher *et al.*, 2001). Toutefois, il est important de tenir compte du coût associé à la gestion de ces précipités métalliques.

1.1.9.3 Utilisation d'inhibiteurs

Près de 88 inhibiteurs de la croissance des BSR ont été testés (Tanimoto *et al.*, 1989). Le molybdate, connu pour être un analogue des sulfates a aussi été testé pour inhiber l'activité biologique des BSR sous certaines conditions. Contrairement à des tests réalisés en mode continu avec des boues de digesteurs anaérobies, des tests en mode discontinu (batch) ont montré l'inhibition des BSR en présence de molybdate (0,2 à 200 mM) et en présence de fortes concentrations de phosphates (50 mM) (Clancy *et al.*, 1992). Toutefois, le prix élevé de ce produit chimique limite son utilisation de manière régulière (Hilton et Archer, 1988).

1.1.9.4 Compétition pour les accepteurs et/ou donneurs d'électrons

L'inhibition peut également se faire moyennant la compétition entre les groupes microbiologiques pour les électrons donneurs (Ibanez, 2007). En effet, les bactéries

méthanogènes (BM) et les BSR opèrent dans des conditions similaires et entrent en compétition pour le carbone organique présent. Généralement, un ratio DCO/SO₄²⁻ inférieur à 1,5 est favorable aux BSR, alors qu'un ratio supérieur serait favorable aux BM (Ivanov, 2011).

En ce qui concerne les accepteurs d'électrons, les BSR peuvent être inhibées suite à la réduction d'accepteurs d'électrons plus favorables à celle des sulfates (composés ferriques, nitrates, etc.). Jiang *et al.* (2010) ont étudié l'effet de différentes concentrations en nitrites sur l'inhibition de l'activité des BSR tout en faisant varier la durée d'exposition. L'effet d'inhibition observé est positivement proportionnel aux deux facteurs étudiés (concentration en nitrites et durée d'exposition). Toutefois, une concentration minimale en nitrites de 50 mg-N/L est nécessaire, ce qui rarement le cas en traitement des eaux usées.

1.1.10 Infiltration des eaux usées et devenir des sulfures dans le sol

L'infiltration des eaux usées dans le sol est dépendante de la nature du sol. D'ailleurs, la capacité d'infiltration, essentiellement évaluée par la conductivité hydraulique saturée (Ks), mesure la capacité d'un sol en particulier à transmettre l'eau (Soil Science Society of America, 2014). Par exemple, la conductivité hydraulique d'un sol argileux (imperméable) est 100 à 1 000 fois inférieure à celle des sols sablonneux très perméables (Baveye *et al.*, 1998).

L'infiltration des eaux usées dans le sol est considérée, en elle-même, comme une technique d'épuration (Lowe et Siegrist, 2008, Van Cuyk *et al.*, 2001). Lors du traitement décentralisé, elle se fait moyennant un champ de polissage qui peut être constitué de tranchées ou de lits d'absorption (Service des eaux municipales, 2007). Lors du contact entre l'eau usée traitée et le sol, plusieurs types d'interactions peuvent survenir comprenant des phénomènes physique, chimique et biologique.

En effet, les matières en suspension peuvent être éliminées en s'accumulant dans les pores du sol et ce, principalement dans les premiers centimètres de ce dernier. Les matières carbonées retrouvées dans les eaux usées, évaluées en termes de DBO₅ et/ou de DCO, peuvent être dégradées par les micro-organismes à la surface du champ. Ces interactions complexes peuvent, bien évidemment, conduire au traitement des contaminants présents dans les eaux

usées (Hargett *et al.*, 1981, Lowe et Siegrist, 2008, Siegrist et Thresher, 1985). Toutefois et dans certaines conditions, ces réactions peuvent influencer négativement les processus hydrauliques et conduire à un phénomène de colmatage (Baveye *et al.*, 1998). Il est donc important d'évaluer la performance d'infiltration des eaux usées dans les sols.

Lors de l'infiltration des eaux dans le sol, deux principales situations sont décrites par plusieurs auteurs à savoir, l'infiltration dans un sol submergé (mode saturé) ou dans un sol non submergé (mode insaturé). Dans le cas d'inondations, le sol se retrouve submergé (noyé) d'eau. Ainsi, l'échange gazeux se fait difficilement et il devient, par conséquent, dépourvu d'oxygène, menant ainsi à des conditions anoxiques ou anaérobies (Ibanez, 2007). Par contre, quand le sol n'est pas submergé, l'échange gazeux se fait bien, l'oxygène pénètre aisément dans le sol, menant à des conditions aérobies (Reddy et DeLaune, 2008).

Tout comme la formation des sulfures dans les eaux, leur génération dans le sol dépend également des conditions favorables à l'activité bactérienne des BSR. En effet et dans le cas de sol submergé d'eau et donc de conditions anaérobies, les concentrations en sulfures augmentent (Ibanez, 2007). Par contre, lorsque le sol n'est pas submergé, la concentration en sulfures diminue en raison des conditions aérobies (Reddy et DeLaune, 2008).

Généralement, les BSR sont connues pour être des anaérobies strictes et leur prolifération dans le sol commence à des valeurs de POR inférieures à -100 mV (Riding et Awramik, 2000). Cependant, la réduction des sulfates peut se faire dans des sols anoxiques si des microsites anaérobies sont également présents. Plus encore, la présence de BSR a également été détectée au niveau de petites particules bien oxydées du sol. Par conséquent, selon (Batzer et Sharitz, 2006), il n'est pas très recommandé de se fier seulement aux valeurs de POR pour prédire la présence ou l'absence de certains processus biogéochimiques.

De plus, selon les accepteurs d'électrons présents dans le milieu, la réduction des nitrates, des oxydes de manganèse et de fer se fait préalablement à celle des sulfates (Reddy et DeLaune, 2008). Ainsi, la présence de ces composés inhibiteurs dans le sol peut limiter, voire empêcher, la réduction des sulfates. La température influence également la présence ou l'absence de sulfures. D'après Ibanez (2007), la production de sulfures dans les sols augmente avec la

température et surtout avec un climat chaud et humide. De plus, selon cet auteur, la présence de sulfures est encore plus prononcée en milieu salin et riche en sulfates (Ibanez, 2007).

Dans le cas d'un traitement domestique, moyennant une installation septique avec un champ de polissage, plusieurs types de sols peuvent être rencontrés. En effet, chaque terrain résidentiel est différent de par les propriétés physiques du sol en question (structure, texture, granulométrie, densité relative, conductivité hydraulique). Le principal problème pratique pouvant survenir lors de l'infiltration dans un sol sur un terrain résidentiel est le fait de favoriser un milieu anaérobie. Ce dernier peut avoir lieu dans le cas d'un sol faiblement perméable, au niveau duquel le POR et l'OD auront des valeurs faibles. Il peut aussi être favorisé dans le cas d'un sol riche en matière organique disponible pour les BSR en tant que donneurs d'électrons. De plus, une attention particulière doit aussi être donnée en ce qui concerne la végétation en place et surtout par rapport à la respiration de cette dernière par ses racines. La stabilisation du terrain récepteur est réalisée moyennant une végétation herbacée (MDDELCC, 2015) qui permet :

- d'assurer la stabilité du sol de recouvrement ;
- de favoriser l'aération du sol ;
- d'aider à l'épuration par l'évapotranspiration des végétaux.

1.2 Hypothèses, objectifs de recherche et originalité

1.2.1 Hypothèses et objectifs

L'hypothèse de recherche de ce projet est qu'il y a un risque de production de sulfures au niveau de l'effluent du procédé de dénitrification autotrophe ou encore lors de son infiltration dans le sol d'un champ de polissage en raison des conditions favorables du milieu (teneurs relativement élevées en sulfates mesurées dans les eaux usées dénitrifiées et conditions anaérobies du milieu).

Afin de répondre à l'hypothèse générale, des hypothèses spécifiques ont été définies comme suit pour ce projet de doctorat:

- Hypothèse 1: La perméabilité du sol et le mode de saturation peuvent influencer la génération de sulfures lors de l'infiltration dans les sols des eaux usées dénitrifiées.
- Hypothèse 2: Les conditions réelles (température, etc.) ainsi que la charge hydraulique (débit, matière organique et sulfates) peuvent influencer la génération de sulfures.
- Hypothèse 3: Les conditions critiques menant à la génération de sulfures à l'aide d'essais en mode batch peuvent être identifiées.

L'objectif général de ce projet est donc de vérifier si une production de sulfures peut être observée au niveau de l'effluent de l'unité de dénitrification ou encore lors de son infiltration dans un champ de polissage afin de s'assurer de l'innocuité du procédé de dénitrification développé pour le traitement des eaux usées provenant des résidences isolées.

Ainsi, les objectifs spécifiques de ce projet de doctorat sont :

1. L'étude de l'infiltration des eaux dénitrifiées (échelle laboratoire)
 - Évaluation de la perméabilité du sol
 - Évaluation du mode de saturation

2. L'étude de l'infiltration des eaux dénitrifiées (échelle pilote)
 - Évaluation des conditions réelles
 - Évaluation de la charge hydraulique
3. La détermination des conditions favorables à la génération des sulfures
 - Identification des paramètres clés
 - Détermination des conditions favorables
 - Confirmation des conditions favorables

La [Figure 1-4](#) résume les différents objectifs spécifiques de ce projet de recherche.

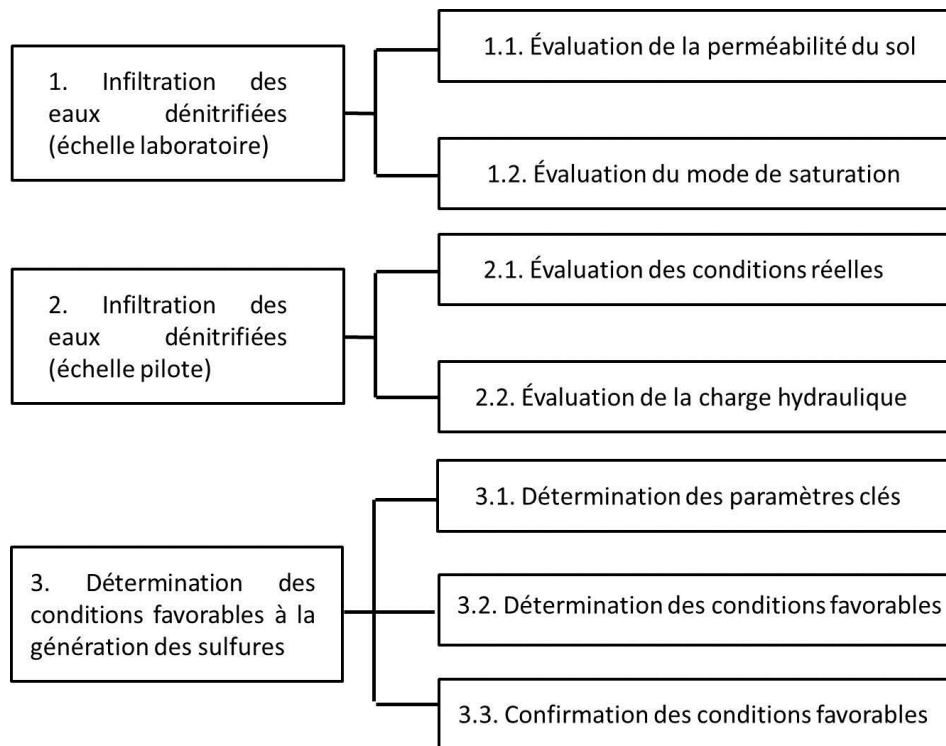


Figure 1-4 Organigramme des différents essais réalisés au cours de ce projet de recherche

1.2.2 Originalité

Considérant l'importance grandissante des méthodes mises en place pour évaluer les impacts d'un produit sur l'environnement (cycle de vie), le développement de nouvelles technologies pour le traitement des eaux usées issues des résidences isolées doit s'assurer de l'innocuité des sous-produits générés. L'étude du devenir des sous-produits issus des procédés tertiaires est incontournable avant leur commercialisation. Leur gestion ne peut plus être considérée comme une étape annexe.

L'originalité de ce projet de recherche réside en quatre points distincts :

- À notre connaissance, aucun système de dénitrification autotrophe sur soufre et calcaire n'est commercialisé de nos jours, dans la Province de Québec et à travers le monde, pour le traitement des eaux usées issues des résidences isolées.
- À ce jour, aucune étude ne s'est penchée sur la problématique de production des sulfures lors de l'infiltration des eaux usées dénitrifiées dans un champ de polissage.
- La détermination des conditions permettant l'exploitation de ce procédé sans risque de production de sulfures, pouvant représenter des risques ou des nuisances pour les humains ou l'environnement semble primordiale.
- Il est donc innovant et primordial d'évaluer les conditions pouvant entraîner la production de sulfures avant la mise sur le marché du procédé de dénitrification autotrophe sur soufre et calcaire développé.

1.3 Démarche méthodologique

L'approche méthodologique adoptée pour étudier l'innocuité des effluents issus du procédé de dénitrification autotrophe sur soufre et calcaire comprend quatre parties principales. La première partie de ce travail de doctorat porte sur la caractérisation et la détermination des conductivités hydrauliques des sols recomposés (mélanges de sable/silt) qui serviront pour la construction des champs de polissage. Cette caractérisation a permis, par la suite, d'entamer la deuxième partie du travail qui consiste à étudier l'infiltration de l'effluent obtenu après dénitrification dans trois types de sols de perméabilités différentes selon deux modes opératoires et ce, à l'échelle laboratoire. Les essais réalisés à l'échelle laboratoire en colonne (petite échelle) ont pour but d'étudier le comportement des eaux dénitrifiées lors de leur infiltration dans des sols de perméabilités différentes dans des conditions facilement maîtrisables. Quant à la troisième section, elle consiste à procéder à l'infiltration des eaux usées dénitrifiées dans des sols très perméable et perméable, à moyenne échelle et ce, directement en aval du procédé de dénitrification. Les essais réalisés à plus grande échelle dans des barils de 200 L (moyenne échelle) ont pour but d'évaluer les risques potentiels de génération de sulfures à partir de systèmes plus représentatifs d'un champ de polissage (même si des adaptations sont encore nécessaires pour prédire la génération potentielle de sulfures à échelle réelle) ainsi que les problèmes opérationnels et de design qui peuvent survenir et qui doivent être évités. N'ayant pas constaté de production importante de sulfures durant les différents essais réalisés aux échelles laboratoire et moyenne, il a été important de définir, dans la quatrième section, les conditions critiques du milieu pouvant entraîner leur génération et ce, moyennant des essais en mode batch. Afin de déterminer ces conditions et de prédire la production de sulfures, une approche par la méthodologie des plans d'expériences en surface de réponses (plan Box Behnken) a été utilisée.

1.3.1 Caractérisation des sols recomposés et détermination de leurs perméabilités

Selon le règlement Q.2.-r 22, trois types de sol doivent être considérés lors de l'infiltration des eaux usées traitées dans des champs de polissage. Ainsi, trois sols de perméabilité différente ont été testés au cours de ce projet de doctorat, à savoir un sol très perméable (100% sable), un

sol perméable (sablo-silteux) et un sol peu perméable (silteux-sablonneux). Afin de reconstituer les trois types de sol, quatre sables différents ont été testés (sable de construction, de plage, séché et de jeu). En se basant sur les spécifications d'un sable filtrant présentées en [Annexe 2](#), le sable utilisé au cours des différents essais est le sable de plage acheté chez Biomix (Québec, QC, Canada) étant donné que ces spécifications se rapprochent le plus de celles d'un sable filtrant. En ce qui concerne les sols perméable et peu perméable, le silt utilisé provient d'un échantillon de sol récolté au bord de la rivière St-Charles (Québec, QC, Canada). Ce dernier a été tamisé à l'aide d'un tamis ayant une ouverture de 53 μm afin d'extraire le silt présent. Cette fraction a été mélangée au sable, la répartition massique du sable et du silt varie selon le type de sol désiré (très perméable, perméable ou peu perméable). Par la suite, la conductivité hydraulique des sols recomposés a été déterminée suite à un essai à charge constante suivant la Loi de Darcy ([Section 2.5.2](#)). Les taux d'application des eaux traitées sur le sol dépendent de leur perméabilité et du nombre de chambres à coucher d'une résidence isolée tel qu'indiqué dans le Règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées (Q2, r.22). Les taux d'application ont été choisis pour le cas d'une résidence isolée ayant deux chambres à coucher, à savoir 65 L/m²/d pour les sols très perméables, 35 L/m²/d pour les sols perméables et 20 L/m²/d pour les sols peu perméables.

1.3.2 Développement de la microflore bactérienne

Le développement de la microflore bactérienne a été nécessaire à deux reprises. Pour les essais d'infiltration à petite échelle, des boues épaissies en provenance de la station Est d'épuration des eaux usées de la ville de Québec (QC, Canada), dont les solides totaux étaient d'environ 4 %, ont été utilisées. Quant aux essais réalisés pour la détermination des conditions critiques pour la génération des sulfures, de l'eau brute en provenance de la station de Bellevue (QC, Canada) a été utilisée pour favoriser le développement des BSR.

Les deux sources de BSR ont été mélangées avec un milieu nutritif (Postgate B) propre au développement des bactéries sulfato-réductrices à un rapport de 1/6 (v/v) en boues épaissies/milieu nutritif (essais d'infiltration à petite échelle – [Chapitre 2](#)) et un rapport de 1/1 (v/v) en eau usée brute/milieu nutritif (essais de détermination des conditions critiques –

Chapitre 4). Afin de maintenir des conditions anaérobies, les mélanges ont été introduits dans des fioles Erlenmeyer fermées à l'aide de bouchons étanches non protégées de la lumière et non agitées. Seules deux sorties ont été prévues, l'une afin d'échantillonner le liquide et l'autre reliée à un sac de Tedlar prévu pour recueillir le gaz formé (Figure 1-5). Le système a été maintenu à température ambiante (20 - 25°C) pour une durée d'acclimatation de deux mois. Un échantillonnage a été effectué trois fois par semaine afin de faire le suivi du pH, du POR et de la teneur en sulfates.

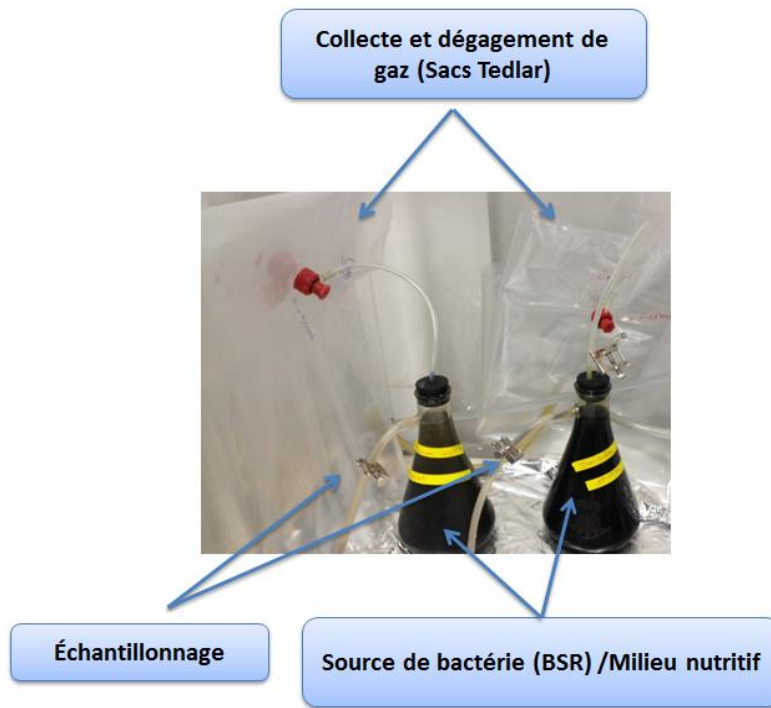


Figure 1-5 Montage mis en place pour le développement de la microflore bactérienne

Le milieu nutritif utilisé est composé de 0,5 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de NH_4Cl , 1 g/L de CaSO_4 , 2 g/L de $\text{mgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,5 g/L de lactate de sodium, 1 g/L d'extrait de levure, 1 g/L d'acide ascorbique, 0,1 g/L d'acide thioglycolique et 0,5 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cet ensemble a été préparé dans 1 L d'eau désoxygénée afin de s'assurer d'avoir des conditions anaérobies. Le pH de ce milieu a été fixé à 7,0 à l'aide d'une solution de NaOH (1 M).

1.3.3 Infiltration dans le sol de l'effluent dénitrifié : essais à petite échelle

Des essais d'infiltration des eaux usées dénitrifiées ont été réalisés, à l'échelle laboratoire, dans neuf colonnes de 2,54 cm de diamètre interne et 121 cm de hauteur (Figure 1-6). Chacune de ces colonnes a été remplie à l'aide de 15 cm de gravier et de 30 ou 60 cm de sol, selon la perméabilité désirée.

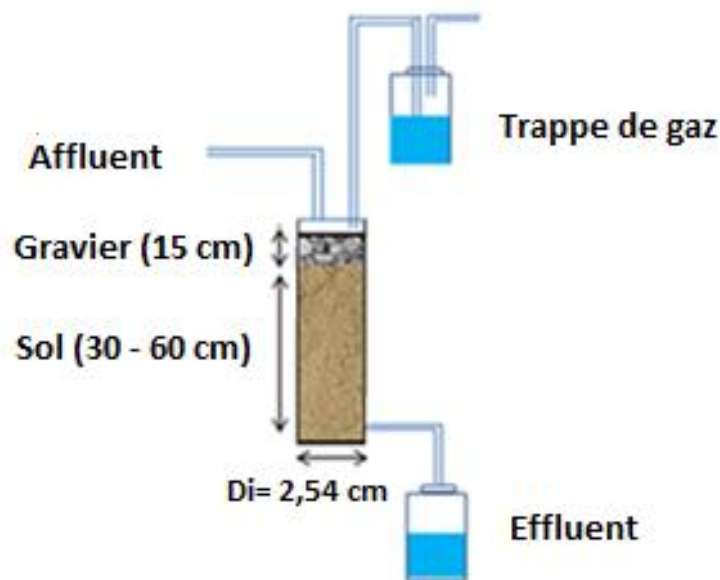


Figure 1-6 Schéma du montage utilisé pour les essais à échelle laboratoire

Les proportions de sable-silt présentes dans les colonnes sont de 100% - 0% pour le sol très perméable, de 85% - 15% pour le sol perméable et de 70% - 30% pour le sol peu perméable. Les expérimentations en mode saturé ont été réalisées pour chaque type de sol en duplicata (6 colonnes) alors que les essais en mode insaturé ont été effectués une seule fois pour chaque type de sol (3 colonnes). Dans un premier temps, la possibilité de dégagement de H_2S dans des conditions maîtrisées, à savoir dans des conditions saturées, a été évaluée. Par la suite, des expérimentations en mode gravitaire insaturé ont été effectuées, reflétant l'infiltration

gravitaire des eaux usées dans un champ de polissage. Les effluents en sortie des colonnes en mode saturé ou insaturé ont été collectés de 2 à 3 fois par semaine pour suivre l'évolution de divers paramètres (pH, température, demande chimique en oxygène (DCO), teneurs en sulfates ou sulfures aqueux, etc.). De plus, une trappe à NaOH a été installée au-dessus de chaque colonne pour capter le H₂S gazeux qui aurait potentiellement pu se dégager des colonnes.

1.3.4 Infiltration dans le sol de l'effluent dénitrifié : essais à moyenne échelle

Des essais d'infiltration des eaux usées traitées dans des sols ont été réalisés à moyenne échelle à la station expérimentale de PTA, moyennant des réservoirs d'une capacité de 200 L et ayant un diamètre interne de 58 cm et une hauteur de 95 cm (Figure 1-7). Deux réservoirs ont été installés, un réservoir simulant un sol très perméable et un autre simulant un sol perméable. Pour permettre l'échantillonnage des eaux sortant du système, les fonds des réservoirs ont été percés pour faire passer un adaptateur de réservoir dans chacun d'entre eux, à travers lequel l'eau infiltrée dans le sol pouvait s'écouler. Une couche de plastique ainsi qu'une bâche ont été utilisées pour s'assurer que l'eau soit recueillie dans le trou et pour empêcher que le plastique ne soit déchiré par le gravier. Une quantité de gravier a été introduite au fond du réservoir afin d'obtenir une hauteur de 10 cm. Un film de plastique a été installé de sorte à former une pente permettant l'écoulement des eaux vers l'adaptateur de réservoir et évitant ainsi que l'eau ne stagne au niveau des parois du réservoir. Par la suite, 30 ou 60 cm de sol (mélange de sable et de silt en différentes proportions) ont été ajoutés. Une couche finale de 15 cm de gravier a été ajoutée au-dessus du sol.

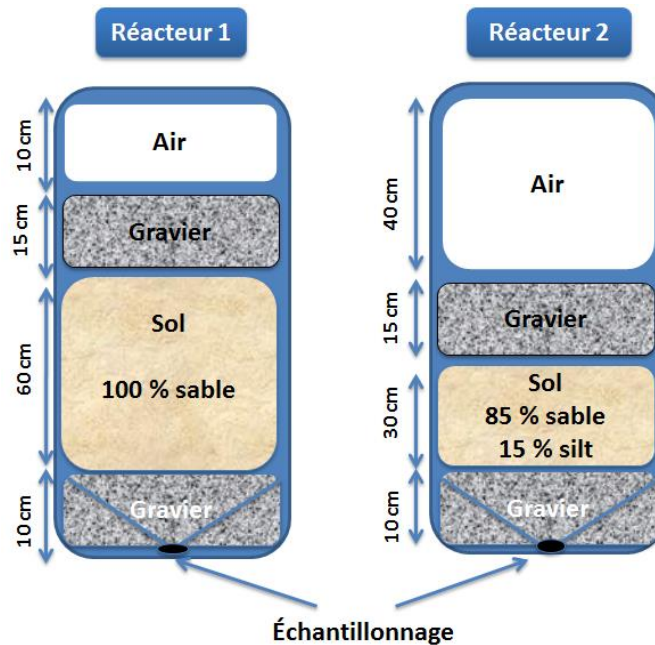


Figure 1-7 Schéma du montage utilisé pour les essais à moyenne échelle (Réacteurs de 200 L)

Les effluents en sortie des réacteurs ont été collectés 2 fois par semaine pour suivre l'évolution de divers paramètres (pH, température, COD, teneurs en sulfates et en sulfures aqueux, etc.). Par ailleurs, une mesure du H₂S gazeux dans l'air a été effectuée lors de chaque échantillonnage à la sortie du système de dénitrification autotrophe, à l'entrée et au-dessus de chaque réacteur (en introduisant le détecteur dans l'espace compris entre le sol et le couvercle du réacteur).

1.3.5 Détermination des conditions critiques pour la génération des sulfures

Du point de vue de l'exploitation du procédé de dénitrification autotrophe sur soufre et calcaire, il est particulièrement important d'établir les conditions à respecter afin d'éviter la production de sulfures lors du rejet des effluents dénitrifiés dans l'environnement. L'objectif de cette partie du projet de recherche vise à vérifier l'influence de différents paramètres importants (concentration en carbone et en sulfates, température) sur la production de sulfures.

La première partie de cette étude vise à évaluer les risques de production de sulfures en fonction des teneurs en matière organique (entre 42 et 87 mg/L) présentes dans les eaux usées dénitrifiées. Des essais ont été menés en mode batch dans des contenants de 1 L ayant différentes proportions en eaux usées issues de la fosse septique (non dénitrifiées – riches en matières organiques et pauvres en sulfates) et en eaux usées dénitrifiées (dénitrifiées – riches en sulfates et pauvres en matières organiques) ([Tableau 4-1](#)). Les paramètres suivants ont été suivis lors de ces essais : pH, POR, OD, DCO, concentration en COD, sulfates, sulfures et S_{tot} . Des corrélations ont été établies entre ces paramètres et la production de sulfures.

Par la suite, les effets d'autres paramètres (température, teneurs en sulfates et en matières organiques) sur la production de sulfures gazeux et/ou aqueux ont été évalués par une approche méthodologique faisant appel à un plan d'expériences en surface de réponses de type Box-Behnken. Le nombre d'essais ($n = 17$) nécessaires a été calculé suivant l'[Équation 1-21](#).

Équation 1-21 Détermination du nombre d'essais à réaliser pour un plan de type Box-Behnken

$$n = 2k \cdot (k - 1) + C_0$$

n est le nombre d'essais, k est le nombre de facteurs et C_0 est le nombre des points centraux

Le [Tableau 4-2](#), présenté au [Chapitre 4](#), présente les facteurs choisis ainsi que leurs niveaux. Dans la présente étude, 17 essais, dont 5 répétitions, ont été effectués. Chaque semaine, 35 mL d'échantillon ont été prélevés et les paramètres suivants ont été analysés à savoir le pH, le POR, l'OD, les concentrations en sulfures gazeux et aqueux, en sulfates et la teneur en COD.

À la fin des expériences, un modèle polynômial au second degré a pu être établi entre la réponse (quantité de sulfures produits) et les différentes variables (température et teneurs en

COD et en sulfates) comme décrit dans l'Équation 1-22 en utilisant le logiciel Design-Expert 8.0 (Kamoun, 2011).

Équation 1-22 **Détermination de l'équation de second degré permettant de prédire la réponse souhaitée en fonction des facteurs étudiés**

$$y_i = b_0 + \sum_{j=1}^n b_j X_{ij} + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{\substack{m=2 \\ m>j}}^k b_{jm} X_{ij} X_{im} + \sum_{j=1}^k b_{jj} X_{ij}^2$$

y_i est la réponse calculée pour la i^e expérience, X_{ij} est le niveau du facteur j à la i^e expérience et b₀, b_j, b_{jm} et b_{jj} sont les coefficients du modèle

Une optimisation des paramètres a été réalisée à l'aide du logiciel Design-Expert 8.0 afin de produire une quantité importante de sulfures gazeux et aqueux. Des tests complémentaires ont été réalisés en triplicata dans les conditions critiques identifiées afin de confirmer/infirmes les valeurs prédites par le logiciel pour la production de sulfures aqueux.

1.3.6 Méthodes analytiques

1.3.6.1 Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique des sols et des différents sables a été réalisée à l'aide d'un granulomètre laser (Particle Laser Scattering LA-950V2 – Laser Particle Size Analyzer, Tokyo, Japon). Cette technique est basée sur la diffraction d'un rayon laser traversant le liquide (généralement de l'eau) contenant les particules de sol à analyser. Une mesure de la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée est réalisée lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon de particules dispersées.

1.3.6.2 Analyse des teneurs en carbone, azote et soufre

L'analyse élémentaire, à savoir les teneurs en carbone, azote, hydrogène et soufre présents dans les sols séchés à 60°C a été effectuée à l'aide d'un analyseur CHNS (modèle Leco TruSpec Micro, St Joseph, MI, États-Unis). Cette technique consiste en la combustion de 2 à 3 mg d'échantillon à 1100°C. Ainsi, l'azote, le carbone et le soufre vont être détectés respectivement sous forme de : N₂, CO₂, et SO₂ moyennant un détecteur infrarouge. Deux contrôles certifiés, sous forme de poudre, ont été utilisés (sulfaméthazine, USA et OEA, Royaume-Uni) pour vérifier l'exactitude des résultats au cours de chaque série de mesures.

1.3.6.3 Carbone organique dissous

L'analyse du carbone organique dissous (COD) présent dans les échantillons liquides a été réalisée à l'aide d'un appareil TOC-Analyzers (modèle TOC-VCPH de la compagnie Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, États-Unis). Les échantillons ont tout d'abord été filtrés sur une membrane G6 (porosité : 1,5 µm) pour enlever le carbone particulaire. De plus, une acidification de l'échantillon avec une solution 0,01N HCl est nécessaire pour éliminer le carbone inorganique présent sous forme de carbonates. Par la suite, la détermination du carbone organique total se fait suite à une combustion à 680°C et à l'analyse du CO₂ dégagé par détection infrarouge.

Une solution de contrôle certifiée (100 µg/mL) de SCP Science (Canada) a été utilisée pour contrôler l'exactitude des résultats.

1.3.6.4 Détermination de la demande chimique en oxygène et des teneurs en sulfates et sulfures aqueux

L'ensemble des analyses de la demande chimique en oxygène (DCO) et la détermination des teneurs en sulfates (SO₄²⁻) et en sulfures (H₂S) aqueux ont été réalisées à l'aide de méthodes colorimétriques. Ces analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Varian Cary® 50, Varian, Inc., Mississauga, ON, Canada) aux longueurs d'ondes de 600, 530 et 670 nm, respectivement. L'analyse des sulfates a été réalisée suivant la méthode initialement

développée par Bertolacini et Barney (1957). Cette méthode d'analyse consiste, tout d'abord, à mélanger l'échantillon avec une résine échangeuse de cations afin d'éliminer les interférents cationiques présents en solution et susceptibles de former des chloranilates de cations insolubles. Une fois dépourvu de cations, le pH de l'échantillon est fixé à pH 4,0 à l'aide de solutions de NaOH ou de HCl. Un mélange, formé de 8 mL d'échantillon, de 2 mL de solution buffer (phtalate acide de potassium) et de 10 mL d'éthanol (90%), est par la suite mélangé à 0,069 g de baryum chloranilate ($\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$). Le développement de la couleur des ions d'acide chloranilate, proportionnel au nombre d'ions sulfates présents en solution, prend environ 10 à 15 min. Enfin, une étape de filtration sur un filtre G6 est nécessaire. La gamme d'étalonnage est préparée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les échantillons à partir de sulfate de potassium (K_2SO_4) ainsi que des solutions contrôles certifiées. D'ailleurs, une solution (Multi-element Ion Chromatography standard dol II in H_2O , Fluka, Sigma Aldrich, Canada) et une autre de sulfate d'ammonium (10 000 $\mu\text{gS/mL}$, Plasma Cal SCP Science, Canada) ont été utilisées pour valider l'exactitude des mesures.

Les teneurs en sulfures aqueux ont été déterminées selon la méthode développée par Cline (1969). Dans des bouteilles de verre ambré d'une capacité de 40 mL, 200 μL de chaque réactif colorimétrique A et B sont ajoutés à 5 mL d'échantillon. Le réactif A est préparé à partir de 0,05 g de N,N'-diméthyl-p-phénylènediamine sulfate dans 50 mL d'une solution d'HCl à 50%. Quant au réactif B, il est préparé à partir de 0,075 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 50 mL d'une solution d'HCl à 50%. La courbe de calibration faite à partir de sulfure de sodium et ainsi que les réactifs sont préparés avec de l'eau ultra pure désoxygénée.

Enfin, la détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) a été effectuée selon la méthode d'analyse MA. 315 – DCO 1.1 du CEAEQ (MDDEFP, 2014). Pour cela, deux solutions doivent être préparées préalablement. Une première solution de digestion est préparée à partir de bichromate de potassium (10,2 g), d'acide sulfurique concentré (167 mL) et de sulfate d'argent (33,3 g) dans un volume total de 1 L. Quant à la deuxième solution, appelée réactif acide, elle est composée de 5,5 g de sulfate d'argent dissous dans un kilogramme d'acide sulfurique concentré. Une fois les deux solutions préparées, 2,5 mL d'échantillon, 1,5 mL de la solution de digestion et 3,5 mL du réactif acide sont introduits dans un tube de digestion à DCO

et sont mis à chauffer à reflux pendant 2 h. Par la suite, les tubes sont laissés pendant 2 heures pour que les échantillons refroidissent. La courbe de calibration est préparée à partir d'une solution mère de biphthalate de potassium à 10 000 mg O₂/L. Une solution contrôle certifiée (500 mg/L solution, standard calibration, RTC) a été utilisée pour garantir la qualité des résultats pour chaque série de mesures.

1.3.6.5 Détermination des teneurs en cations

Afin de déterminer les teneurs en cations (y compris celles en métaux) présents dans les sols et/ou les eaux usées dénitrifiées et non dénitrifiées, une digestion partielle de ces différents échantillons a été réalisée selon la méthode décrite par MENVIQ (1989). Pour cela, une masse de 0,5 g de sol est introduite dans des tubes de digestion puis 5 mL d'acide nitrique à 50% (v/v) sont ajoutés. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 15 min. Par la suite, 5 mL d'acide nitrique concentré sont ajoutés et le mélange est laissé à réagir pendant 1 h. Des ajouts successifs de 3 mL de peroxyde d'hydrogène concentré sont réalisés à 15 min d'intervalles puis le mélange est chauffé à 90°C pendant 2 h. Une fois les tubes refroidis, 2,5 mL d'acide nitrique concentré sont ajoutés puis le mélange est chauffé pendant 15 min. Après la digestion, une solution d'acide nitrique à 5% (v/v) est ajoutée au mélange pour compléter le volume à 50 mL. Le digestat est ensuite filtré sous vide sur une membrane G6 (porosité : 1,5 µm). Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C jusqu'au moment de l'analyse par spectrophotométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy, modèle Vista, marque Varian 725-ES, Mississauga, ON, Canada).

1.3.6.6 Détermination du pH, POR et OD

Pour les essais réalisés à l'échelle laboratoire, le pH ainsi que le POR ont été mesurés en utilisant un appareil de marque Fischer (Accumet, XL 600, double chaînes pH/POR, Fisher Scientific, Québec, QC, Canada). La mesure de pH a été effectuée moyennant une électrode Cole-Palmer à double jonction avec une cellule de référence Ag/AgCl. Quant à la mesure de POR, elle a été effectuée à l'aide d'une électrode à bande de platine. Pour les essais réalisés à

moyenne échelle, le pH, le POR ainsi que l'oxygène dissous ont été mesurés directement sur le site en utilisant un conductimètre portatif (modèle A322Thermo Scientific Orion STAR, USA).

Avant chaque série de mesures, la cellule de référence Ag/AgCl, utilisée pour la mesure du pH, a été calibrée en utilisant des solutions certifiées (pH = 2,00, 4,00 et 7,00). La cellule POR a été calibrée avant chaque série de mesures en utilisant une solution certifiée (POR = 470 mV).

1.3.6.7. Détermination de sulfures gazeux

Le sulfure d'hydrogène gazeux a été mesuré selon deux méthodes distinctes. Pour les essais réalisés à petite échelle, une trappe de NaOH ($V = 7 \text{ mL}$; $[\text{NaOH}] = 0,05 \text{ M}$) a été mise en place. Quant aux essais à moyenne échelle et pour la détermination des conditions critiques menant à la formation de sulfures, un détecteur H_2S (ToxiRAE Pro, San Jose, CA, États-Unis) a été utilisé.

1.4 Discussion des principaux résultats

1.4.1 Caractérisation des sols

Trois types de sols de composition différentes (100% sable et 0% silt, 85% sable et 15% silt et enfin 70% sable et 30% silt) ont été sélectionnés pour la présente étude. Chaque composition a été définie afin d'obtenir une perméabilité donnée à savoir un sol très perméable ($K_s = 0,028$ cm/s), perméable ($K_s = 0,0013$ cm/s) et peu perméable ($K_s = 0,00015$ cm/s) (MDDELCC, 2015).

Une caractérisation globale de ces différents sols a été effectuée dont la distribution granulométrique (Chapitre 2, Figure 2-2) ainsi que la caractérisation élémentaire (Chapitre 2, Tableau 2-3). L'ajout de silt ($D < 53 \mu\text{m}$) à des proportions croissantes a diminué la perméabilité du sol et a augmenté la teneur en matière organique (Brady et Weil, 2008, Lewandowski, 2013). D'ailleurs, seuls les sols 2 (perméable) et 3 (peu perméable) contiennent une faible teneur en matière organique avec des pourcentages de carbone de 0,33% et 1,18%, respectivement. La teneur en matière organique présente dans le sol 1 (très perméable), quant à elle, est inférieure à la limite de détection ($< 0,05\%$). D'un autre côté, que ce soit les concentrations en nitrites ou en nitrates, ces dernières sont relativement faibles, ne dépassant pas 5 mg/kg. Contrairement aux NO_x et au PO_4^{2-} , les teneurs en sulfates et en chlorures augmentent au fur et à mesure que le pourcentage de silt présent dans le sol étudié augmente.

1.4.2 Caractérisation des eaux usées

Une caractérisation des eaux issues du système de dénitrification autotrophe a été effectuée au début des essais d'infiltration de ces eaux, prélevées directement dans le réacteur contenant le mélange soufre-calcaire. Le Tableau 2-4, présenté au Chapitre 2, résume les principales caractéristiques des eaux usées au niveau du procédé de dénitrification autotrophe, appelées « eaux dénitrifiées » dans la suite de ce manuscrit et qui présentent un milieu favorable à la production de sulfures. En effet, le faible potentiel d'oxydo-réduction ($\text{POR} = -297$ mV) traduisant un milieu réducteur, le pH proche de la neutralité (6,54) ainsi que la faible teneur en oxygène dissous (0,41 mg/L) sont autant de conditions favorables à la production de sulfures

par les BSR (Park *et al.*, 2014). De plus, le rapport DCO/SO_4^{2-} est de 0,47, ce qui est proche du rapport théorique de 0,67 à partir duquel les BSR ont assez de substrat pour croître favorablement dans le milieu (Biswas, 2012, Dar *et al.*, 2008, Velasco *et al.*, 2008). Enfin, les teneurs en cations ainsi qu'en métaux présents dans le milieu indiquent que ce dernier est exempt d'éléments dont les concentrations pourraient favoriser la précipitation des sulfures sous forme de sulfures métalliques.

1.4.3 Essais à petite échelle

La première partie de ce projet de doctorat a consisté en l'étude de l'infiltration des eaux usées dénitrifiées dans le sol et ce, à petite échelle. Elle vise à déterminer le potentiel de génération de sulfures lors de l'infiltration des eaux dénitrifiées dans trois types de sols de perméabilités différentes (très perméable, perméable et peu perméable). Les expériences ont été menées selon deux modes d'infiltration (insaturé et saturé). Le mode insaturé est caractérisé par un sol qui n'est pas submergé d'eau, ce qui permet une bonne oxygénation et donc des conditions d'aérobie (Reddy et DeLaune, 2008). Contrairement à ce dernier, le mode saturé représente un sol submergé d'eau, comme dans le cas d'inondations par exemple, conduisant ainsi à un mauvais échange gazeux et donc à des conditions anoxiques ou anaérobies (Buchanan, 2014, Ibanez, 2007).

1.4.3.1 Profil à deux phases

Que ce soit en mode saturé ou en mode insaturé, deux phases distinctes ont été identifiées au cours des essais réalisés à l'échelle laboratoire. La 1^{re} phase a duré 31 et 47 jours pour les essais réalisés en modes insaturé et saturé, respectivement. Quant à la 2^e phase, elle a duré tout le reste de la période d'échantillonnage. La [Figure 1-8](#) présente l'évolution du POR au cours des différentes expérimentations réalisées en modes saturé et insaturé, mettant en évidence la présence de ces deux phases. Durant la 1^{re} phase de ces essais, le POR est légèrement négatif (-50 mV) et ce, pour les trois sols étudiés suivie par une 2^e phase pendant laquelle le POR a considérablement augmenté pour atteindre +167 et +150 mV pour le mode insaturé et saturé, respectivement. Notons que la valeur de POR initiale a augmenté par rapport à celle mesurée

directement au niveau de l'unité de dénitrification autotrophe sur soufre. Ceci revient principalement à une oxygénation des eaux dénitrifiées au niveau des conduites lors de la collecte en aval du réacteur soufre-calcaire et lors du transport vers les laboratoires de recherche.

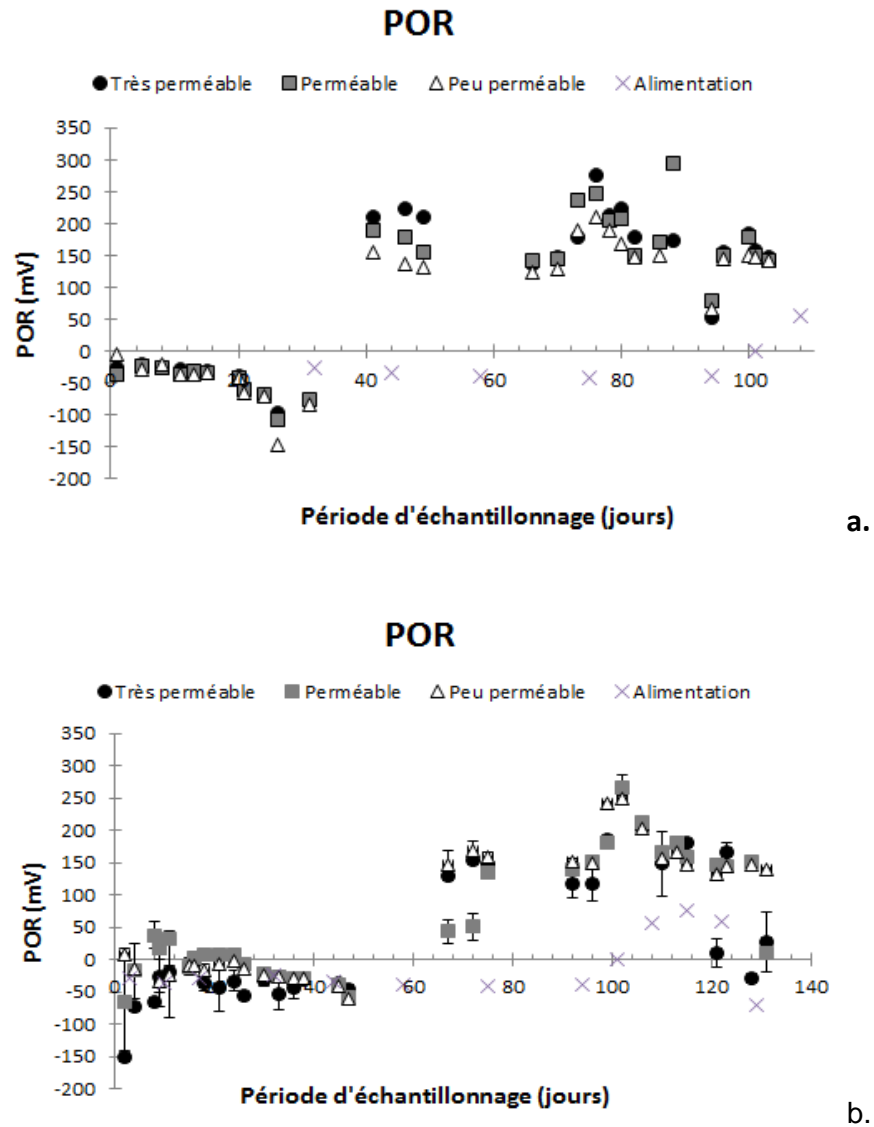


Figure 1-8 Évolution du POR lors de l'infiltration des eaux usées dans trois types de sols de perméabilité différentes en modes insaturé (a) et saturé (b)

L'oxygène entrant dans le système est responsable des fluctuations du profil de POR. Au fait, il est utilisé comme accepteur d'électrons nécessaire à la décomposition de la matière organique par les bactéries aérobies. Un profil similaire a été présenté par (Okubo et Matsumoto, 1979), attestant d'une première phase avec une légère diminution du taux d'oxygène ainsi que du taux d'infiltration, ce qui reflète une croissance microbienne aérobie. Cette phase a duré une vingtaine de jours pendant laquelle la croissance microbienne aérobie a fini par être limitée par le manque d'oxygène dissous. Enfin, les teneurs en oxygène ont augmenté et sont ensuite restées relativement constantes durant la période d'échantillonnage en raison de l'activité des microorganismes facultatifs présents dans les sols (Okubo et Matsumoto, 1979). Cette dernière phase est également caractérisée par une importante diminution du taux d'infiltration et une augmentation de la DCO (supérieure à celle de l'affluent). Dans certains cas, ceci peut conduire à un phénomène de colmatage sous des conditions d'activité anaérobie.

Le profil à deux phases rencontré lors de l'étude réalisée à petite échelle a aussi été décrit par Siegrist *et al.* (2004) lors d'une étude d'infiltration des eaux usées dans le sol dans des conditions similaires. Selon ces auteurs, la 1^{re} phase peut durer 10 à 100 fois plus que le taux de charge hydraulique. Elle est principalement connue en tant que période d'initiation et de maturation précoce pendant laquelle une distribution imparfaite est enregistrée. Avec le temps, la biomasse s'accumule dans les micropores du sol, conduisant à une infiltration de l'effluent plus uniforme selon un régime d'écoulement insaturé. Lors de cette phase, une diminution graduelle au niveau de la perméabilité du sol se fait ressentir conduisant ainsi à la 2^e phase. Cette dernière phase est souvent plus affectée par un phénomène de colmatage. Selon McKinley et Siegrist (2011), la matière en suspension, la biomasse ainsi que les substances polymériques extracellulaires (SPE) formées peuvent s'accumuler dans les pores ainsi qu'au niveau de la surface. Ces derniers conduisent donc à un phénomène de colmatage et à un état quasi-constant.

D'après Arizona State *et al.*(1998), le profil de la teneur en oxygène dépend de la qualité des eaux infiltrées et d'ailleurs une eau davantage chargée en COD aurait vu un déclin plus rapide . Par ailleurs et selon le même auteur, une eau dénitrifiée avec une DBO₅ de 5 mg/L ne verra pas son niveau d'oxygène diminuer à des niveaux atteignant des conditions anoxiques. Selon (Erickson, 2000), un système long, fin et rempli avec un sol sec poreux et qui se fait alimenter par une eau usée ayant de faibles teneur en DBO₅ augmenterait le flux d'oxygène vers le système.

1.4.3.2 Évolution des paramètres importants lors de l'infiltration des eaux dénitrifiées à petite échelle

La première phase s'est caractérisée par un pH moyen de 7,5 pour les deux modes avec une variabilité des valeurs selon la perméabilité des sols et donc de la quantité de silt ajouté (Chapitre 2, Figures 2-4a. et 2-6a.). La variabilité est à l'image des valeurs initiales de pH des sols (8,40 - 9,91 et 9,95 pour les sols très perméable, perméable et peu perméable, respectivement). De plus, une légère augmentation a bien été remarquée au cours de la période d'échantillonnage en raison de la libération de CO₂ dans le milieu lors de l'activité microbienne (Deepa et Krishnaveni, 2012, Yuan *et al.*, 2013). Cette dernière a préalablement été mentionnée par (Deepa et Krishnaveni, 2012) pour des effluents municipaux traités (dont le pH varie entre 7,4 et 8,0) ayant traversés des colonnes contenant des sols ayant un pH initial de 6,8.

Lors du démarrage des différents essais à l'échelle laboratoire, les teneurs en sulfates et en DCO étaient élevées avec des valeurs atteignant 1140 mg/L et 1196 mg/L, respectivement. Ces teneurs élevées mesurées dans l'effluent proviennent de l'inoculum utilisé pour inoculer les différentes colonnes. Lors de la 1^{re} phase, une baisse des concentrations en sulfates ainsi que de la DCO a été observée pour les trois sols, ce qui est sûrement dû à un phénomène de drainage de l'effluent riche en inoculum. Le comportement des sulfates et de la DCO s'est avéré différent pour le sol peu perméable lors du drainage. En effet, il semble que la teneur en DCO soit restée élevée en raison du faible taux de charge pour les essais réalisés en présence de ce sol (10 mL/jour) comparativement aux deux autres sols (33 mL/jour pour le sol très perméable

et 18 mL/jour pour le sol perméable). Pour les essais réalisés en présence des sols très perméable et perméable, les concentrations en DCO ont diminué jusqu'à 92 mg/L, atteignant ainsi la concentration de l'affluent en entrée des colonnes ([Chapitre 2, Figures 2-4c. et 2-6c.](#)). Quant au sol peu perméable, sa concentration en DCO est restée stable et élevée (190 et 143 mg/L pour les essais en mode insaturé et saturé, respectivement). Tout comme la DCO, les concentrations en sulfates ont diminuées jusqu'à atteindre les teneurs mesurées dans l'affluent (242 mg/L) pour les sols très perméable et perméable ([Chapitre 2, Figures 2-5a. et 2-7a.](#)), alors que pour le sol peu perméable, la concentration a considérablement chuté, atteignant une concentration de 36 mg/L et 82 mg/L pour les essais effectués en mode insaturé et saturé, respectivement.

Pendant la deuxième phase et contrairement au sol très perméable, les concentrations moyennes en DCO ont augmenté pour le sol perméable (128 mg/L) et sont restées élevées pour le sol peu perméable (134 mg/L) pour les essais réalisés en mode insaturé. Quant au mode saturé, seule la DCO du sol peu perméable est restée élevée avec une concentration atteignant 143 mg/L. D'ailleurs, la diminution du taux d'infiltration s'est accentuée et a conduit à un phénomène de colmatage plus poussé pendant la deuxième phase pour les essais réalisés en présence des sols peu perméables et ce, en modes insaturé et saturé. En effet, lors du colmatage, le temps de contact de l'effluent et du sol a été rallongé, induisant ainsi un enrichissement de l'effluent en matière organique provenant du sol silteux. Cette observation a été confirmée par les résultats obtenus lors d'une série d'essais mettant en jeu un sol riche en silt et de l'eau usée ([Tableau 1-4](#)). En effet, la concentration en DCO a pratiquement doublée après seulement 2 jours et quadruplé après 6 jours par rapport à un blanc contenant uniquement de l'eau usée.

Tableau 1-4 Essais complémentaires d'enrichissement d'eau usée en matière organique en contact avec du sol silteux

Période (jours)	t = 0	t = 2	t = 6
DCO (mg/L)	20	50	96

De plus, une diminution des concentrations en sulfates a été observée par rapport à l'affluent dans le cas des sols peu perméables, ce qui est probablement dû à une réduction de ces anions en sulfures (voir [Section 1.4.3.3](#)). Malgré le fait qu'il n'y a pas eu d'importantes quantités de sulfures aqueux ou gazeux observées au cours de cette phase, une diminution du taux d'infiltration a été observée, ce qui aurait pu conduire à un milieu favorable à la réduction des sulfates et par conséquent à la formation de sulfures.

1.4.3.3 Production et oxydation des sulfures

Suivant les conditions citées ci-dessus en termes de POR, de pH et de concentration en sulfates et DCO, de faibles concentrations en sulfures ont été mesurées, ne dépassant pas 0,25 mg S²⁻/L et 0,15 ppm pour H₂S_{aq} et H₂S_g, respectivement. Malgré la diminution de la concentration en sulfates observée par rapport à la concentration de l'affluent dans le cas du sol peu perméable (36 et 82 mg/L pour les modes insaturé et saturé, respectivement), aucune production importante de sulfure gazeux ou aqueux n'a été mise en évidence. Ceci peut être dû, dans un premier temps, à une réduction des sulfates en sulfures par les BSR, suivie dans un second temps, de leur oxydation en soufre élémentaire. D'ailleurs, cette formation de soufre élémentaire peut aussi être responsable en partie du phénomène de colmatage rencontré pour les essais réalisés en présence de sol peu perméable (Soares, 2002, Van Der Hoek *et al.*, 1992)).

D'une manière générale, l'oxydation des composés soufrés peut se faire en conditions aérobies ou anaérobies. Par exemple, les bactéries chimiolithoautotrophes oxydent les sulfures produits en conditions aérobies (Li *et al.*, 2013). Quant aux bactéries phototrophes, elles oxydent le sulfure d'hydrogène en soufre élémentaire en présence de lumière à l'aide d'enzymes en

conditions anaérobies (Cervantes *et al.*, 2006, Friedrich *et al.*, 2001). En fait, les sulfures, une fois produits, peuvent être oxydés soit complètement en sulfates ou partiellement en soufre élémentaire. Ceci dépend de l'énergie libre de chacune des réactions mises en jeu. D'ailleurs, l'oxydation incomplète des sulfures en soufre élémentaire est souvent favorable dans le cas d'effluents à faibles teneurs en matière organique contenant des sulfures d'hydrogène. En effet, elle nécessite moins d'énergie et peut donc se produire à de faibles concentrations en oxygène et en présence de fortes concentrations de sulfures (Cervantes *et al.*, 2006). La Figure 1-9 illustre le phénomène de réduction des sulfates en sulfures et leur oxydation en soufre élémentaire décrite par (Odom et Singleton, 1993). D'ailleurs, des procédés de traitement SOAD (sulfide-oxidizing autotrophic denitrification) ont été développés afin d'oxyder les sulfures produits suite à la dénitrification autotrophe des effluents en soufre élémentaire (Moraes *et al.*, 2012).

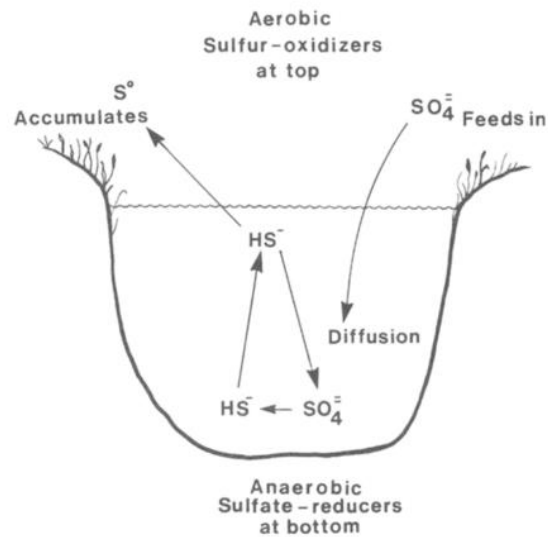


Figure 1-9 Réduction des sulfates en sulfures en conditions anaérobies suivie de leur oxydation en soufre élémentaire en conditions aérobies (Odom et Singleton, 1993)

Ainsi, l'étude à petite échelle (échelle laboratoire) a montré que les teneurs les plus élevées en sulfures aqueux demeurent faibles comparativement à la teneur de rejet dans le réseau d'égout pluvial ou dans un cours d'eau ($1 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$), que ce soit en mode insaturé (cas du sol peu perméable $0,25 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$) ou saturé (cas de l'alimentation $0,18 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$). Quant à la valeur maximale de sulfures gazeux émis, elle est de $0,15 \text{ ppm}$. Pour comparaison, l'odeur déplaisante, qui est celle de l'œuf pourri, est perceptible à une concentration de $0,2 \text{ ppm}$. Par conséquent, l'infiltration des eaux usées dénitrifiées ne semblent pas être problématique et ce, quelle que soit la perméabilité du sol (TP, P et PP). Toutefois, un risque de colmatage a été remarqué pour le sol peu perméable à la fin des expérimentations ce qui peut être expliqué par la faible perméabilité de ce sol. Malgré cela, seul le taux d'infiltration des eaux dans le sol peu perméable a été affecté, aucune génération importante de sulfures n'a été observée.

1.4.4 Essais à moyenne échelle

Encore plus proche de la réalité que les essais réalisés à petite échelle, cette partie du projet de recherche a porté sur l'étude de l'infiltration, à moyenne échelle, des eaux usées dénitrifiées à travers des sols très perméable (Réacteur R1) et perméable (Réacteur R2). La performance hydraulique ainsi que la production de sulfures aqueux et gazeux ont été évaluées afin de s'assurer de la longévité du système directement disposé en aval du procédé de dénitrification autotrophe. Étant donné les problèmes d'infiltration survenus dans le sol peu perméable (essais réalisés à petite échelle), seuls les sols sablonneux et sablo-silteux ont été testés pour représenter le sol très perméable ($K_s = 0,028 \text{ cm/s}$) et perméable ($K_s = 0,0013 \text{ cm/s}$), respectivement. Pour le sol très perméable, le suivi a été effectué sur une durée d'un an. Quant au sol perméable, le suivi a été réalisé sur une durée de 10 semaines en raison d'un problème de colmatage décrit à la [Section 1.4.4.2](#).

1.4.4.1 Évolution des paramètres importants lors de l'infiltration des eaux dénitrifiées à moyenne échelle

Le profil à deux phases observé lors des essais réalisés à petite échelle (à température ambiante) ne s'est pas dessiné lors des expérimentations effectuées à moyenne échelle (à température variable). En effet, une variation des paramètres a été observée cette fois-ci en fonction des différentes saisons de l'année, surtout pour l'alimentation. Pendant l'hiver et ce durant les 175 premiers jours d'expérimentations, le système a été opéré à une température moyenne de 7,3°C ([Chapitre 3, Figure 3-2a.](#)) avec un affluent ayant un POR de -75 mV et un pH de 6,84. Pendant cette période, une génération de sulfures aqueux et gazeux allant jusqu'à 0,7 mg/L et 2,1 ppm, respectivement a été enregistrée au niveau de la solution d'alimentation mg ppm. La température a, par la suite, augmenté graduellement durant l'été avec une moyenne de 15°C. Cette augmentation de température a pu être responsable d'une diminution des valeurs de pH (6,52) en raison de la vibration moléculaire et la libération des protons H⁺ dans le milieu (Down et Lehr, 2005) suivie par une augmentation des valeurs de POR (+101 mV) (James *et al.*, 2004). De plus, Ben-Khaled (2016) a mentionné que durant la période de gel (affluent à 3,5°C) le système a montré une baisse de rendements de dénitrification à $73,6 \pm 8,6\%$ avec une teneur résiduelle la plus élevée enregistrée a été de 7 mg NO₃-N/L en raison des températures basses (3,5°C) peu favorables à l'activité des BSR. Par conséquent, l'augmentation de la température de l'eau entre la période hivernale et la période estivale a entraîné une augmentation des performances du système de dénitrification, menant ainsi à une acidification du milieu que le calcaire en place n'a pas réussi à compenser (perte du pouvoir neutralisant du calcaire avec le temps). À ces conditions, une faible production de sulfures gazeux (< 0,5 ppm) et/ou aqueux (< 0,2 mg/L) a été observée au niveau de l'affluent.

L'infiltration de cette eau à travers les deux sols utilisés (très perméable et perméable) au cours de ces expériences a entraîné une augmentation à la fois des teneurs en OD (7,8 et 5,2 mg/L) et des valeurs de POR (+103 et +75 mV), qui sont des paramètres critiques pour l'activité des BSR et donc la production de sulfures. Selon plusieurs études, ces valeurs élevées de POR et d'OD

empêchent la production de sulfures, les BSR ayant besoin de faibles POR et de conditions anaérobies pour croître (Annable *et al.*, 2008).

De plus, malgré le fait qu'à certaines occasions le rapport DCO/SO_4^{2-} au niveau de la solution d'alimentation a atteint des valeurs égales et supérieures à 0,67 (Figure 1-10) (Biswas, 2012, Dar *et al.*, 2008, Velasco *et al.*, 2008), la concentration en sulfures d'hydrogène gazeux présents dans les réacteurs R1 et R2 n'a pas dépassé 0,5 ppm. Cela indique qu'il n'y a pas eu de production importante de sulfures d'hydrogène au cours de l'infiltration des eaux usées dénitrifiées à travers les sols très perméable et perméable. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus à petite échelle pour les essais réalisés sur des sols très perméable, et perméable pour lesquels les teneurs en sulfures aqueux et gazeux ne dépassaient pas 0,25 mg S^{2-}/L et < 0,15 ppm, respectivement et ce, malgré le fait que le débit d'alimentation ait été doublé pour les essais à moyenne échelle. En effet, les sols sablonneux et sablo-silteux, sont connus pour leurs bonnes percolations de l'eau et leurs capacités à favoriser les échanges gazeux. Ces qualités réduisent donc le développement des zones anaérobies et, par conséquent, la réduction des sulfates en sulfures par les BSR (Anderson *et al.*, 1980). Cette observation a été confirmée par l'évolution des concentrations en sulfates au cours de la période d'échantillonnage, qui est restée proche (146 et 161 mg/L pour R1 et R2, respectivement) de la concentration initiale mesurée dans la solution d'alimentation (137 mg/L) (Chapitre 3, Figure 3-3b.).

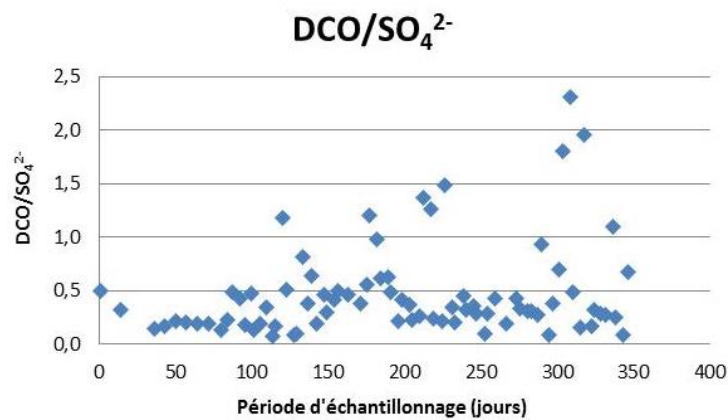


Figure 1-10 Profil du rapport DCO/SO_4^{2-} de l'eau dénitrifiée

D'après les résultats obtenus, l'infiltration d'eaux usées dénitrifiées dans un sol sablonneux s'avère sans risque ni de colmatage ni de génération de sulfures. Contrairement aux résultats obtenus à la petite échelle où aucune production de sulfures gazeux n'a été mesurée, une légère émission de H₂S a été observée lors de l'augmentation des températures. Ainsi, la production de sulfures semble proportionnellement liée aux variations de pH et de température. Malgré le fait que l'augmentation de la température reste légère (de 5 à 17°C) et restreinte à la solution d'alimentation, elle a été responsable de l'augmentation de la solubilité des composés organiques disponibles pour les microorganismes, ce qui a accéléré la vitesse des réactions biologiques et a entraîné une augmentation de la vitesse de conversion.

En résumé, pour les deux perméabilités de sol (TP et P), l'infiltration des eaux usées dénitrifiées ne semblent pas être problématique quant à la génération de sulfures et ceux malgré le fait de doubler le taux d'application (à savoir 130 L/m²/d pour le sol très perméable et 70 L/m²/d pour le sol perméable).

1.4.4.2 Phénomène de colmatage

Le phénomène de colmatage est survenu seulement pour le sol perméable (sablo-silteux) après 37 jours d'infiltration continue des eaux dénitrifiées. Ce phénomène s'est traduit par une diminution du taux d'infiltration et ce, jusqu'à atteindre un état stationnaire ([Chapitre 3, Figure 3-4](#)). Comme mentionné par Lowe et Siegrist (2008), cet état est appelé «état final». Pour le même type de sol (perméable), aucun phénomène de colmatage n'a été observé au cours des expériences réalisées à l'échelle laboratoire décrites à la [Section 1.4.3](#). Ces différences entre les deux échelles (petite et moyenne) pourraient être expliquées par le fait que le taux de charge est deux fois plus élevé pour les expériences réalisées à l'échelle moyenne. Cela peut ainsi conduire à une diminution de la capacité d'infiltration des eaux ainsi qu'une perte de la perméabilité, tel que décrit par Hargett *et al.* (1981).

Afin de bien comprendre les raisons pour lesquelles le colmatage a eu lieu, plusieurs hypothèses ont été explorées. Pour cela, 17 échantillons de sol ont été prélevés en fonction de la profondeur en plusieurs sections séparées d'environ 1,5 cm chacune. La [Figure 3-5a.](#), présentée au [Chapitre 3](#), présente les résultats de l'analyse de la distribution de la taille des

particules réalisée. Ces courbes montrent une certaine homogénéité des échantillons, avec une légère variation granulométrique. D'après ces résultats, il est possible de conclure qu'il n'y a pas eu de migration potentielle des particules fines à travers les particules de sable, ce qui aurait pu limiter l'infiltration des eaux usées dénitrifiées à travers le sol. De plus, la mesure des taux d'humidité des 17 échantillons de sols a montré que, quelle que soit la profondeur des sections, une teneur en eau moyenne de $12,5 \pm 1,1\%$ a été obtenue ($n = 17$ échantillons). Par conséquent, il n'est pas possible de dire si le colmatage s'est produit à une certaine profondeur et si l'eau n'a pas été bloquée à un niveau bien déterminé dans le réacteur R2.

D'autres recherches ont été menées pour expliquer l'effet de colmatage. Lowe et Siegrist (2008) supposent que le colmatage est un processus qui dépend fortement des contaminants présents dans les eaux usées tels que la matière organique remplissant les pores du sol. D'autres auteurs ont constaté que l'activité biologique, en particulier dans des conditions aérobies, conduit à la formation de sous-produits tels que les substances polymériques extracellulaires (SPE), qui provoquent le phénomène de colmatage. En outre, de nombreuses études ont montré que la présence de carbone organique à la surface d'infiltration (SI) peut également provoquer un colmatage important du sol (Siegrist et Thresher, 1985, Winstanley et Fowler, 2013). D'ailleurs, une couche mince brune d'environ 5 mm, s'est formée à la surface d'infiltration du réacteur R2. Cette couche mince avait une couleur différente de celle des autres couches du sol. Cette couche, appelée aussi biomate biologique, est généralement due à un dépôt de matière organique. Elle influence généralement la capacité d'infiltration d'un sol quelle que soit sa perméabilité initiale (White *et al.*, 2003). D'ailleurs, l'analyse du carbone organique, réalisée sur les différentes sections de sol recueillies, a montré que les quantités de carbone organique étaient similaires pour tous les échantillons (inférieures à 2%). Cependant, pour la couche de biomate, un enrichissement élevé en matière organique a été observé avec une quantité de carbone organique atteignant 7,5% (Chapitre 3, Figure 3-5c.). Par conséquent, le biomate aurait pu fortement influencer l'infiltration des eaux usées traitées à travers le sol en obstruant la surface.

Une autre raison et non la moindre ayant conduit au phénomène de colmatage est la formation d'une couche rouge et gélatineuse connue sous le nom d'« ocre ferreuse » au fond du réacteur R2 (Chapitre 3, Figure 3-6) (Ford, 1985, Smart et Herbertson, 1992). Une analyse complète de cette couche gélatineuse a montré une teneur en fer atteignant près de 112 g/kg, ce qui est 14 fois plus élevée que l'échantillon de sol initial (7,7 g/kg). Elle s'est formée suite à l'oxydation des composés de fer ferreux présents initialement dans le sol en oxydes ferriques insolubles (Fe_2O_3) (Smart et Herbertson, 1992).

Par conséquent, l'apparition de la couche biomate aurait conduit tout d'abord à inonder le sol qui est devenu appauvri en oxygène. Cet état a permis ainsi aux ions ferriques présents dans le sol de migrer dans l'eau moyennant des bactéries réductrices du fer (Ford, 1985) suivi par une oxydation de ce dernier en contact de l'air; entraînant la formation d'ocre ferreuse au fond du réacteur R2. Ainsi, ces deux phénomènes sont responsables du phénomène de colmatage observé dans le réacteur R2. De plus, la réduction des ions ferriques explique la non-réduction des sulfates en sulfures. En effet, les bactéries chimio-organotrophes oxydent la matière organique moyennant des oxydants présents dans le milieu selon un ordre bien précis (selon les énergies libres des réactions en jeu). Il s'avère que la réduction des ions ferriques ($\Delta G^0 = -115,0$ KJ/mol) précède celle des ions sulfates ($\Delta G^0 = -104,7$ kJ/mol) (Baveye *et al.*, 1998).

En résumé, l'augmentation du taux d'application a conduit à un phénomène de colmatage pour le sol perméable. En effet, ceci a conduit à l'apparition d'une couche de biomate qui a inondé le sol en le rendant appauvri en oxygène. Cet état a permis ainsi aux ions ferriques présents dans le sol de migrer dans l'eau moyennant des bactéries réductrices du fer (Ford, 1985), suivi par une oxydation de ce dernier en contact de l'air; entraînant la formation d'ocre ferreuse au fond du réacteur. Ainsi, ces deux phénomènes ont été responsables du phénomène de colmatage observé dans le réacteur avec un sol perméable. D'ailleurs, une certaine reproductibilité des données a été remarquée avec une faible génération de sulfures dissous et gazeux pour ces deux échelles et ce, malgré le fait que le taux d'application ait été doublé (quantités de sulfates de COD introduites dans le système plus importantes et, par conséquent, plus favorables à l'activité des BSR). Ceci revient principalement à une faible teneur en donneur d'électron

quantifiable en DCO et/ou COD. D'où l'intérêt de déterminer les conditions critiques menant à la formation de sulfures pour les comparer aux conditions testées à petite et moyenne échelles.

1.4.5 Détermination des conditions critiques menant à la formation de sulfures

1.4.5.1 Essais préliminaires

Que ce soit à petite et/ou à moyenne échelle, l'infiltration des eaux usées dénitrifiées dans des sols de perméabilités différentes n'a pas mené à une production importante de sulfures. Par conséquent, des essais complémentaires ont été réalisés de manière à déterminer les conditions à partir desquelles des sulfures sont produits. La composition initiale des différents réacteurs (R1 à R8) utilisés au cours de ces essais est présentée en [Annexe 3](#). L'[Annexe 4](#) présente les résultats obtenus pour les différents réacteurs étudiés pendant toute la période d'échantillonnage (8 semaines). Une production de sulfures gazeux et aqueux a été observée pour les réacteurs R5 à R8 après 2 à 4 semaines d'expérimentation.

Des essais préliminaires ont permis de mettre en évidence que la production de sulfures aqueux et/ou gazeux apparaît à partir de certains seuils de valeurs pour les teneurs en COD et sulfates. En effet, une concentration initiale en COD de 77 mg/L, un ratio initial COD/SO₄²⁻ de 0,18 et un ratio initial de DCO/SO₄²⁻ de 0,53 s'avèrent nécessaires pour obtenir des concentrations variant entre 84 et 100 ppm en sulfure gazeux et ce, à partir de la 2^e semaine d'expérimentations ([Chapitre 4, Figure 4-2a.](#)). Par ailleurs, une concentration initiale en COD supérieure à 56 mg/L, un ratio initial COD/SO₄²⁻ de 0,15 et un ratio initial DCO/SO₄²⁻ de 0,66 semblent nécessaires pour favoriser la production de sulfures aqueux avec des concentrations variant de 0,4 à 0,8 mg/L et ce, à partir de la 2^e semaine d'expérimentations ([Chapitre 4, Figure 4-2 b.](#)).

La génération des sulfures aqueux et gazeux a été observée dans les réacteurs ayant un pH d'environ 7,5, ce qui correspond à une valeur de pH optimal pour favoriser l'activité des BSR (Liu *et al.*, 2015, Yeh, 2000). De plus, la production de sulfures aqueux et gazeux a été accompagnée par une diminution des valeurs du potentiel d'oxydo-réduction (POR) au niveau des réacteurs concernés ([Chapitre 4, Figure 4-2c.](#)). D'ailleurs, cette diminution des valeurs de POR est en étroite relation avec les concentrations en COD mesurées dans les différents

réacteurs après 14 jours d'expériences ([Chapitre 4, Figure 4-3a.](#)). La [Figure 4-3b.](#), présentée au [Chapitre 4](#), illustre bien cette relation linéaire ($R^2 = 0,938$) entre les valeurs de POR mesurées après deux semaines d'expériences et la teneur initiale en COD.

Moyennant les résultats obtenus lors de la 2^e semaine d'expérimentations, deux corrélations ont pu être établies afin de prédire la quantité de sulfures gazeux et/ou aqueux (Huan, 2013). Une régression linéaire ($\alpha = 0,05$) a été trouvée entre la production de sulfures d'hydrogène gazeux et les valeurs de potentiel redox et de la teneur en COD ($p = 0,0181$ et $0,0014$, respectivement) avec un coefficient de corrélation (R^2) de $0,969$ ([Équation 1-23](#)).

Équation 1-23
$$H_2S_g = 0,29 \text{ POR} + 43 \text{ COD} - 350$$

Quant aux sulfures aqueux, une relation étroite ($R^2 = 0,94$) ([Chapitre 4, Figure 4-4](#)) entre les valeurs de POR et le logarithme du rapport des teneurs en sulfures/sulfates ([Équation 1-24](#)) a été établie moyennant la relation citée par (Chang *et al.*, 2008, Delgado *et al.*, 1999, Huan, 2013).

Équation 1-24
$$\text{POR} = f \left(\log \left(\frac{[H_2S_{aq}]}{[SO_4^{2-}]} \right) \right)$$

1.4.5.2 Évaluation de la production de sulfures aqueux selon la méthodologie Box-Behnken

En se basant sur les résultats issus des études préliminaires ([Section 1.4.5.1](#)), l'influence de trois facteurs (POR, concentration en sulfates et en COD) sur la production de sulfures gazeux et aqueux a été observée ([Annexe 5](#)). Toutefois, cette étude a aussi montré que le POR est en étroite relation avec la teneur de COD et qu'il évolue en fonction de ce dernier. De plus, puisque les valeurs de POR en temps réel ne peuvent pas être fixées, un 3^e facteur

(température) en plus de la teneur en COD et sulfates a été étudié en utilisant la méthodologie des plans d'expériences en surface de réponses (plan Box-Behnken).

Au bout de deux semaines d'expérimentations, la concentration en sulfures gazeux la plus élevée mesurée était de 84 ppm à T= 25°C avec une concentration initiale en sulfates de 270 mg/L et en COD de 90 mg/L. Toutefois, aucune relation mathématique n'a pu être établie par le logiciel Design Expert 8.0 entre la quantité de sulfures gazeux produits et les différents paramètres étudiés en raison du fait que la production de sulfures gazeux requièrent des conditions extrêmes (teneurs élevées en COD et sulfates). Cependant, les données expérimentales concernant les quantités de sulfures aqueux produits, présentées en [Annexe 3](#), ont pu être corrélées avec les paramètres étudiés selon un modèle mathématique quadratique (CV = 16,64 - p < 0,0001 - R² = 0,99). L'[Équation 1-25](#) présente l'équation quadratique, en termes de facteurs codés, mise en place par le logiciel Expert Design et permettant de prédire la quantité de sulfures aqueux en fonction de la température et des concentrations en sulfates et en COD initialement présentes dans les eaux dénitrifiées après 14 jours d'expérimentations.

Équation 1-25 Détermination de la quantité de sulfures aqueux produits

$$H_2S_{aq} = 0,208 + 0,164 A + 0,351 B + 0,978 C + 0,551 AB + 0,172 AC + 0,354 BC \\ + 0,355 A^2 + 0,231 B^2 + 0,486 C^2$$

Avec A, B et C représentant la température, les concentrations en sulfates et en COD, respectivement.

La significativité des différents facteurs et de leurs interactions éventuelles pouvant influencer la génération de sulfures peut aussi être évaluée à l'aide de tests de Fisher. Les valeurs de F présentées au [Tableau 1-5](#) indiquent que les facteurs considérés (température, concentration en sulfate et en COD) ainsi que leurs interactions ont un impact significatif sur la génération de sulfures dissous (Prob > F est inférieur à 0,05). Par exemple, l'interaction significative X₁X₂ (Prob

> F = 0,0025) révèle que la température (X_1) a un impact sur la génération des sulfures dissous mais que cet impact dépend de la concentration en sulfate (X_2). De plus, l'interaction significative X_2X_3 (Prob > F = 0,0015) révèle que la concentration en sulfate (X_2) a un impact sur la génération des sulfures dissous mais que cet impact dépend de la concentration en COD (X_3).

Tableau 1-5 Significativité des facteurs et de leurs interactions

	Sulfures dissous	
	Valeur de F	Prob > F
X_1 -Température	8,36	0,0341
X_2 -Concentration en sulfate	38,6	0,0016
X_3 -Concentration en carbone organique dissous	599	< 0,0001
X_1X_2	31,7	0,0025
X_1X_3	9,20	0,0290
X_2X_3	39,2	0,0015
X_1^2	27,2	0,0034
X_2^2	11,5	0,0195
X_3^2	51,0	0,0008

Selon les valeurs des coefficients définis dans l'Équation 1-25 exprimée en termes de facteurs codés, la production de sulfures aqueux est positivement influencée par tous les facteurs étudiés (température, concentrations en COD et en sulfates). De plus, il semble que la teneur en COD soit le principal paramètre influençant la production de sulfures aqueux suivi par la concentration en sulfates puis la température.

De plus, la Figure 4-6 présentée au Chapitre 4 illustrant les réponses (quantités de sulfures aqueux produits après deux semaines d'expérimentations) en fonction des paramètres étudiés, confirme bien l'influence positive de ces trois paramètres.

1.4.5.3 Détermination des conditions opératoires optimales menant à la production de sulfures aqueux

Afin de confirmer la qualité du modèle mathématique établi et les conditions du milieu favorables à la production de sulfures aqueux, des expériences complémentaires ont été réalisées en triplicats [$T = 25^{\circ}\text{C}$, $[\text{COD}]_i = 90 \text{ mg/L}$ et $[\text{SO}_4^{2-}]_i = 270 \text{ mg/L}$]. Selon le logiciel Design Expert 8.0, de nombreuses solutions ont été proposées indiquant la production potentielle de sulfures aqueux. Parmi ces solutions, une quantité de sulfures aqueux d'environ 2,36 mg/L est prédite pour une température de 25°C avec une concentration initiale en sulfates de 270 mg/L et une teneur en COD de 90 mg/L. Pour la même période d'expérimentations (2 semaines), la quantité de sulfures aqueux produits ($2,29 \pm 0,07 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$) s'est avérée proche de la valeur prédite par le modèle ($2,36 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$) avec une variation estimée à seulement 3,02%, ce qui permet de valider les conditions critiques favorables à la production de sulfures dissous dans les eaux usées ([Annexe 6](#)). Les conditions critiques qui ont conduit à la production de 100 ppm de sulfures gazeux et de 2,29 mg/L de sulfures aqueux indiquent la nécessité d'avoir une teneur en COD de 90 mg/L, ce qui est 9 fois plus élevée que celle mesurée dans les eaux usées dénitrifiées utilisées à petite et moyenne échelles. Ces résultats corroborent le fait qu'aucune génération importante de sulfures gazeux et aqueux n'ait été observée à petite et à moyenne échelles où la teneur en COD est restée très faible.

1.5 Conclusion et recommandations

Afin d'éviter une contamination environnementale liée à une gestion inadéquate des eaux usées domestiques issues de résidences isolées, une multitude de procédés de traitement ont vu le jour au cours de ces dernières décennies afin de réduire les teneurs en contaminants et/ou nutriments pouvant représenter un risque pour l'environnement (phénomène d'eutrophisation par exemple). Considéré comme étant un traitement tertiaire des eaux usées issues des collectivités non raccordées à un réseau d'égout, le procédé de dénitrification autotrophe sur soufre a fait ses preuves, permettant d'atteindre près de 81 à 99% d'élimination des nitrates. Ce procédé permet d'atteindre des concentrations faibles en nitrates ($< 5 \text{ mg NO}_3^- \text{-N/L}$) mais génère en même temps des concentrations en sulfates allant de 100 à 280 mg/L. Les risques potentiels liés à la production de sulfures peuvent représenter un frein au développement du procédé de dénitrification développé. Ainsi, le présent travail visait à étudier le devenir des sous-produits générés ainsi que sur les risques potentiels liés à l'infiltration des eaux usées dénitrifiées à travers différents types de sols (très perméable, perméable et peu perméable). Pour cela, une infiltration des eaux usées dénitrifiées dans des sols de perméabilité différente a été effectuée à petite échelle (selon deux modes de saturation) et à moyenne échelle. Par la suite, des essais en mode batch ont été réalisés afin de déterminer les conditions favorables à la génération de sulfures.

Que ce soit en mode insaturé ou saturé, les résultats obtenus lors de l'infiltration des eaux usées dénitrifiées à travers des sols très perméable, perméable et peu perméable à petite échelle ont montré que de faibles concentrations en sulfures aqueux ($< 0,25 \text{ mg/L}$) et gazeux ($< 0,15 \text{ ppm}$) ont été produites. Toutefois, il a été démontré qu'à cause d'un phénomène de colmatage produit au niveau du sol peu perméable, une réduction de la concentration en sulfates a été observée alors que les concentrations en sulfures sont restées faibles. Cela indique ainsi qu'après la réduction des sulfates en sulfures, ces derniers se sont ré-oxydés en soufre élémentaire ou qu'ils ont pu précipiter sous forme de sulfures métalliques.

Les essais réalisés à moyenne échelle, directement en aval du processus de dénitrification autotrophe sur soufre opéré à une échelle pré-commerciale, ont montré que les concentrations en sulfures les plus élevées étaient de 0,7 mg S²⁻/L (sulfures aqueux) et 2,1 ppm (sulfures gazeux). Ces faibles teneurs en sulfures produits, similaires à celles observées à petite échelle, sont principalement dues aux faibles teneurs en matière organique présente dans les eaux usées dénitrifiées et à une oxygénation des effluents (valeurs d'OD et POR élevées) qui sont défavorables à l'activité des BSR responsables de la réduction des sulfates en sulfures.

Au niveau des deux échelles, un phénomène de colmatage a été détecté. Pour les essais réalisés à petite échelle (cas du sol peu perméable), la faible perméabilité du sol a affecté le taux d'infiltration des eaux, menant au phénomène de colmatage observé. Pour les essais réalisés à moyenne échelle (cas du sol perméable), le fait de doubler le taux d'application (quantité de matière organique introduite dans le système plus importante) a conduit à la formation de biomate et d'ocre ferreuse, responsables du colmatage.

Par la suite, les conditions critiques à partir desquelles la formation des sulfures dans les eaux usées est observée ont été identifiées moyennant des essais en mode batch avec des concentrations croissantes en COD (allant de 42 à 87 mg/L). Dans un premier temps, des corrélations mathématiques ont été établies entre les quantités de sulfures gazeux et aqueux et les paramètres opératoires (POR, concentrations en COD et en sulfates). La première équation met en jeu la concentration en sulfures gazeux en fonction du POR et de la concentration en COD alors que la deuxième relation met en jeu la quantité de sulfures aqueux produits en fonction du logarithme du rapport des teneurs en sulfures/sulfates. Ces corrélations ont permis de connaître les facteurs influençant le plus la production de sulfures à partir des eaux usées dénitrifiées, à savoir le POR, la concentration en sulfates et en COD. Il a également pu être démontré que le POR est en étroite relation avec la génération de sulfures et comme ce paramètre ne peut pas être fixé, seules les concentrations en sulfates et en COD ont été fixées ainsi que la température pour étudier leur influence à l'aide d'un plan d'expériences en surface de réponses de type Box-Behnken. Ainsi, un modèle mathématique de second ordre a pu être

établi afin d'évaluer la concentration en sulfures aqueux produits à partir des eaux usées dénitrifiées en mode batch. Les conditions critiques qui ont conduit à la production de 100 ppm de sulfures gazeux et de 2,29 mg/L de sulfures aqueux sont une température de 25°C, une concentration en sulfates de 270 mg SO_4^{2-} /L et une teneur en COD de 90 mg/L. En effet, cette concentration est 9 fois plus élevée que celle mesurée dans les eaux dénitrifiées. Ces résultats corroborent bien ceux trouvés à petite et à moyenne échelle où les teneurs en COD sont restées trop faibles pour pouvoir entraîner la génération de sulfures aqueux ou gazeux. Il est à noter que les observations ainsi que le modèle mathématique significatif obtenu au cours de cette étude après deux semaines sont valables pour l'inoculum spécifique et les eaux usées domestiques utilisées. En effet, la biodégradabilité du COD présent dans une autre eau usée peut influencer les observations faites ainsi que le modèle mathématique de prédiction de la quantité de sulfures aqueux produits.

Les résultats de cette étude ont démontré qu'il y a peu de risques que des sulfures aqueux ou gazeux soient émis lors de l'infiltration des eaux usées dénitrifiées dans des sols très perméable et perméable. La production de sulfures d'hydrogène pourrait arriver dans le cas où une importante contamination surviendrait dans l'unité de traitement décentralisé ou si le sol utilisé contient d'importantes concentrations en matière organique. Cependant, ces essais ont été réalisés sur des sols reconstitués dans des colonnes ou dans des réacteurs et non sur des sols réels contenant de la végétation. Par conséquent, les résultats obtenus sont de bons indicateurs des phénomènes pouvant être rencontrés lors de l'infiltration des eaux usées dans un champ de polissage mais ils ne permettent pas de prédire de façon certaine le comportement des sulfates (risque de production de sulfures) à l'échelle réelle. En effet, même si les résultats obtenus mettent en évidence que des conditions extrêmes (concentrations élevées en matière organique biodégradable (> 90 mg/L) et en sulfates (> 270 mg/L)) sont requises pour favoriser l'activité des BSR et par conséquent, la réduction des sulfates en sulfures, ils ne nous permettent pas d'extrapoler en ce qui concerne les mécanismes qui auront lieu lorsque de la végétation sera présente sur le site. De plus, les résultats intéressants obtenus à l'échelle moyenne concernant les risques de colmatage ne permettent pas de conclure si ces

phénomènes seront observés à pleine échelle étant donné que les taux d'infiltration ont été doublés par rapport aux recommandations du MDDELCC pour pouvoir faire un suivi des systèmes dans un délai raisonnable.

Afin de répondre aux limitations des résultats actuels mises en avant, quelques recommandations peuvent être apportées, soit :

- Évaluer l'influence de la biodégradabilité du carbone organique présent dans différents types d'eaux usées sur le potentiel de génération des sulfures lors de l'infiltration des eaux usées;
- Évaluer l'influence des micro-organismes présents dans les sols sur le potentiel de génération des sulfures lors de l'infiltration des eaux usées;
- Évaluer les paramètres de design du champ de polissage pouvant mener à un phénomène de colmatage (propriétés physiques du sol (structure, texture, granulométrie, structure, densité relative, la conductivité hydraulique, nature de la couche naturelle de sol rencontrée sur le site permettant l'épuration des eaux usées par infiltration, éviter d'avoir une succession de zone anaérobie-aérobie, etc.)
- Mettre en place le procédé de dénitrification à l'échelle commerciale réelle et faire un suivi dans une résidence afin de s'assurer que le sol remplit toujours sa fonction d'infiltration des eaux usées dans le temps;
- Prévoir des techniques adéquates afin d'éliminer les sulfures aqueux lorsque ces derniers sont produits en de fortes quantités.

1.6 Références

- Abhilash, Pandey BD & Natarajan KA (2015) *Microbiology for minerals, metals, materials and the environment*. Disponible à l'adresse suivante : <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=953671>. Consulté le 30-05-2016.
- Alani AM, Faramarzi A, Mahmoodian M & Tee KF (2014) Prediction of sulphide build-up in filled sewer pipes. *Environmental Technology* 35(14):1721-1728.
- Anderson JL, Halsey CF (1980) *Evaluating soil texture for a house site*. Agricultural Extension Service, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA.
- Annable MD, Teodorescu M, Hlavinek P & Diels L (2008) *Methods and techniques for cleaning-up contaminated sites*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 196 p.
- Arizona State U, University of A, University of Colorado B & Foundation AR (1998) Soil treatability pilot studies to design and model soil aquifer treatment systems. American Water Works Assoc., Denver, CL, USA.
- ATSDR (2006) Hydrogen sulfide. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology and Environmental Medicine, Atlanta, GA, USA. Disponible à l'adresse suivante: <http://publ.fdlp.gov/GPO/gpo24788>. Consulté le 15-07-2016.
- Batchelor B & Lawrence AW (1978) Autotrophic Denitrification Using Elemental Sulfur. *Water Pollution Control Federation* 50(8):1986-2001.
- Batzer DP & Sharitz RR (2006) *Ecology of Freshwater and Estuarine Wetlands*. University of California Press, Berkeley, USA, 382 p. Disponible à partir de l'adresse suivante : <http://site.ebrary.com/id/10676283>. Consulté le 12 -01-2016.
- Baveye P, Vandevivere P, Hoyle BL, DeLeo PC & de Lozada DS (1998) Environmental Impact and Mechanisms of the Biological Clogging of Saturated Soils and Aquifer Materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 28(2):123-191.
- Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA & Leber P (1984) A Critical Review of the Literature on Hydrogen Sulfide Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 13(1):25-97.
- Ben-Khaled (2016) *Couplage de la dénitrification autotrophe sur soufre aux systèmes de traitement biologique des eaux usées domestiques applicables au secteur de l'assainissement décentralisé*. Mémoire de doctorat, INRS, Québec, QC, Canada, 199 p.
- Benedetto JS, de Almeida SK, Gomes HA, Vazoller RF & Ladeira ACQ (2005) Monitoring of sulfate-reducing bacteria in acid water from uranium mines. *Minerals Engineering* 18(13-14):1341-1343.
- Bernier B & MDDELCC (2012) *Guide pour l'étude des technologies conventionnelles du traitement des eaux usées d'origine domestique*. Rapport technique, Québec, QC, Canada, p 3-1.

- Bertolacini RJ & Barney JE (1957) Colorimetric Determination of Sulfate with Barium Chloranilate. *Analytical Chemistry* 29(2):281-283.
- Biswas T (2012) Effect of Linoleic Acid and COD/SO₄²⁻ Ratio on Anaerobic Sulphate Reduction in Semi-Continuous Reactors. Thesis report, University of Windsor, Windsor, ON, Canada, 119 p.
- Brady N & Weil RR (2008). The nature and properties of soils. 13th Edition N.C. Brady & R.R. Weil, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. ISBN 0-13-016763-0,960 p.
- Buchanan JR (2014) Chapter 3.13 - Decentralized Wastewater Treatment p 244-267. *Comprehensive Water Quality and Purification*, Ahuja S (Édit.) Elsevier, Calabash, NC, USA, 1536 p. Disponible à l'adresse suivante: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00050-5>. Consulté le 16-11-2015.
- Buisman CJN, Lettinga G, Paasschens CWM & Habets LHA (1991) Biotechnological Sulphide Removal from Effluents. *Water Science & Technology* 24:347–356.
- Campos JL, Carvalho S, Portela R, Mosquera-Corral A & Méndez R (2008) Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. *Bioresource Technology* 99(5):1293-1299.
- Canadian Centre for Occupational Health and Safety (2016) *CHEMINFO database*. Canadian Centre for Occupational Health and Safety, Hamilton, ON, Canada. Disponible à l'adresse suivante: <http://www.ccohs.ca/products/databases/cheminfo.html>. Consulté le 06-06-2016.
- Canadian Water Network (2015) Assessment and Management of Environmental Risks Associated with Decentralized Rural Wastewater Management Systems, Canada, 5 p.
- Cervantes FJ, Pavlostathis S & Van Haandel AC (2006) Advance biological treatment processes for industrial wastewaters principles and applications. IWA Publishing, Londres, Royaume-Uni. Disponible à l'adresse suivante : <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3120870>. Consulté le 10-07-2016.
- Chaiprapat S, Mardthing R, Kantachote D & Karnchanawong S (2011) Removal of hydrogen sulfide by complete aerobic oxidation in acidic biofiltration. *Process Biochemistry* 46(1):344-352.
- Chambers MA, Walker SL, Marsalek J, Lawrence J, Servos M, Busnarda J, Munger KS, Adare K, Jefferson C, Kent RA & Wong MP (1997) Examen des incidences des effluents d'eaux usées municipales sur les eaux canadiennes. *Water Quality Research Journal of Canada* 32:659-671.
- Chang YJ, Chang YT & Hung CH (2008) The use of magnesium peroxide for the inhibition of sulfate-reducing bacteria under anoxic conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35(11):1481-1491.

- Chou CHSJ (2003) *Hydrogen Sulfide*. World Health Organization, Genève, Suisse. Disponible à l'adresse suivante : <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=753834>. Consulté le 11-03-2014.
- Chou CHSJ, World Health Organization, United Nations Environment P, International Labour O, Inter-Organization Programme for the Sound Management of C & International Program on Chemical S (2003) *Hydrogen sulfide : human health aspects*. World Health Organization, Genève, Suisse, 37 p.
- Christianson L, Lepine C, Tsukuda S, Saito K & Summerfelt S (2015) Nitrate removal effectiveness of fluidized sulfur-based autotrophic denitrification biofilters for recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 68:10-18.
- Chung J, Amin K, Kim S, Yoon S, Kwon K & Bae W (2014) Autotrophic denitrification of nitrate and nitrite using thiosulfate as an electron donor. *Water Research* 58:169-178.
- Churchill P & Elmer D (1999) Hydrogen Sulfide Odor Control in Wastewater Collection Systems *Newea Journal* 33(1):57-63.
- Clancy PB, Venkataraman N & Lynd LR (1992) Biochemical Inhibition of Sulfate Reduction in Batch and Continuous Anaerobic Digesters. *Water Science & Technology* 5(7):51-60.
- Claus G & Kutzner HJ (1985) Autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans* in a packed bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22(4):289-296.
- Cline JD (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* 14(3):454-458.
- Colleran E, Finnegan S & Lens P (1995) Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek* 67(1):29-46.
- Dar SA, Kleerebezem R, Stams AJM, Kuenen JG & Muyzer G (2008) Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:1045-1055.
- Deepa K & Krishnaveni M (2012) Water quality performance of soil aquifer treatment (SAT) using municipal treated wastewater of Chennai city, India. *Journal of Environmental Hydrology* 20:1-9.
- Delgado S, Alvarez M, Rodriguez-Gomez LE & Aguiar E (1999) H₂S generation in a reclaimed urban wastewater pipe. case study: Tenerife (Spain). *Water Research* 33(2):539-547.
- DeLong EF (2012) *Prokaryotes prokaryotic physiology and biochemistry*. Springer, Berlin, London, Disponible à l'adresse: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4>. Consulté le 10-07-2016.
- Doujaiji B & Al-Tawfiq JA (2010) Hydrogen sulfide exposure in an adult male. *Annals of Saudi Medicine* 30(1):76-80.
- Down RD & Lehr JH (2005). *Environmental instrumentation and analysis handbook*. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, USA.

- Erickson, T.E.J. (2000). *Soil Oxygen Delivery to Wastewater Infiltration Surfaces*. Conference Proceedings National Onsite Wastewater Recycle Association, USA, pp. 91-96.
- Eun S, Reinhart DR, Cooper CD, Townsend TG & Faour A (2007) Hydrogen sulfide flux measurements from construction and demolition debris (C&D) landfills. *Waste Management* 27(2):220-227.
- Ford, HW (1985). Iron ochre and related sludge deposits in subsurface drain lines. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL, USA.
- Foucher S, Battaglia-Brunet F, Ignatiadis I & Morin D (2001) Treatment by sulfate-reducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recovery. *Chemical Engineering Science* 56(4):1639-1645.
- Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A & Fischer J (2001) Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism? *Applied and Environmental Microbiology* 67(7):2873-2882.
- Gibert O, de Pablo J, Luis Cortina J & Ayora C (2004) Chemical characterisation of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage. *Water Research* 38(19):4186-4196.
- Glass DC (1990) A review of the health effects of hydrogen sulphide exposure. *Annals of Occupational Hygiene* 34(3):323-327.
- Gouvernement du Québec (2016) Règlement sur la qualité de l'eau potable. Loi sur la qualité de l'environnement chapitre Q-2,r. 40. Gouvernement du Québec, Québec, QC, Canada.
- Gouvernement du Canada (2016) *Gestion des eaux usées*. Canada. Disponible à l'adresse suivante: <https://www.ec.gc.ca/eu-ww/default.asp?lang=Fr&n=0FB32EFD-1>. Consulté le 06-06-2016.
- Gouvernement du Canada (1994) Guidelines for Canadian drinking water quality : guideline technical document - Sulphate, Rapport technique, 5 p. Disponible à l'adresse suivante: <http://healthycanadians.gc.ca/publications/healthy-living-vie-saine/water-sulphate-sulfate-eau/index-eng.php>. Consulté le 25-06-2016.
- Gutierrez O, Park D, Sharma KR & Yuan Z (2009) Effects of long-term pH elevation on the sulfate-reducing and methanogenic activities of anaerobic sewer biofilms. *Water Research* 43(9):2549-2557.
- Hao OJ, Chen JM, Huang L & Buglass R (1996) Sulfate-Reducing Bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26(1):155-187.
- Hargett DL, Tyler EJ, Siegrist RL, Project SSWM & Wisconsin--Extension Uo (1981) Soil infiltration capacity as affected by septic tank effluent application strategies. Small Scale Waste Management Project. Université du Wisconsin, Madison, WI, USA, 13 p. Disponible à l'adresse suivante: <https://books.google.ca/books?id=IGNVAAAAMAAJ>. Consulté le 11-01-2016.

- Heuer K (1993) Prevention of Concrete Corrosion and Odour Annoyance with Biofiltration. *Water Science and Technology* 27(5-6):207-218.
- Hilton mg & Archer DB (1988) Anaerobic digestion of a sulfate-rich molasses wastewater: Inhibition of hydrogen sulfide production. *Biotechnology and Bioengineering* 31(8):885-888.
- Holland HD & Turekian KK (2010) Isotope Geochemistry a derivative of the Treatise on Geochemistry. Elsevier Science, Burlington, VT, USA, Disponible à l'adresse suivante: http://www.123library.org/book_details/?id=37397. Consulté le 14-03-2016.
- Huan NH, Hai, Yem & Tuan NN (2013) Factors effect to the sulfide generation rate in the To Lich River, Vietnam. *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences* 8(3):190-199.
- Hulshoff Pol L & Lens PNL (2000) Environmental technologies to treat sulfur pollution : principles and engineering. IWA Publishing, Londres, Royaume-Uni, 550 p.
- Ibanez JG (2007) Environmental chemistry fundamentals. Springer, New-York, NY, USA. Disponible à l'adresse suivante: <http://site.ebrary.com/id/10392840>. Consulté le 17-05-2015.
- Ivanov V (2011) Environmental microbiology for engineers. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 438 p.
- James CN, Copeland R & Lytle DA (2004) Relationships between oxidation-reduction potential, oxidant, and pH in drinking water. In: *US EPA (Ed.), AWWA WATER Quality Technology Conference*, San Antonio, TX, USA.
- Jiang G, Gutierrez O, Sharma KR & Yuan Z (2010) Effects of nitrite concentration and exposure time on sulfide and methane production in sewer systems. *Water Research* 44(14):4241-4251.
- Kamoun (2011) Plans d'expériences et traitements de surface - Méthodologie des surfaces de réponses (MSR). Techniques de l'ingénieur, France, 31 p.
- Kearns JR & Little BJ (1994) Microbiologically influenced corrosion testing. ASTM International, Philadelphie, PA, USA, 291 p.
- Kilburn KH & Warshaw RH (1995) Hydrogen Sulfide and Reduced-Sulfur Gases Adversely Affect Neurophysiological Functions. *Toxicology and Industrial Health* 11(2):185-197.
- Kimura K, Nakamura M & Watanabe Y (2002) Nitrate removal by a combination of elemental sulfur-based denitrification and membrane filtration. *Water Research* 36(7):1758-1766.
- Komarnisky LA, Christopherson RJ & Basu TK (2003) Sulfur: its clinical and toxicologic aspects. *Nutrition* 19(1):54-61.
- Lampe & Zhang (1996) Evaluation of sulfur-based autotrophic denitrification. in *Proceedings of the HSRC/WERC Joint Conference on the Environment*, Albuquerque, NM, USA, p 444-458.
- Leboffe MJ & Pierce BE (2006) Microbiology : laboratory theory and application. Morton Publishing Compagny, Englewood, IL, USA, 896 p.

- Lens PNL, Visser A, Janssen AJH, Pol LWH & Lettinga G (1998) Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 28(1):41-88.
- Lerman A & Meybeck M (1988) Physical and chemical weathering in geochemical cycles. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, MA, USA, 375 p.
- Lewandowski A (2013) Organic matter management. Soil Quality Institute, Natural Resources Conservation Service, USA.
- Li W, Lin J, Liu L & Liang X (2013) Competition of autotrophic and heterotrophic denitrification in anaerobic biofilm wastewater treatment process. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5(12):30-35.
- Liang CCV (2008) Reduced sulphur compounds in ambient air and in emissions from wastewater clarifiers at a kraft pulp mill. Mémoire de doctorat, Université de Toronto, ON, Canada, 245 p.
- Liu H, Jiang W, Wan D & Qu J (2009) Study of a combined heterotrophic and sulfur autotrophic denitrification technology for removal of nitrate in water. *Journal of Hazardous Materials* 169(1-3):23-28.
- Liu ZH, Maszenan AM, Liu Y & Ng WJ (2014) A brief review on possible approaches towards controlling sulfate-reducing bacteria (SRB) in wastewater treatment systems. *Desalination and Water Treatment* 53(10):2799-2807.
- Liu ZH, Maszenan AM, Liu Y & Ng WJ (2015) A brief review on possible approaches towards controlling sulfate-reducing bacteria (SRB) in wastewater treatment systems. *Desalin. Water Treat.* 53, 2799-2807.
- Lowe K & Siegrist R (2008) Controlled Field Experiment for Performance Evaluation of Septic Tank Effluent Treatment during Soil Infiltration. *Journal of Environmental Engineering* 134(2):93-101.
- Lv X, Shao M, Li J & Xie C (2014) Nitrate removal with lateral flow sulphur autotrophic denitrification reactor. *Environmental Technology* 35(21):2692-2697.
- Mackenzie FT (2005) Sediments, diagenesis, and sedimentary rocks. Elsevier, San Diego, CA, USA, 446 p. Disponible à l'adresse suivante: http://www.123library.org/book_details/?id=38738. Consulté le 09-06-2016.
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J (2003) Brock biology of microorganisms. Prentice Hall/Pearson Education, Upper Saddle River, NJ. Benjamin Cummings; 13 edition, 1152 p.
- McKinley JW & Siegrist RL (2011) Soil Clogging Genesis in Soil Treatment Units Used for Onsite Wastewater Reclamation: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41(24):2186-2209.

- MDDEFP (2013) Étude d'impact économique du projet de règlement modifiant le règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées. Ministère du Développement Durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, Québec, QC, Canada, 15 p.
- MDDEFP (2014) Détermination de la demande chimique en oxygène : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium, MA. 315 – DCO 1.1, Rév. 4, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, Québec, QC, Canada, 12 p.
- MDDELCC (2015) Règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées. Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques, Québec, QC, Canada. Disponible à l'adresse suivante: http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/Q_2/Q2R22.htm. Consulté le 21-09-2015.
- MENVIQ (1989) Méthode de digestion du Ministère de l'Environnement du Québec, No. 89.12/213 - Mét. 1.3. Gouvernement du Québec, Québec, QC, Canada.
- Ministère de la justice (2016) Règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées. Ministère de la justice, Canada, 71 p.
- Moraes BS, Souza TSO & Foresti E (2012) Effect of sulfide concentration on autotrophic denitrification from nitrate and nitrite in vertical fixed-bed reactors. *Process Biochemistry* 47(9):1395-1401.
- Muyzer G & Stams AJM (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6(6):441-454.
- Neculita CM & Zagury GJ (2008) Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization. *Journal of Hazardous Materials* 157(2–3):358-366.
- Nielsen AH, Hvitved-Jacobsen T & Vollertsen J (2005) Kinetics and stoichiometry of sulfide oxidation by sewer biofilms. *Water Research* 39(17):4119-4125.
- Nielsen AH, Vollertsen J, Jensen HS, Wium-Andersen T & Hvitved-Jacobsen T (2008) Influence of pipe material and surfaces on sulfide related odor and corrosion in sewers. *Water Research* 42(15):4206-4214.
- Nielsen PH & Hvitved-Jacobsen T (1988) Effect of Sulfate and Organic Matter on the Hydrogen Sulfide Formation in Biofilms of Filled Sanitary Sewers. *Journal of Water Pollution Control Federation* 60(5):627-634.
- Nielsen PH, Raunkjær K & Hvitved-Jacobsen T (1998) Sulfide production and wastewater quality in pressure mains. *Water Science and Technology* 37(1):97-104.
- Odom JM & Singleton R (1993) The Sulfate-reducing bacteria : contemporary perspectives. Springer-Verlag, New York, NY, USA, 289 p.

- Oh SE, Kim KS, Choi HC, Cho J & Kim IS (2000) Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulfur bacteria. in *Water Science and Technology*, p 59-68.
- Okubo T & Matsumoto J (1979) Effect of infiltration rate on biological clogging and water quality changes during artificial recharge. *Water Resources Research* 15(6):1536-1542.
- Osman KT (2013) Soils : principles, properties and management. Springer, Dordrecht, New York, NY, USA. Disponible à l'adresse suivante: <http://site.ebrary.com/id/10634966>. Consulté le 10-05-2016.
- Park K, Lee H, Phelan S, Liyanaarachchi S, Marleni N, Navaratna D, Jegatheesan V & Shu L (2014) Mitigation strategies of hydrogen sulphide emission in sewer networks – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 95 (Part A): 251-261.
- Parker CD (1945) The corrosion of concrete. *Australian Journal of the Experimental Biology and Medical Science* 23(2):81-90.
- Partlo LA, Sainsbury RS & Roth SH (2001) Effects of Repeated Hydrogen Sulphide (H₂S) Exposure on Learning and Memory in the Adult Rat. *NeuroToxicology* 22(2):177-189.
- Peck HD (1961) Enzymatic basis for assimilatory and dissimilatory sulfate reduction. *Journal of Bacteriology* 82(6):933-939.
- Pomeroy R & Bowlus FD (1946) Progress Report on Sulfide Control Research. *Sewage Works Journal* 18(4):597-640.
- PremierTech (2015a). PremierTech, Rivière du Loup, QC, Canada. Site internet de la compagnie disponible à l'adresse suivante: <http://premiertech.com/global/fr>. Consulté le 17-03-2015.
- PremierTechAqua (2015b) PremierTech, Rivière du Loup, QC, Canada. Site internet de la compagnie disponible à l'adresse suivante: <http://www.premiertechaqua.com/assainissement-traitement-eaux-usees>. Consulté le 17-03-2015.
- Qiu R, Zhao B, Liu J, Huang X, Li Q, Brewer E, Wang S & Shi N (2009) Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. *Journal of Hazardous Materials* 164(2–3):1310-1315.
- Reddy KR & DeLaune RD (2008) Biogeochemistry of wetlands : science and applications. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 800 p.
- Reiffenstein RJ, Hulbert WC & Roth SH (1992) Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32(1):109-134.
- Riding R & Awramik SM (2000) Microbial sediments. Springer, New York, NY, USA, 331 p.
- Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stacjebandt R & Thompson F (2012) *Prokaryotes prokaryotic physiology and biochemistry*. Springer (Eds), Berlin, Allemagne, 662 p. Disponible à l'adresse suivante : <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4>. Consulté le 10-04-2015.

- Sahinkaya E & Kilic A (2014) Heterotrophic and elemental-sulfur-based autotrophic denitrification processes for simultaneous nitrate and Cr(VI) reduction. *Water Research* 50:278-286.
- Schmidt TM & Schaechter M (2012) Topics in ecological and environmental microbiology. Academic Press, Amsterdam, Pays-Bas, 774 p.
- Sengupta S & Ergas SJ (2006) Autotrophic Biological Denitrification with Elemental Sulfur or Hydrogen for Complete Removal of Nitrate-Nitrogen from a Septic System Wastewater. Rapport technique, Université du Massachussets, North Darmouth, MA, USA, p 39.
- Sengupta S, Ergas SJ, Lopez-Luna E, Sahu AK & Palaniswamy K (2006) Autotrophic Biological Denitrification for Complete Removal of Nitrogen from Septic System Wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* 6(1):111-126.
- Service des eaux municipales (2007) Traitement des eaux usées des résidences isolées guide technique. Service des eaux municipales, Direction des politiques de l'eau, Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs, Québec, QC, Canada, 224 p.
- Shan J & Zhang TC (1998) Septic tank effluent denitrification with sulfur/limestone processes. In *Conference on Hazardous Waste Research*, Utah, UT, USA, p 15.
- Shao MF, Zhang T & Fang HHP (2010) Sulfur-driven autotrophic denitrification: diversity, biochemistry, and engineering applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(5):1027-1042.
- Siegrist RL & Thresher JE (1985) Microanalysis of Wastewater Amended Vadose Zone Soils. in *The National Water Well Conference* Denver, CO, USA, p 9.
- Siegrist RL, McCray JE & Lowe KS (2004) Wastewater Infiltration into Soil and the Effects of Infiltrative Surface Architecture. *Journal of Small Flows* 5:29-39.
- Sierra-Alvarez R, Beristain-Cardoso R, Salazar M, Gómez J, Razo-Flores E & Field JA (2007) Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment. *Water Research* 41(6):1253-1262.
- Smart P & Herbertson JG (1992) Drainage design. Blackie, Glasgow, Royaume Uni.
- Soares MIM (2002) Denitrification of groundwater with elemental sulfur. *Water Research* 36(5):1392-1395.
- Soil Science Society of America (2014) Innovation in soil-based onsite wastewater treatment. Conference proceedings; April 7 - 8, 2014, Albuquerque, NM, USA, 325 p.
- Statistique et Division des comptes et de la statistique (2010) L'activité humaine et l'environnement. Statistique Canada, Ottawa, ON, Canada.
- Statistics Canada (2011) Households and the Environment. Statistics Canada and Ministry of Industry, Ottawa, ON, Canada, 227 p.
- Su L & Zhao Y (2012) Chemical reduction of odour in fresh sewage sludge in the presence of ferric hydroxide. *Environmental Technology* 34(2):165-172.

- Sun Y (2012) Denitrification and desulfurization with elemental sulfur and hydrogen sulfide. Mémoire de Maîtrise, Université du Saskatchewan, Saskatchewan, SK, Canada, 98 p.
- Tanimoto Y, Tasaki M, Okamura K, Yamaguchi M & Minami K (1989) Screening growth inhibitors of sulfate-reducing bacteria and their effects on methane fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 68(5):353-359.
- Tyler J (2002) Soil Oxygen Supply to Wastewater Infiltration Systems. On-site Wastewater Treatment Conference-Life Cycle Management of On-site Technologies. North Carolina, USA.
- US EPA (1992) Detection, Control, and Correction of hydrogen sulfide Corrosion in Existing Wastewater Systems. United States Environmental Protection Agency, USA, p 4-2.
- Van Cuyk S, Siegrist R, Logan A, Masson S, Fischer E & Figueroa L (2001) Hydraulic and purification behaviors and their interactions during wastewater treatment in soil infiltration systems. *Water Research* 35(4):953-964.
- Van der Hoek JP, Hijnen WAM, Van Bennekom, CA & Mijnders, BJ 1992. Optimization of the sulphur-limestone filtration process for nitrate removal from groundwater. *Aqua* 41, 209-218.
- Velasco A, Ramírez M, Volke-Sepúlveda T, González-Sánchez A & Revah S (2008) Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation. *Journal of Hazardous Materials* 151(2–3):407-413.
- Wei C, Wang W, Deng Z & Wu C (2007) Characteristics of high-sulfate wastewater treatment by two-phase anaerobic digestion process with Jet-loop anaerobic fluidized bed. *Journal of Environmental Sciences Journal of Environmental Sciences* 19(3):264-270.
- White KD & West LT (2003) In-Ground Dispersal of Wastewater Effluent: The Science of Getting Water into the Ground. *Small Flows Quarterly* 4, 28-35.
- Winstanley HF & Fowler AC (2013) Biomat Development in Soil Treatment Units for On-site Wastewater Treatment. *Bull. Math. Biol.* 75, 1985-2001.
- Xu Y, Chen N, Feng C, Hao C & Peng T (2016) Sulfur-based autotrophic denitrification with eggshell for nitrate-contaminated synthetic groundwater treatment. *Environmental Technology*, DOI: 10.1080/09593330.2016.1176077:1-10.
- Yeh E (2000) *Raw sludge as substrate for sulphate-reducing bacteria*. Thesis report, University of Toronto, Toronto, ON, Canada, 146 p.
- Yuan H, Nie J, Zhu N, Miao C & Lu N (2013) Effect of temperature on the wastewater treatment of a novel anti-clogging soil infiltration system. *Ecological Engineering* 57, 375-379
- Zhang TC & Shan J (1999) In Situ Septic Tank Effluent Denitrification Using a Sulfur-Limestone Process. *Water Environment Research* 71(7):1283-1291.
- Zhao Y, Zhang B, Feng C, Huang F, Zhang P, Zhang Z, Yang Y & Sugiura N (2012) Behavior of autotrophic denitrification and heterotrophic denitrification in an intensified biofilm-

electrode reactor for nitrate-contaminated drinking water treatment. *Bioresource Technology* 107:159-165.

PARTIE 2 : ARTICLES

2 CHAPITRE 2

Assessment of sulfide production risk in soil during the infiltration of domestic wastewater treated by sulfur-utilizing denitrification process

Évaluation des risques de production de sulfures lors de l'infiltration dans le sol d'eaux usées domestiques issues d'un procédé de dénitrification autotrophe sur soufre

Revue : Environmental Science and Pollution Research

Soumis le 29 décembre 2015, Accepté le 25 Mai 2016, Publié le 24 Juin 2016

Auteurs

Leila Ghorbel Étudiante au doctorat, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-4677, Fax: (418) 654-2600, Email: leila.ghorbel@ete.inrs.ca

Lucie Coudert Associée de recherche, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-3793, Fax: (418) 654-2600, Email: lucie.coudert@ete.inrs.ca

Yan Gilbert Gestionnaire de projet, PREMIER TECH, 1 avenue Premier Campus Premier Tech, Rivière-du-Loup, QC, Canada, G5R 6C1, Phone: (418) 867-8883, Fax: (418) 862-6642, email: gily@premiertech.com

Guy Mercier Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-2633, Fax: (418) 654-2600, Email: guy.mercier@ete.inrs.ca

Jean-François Blais Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-2575, Fax: (418) 654-2600, Email: blaisjf@ete.inrs.ca

Note

L'étudiante est le premier auteur de cet article. Toutes les manipulations, le traitement des données ainsi que la rédaction ont été effectués par l'étudiante sous la supervision des autres co-auteurs.

Modifications exigées par le comité de lecture

L'article a été accepté avec des modifications majeures. Les commentaires les plus importants demandaient une amélioration de la discussion ainsi que de la conclusion avec une meilleure explication des phénomènes observés.

2.1 Résumé

Cette étude vise à déterminer le potentiel de génération de sulfures lors de l'infiltration dans le sol des eaux usées domestiques traitées par un procédé de dénitrification utilisant du soufre. Pour cela, trois types de sol avec différents taux de perméabilité ($K_s = 0,028 - 0,0013$ et $0,00015$ cm/s) ont été étudiés pour évaluer le risque potentiel de production de sulfures au cours de l'infiltration des eaux usées domestiques traitées par un système de dénitrification sur soufre et calcaire. Ces sols ont été caractérisés et testés pour évaluer leurs capacités à être utilisés pour la construction des champs de polissage. Des expériences ont été menées selon deux modes de fonctionnement (saturé et insaturé). Les teneurs en sulfates, en sulfure ainsi que la demande chimique en oxygène (DCO) ont été mesurés sur une période de 100 jours. Malgré la forte concentration en sulfates (200 mg/L) présentes dans les eaux dénitrifiées et les conditions anaérobies ($ORP = -297$ mV), aucune quantité significative de sulfures n'a été générée dans les phases aqueuse ($<0,25$ mg/L) ou gazeuse ($<0,15$ ppm) et ce, sur la totalité de l'expérimentation. En outre, la perméabilité du sol n'a pas eu d'effet notable sur l'infiltration des eaux usées domestiques traitées par un système de dénitrification utilisant du soufre, en raison des faibles teneurs en matière organique (carbone organique dissous - COD). Le procédé de dénitrification autotrophe, qui a été employé afin de traiter les eaux usées domestiques, a permis la réduction de la concentration de la demande biochimique en oxygène (DBO_5) à moins de 5 mg/L, de carbone organique dissous (COD) au-dessous de 7 mg/L et de la demande chimique en oxygène (DCO) au-dessous de 100 mg/L.

Mots clés : eaux usées domestiques; dénitrification autotrophe; infiltration; sol; production de sulfures.

2.2 Abstract

This study aimed to determine the potential of sulfide generation during infiltration through soil of domestic wastewater treated by a sulfur-utilizing denitrification process. Three types of soil with different permeability rates ($K_s = 0.028, 0.0013$ and 0.00015 cm/s) were investigated to evaluate the potential risk of sulfur generation during the infiltration of domestic wastewater treated by a sulfur-utilizing denitrification system. These soils were thoroughly characterized and tested to assess their capacity to be used as drainages for wastewaters. Experiments were conducted under two operating modes (saturated and unsaturated). Sulfate, sulfide and chemical oxygen demand (COD) levels were determined over a period of 100 days. Despite the high concentration of sulfates (200 mg/L) under anaerobic conditions (ORP = -297 mV), no significant amount of sulfide was generated in the aqueous (< 0.25 mg/L) or gaseous (< 0.15 ppm) phases. Furthermore, the soil permeability did not have a noticeable effect on the infiltration of domestic wastewater treated by a sulfur-utilizing denitrification system due to low contents of organic matter (i.e., dissolved organic carbon; DOC). The autotrophic denitrification process used to treat the domestic wastewater allowed the reduction of the concentration of biochemical oxygen demand (BOD_5) below 5 mg/L, of dissolved organic carbon (DOC) below 7 mg/L and of chemical oxygen demand (COD) below 100 mg/L.

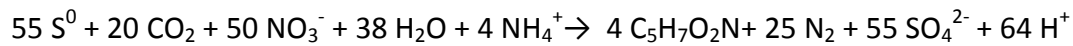
Keywords: domestic wastewater; autotrophic denitrification; infiltration; soil; sulfide production.

2.3 Abbreviations

BOD ₅	Biochemical oxygen demand after 5 days
COD	Chemical oxygen demand
DOC	Dissolved organic carbon
HRT	Hydraulic retention time
Ks	Hydraulic retention rate
ORP	Oxidation-reduction potential
SRB	Sulfate-reducing bacteria
SS	Suspended solids

2.4 Introduction

In urban areas, domestic wastewater management is typically handled by municipal infrastructures served by collection and treatment systems. However, in rural settings where occupation densities are low, households are generally connected to decentralized wastewater treatment systems (Suriyachan *et al.*, 2012). According to the study conducted by the Canadian Water Network (2015), nearly 20% of Canadian households were connected to a decentralized treatment system, with the highest percentage (50%) recorded in Nova Scotia. In Quebec, nearly 1 million residents were connected to this type of system in 2013 (MDDEFP, 2013). Typically, a conventional on-site system consists of a pre-treatment step carried out in a septic tank followed by a biological treatment. The pre-treatment separates solids from liquids by settling suspended matter or by flotation. According to Buchanan (2014), this step removes approximately 30-50% of the BOD₅ after 2 days in a septic tank. Following this step, the treated wastewater is delivered to a drainfield where it infiltrates the soil and comes into contact with groundwater. For a few installations, secondary or even tertiary treatments are used to remove additional biodegradable organic matter and to reduce the amount of pathogens in the wastewater (Massoud *et al.*, 2009). For example, the septic tank used in the pre-treatment step can be connected to an advanced secondary treatment system, such as a biofilter, an aerobic treatment unit or any other alternative to a drainfield. These biological treatments enhance the removal of organic matter. Tertiary treatment processes, such as denitrification, phosphorus removal technologies and disinfection, are used to improve the performance of the wastewater treatment system. Recently, various promising autotrophic denitrification processes using sulfur and limestone have been designed to remove over 90% of nitrates and nitrites from wastewater (Zhou *et al.*, 2011). During autotrophic denitrification, nitrates are reduced to nitrogen gas, and sulfur is oxidized into sulfates in the presence of sulfur-oxidizing bacteria. In the environment, sulfur could be within nine different oxidation states varying between -2 and +6. Depending on its oxidation state, sulfur can remain in almost 17 different common compounds (Lens et Hulshoff Pol, 2004). The complete oxidation of sulfates into sulfides involving *Thiobacillus denitrificans* has been initially proposed by Batchelor and Lawrence (1978) and is presented in [Equation 2-1](#).

Equation 2-1

Zhou *et al.* (2011) established a correlation between the reduction of nitrates or nitrites and the oxidation of sulfur into sulfates. For each mole of nitrate reduced, 0.93 mole of sulfur were consumed, which led to the production of 0.93 mole of sulfate. For each mole of nitrite, 0.54 mole of sulfur were consumed, leading to the production of 0.76 mole of sulfate. Several studies have reported that the production of sulfates does not represent a threat to the environment because sulfates are inert, non-volatile and non-toxic in aerobic environments. However, Zhou *et al.* (2011) recently indicated that the presence of sulfates produced during the treatment of domestic wastewater using sulfur-utilizing denitrification process could be problematic under anaerobic conditions. Indeed, during the infiltration of denitrified wastewater through soil, anaerobic conditions favor the reduction of sulfate into sulfide by sulfate-reducing bacteria (SRB) (Colleran *et al.*, 1995). In fact, these bacteria use organic matter as electron donors and sulfates as electron acceptors to produce energy, resulting in the production of H₂S as a by-product (Equation 2-2) (Alani *et al.*, 2014).



Based on the acid-base equilibria, once produced, sulfide may be present in liquid phase under different forms, such as H₂S, HS⁻ or S²⁻ (Lens et Hulshoff Pol, 2004). According to Henry's law, only the molecular sulfide form (H₂S) can be distributed into the gas and the liquid phases, with a Henry's law constant of 468 atm/mol fraction at 20°C. At approximately pH 6.0, the production of sulfur by-product leads to the generation of hydrogen sulfide, which is corrosive, smelly and toxic to the environment and humans (Chou, 2003). Over the past few decades, hydrogen sulfide has been scrutinized due to its unpleasant odor and adverse health effects. The impact of the hydrogen sulfide on human health depends on the concentrations of sulfide

released into the atmosphere and on the duration of exposure (Doujaiji *et al.*, 2010). The effects vary and can include a simple olfactory irritation (0.025 - 0.13 ppm), a feeling of an offensive and foul odor (3 - 5 ppm), irritations of the throat and lungs accompanied by digestive disorders (20 - 50 ppm), severe irritations of the nose, throat and lungs with loss of smell (100 - 250 ppm), the occurrence of lung edemas (250 - 500 ppm), and severe lung irritation, dizziness and collapse leading to death within 4 - 8 h after exposure (above 500 ppm). Prolonged exposure at concentrations as low as 50 to 100 ppm leads to coughs, hoarseness and shortness of breath. Hydrogen sulfide can be detected at very low concentrations (i.e., 0.2 ppm). The sense of smell is lost at 100 - 250 ppm concentrations (Beauchamp *et al.*, 1984, Chou, 2003, Glass, 1990, Partlo *et al.*, 2001, Reiffenstein *et al.*, 1992).

Castro *et al.* (2000) classified SRB, which can reduce sulfate into sulfide, into four groups (i.e., Gram-negative mesophilic, Gram-positive spore forming, thermophilic bacterial and thermophilic archaeal). A number of properties (e.g., cell shape, motility, GC content, growth temperature, metabolism, presence/absence of desulfovirin and cytochromes) have been considered in establishing the phylogenetic classification of SRB. Liu *et al.* (2014) described SRB typically found in wastewater and their properties according to their origins. Based on these studies, all types of wastewater contain SRB; however, several conditions are necessary to lead to the production of hydrogen sulfide. First, microbiological conditions for SRB activity are required (e.g., optimal pH, ORP and growth temperature ranges). Initial studies conducted by Pomeroy and Bowlus (1946) demonstrated that SRB can tolerate temperatures between 15 and 38°C and operate well in an optimum pH range between 6 and 9. A 7% increase in the sulfide production rate was observed for each one degree Celsius increase. However, sulfide production was also observed between 5 and 12°C by Nielsen and Hvitved-Jacobsen (1998) at a release rate reaching 0.02 and 0.1 g/(m².h). According to Gutierrez *et al.* (2009), pH also influences SRB activity. Sulfide production was reduced by 30 and 50% at pH 8.6 and 9.0, respectively, when compared with a control at pH 7.6. Moreover, because these bacteria are known to be anaerobic, an ORP range between -50 mV and -300 mV has been shown to be favorable for SRB activity (Huan *et al.*, 2013). According to Hao *et al.* (1996a), an ORP of at least -100 mV seems to be necessary for the reduction of sulfate into sulfide. Furthermore, according

to Huan *et al.* (2013), an ORP over 50 mV and a pH between 8.5 and 9 are necessary to avoid sulfide generation. Jiang *et al.* (2010) studied the influence of different concentrations of nitrite on the inhibition of SRB activity while varying exposure time. The inhibition of SRB activity seemed to be positively correlated with the concentration of nitrite and the exposure time. However, when nitrite concentrations increased above 50 mg N/L, the formation of hydrogen sulfide was inhibited. SRB have also been shown to be highly dependent on the organic content in their media (Nielsen et Hvitved-Jacobsen, 1988). Several studies highlighted the importance of maintaining a COD/SO₄²⁻ ratio over 0.67 for the development of SRB (based on the sulfate reduction reaction stoichiometry). Otherwise, bacteria would not have sufficient substrate to mature (Lens *et al.*, 1998, Velasco *et al.*, 2008). However, according to Neculita et Zagury (2008), this theoretical ratio is dependent on the type of substrate used. With ethanol, this ratio may vary between 0.55 and 0.84, whereas for substrates, such as municipal compost or activated sludge, the optimum ratio would vary between 1.6 and 5.0. These differences are due to the complexity of the substrates and their availability to the SRB.

Thus, the aim of this work was to understand the mechanisms of wastewater infiltration through the soil and the effects of various factors (e.g., physical, biological and chemical) on the potential release of sulfide. Moreover, this paper aimed to evaluate the risks of potential sulfide generation during soil infiltration of domestic wastewater treated by a sulfur-utilizing denitrification process. This study has implications on ecological and human health issues.

2.5 Material and methods

2.5.1 Soil materials

Three different soils (highly permeable, permeable and lowly permeable) were used to simulate the types of soil that denitrified wastewater could potentially encounter during on-site wastewater treatment. These soils (5 kg) were prepared from a mixture of sand and loam in different proportions as described in [Table 2-1](#). Four different sand types (Sandplay, Dried sand, Beach sand and Construction sand) were sieved before preparing the soil mixtures. The sand particle sizes showed a homogeneous distribution from 200 to 1,000 µm. Among the four different sand types, Beach sand was selected to prepare the soils because it was nearly free

(<0.8%) of silt (particles with diameters < 53 μm) and contained the lowest fraction of particles over 1 mm in diameter. Moreover, the majority of particles in Beach sand had a mean diameter of 378 μm (median diameter: 351 μm), which classified it as a medium sand grade (Canadian Agricultural Services Coordinating *et al.*, 2002). Beach sand samples were sieved through a 1-mm sieve to remove pebbles and coarse particles. To obtain the loam fraction used in the soil mixtures, approximately 300 kg of soil were collected along the St. Charles River (Quebec, QC, Canada) and passed through a 53- μm sieve. The soil was then mixed in different proportions with Beach sand to obtain the targeted properties. The mass distribution of sand and silt varied depending on the desired permeability as described in [Table 2-1](#).

Table 2-1 Soil composition and experimental conditions used for the experiments in saturated and unsaturated modes

Infiltration mode	Saturated mode						Unsaturated mode		
	*HP	*P	*LP			*HP	*P	*LP	
Columns	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C'1	C'2	C'3
Sand proportion (% by weight)	100	100	85	85	70	70	100	85	70
Silt proportion (% by weight)	0	0	15	15	30	30	0	15	30
Soil length (cm)	60	60	30	30	30	30	60	30	30
Soil weight (g)	549	556	292	295	287	287	536	284	257
Soil volume (cm^3)	304	304	152	152	152	152	304	152	152
Apparent density (g/cm^3)	1.80	1.82	1.92	1.94	1.89	1.88	1.76	1.88	1.69
Real density (g/cm^3)	2.69	2.69	2.67	2.67	2.64	2.64	2.69	2.67	2.64
V soil total pore (cm^3)	101	97.9	43.0	42.5	43.3	43.7	105	45.9	55.0
V gravel total pore (cm^3)	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4
V total pore (cm^3)	138	135	80.4	80.3	80.7	81.0	142	83.4	92.4
Q (mL/d)	33	33	18	18	10	10	33	18	10
HRT (d)	3.00	2.96	2.38	2.32	4.33	4.36	3.20	2.50	5.50

* HP :Highly Permeable; P :Permeable; LP :Lowly Permeable

The proportions of sand-loam used were as follows: 100% - 0% (w/w) for the highly permeable soil, 85% - 15% (w/w) for the permeable soil and 70% - 30% (w/w) for the lowly permeable soil.

2.5.2 Determination of soil sample permeability

The hydraulic conductivity was determined by a constant load test. Briefly, a sample of granular material (mixture of silt and sand) was loaded in a 45 cm high, 2.54-cm diameter column. The mixture was gradually added and compacted at a constant compaction force, resulting in layers with uniform thickness and a relative soil density of 1.8 g/cm³. A geotextile was placed on the top and bottom of the column to prevent soil leakage during water infiltration. Thereafter, a two-stage saturation was conducted. The first stage circulated carbon dioxide (CO₂) through the column at low pressure (3 -5 psi) for 30 min to purge and replace oxygen from the packed pores with CO₂, which is very soluble in water. In the second stage, an up-flow water saturation was performed on the packed column by means of a Marriott vessel to provide a constant pressure head on the tested material. The calculation of permeability was determined by measuring the outlet flow from the column according to Darcy's Law (Equation 2-3):

Equation 2-3
$$K_s = \frac{Q \cdot L}{S \cdot \Delta h}$$

where K_s is the permeability coefficient (cm/s); S is the cross-sectional area of the column (cm²); L is the column length (cm); Δh is the loading difference between the input and output (cm); and Q is the outlet flow rate (cm³/s).

2.5.3 Experimental set-up

Wastewater infiltration experiments were performed at laboratory scale to ensure the experimental mixtures corresponded to the targeted permeability. Six columns with 2.54 cm internal diameters and 121-cm heights were used, as shown in Fig. 2-1.

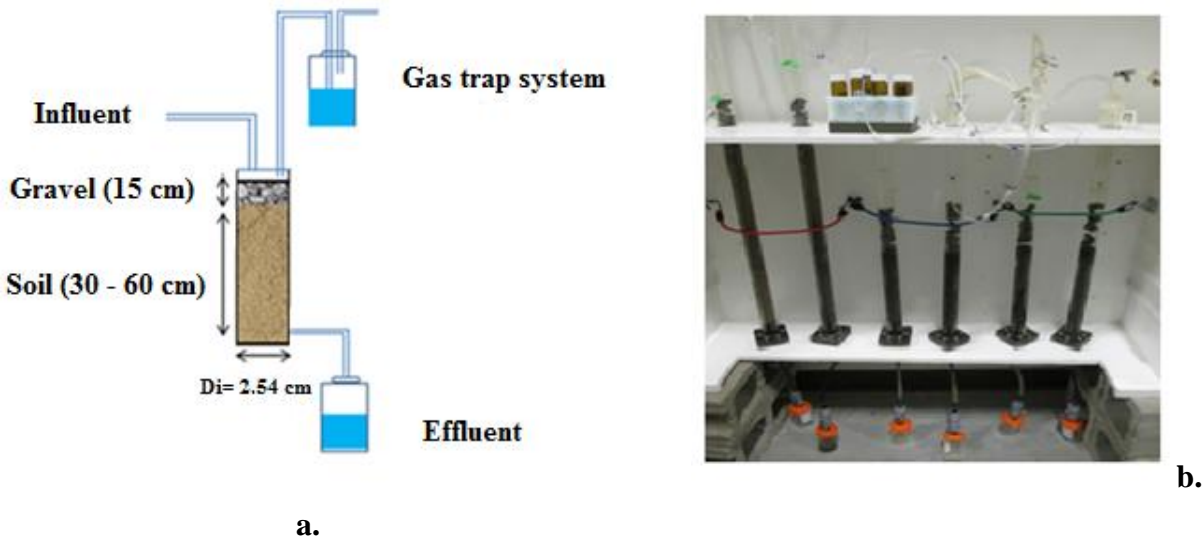


Figure 2-1 Design and composition of the columns used for laboratory-scale experiments during domestic wastewater infiltration through different soil permeabilities: (a.) schematic representation of the experiment and (b.) picture of the equipment used.

Depending on the soil permeability, the columns were filled with 30 cm of material (permeable and lowly permeable soils) or 60 cm of material (highly permeable soil). Then, a 15 cm layer of gravel was disposed on the top of the material in each column. Infiltration experiments were conducted in saturated mode and performed twice for each soil type (Columns C1 and C2 for the highly permeable soils, Columns C3 and C4 for the permeable soils, and Columns C5 and C6 for the lowly permeable soils). Additional, unsaturated mode experiments were conducted only once for the three different soils (Column C'1 for the highly permeable soil, Column C'2 for the permeable soil and Column C'3 for the lowly permeable soil).

2.5.4 Acclimatization of the bacterial microflora

Bacterial microflora were cultured on thickened sludge (4% total solids) obtained from a sewage treatment plant in Quebec City (QC, Canada). A mixture of microbial species present in this anaerobic sludge was used instead of individual strains. An identification of the species was difficult. However, according to the study carried out by Brand et al. (2015) on the population diversity of SRB present in nine wastewater treatment plant, the most common SRB species were *Desulfobacter postgatei*, *Desulfobulbus propionicus* and *Desulfovibrio intestinalis*. To develop sulfate-reducing bacteria, a 1/6 ratio (v/v) of thickened sludge to Postgate medium B nutrient was prepared and inoculated in 2-L flasks. The Postgate B nutrient media comprised 0.5 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 1 g/L CaSO_4 , 2 g/L $\text{mgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.5 g/L sodium lactate, 1 g/L yeast extract, 1 g/L ascorbic acid, 0.1 g/L thioglycolic acid and 0.5 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. This medium was prepared in 1 L of deoxygenated water. The pH was adjusted to 7.0 using a 1 M NaOH. To maintain anaerobic conditions, the system was closed with sealing plugs. Only two outputs were provided. The first outlet was used for sampling, and the second outlet was connected to a Tedlar bag to collect produced gases. The system was maintained at room temperature (20-25°C) for an acclimatization period of two months. Samplings of 20 mL were taken three times a week to monitor various parameters, such as pH, ORP and sulfate concentration (Biswas, 2012, Hao et al., 1996a).

2.5.5 System start-up

The different soil columns were inoculated with a maximum of 250 mg of the inoculum mixture. For this purpose, the pore volume was calculated for each column to determine the appropriate amount of inoculum mixture and nutrient medium to be added. The columns were then fed with freshly treated wastewater, which was collected from the effluent of an on-site wastewater treatment drain used for treating domestic wastewater. The collected effluent was refrigerated weekly during storage and maintained at ambient temperature prior to loading. The wastewater treatment process consisted of a primary settling step, a biological secondary process and a sulfur-based autotrophic denitrification unit.

The hydraulic retention time ($HRT = V \text{ soil total pore}/Q$) and the wastewater loading rates for each soil column were based on the soil permeability and the number of bedrooms in a typical isolated domestic dwelling (Table 2-1). In the present study, the wastewater loading rates were based on an isolated dwelling with two bedrooms (Service des eaux municipales, 2007). The wastewater input flows were fixed at 65 L/m²/d for highly permeable soils, 35 L/m²/d for permeable soils and 20 L/m²/d for lowly permeable soils. Because the experiments were conducted in 2.54-cm diameter columns (i.e., a cross-sectional area of 5.06 cm²), the treated wastewater was pumped at a rate of 33, 18 and 10 mL/day for the highly permeable, permeable and lowly permeable soils, respectively. Unsaturated and saturated experiments were conducted for 100 and 130 days, respectively.

In the present study, the experiments were carried out at a laboratory scale. Therefore, the volume of sample easy to collect in a reasonable time (to avoid sulfide oxidation) was just enough to measure the main sulfur-compounds which are sulfates (+6), dihydrogen sulfide H₂S (-2), hydrogen sulfide ion HS⁻ (-2) and total sulfur. Every two days, approximately 20 mL of liquid sample were collected from the bottom of the columns to measure the levels of various parameters (i.e., pH, ORP, COD and sulfate and sulfide contents). A NaOH trap containing a 0.05 mg/L NaOH solution was installed above each column to capture the hydrogen sulfide released from the top of the columns. Two operating modes, unsaturated and saturated, were considered. The essential difference between the saturated and the unsaturated systems is the gas exchange. As mentioned by Buchanan (2014), a saturated mode is obtained when the soil is frequently saturated with water; leading to a poor gas exchange and the apparition of anaerobic conditions. While, the unsaturated soil leads to a high gas exchange and the presence of aerobic conditions. Moreover, the unsaturated soil is usually used to simulate a common infiltration of wastewater through the soil, while the saturated soil is used to simulate extreme conditions or/and the infiltration of denitrified wastewater through the soil when it reaches groundwater.

2.5.6 Analytical methods

The particle size distribution of the different sand samples was determined using a laser particle sizer (Partica Laser Scattering LA-950V2, Laser Particle Size Analyzer, Tokyo, Japan). Elemental analyses of the soils were performed using a CHNS Leco Analyzer (TruSpec Micro, Michigan, USA). Anionic species were detected in the different soil samples using a Dionex ICS 2000 (with an AS18 column and an AG18 as pre-column) and an ARS 500 anion self-regenerating suppressor. The total sulfur was measured using an ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy, Vista model, Varian 725-ES, Mississauga, On, Canada).

All colorimetric methods used for the determination of sulfate, sulfide and COD contents were performed using a UV-Vis Spectrophotometer (Varian Cary® 50, Varian, Inc., Mississauga, ON, Canada).

Sulfate analyses were performed using a method described by Bertolacini *et al.* (1957). A calibration curve was prepared under the same conditions as the samples using serial dilutions of potassium sulfate (K_2SO_4). Additionally, two certified control solutions (Multi-element Ion Chromatography standard sol II in H_2O , Fluka, Sigma Aldrich) and an ammonium sulfate solution (10,000 μg S/mL, Plasma Cal SCP Science, Canada) were used to validate these analyses.

Sulfide analyses were also performed using a colorimetric method according to Cline (1969). A calibration curve was prepared from sodium sulfide. All solutions were prepared with ultra-pure deoxygenated water. Absorbance readings were taken using an UV-visible spectrophotometer at a 670 nm wavelength.

The determination of chemical oxygen demand (COD) was performed according to the MA. 315 - COD 1.1 CEAEQ analysis method (MDDEFP, 2014). The calibration curve was prepared from a potassium biphthalate stock solution (10,000 mg O_2 /L). Additionally, a certified control solution (500 mg/L solution, calibration standard, RTC) was also used to ensure the quality of the results for each series of measurements.

The pH and the ORP were both measured using a Fischer Scientific apparatus (Accumet, XL 600, dual channel pH/ORP, Fisher Scientific). Before each series of measurements, an Ag/AgCl reference cell used for the pH measurement was calibrated using certified solution (pH = 2.00, 4.00, and 7.00). The ORP cell was calibrated for each series of measurements using a certified solution (ORP = 470 mV).

2.6 Results and discussion

2.6.1 Preparation and characterization of the different soil samples

In this wastewater treatment experiment, the soils were well-defined to represent the treatment medium. Physical (e.g., texture, structure, soil aeration and soil temperature) and chemical properties (e.g., the presence of cations or anions) were measured to predict how the soil will receive, treat and disperse wastewater (Buchanan, 2014). Regarding the soil texture, which is primarily defined by the soil particle size distribution, [Fig. 2-2](#) presents the particle size distribution as a function of diameter for the three different types of soils tested (i.e., highly permeable, permeable and lowly permeable). According to the silt fraction in each soil, the highly permeable soil had a 0.8% silt fraction, while the permeable and the lowly permeable soil had 17.55 and 31.1% silt fractions, respectively.

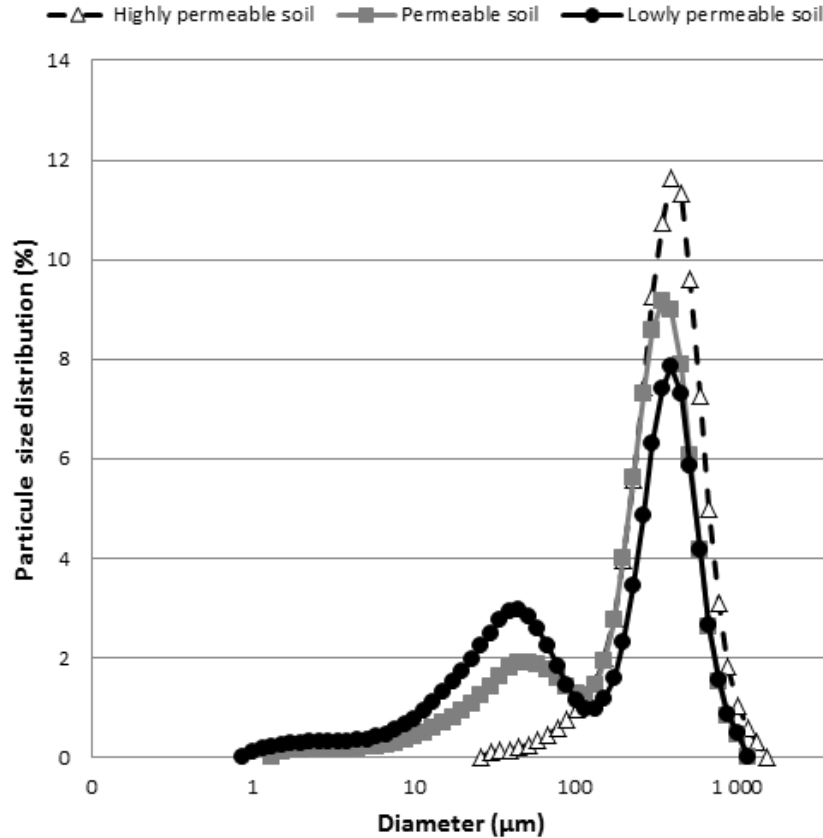


Figure 2-2 Particle size distribution of three different soil samples (highly permeable, permeable and lowly permeable) determined using a Laser particle size analyzer

The highly permeable, permeable and lowly permeable soil samples were prepared using different proportions of silt and Beach sand. [Table 2-2](#) presents the hydraulic conductivity for each soil mixture, which depends on several factors such as the particle size, the distribution of the grain size on the column. Indeed, these physical factors can affect the pressure drop exerted on the column and therefore the hydraulic conductivity.

Table 2-2 Determination of the hydraulic conductivity of the different soil mixture produced (mixture of silt and sand)

Soil	Soil 1			Soil 2	Soil 3
Sand/silt proportion (%-%)	100-0			85-15	70-30
Height Δh (cm)	$\Delta h_1 = 19$	$\Delta h_2 = 42$	$\Delta h_3 = 70$	$\Delta h = 200$	$\Delta h = 211.5$
Rep 1 Q (mL/min)	4	8	14	0.034	0.0037
Rep 2 Q (mL/min)	3	9	13	0.030	0.0034
Rep 3 Q (mL/min)	3	8	14	0.028	0.0038
Rep 4 Q (mL/min)	4	8	14	0.028	0.0038
Q_{moy} (mL/s)	0.058	0.138	0.229	0.030	0.0037
$K_{S_{moy}}$ (cm/s)	0.029	0.029	0.027	0.0013	0.00015
Ks_{final} (cm/s)	2.8×10^{-2}			1.3×10^{-3}	1.5×10^{-4}
Permeability criteria (cm/s)	$Ks > 4.0 \times 10^{-3}$			$2.0 \times 10^{-4} < Ks < 4.0 \times 10^{-3}$	$6.0 \times 10^{-5} < Ks < 2.0 \times 10^{-4}$
Permeability	Highly permeable			Permeable	Lowly permeable

The hydraulic conductivity was determined at three different heights (19, 42 and 70 cm) for soil 1, and an average value of K_s was calculated. The hydraulic conductivity of soil 1, made of 100% sand and 0% silt, was estimated to be 2.8×10^{-2} cm/s, which is higher than the limit value specified for a highly permeable soil ($K_s > 4 \times 10^{-3}$ cm/s) (Gouvernement du Québec, 2015). Therefore, this soil was considered as highly permeable. For soil 2, composed of 85% sand and 15% silt, the hydraulic conductivity was estimated to be 1.3×10^{-3} cm/s, which was in the permeable soil range between 2×10^{-4} and 4×10^{-3} cm/s. Finally, soil 3, made of 70% sand and 30% silt, was considered lowly permeable due to a K_s value (1.5×10^{-4} cm/s) within the range of values specified for lowly permeable soil ($6 \times 10^{-5} < K_s < 2 \times 10^{-4}$ cm/s).

To complete the characterization of the three different soils, physico-chemical analyses were performed. According to the results (Table 2-3), low organic matter contents were measured in soils 2 and 3 at 0.33% and 1.18%, respectively. The organic matter measured in soil 1 was below the detection limit ($< 0.05\%$). The concentration of organic matter in the soil samples increased with silt proportion. The decomposition of organic matter is more favorable in aerated sandy soil than in loamy or clayed soils; this indicates that fine particles contain much more organic matter (Brady et Weil, 2008, Lewandowski, 2013). The concentrations of nitrite or nitrate measured in the different soil samples were quite similar for all of the samples and were lower than 5 mg/kg. Unlike NO_x , the concentrations of sulfate and chloride gradually increased as the percentage of silt in the soil increased.

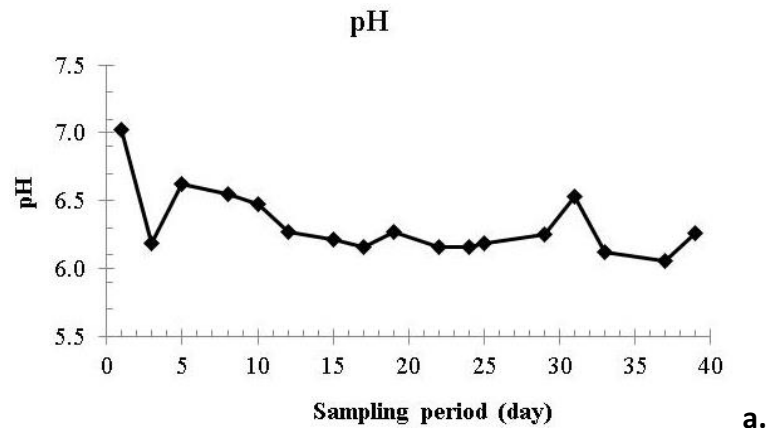
Table 2-3 Elemental characterization of the different soils studied

Soil sample	C (%)	S (%)	Cl^- (mg/kg)	NO_3^- (mg/kg)	NO_2^- (mg/kg)	SO_4^{2-} (mg/kg)	PO_4^{3-} (mg/kg)
Soil 1	< 0.05	< 0.05	5.17	4.18	0.320	9.35	121
Soil 2	0.33	< 0.05	30.4	2.67	< 0.097	85.2	91.5
Soil 3	1.18	< 0.05	77.8	3.68	< 0.098	170	36.8

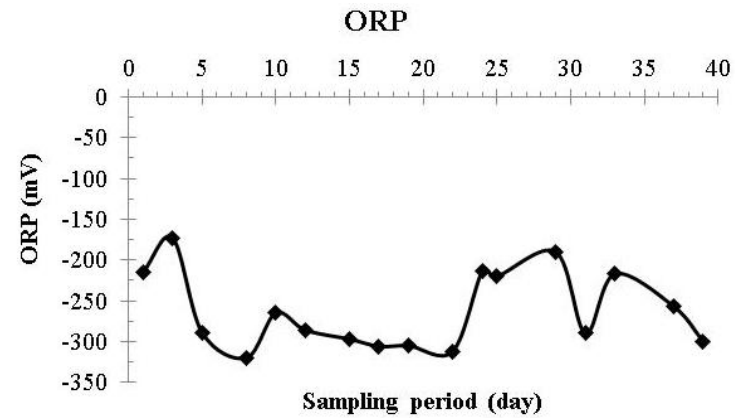
Table 2-1 summarizes the soil permeability, the real and the apparent densities measured for each experiment conducted in saturated and unsaturated modes in highly permeable, permeable and lowly permeable soils. The apparent density depended on the soil compaction and varied from 1.76 to 1.94 g/cm³, whereas the real density was relatively constant (approximately 2.64 - 2.67 g/cm³).

2.6.2 Bacterial microflora acclimatization

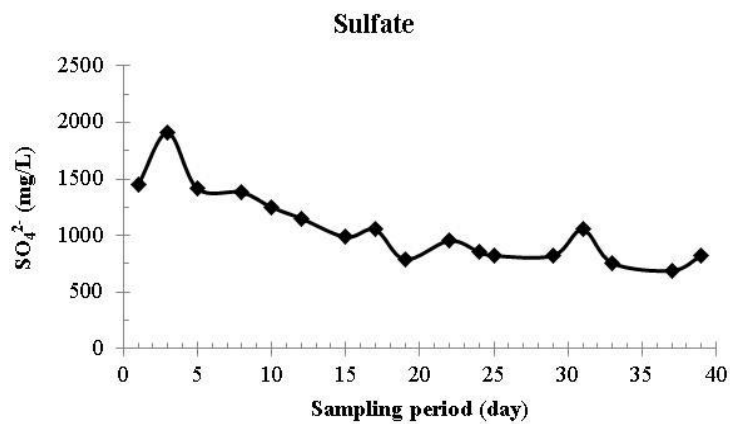
SRB acclimatization was performed at room temperature using sludge from a wastewater treatment plant and a SRB-selective nutrient medium (Postgate B). Fig. 2-3 presents the pH and ORP levels and the concentrations of sulfate and total sulfur during acclimatization. The pH was relatively stable and close to neutrality (i.e., between 6 and 7) during the acclimatization period. Despite some fluctuations due to air entry during sampling, the oxidation-reduction potential (ORP) remained negative between -320 and -173 mV. Moreover, a characteristic rotten egg smell odor and a visible black color due to the precipitation of iron sulfide confirmed SRB growth (Cao *et al.*, 2009).



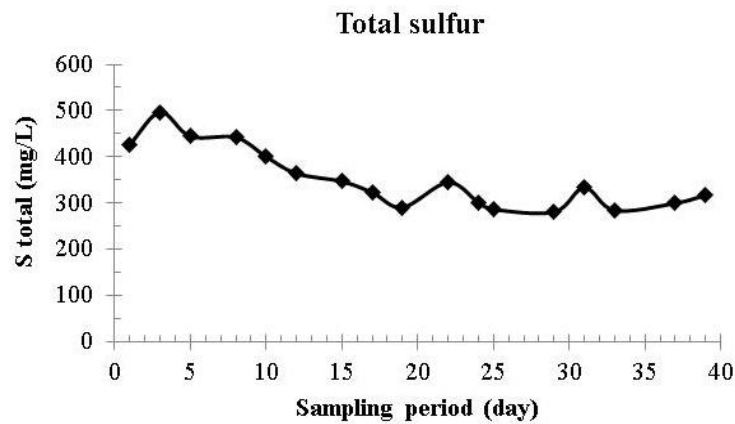
a.



b.



c.



d.

Figure 2-3 Determination of pH (a.), ORP (b.), concentrations of sulfate (SO_4^{2-}) (c.) and total sulfur (S_{total}) (d.) during bacterial microflora acclimatization with the Postgate B medium

After two months of acclimatization, the sulfate concentration in the media decreased by nearly 60%. The sulfate and total sulfur levels decreased from 1,677 mg SO_4^{2-} /L to 690 mg SO_4^{2-} /L and from 461 mg S/L to 280 mg S/L during the bacterial microflora acclimatization period. Thus, the bacterial microflora (SRB) required nearly two months of acclimatization to grow.

2.6.3 Treated wastewater characterization

At the beginning of the saturated and unsaturated infiltration experiments, the water emerging from the autotrophic sulfur-utilizing denitrification system was characterized (Table 2-4).

The pH of the effluent was approximately 6.54, and its ORP was negative (-297 mV). The BOD_5 was 4 mg/L, which indicated the presence of biodegradable matter. The nitrate concentration was relatively low at 4.9 mg NO_x /L, whereas the sulfate concentration was quite high at 212 mg/L. This was likely due to the oxidation of sulfur during the denitrification process. According to Lens et al. (2004), a minimum concentration of 1 mg SO_4^{2-} /L is required for sulfide generation. No metals were present in the denitrified wastewater, and only low concentrations of cationic species (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) were measured. Based on these measurements, the denitrified wastewater had characteristics that would likely promote the production of sulfides. Indeed, the low redox potential (ORP = -297 mV), the neutral pH (6.54) and the low level of dissolved oxygen (0.41 mg/L) are favorable to the development of sulfate-reducing bacteria and the generation of sulfides (Park *et al.*, 2014). The COD/ SO_4^{2-} ratio was estimated at 0.47, which is close to the theoretical ratio of 0.67 known to be favorable for the development of SRB (Biswas, 2012, Dar *et al.*, 2008, Velasco *et al.*, 2008). However, the organic matter present in the denitrified wastewater came from a secondary treatment and is considered low-biodegradable matter. Therefore, the required theoretical ratio for SRB development is higher than 0.67 (Mockaitis *et al.*, 2010).

Table 2-4 Characterization of autotrophic denitrification process effluent (n=1)

Parameters	pH	ORP (mV)	T (°C)	DO (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	COD (mg/L)	H ₂ S _(aq) (mg/L)	NO _x (mg/L)	BOD ₅ (mg/L)	NTK (mg/L)	SS (mg/L)	Alkalinity (mgCaCO ₃ /L)
Values	6.54	- 297	16.6	0.41	212	100	< 0.2	4.9	4	3.1	2.2	98
Parameters	Ca (mg/L)	K (mg/L)	Mg (mg/L)	Na (mg/L)	P (mg/L)	S (mg/L)	Si (mg/L)	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)			
Values	74	25	10	107	0.8	69	1.5	0.13	0.04			

2.6.4 Columns experiments

The infiltration of denitrified wastewater through different soil samples (highly permeable, permeable, lowly permeable) was tested on a sampling period of approximately 100 days at room temperature (20°C) in two different modes (saturated and unsaturated). [Table 2-1](#) summarizes the main characteristics of each column during these experiments according to their permeability. For each column, the pore volume was calculated to evaluate the volume of inoculum required. Then, the columns were inoculated by adding variable volumes of the inoculum prepared as described in [Section 2.2.4](#); the columns were maintained in this state for two weeks before starting the experiments.

The results for the unsaturated and saturated experiments had two major phases and an intermediate phase between their transitions. These two phases were well defined in all of the shown curves in [Fig. 2-4 to 2-7](#) but were easier to see in the ORP curves ([Fig. 2-4 and 2-6](#)).

2.6.4.1 *Unsaturated mode*

The infiltration in unsaturated soil columns was more representative of wastewater infiltration through soil. [Fig. 2-4](#) shows the evolution of pH, ORP and COD, and [Fig. 2-5](#) shows the evolution of sulfate and sulfide concentrations during the sampling period of the different permeability levels of soil samples operated in the unsaturated mode. According to the results presented in [Fig. 2-4 and 2-5](#), two phases were observed during the infiltration of wastewater into the soil through the unsaturated mode. The first phase spanned 31 days from the beginning of the sampling period, while the second phase started after the 41st day and lasted throughout the remaining sampling period. This two-phase profile was identified by Siegrist *et al.* (2004) during a study examining wastewater infiltration into soil under similar conditions.

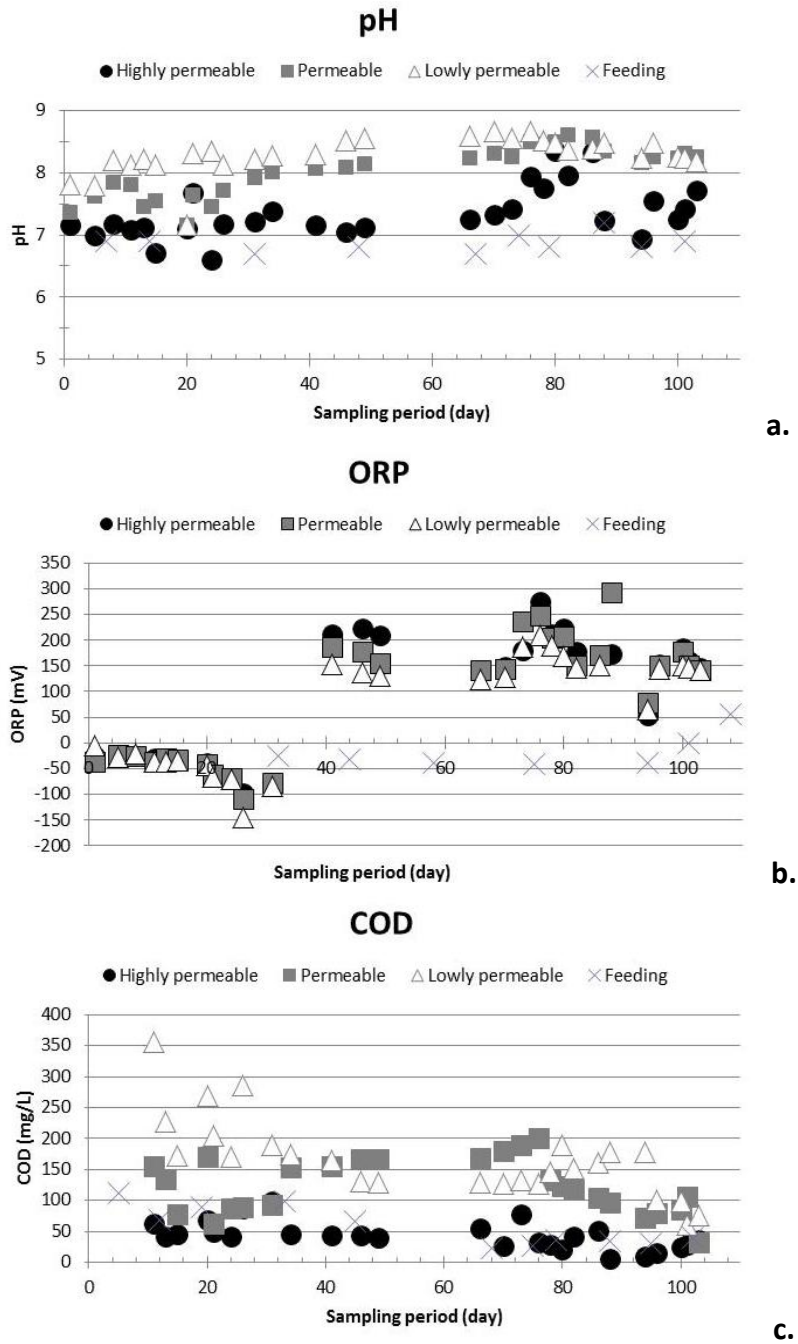
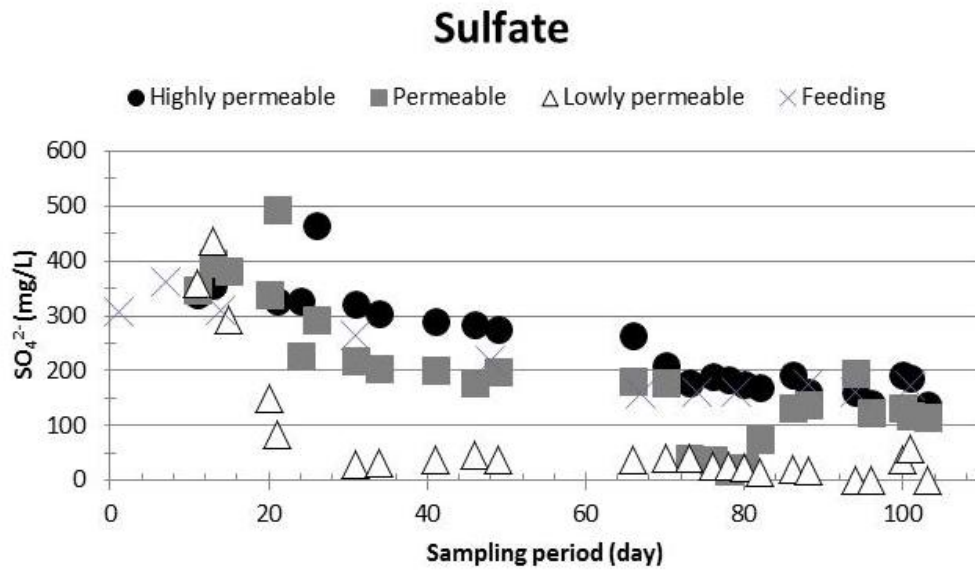
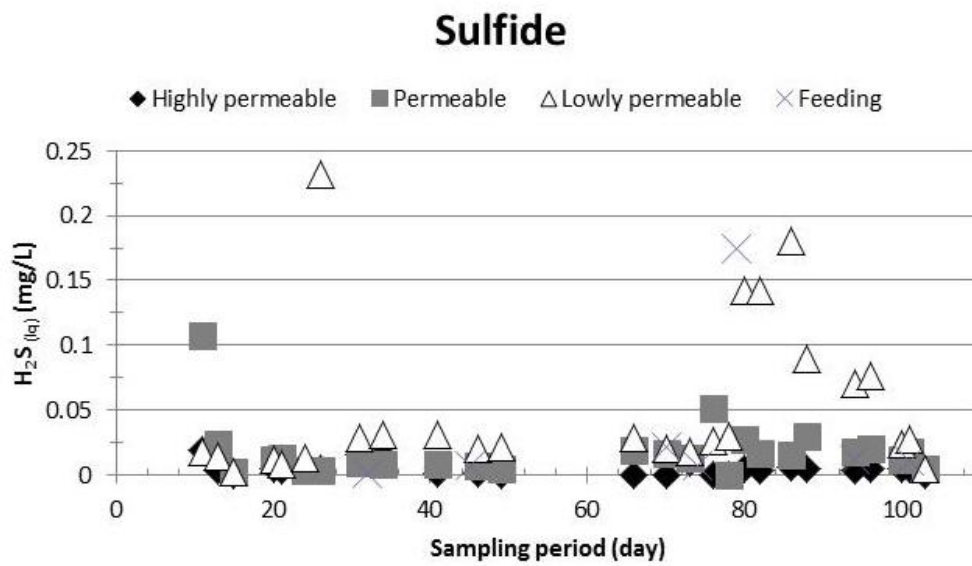


Figure 2-4 Evolution of pH (a.), ORP (b.) and COD (c.) during domestic wastewater infiltration through three different soil permeabilities (highly permeable, permeable and lowly permeable) in unsaturated mode



a.



b.

Figure 2-5 Evolution of sulfate (a.) and aqueous sulfide (b.) during domestic wastewater infiltration through three different soil permeabilities (highly permeable, permeable and lowly permeable) in unsaturated mode

During the first phase, the ORP values [0, -50 mV] (Fig. 2-4) remained close to the initial ORP values (-50 mV) in the three different soil samples because the flow of treated wastewater into the columns was constant, indicating a mass balance. However, because these infiltration experiments were conducted in the laboratory, they were not performed immediately downstream of the sulfur-utilizing denitrification process used to treat the wastewater. Thus, the ORP values were higher than those measured directly after the denitrification process reactor. Many authors have indicated that despite the oxygen toleration of the SRB (i.e., a few hours), an ORP of at least -100 mV was necessary for the reduction of sulfate (Abhilash *et al.*, 2015, Hao *et al.*, 1996a). Initially, such conditions would not result in sulfide generation, even if the pH of the effluent was the optimal pH (pH of 7.5) for SRB activity during the first phase. These observations were confirmed by the concentration of dissolved sulfide present in the effluent, which did not exceed 0.25 mg/L (Fig. 2-5).

Provincial regulations have not limited sulfide concentrations during wastewater infiltration through soil; regulations do exist for discharge in sanitary sewer systems (5 mg/L) and for rainwater sewer systems (1 mg/L).

During the first phase, the COD and sulfate concentrations gradually decreased during the sampling period for all three different soil types. Depending on the flow rate (33 mL/day, 18 mL/day and 10 mL/day), the COD decreased most rapidly in the highly permeable and permeable soils than in the lowly permeable soil. The COD concentrations of the effluents approached the level at the inlets (92 mg/L) for both highly permeable and permeable soils, whereas the COD concentration in the effluent of the lowly permeable soil remained higher (190 mg/L at the 31th day). Despite the higher COD concentration, sulfate consumption was fastest in the lowly permeable soil than in the permeable and highly permeable soils. Moreover, the concentration of sulfate reached a much lower concentration (36 mg/L) than the feeding concentration (242 mg/L) for the lowly permeable soil. According to Siegrist *et al.* (2004), the first stage may be 10 to 100 times longer than the hydraulic loading rate. The first stage was mainly characterized as an initialization and early maturation period during which an imperfect distribution was recorded. However, a more uniform effluent infiltration developed, following an unsaturated flow regime as biomass accumulated in the pores and a biochemical

purification process progressed (a decrease in COD). This phenomenon primarily led to a gradual decrease in the permeability of soil, which led to the next phase.

Thus, the decreases in COD observed for both highly permeable and permeable soils could be due to either a drainage of the enriched inoculum or a biochemical purification process for COD (Siegrist *et al.*, 2004), while the decreases in sulfate concentration were likely due to the drainage of the enriched inoculum. For the lowly permeable soil, the sulfate concentration was very low as a clogging phenomenon occurred, leading to a consumption of the available sulfates and their transformation into sulfides. The clogging was described as a decreased flow rate due to a continuous effluent infiltration; this may lead to a more purified wastewater (Hargett *et al.*, 1981). This phenomenon was better explained during the second phase explained just below.

According to Siegrist *et al.* (2004), the second phase was characterized by increased soil clogging. This complex phenomenon depended on physical, biological and chemical factors (Hargett *et al.*, 1981). According to McKinley et Siegrist (2011), the increased pore blockage by suspended solids led to a surficial clogging due to the increased formation of biomass. As the biomass increased, the generation of cellular byproducts, such as extracellular polymeric substances (EPS), enhanced the pore blocking. Finally, the interactions between calcium and magnesium present in the effluent contributed toward further pore blocking. These factors resulted in a clogging phenomenon with decreased treatment efficiency. This in turn led to a pseudo-steady state.

Indeed, a steady COD concentration was recorded when compared with the level at the inlet (an average input of 36 mg/L for the second phase) for the highly permeable soil during all of the sampling period. The lowly permeable and permeable soils showed increases in COD concentration. The average COD concentrations in the column effluents starting from the 41st sampling day (128 and 134 mg/L, for the permeable and lowly permeable soils, respectively) were higher than the concentrations entering the system. On the one hand, this increase could be explained by the fact that the carbon contents were relatively higher in the lowly permeable (1.18%) and permeable soils (0.33%) when compared with the highly permeable soil (< 0.05 mg/L). In fact, in a clogging state, the treated wastewater stayed in contact longer with

soil and became enriched with the organic carbon present in the soil and in the pores. Additional batch tests were performed over 6 days to confirm that the increased COD levels in the effluents exiting the columns were due to a release of organic matter initially present in the silt. Therefore, a mixture of silt and treated wastewater and a sample of wastewater (blank) were prepared. The concentration of COD was monitored over the 6 day period to evaluate whether organic matter was released from silt, which would lead to an increase in the COD concentration. The results showed that the concentration of COD doubled after 2 days (to 50 mg/L) and quadrupled after 6 days (to 96 mg/L) for the silt-wastewater sample relative to the blank sample whose concentration was initially at 20 mg/L.

McKinley et Siegrist (2011) showed that alternations between aerobic and anaerobic conditions resulted in a greater accumulation of organic carbon and clogging than in strictly aerobic or anaerobic conditions. In fact, the aerobic phase occurs during the accumulation of water above the soil (at 30-cm height), while the anaerobic phase occurs in the column itself. The aeration of the treated wastewater supplied sufficient oxygen to stimulate the accumulation of microbial by-products; however, this was not sufficient oxygen for complete mineralization.

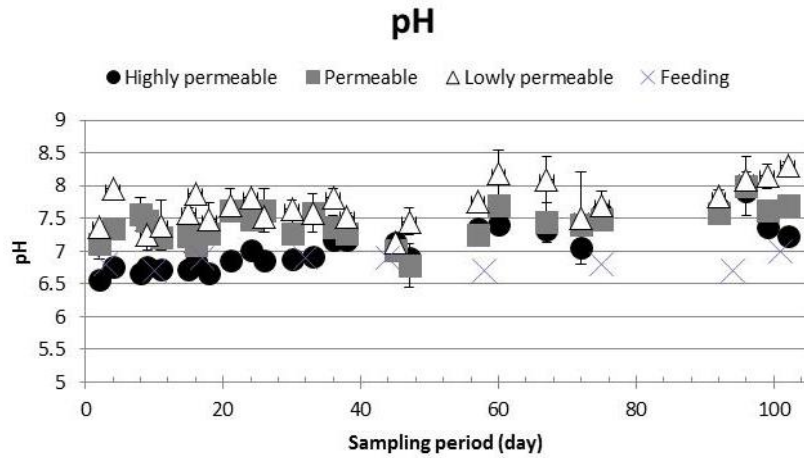
Despite the increased COD concentration in the permeable and the lowly permeable soil column outlets, sulfide production was not detected. Sulfide production was only recorded at the 80th day of the sampling period at a maximum concentration of 0.18 mg/L.

The decrease of sulfate observed for the experiments performed with lowly permeable soils could be due to its reduction into hydrogen sulfide. However, no important aqueous or gaseous sulfide was detected over the entire duration of the experiments. A first hypothesis to explain the decrease of sulfate is that these compounds were not completely reduced into sulfide by sulfate reducing bacteria during the infiltration of denitrified wastewater through the different soils. This incomplete reduction of sulfate by bacteria might be explained by the fact that the reduction process was stopped after the production of elemental sulfur or thiosulfates, due to the lack of nutrients (nitrogen, phosphor) in denitrified wastewater or because the retention time of denitrified wastewater through the soil was not enough long. Another hypothesis is that the sulfates were firstly reduced into hydrogen sulfide by sulfate-reducing bacteria. However, the sulfide produced could have been oxidized into elemental sulfur during the infiltration of

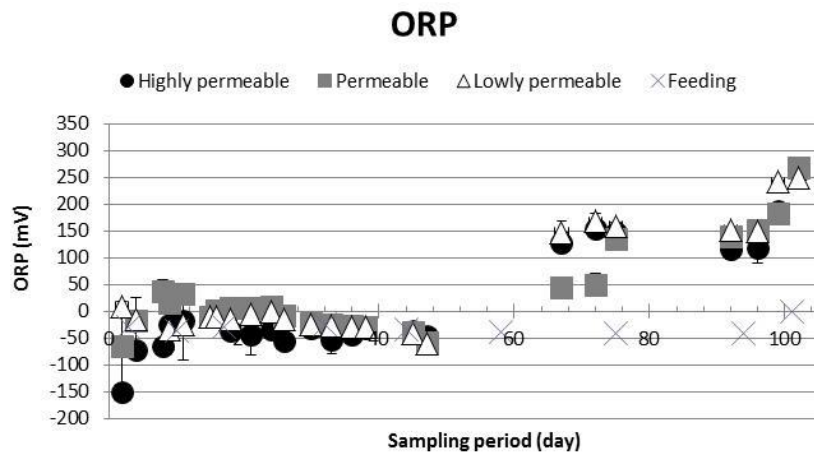
wastewater through the different soils. In fact, according to Friedrich *et al.* (2001), phototrophic and chemotrophic bacteria could anaerobically oxidize the hydrogen sulfide to sulfur in the presence of light using enzymes.

2.6.4.2 Saturated mode

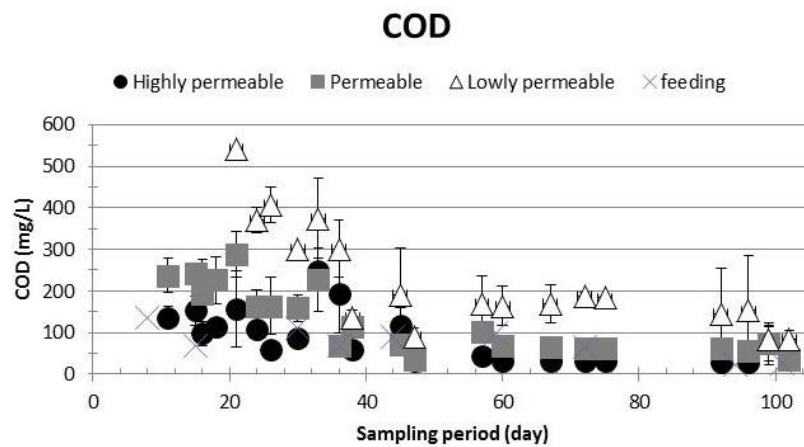
Like the unsaturated mode, the saturated mode showed two phases. Fig. 2-6 shows the changes in pH, ORP and COD during the sampling period of the different permeability levels of soil samples (mean values for C1-C2 highly permeable, C3-C4 permeable and C5-C6 lowly permeable) operated in saturated mode. The first phase of the saturated mode continued until the 47th day, while the second phase started on the 67th day. The first phase lasted longer than that for the unsaturated mode because under saturated conditions, the effluent required more time to exit the columns. The ORP was slightly negative (-50 mV) during the first phase and increased during the second phase (+150 mV). The pH slightly increased over the entire sampling period. The COD curves were obtained under the saturated and unsaturated modes and according to the flow rate of each type of soil, the first phase was longer for the lowly permeable soil than for the permeable and the highly permeable soils. For the highly permeable soil, the COD concentration in the effluent (38 mg/L) was similar or the same as that in the wastewater entering the system (38 mg/L). For the permeable and lowly permeable soils, the concentration of COD remained relatively higher (60 and 143 mg/L) at the effluent than in the influents. This was also observed for the permeable and lowly permeable soils operated under unsaturated mode and may be caused by the release of organic matter from the silt.



a.



b.



c.

Figure 2-6 Evolution of pH (a.), ORP (b.) and COD (c.) during domestic wastewater infiltration through three different soil permeabilities (highly permeable, permeable and lowly permeable) in saturated mode

Fig. 2-7 presents the sulfate and sulfide curves obtained for the unsaturated infiltration experiments. During the second phase, the sulfate concentrations measured for the highly permeable and permeable soils were very close to the concentrations of sulfate found in the inflows (173 mg/L). However, for the lowly permeable soil, the sulfate concentration was lower (82 mg/L) than the inflow. Such an observation was also made in the unsaturated infiltration experiments. Moreover, the dissolved sulfide concentration did not exceed 0.25 mg/L at the outlets of all soils studied for the duration of the experiments. For the lowly permeable soil, the clogging phenomenon was more accentuated. During the infiltration of wastewater into the soil, the unsaturated state became a saturated state during the second phase, resulting in a high similarity between the two modes (Siegrist *et al.*, 2004).

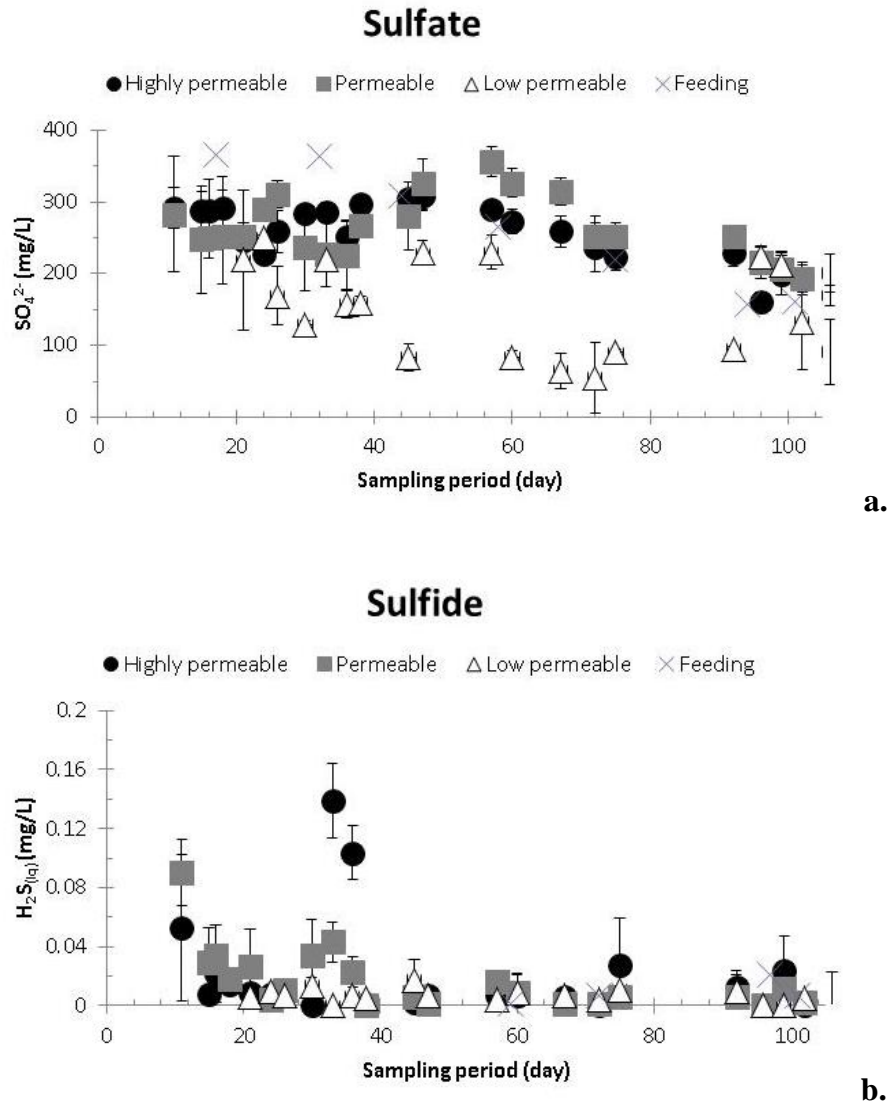


Figure 2-7 Evolution of sulfate (a) and aqueous sulfide (b) during domestic wastewater infiltration through three different soil permeabilities (highly permeable, permeable, and lowly permeable) in saturated mode

2.7 Conclusion

As tertiary treatments, autotrophic denitrification processes constituted interesting alternatives for advanced nitrogen removal to improve the treatment of decentralized domestic wastewaters. Despite the effectiveness of the autotrophic denitrification process, research was still required to improve the control over key parameters responsible for adequate and sustained performances. To limit environmental and health impacts due to sulfur generation from the sulfates released from this process, a better comprehension of sulfate transformation during soil infiltration was necessary. The results showed that the infiltration of denitrified wastewater through different soils did not lead to a high production of gaseous (< 0.15 ppm) or aqueous (< 0.25 mg/L) sulfide. This observation was done, regardless of the permeability of the soil (highly permeable, permeable or lowly permeable) or the operating mode (saturated or unsaturated). Despite this lack of sulfide production, the concentration of sulfate initially present in denitrified wastewaters considerably decreased during the experiments. This can be explained by the fact that the reduction of sulfates into sulfide wasn't complete and just stopped in elemental sulfur state. Another explanation is that the sulfates were completely reduced into sulfide and were then re-oxidized into elemental sulfur in the presence of bacteria.

It is very important to prevent the clogging phenomenon during wastewater infiltration. Thus, a better infiltrative capacity is required to avoid wastewater buildup and clogging effects to improve the understanding of sulfide generation. This present work should be further studied at the pilot scale directly downstream of a denitrification process to better characterize the infiltration effects of a more representative wastewater (lower ORP) over a longer duration (>100 days).

2.8 Acknowledgments

The authors acknowledge the financial and technical support of Premier Tech Aqua and the support from the Research funds of Quebec Nature and Technology. The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada also contributed to this research. Sincere thanks are also extended to Robert Thomas and Ginette Bélanger for their contributions to this study.

Sincere thanks are due to Myriam Chartier (M.Sc. and research agent) who helped very much with the conception of the system and the day-to-day supervision during the experiment and analysis.

2.9 References

- Abhilash, Pandey BD, Natarajan KA (2015). Microbiology for minerals, metals, materials and the environment. In Press, CRC Press, ISBN 9781482257298, 608 p.
- Alani AM, Faramarzi A, Mahmoodian M, Tee KF (2014) Prediction of sulphide build-up in filled sewer pipes. *Environmental Technology* 35:1721-1728.
- Batchelor B, Lawrence AW (1978) Autotrophic Denitrification Using Elemental Sulfur. *Water Pollution Control Federation* 50(8):1986-2001.
- Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA, Leber P (1984) A Critical Review of the Literature on Hydrogen Sulfide Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 13:25-97.
- Bertolacini RJ, Barney JE (1957). Colorimetric determination of sulfate with barium chloranilate. *Anal. Chem. American Chem. Soc.* 29, 281–283.
- Biswas T (2012) Effect of Linoleic Acid and COD/SO₄²⁻ Ratio on Anaerobic Sulphate Reduction in Semi-Continuous Reactors. Thesis report, University of Windsor, Windsor, ON, Canada, 119 p.
- Brady NC, Weil RR (2008). The nature and properties of soils. 13th Edition N.C. Brady & R.R. Weil, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. ISBN 0-13-016763-0, 960 p.
- Brand TPH, Roest K, Chen GH, Brdjanovic D, Loosdrecht MCM (2015) Occurrence and activity of sulphate reducing bacteria in aerobic activated sludge systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31:507-516.
- Buchanan JR (2014) Decentralized Wastewater Treatment, in: Ahuja, S. (Ed.), *Comprehensive Water Quality and Purification*. Elsevier, Waltham, pp. 244-267.
- Canadian Agricultural Services Coordinating and Groupe de travail sur la classification des sols (2002) Le systeme canadien de classification des sols. CNRC-NRC, Presses scientifiques du CNRC, Ottawa, ON, Canada, 202 p.
- Canadian Water Network, (2015) Assessment and Management of Environmental Risks Associated with Decentralized Rural Wastewater Management Systems, 5p, Canada.

- Cao JY, Zhang GJ, Mao ZS., Fang ZH, Yang C, Han BL (2009) Influence of Mg^{2+} on the growth and activity of sulfate reducing bacteria. *Hydrometallurgy* 95:127-134.
- Castro HF, Williams NH, Ogram A (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacterial. *FEMS Microbiology Ecology* 31:1-9.
- Chou CHSJ (2003) Hydrogen Sulfide. World Health Organization, Geneva, Swiss, 41 p.
- Cline JD (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* 14(3):454-458.
- Colleran E, Finnegan S, Lens P (1995) Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek* 67:29-46.
- Dar SA, Kleerebezem R, Stams AJM, Kuenen JG, Muyzer G (2008) Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:1045-1055.
- Doujajji B, Al-Tawfiq JA (2010) Hydrogen sulfide exposure in an adult male. *Annals of Saudi Medicine* 30: 76-80.
- Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A, Fischer J (2001) Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism? *Applied and Environmental Microbiology* 67:2873-2882.
- Glass DC (1990) A review of the health effects of hydrogen sulphide exposure. *Annals of Occupational Hygiene* 34: 323-327.
- Gouvernement du Québec (2015). *Règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées*, Government of Quebec, Québec, QC, Canada.
- Gutierrez O, Park D, Sharma KR, Yuan Z (2009) Effects of long-term pH elevation on the sulfate-reducing and methanogenic activities of anaerobic sewer biofilms. *Water Research* 43(9):2549-2557.

- Hao OJ, Chen JM, Huang L, Buglass RL (1996) Sulfate-reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26:155-187.
- Hargett DL, Tyler EJ, Siegrist RL (1981) Soil infiltration capacity as affected by septic tank effluent application strategies. In *Small Scale Waste Management Project*, University of Wisconsin--Extension, Wisconsin, USA, 13 p.
- Huan NXH, Tran Y, Nguyen NT (2013) Factors effect to the sulfide generation rate in the to Lich River, Vietnam. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences* 8:190-199.
- Jiang G, Gutierrez O, Sharma KR, Yuan Z (2010) Effects of nitrite concentration and exposure time on sulfide and methane production in sewer systems. *Water Research* 44:4241-4251.
- Lens PNL, Hulshoff Pol L (2004) *Environmental technologies to treat sulfur pollution : principles and engineering*. IWA Publishing, London, England, ISBN 1900222094 01/2000, 547 p.
- Lens, PNL, Visser A, Janssen AJH, Pol LWH, Lettinga G (1998) *Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 28:41-88.
- Lewandowski A (2013) *Organic matter management*. Soil Quality Institute, Natural Resources Conservation Service, USA.
- Liu ZH, Maszenan AM, Liu Y, Ng WJ (2014) A brief review on possible approaches towards controlling sulfate-reducing bacteria (SRB) in wastewater treatment systems. *Desalination and Water Treatment* 53:2799-2807.
- Massoud MA, Tarhini A, Nasr JA (2009) Decentralized approaches to wastewater treatment and management: Applicability in developing countries. *Journal of Environmental Management* 90:652-659.
- McKinley JW, Siegrist RL (2011) Soil Clogging Genesis in Soil Treatment Units Used for Onsite Wastewater Reclamation: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41: 2186-2209.

- MDDEFP (2014) Détermination de la demande chimique en oxygène : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium, MA. 315 – DCO 1.1, Rév. 4, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, Quebec, Qc, Canada, 12 p.
- MDDEFP (2013) Étude d'impact économique du projet de règlement modifiant le règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées, Ministère du développement durable, de l'environnement, de la faune et des parcs, Canada, 15 p.
- Mockaitis G, Friedl GF, Rodrigues JAD, Ratusznei SM, Zaiat M, Foresti E (2010) Influence of feed time and sulfate load on the organic and sulfate removal in an ASBR. *Bioresource Technology* 101:6642-6650.
- Neculita CM, Zagury GJ (2008) Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization. *Journal of Hazardous Materials* 157(2–3):358-366.
- Nielsen PH, Hvitved-Jacobsen T (1988) Effect of Sulfate and Organic Matter on the Hydrogen Sulfide Formation in Biofilms of Filled Sanitary Sewers. *Journal (Water Pollution Control Federation)* 60:627-634.
- Nielsen PHR, Raukjaer K, Hvitved-Jacobsen T (1998) Sulfide Production and Wastewater Quality in Pressure Mains. *Water Science and Technology* 37:97-104.
- Park K, Lee H, Phelan S, Liyanaarachchi S, Marleni N, Navaratna D, Jegatheesan V, Shu L (2014) Mitigation strategies of hydrogen sulphide emission in sewer networks – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 95 (Part A): 251-261.
- Partlo LA, Sainsbury RS, Roth SH (2001) Effects of Repeated Hydrogen Sulphide (H₂S) Exposure on Learning and Memory in the Adult Rat. *NeuroToxicology* 22:177-189.
- Pomeroy R, Bowlus FD (1946) Progress Report on Sulfide Control Research. *Sewage Works Journal* 18(4):597-640.

- Service des eaux municipales (2007) Traitement des eaux usées des résidences isolées guide technique. Service des eaux municipales, Direction des politiques de l'eau, Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs, Québec, Qc, Canada, 22 p.
- Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH (1992) Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32:109-134.
- Siegrist RL, McCray JE, Lowe KS (2004) Wastewater Infiltration into Soil and the Effects of Infiltrative Surface Architecture. *Journal of Small Flows* 5:29-39.
- Suriyachan C, Nitivattananon V, Amin ATMN (2012) Potential of decentralized wastewater management for urban development: Case of Bangkok. *Habitat International* 36:85-92.
- Velasco A, Ramírez M, Volke-Sepúlveda T, González-Sánchez A, Revah S (2008) Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation. *Journal of Hazardous Materials* 151:407-413.
- Zhou W, Sun Y, Wu B, Zhang Y, Huang M, Miyanaga T, Zhang Z (2011) Autotrophic denitrification for nitrate and nitrite removal using sulfur-limestone. *Journal of Environmental Sciences* 23:1761-1769.

3 CHAPITRE 3

Sulfide generation and clogging during infiltration of denitrified domestic wastewater through two artificially-created soils

Colmatage et production de sulfures durant l'infiltration des eaux usées domestiques dénitrifiées à travers le sol

Revue : *Journal of Environmental Engineering*

Soumis le 20-09-2016, Révisions soumises le 08-12-2016

Auteurs

Leila Ghorbel Étudiante au doctorat, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-4677, Fax: (418) 654-2600, Email: leila.ghorbel@ete.inrs.ca

Lucie Coudert Associée de recherche, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-3793, Fax: (418) 654-2600, Email: lucie.coudert@ete.inrs.ca

Yan Gilbert Gestionnaire de projet, PREMIER TECH, 1 avenue Premier Campus Premier Tech, Rivière-du-Loup, QC, Canada, G5R 6C1, Phone: (418) 867-8883, Fax: (418) 862-6642, email: gily@premiertech.com

Guy Mercier Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-2633, Fax: (418) 654-2600, Email: guy.mercier@ete.inrs.ca

Jean-François Blais Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-2575, Fax: (418) 654-2600, Email: blaisjf@ete.inrs.ca

Note

L'étudiante est le premier auteur de cet article. Toutes les manipulations, le traitement des données ainsi que la rédaction ont été effectués par l'étudiante sous la supervision des autres co-auteurs.

Modifications exigées par le comité de lecture

L'article a été accepté avec des modifications majeures. Les commentaires les plus importants demandaient une amélioration de la discussion ainsi que de la conclusion avec une meilleure explication de l'application des résultats obtenus à pleine échelle (influence de la présence de végétation, effet du taux d'application sur les phénomènes observés).

3.1 Résumé

Cette étude porte sur l'infiltration à l'échelle pilote des eaux usées dénitrifiées à travers le sol. La performance hydraulique ainsi que la production de sulfures d'hydrogène ont été évaluées afin de s'assurer de la longévité du système tout au long de la période nécessaire à la dénitrification autotrophe. Les expériences ont été réalisées sur une année dans deux réacteurs d'une capacité de 200 L. Les sols sablonneux et sablo-silteux ont été testés pour représenter les sols très perméable ($K_s = 0,028$ cm/s) et perméable ($K_s = 0,0013$ cm/s), respectivement. L'infiltration des eaux usées dénitrifiées à un débit hydraulique continu (130 et 70 L/m²/jour) à travers ces sols n'a pas entraîné la production de quantités importantes de sulfures gazeux (2,1 ppm) ou aqueux (0,7 mg/L). Compte tenu de la performance hydraulique, il n'y a pas eu de perte de la capacité d'infiltration pour le sol sablonneux, alors que pour le sol sablo-silteux, un phénomène de colmatage a été observé après 37 jours. Deux facteurs ont été responsables de ce phénomène de colmatage. Tout d'abord, une fine couche brune, connue sous le nom de biomate, s'est formée sur la surface d'infiltration (SI) du sol, ce qui a conduit à la formation d'ocre ferreuse au fond du réacteur. Le sol sablonneux semble être le meilleur choix, car il ne contient pas de matière organique qui pourrait conduire à la formation de biomate et donc à un phénomène de colmatage.

Mots-clés : eaux usées domestiques; dénitrification autotrophe; génération de sulfures; phénomène de colmatage.

3.2 Abstract

This study focused on a pilot scale infiltration of denitrified wastewater through artificially-created soils. The hydraulic performance and sulfide production were evaluated to ensure the system's longevity over the time period needed for autotrophic denitrification. Experiments were carried out over a year in two reactors of 200-L capacity. Sandy and sandy loam soils were tested to represent highly permeable ($K_s = 0.028$ cm/s) and permeable ($K_s = 0.0013$ cm/s) soils, respectively. The infiltration of denitrified wastewater at a continuous hydraulic rate (130 and 70 L/m²/day) through these soils did not lead to the production of large amounts of gaseous hydrogen sulfide ($[H_2S] < 2.1$ ppm) or aqueous sulfides ($[HS^- + H_2S] < 0.7$ mg/L) sulfides in both feeding affluent and effluents of the 200-L reactors. Considering the hydraulic performance, no loss in the infiltration capacity was recorded for the sandy soil, whereas a clogging phenomenon was observed after 37 days for the sandy loam soil. Two factors were responsible for this clogging phenomenon. A fine brown layer, known as a biomat, was formed on the infiltrative surface (IS) of the soil, which led to the formation of iron ochre at the bottom of the reactor. As an ascertainment due to the clogging phenomenon faced, sandy soil appeared to be the best choice as it didn't contain organic matter, which could lead to the biomat formation and therefore, to a clogging phenomenon.

Keywords: domestic wastewater; autotrophic denitrification; sulfide generation; clogging phenomenon.

3.3 Abreviation

BOD ₅	Biochemical oxygen demand after 5 days
COD	Chemical oxygen demand
DO	Dissolved oxygen
DW	Denitrified wastewater
DOC	Dissolved organic carbon
EPS	Extra polymeric substance
HLR	Hydraulic loading rate
IS	Infiltrative surface
ORP	Oxidation-reduction potential
ppm	Parts per million
SRB	Sulfate-reducing bacteria

3.4 Introduction

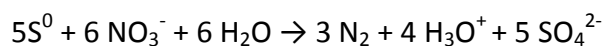
In rural areas, residential wastewater is usually managed using an on-site wastewater system, commonly called septic systems. According to Statistics Canada (2011), 13.3 M of households were not connected to a centralized system. Among them, 1 M are in the province of Quebec (MDDEFP, 2013). A septic system typically consists firstly in a physical treatment using a septic tank. The septic tank ensures the settling of heavy solids to form a sludge and the flotation of the light suspended solids and grease to form a scum layer. According to MDDELCC (2015), discharge standard requires that suspended solids in wastewater from septic tank should be lower than 100 mg/L. In addition to the septic tank, the wastewater joins a drain field which ensures the biodegradation of organic matter and the reduction of pathogenic organisms. Studies on the effectiveness of underground disposal shows that wastewater has a high acceptable quality in terms of BOD₅, suspended solid, phosphorus, nitrogen, fecal coliforms which are closed to zero. However, depending on the local regulations and environmental conditions, more compact biological processes, such as aerobic treatment units (ATUs) or biofilters, can be installed after the septic tank, replacing drain fields (Buchanan, 2014). In such cases, the treated wastewater flows to an infiltration bed (sometimes referred to as a polishing bed) into which it infiltrates. Thus, the treated wastewater undergoes an additional purification step through the soil before reaching the groundwater. This purification zone allows further filtration of particulates and biomass growth and provides low-cost reduction in the concentrations of some contaminants (Lowe and Siegrist, 2008). However, some deficiencies can remain because of the biological, chemical and/or physical interactions that occur between the intrinsic components of the soils and the remaining residual contaminants in treated wastewater (Baveye et al., 1998).

The infiltration capacity is mainly evaluated by the saturated hydraulic conductivity (Ks), which measures the ability of soil to transmit water (Lindbo *et al.*, 2014). For example, the hydraulic conductivity of highly restrictive soil such as clay is 100 to 1 000 times lower than that of highly permeable sandy soils (Baveye et al., 1998). According to Lowe and Siegrist (2008), sandy and sandy silty soils exhibit good infiltration and follow an unsaturated flow regime. Over time, with

a continuous infiltration of effluent, wastewater can reach the saturated hydraulic conductivity zone of a soil. Furthermore, after a long period of constant wastewater infiltration, a biozone or biomat might form on the infiltration surface (IS) (Lowe and Siegrist, 2008). Both of these phenomena are due to the accumulation of microbial biomass and/or organic matter in the soil (Lowe and Siegrist, 2008). These phenomena are usually welcomed, as they result in more uniform infiltration and, to a certain degree, better wastewater purification through biotransformation and/or sorption of the contaminants (Hargett et al., 1981; Lowe and Siegrist, 2008; Siegrist and Thresher, 1985). However, over time, the infiltration capacity of treated wastewater through the soil seems to be influenced by the nature of the biomat. According to White and West (2003), the formation and nature of a biomat have a more important effect on the infiltration of treated wastewater than the initial soil permeability. Acting as a barrier, the biomat influences the infiltration capacity of the treated wastewater through the soil, leading to a clogging phenomenon, which enhances hydraulic failure and oxygen depletion, leading to anaerobic conditions in the soil (Siegrist and Thresher, 1985). Many biological and chemical reactions could occur depending on the components present in both treated wastewater and soil. Therefore, it is important to ensure the harmlessness of the by-products.

Many studies investigated the performance of an autotrophic denitrification system to reduce nitrates to nitrogen gas from the water using elemental sulfur (Equation 3-1) (Ben-Khaled, 2016; Christianson et al., 2015; Kimura et al., 2002; Soares, 2002; Van Der Hoek et al., 1992).

Equation 3-1



Ben-Khaled (2016) used elemental sulfur and limestone in an on-site treatment system. In another study, elemental sulfur and oyster shells were also shown to be highly efficient in removing nitrates and nitrites (100% nitrate removal), with initial concentrations ranging from 25 to 30 mg/L from marine water systems (Simard et al., 2015). In these processes, denitrifying

bacteria use nitrate as an electron acceptor, sulfur as an electron donor and an inorganic source of carbon such as CO_2 and HCO_3^- (Zhang and Shan, 1999). The main advantage of these processes is that no external carbon is required. However, one of the main drawbacks is the release of high quantities of sulfates (100-200 mg/L), the degree to which depends on the initial concentration of nitrate ions present in water and the removal capacity of the process used.

Despite the fact that many studies pointed out the high performances of nitrate removals from wastewater using an autotrophic denitrification process, few of them were interested in the potential production of sulfides following Equations 3-2 and 3-3.

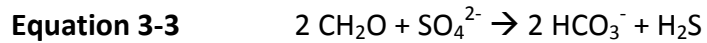
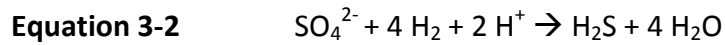


Table 3-1 summarizes some recent researches related to the potential release of sulfide products from denitrified groundwater or domestic wastewater. Among these studies, Zhang and Shan (1999) mentioned a sulfide concentration ranging from 1.5 to 10 mg/L during the treatment of an effluent from a septic tank, using sulfur and limestone. Otherwise, the other authors briefly mentioned that the production of sulfide products is very low, without quantifying them (Sierra-Alvarez et al., 2007; Xu et al., 2016). Meanwhile, no sulfide was generated during the removal of nitrates from groundwater (Kimura et al., 2002; Soares, 2002).

Table 3-1 Summary of by-products from autotrophic denitrification processes on elemental sulfur

Field	Material	Nitrate removal (%)	Sulfate (mgSO ₄ ²⁻ /L)	Sulfide (mg S ²⁻ /L)	Reference
Groundwater	Egg shell	97	350 - 450	Low	Xu et al. (2016)
Domestic wastewater	Limestone	81 - 99	100 - 280	NM [*]	Ben-Khaled (2016)
Aquaculture wastewater	None	50	136	0.069	Christianson et al. (2015)
Groundwater	Limestone	96	610	<0.048	Sierra-Alvarez et al. (2007)
Groundwater	None	100	640	ND ^{**}	Kimura et al. (2002)
Groundwater	None	80	320	ND	Soares (2002)
Septic tank effluent	Limestone	90	300 - 400	1,5 - 10	Zhang and Shan (1999)
Groundwater	Limestone	90	130 - 170	10	Van Der Hoek et al. (1992)

NM : Not mentionned ;ND : Not detected

According to the Eh-pH diagram, sulfide may be present in liquid phase under different forms (H₂S, HS⁻ or S²⁻) (Lens and Hulshoff Pol, 2004). However, only the molecular sulfide form (H₂S) can be distributed between the gas and the liquid phases. These concentrations are related to the solubility of H₂S_(aq) and the partial pressure in air following the Equation 3-4, involving the Henry's law constant (KH). For instance, the Henry's law constant is estimated at 0.131 mol/L/bar at 1 bar and 15°C (Reddy and DeLaune, 2008).

Equation 3-4

$$[H_2S]_{aq} = K_H P_{H_2Sg}$$

where $[H_2S]_{aq}$ is the concentration of H_2S in liquid phase (mol/L), K_H is the Henry's law constant (mol/L/bar) and P_{H_2Sg} is the partial pressure of H_2S in the air (bar).

During the infiltration of denitrified wastewater (DW) through the soil, the sulfate-reducing bacteria (SRB) present in soils can use the organic matter as electron donors and the sulfates as electron acceptors, resulting in the reduction of sulfate to sulfide (Zhou et al., 2011). Sulfide generation could be responsible for many bad effects such as negative impacts on human health, unpleasant odor and corrosion, which can occur during the infiltration of denitrified wastewaters through the soil. The effects of sulfide on human health vary from a simple olfactory irritation to severe lung irritation, dizziness and collapse leading to death within 4 – 8 h after exposure (above 500 ppm) (Beauchamp et al., 1984; Chou, 2003; Glass, 1990; Partlo et al., 2001; Reiffenstein et al., 1992). All these drawbacks could highly affect septic system performance and be harmful for users. The SRB activity is dependent upon factors such as the temperature, the pH of the wastewater, anaerobic conditions and the availability of a biodegradable carbon source (Barton and Hamilton, 2007). Liang (2008) emphasizes that a temperature varying between 28 and 32°C is optimum for most SRB. Moreover, the SRB species usually exist in a range of pH varying between 5.5 and 9.0 (Liang, 2008; Nielsen et al., 1998). Thus, the SRB are able to produce sulfide under the usual pH and temperature conditions encountered in soils. Anaerobic environments are highly dependent on the Oxidation Redox Potential (ORP) of the media, which should be lower than -100 mV to support SRB activity (Abhilash et al., 2015; Huan et al., 2013). Some SRB species can use H_2 as an electron donor or, more commonly, simple or complex organic matter such as propionate, butyrate, lactate, ethanol, pyruvate, malate, fumarate and glycerol (Liu et al., 2015).

Over the last years, many researchers have developed autotrophic denitrification processes to meet the regulations, which are more stringent in terms of contaminant releases from wastewater to the environment and especially nitrates. Despite the fact that these processes allowed the decrease of the concentration of nitrate below $5 \text{ mg NO}_3^- \text{-N/L}$, avoiding eutrophication and cyanobacteria developments, they require a better understanding of the behavior of by-products generated such as sulfate to ensure the safety of these processes. In this context, this research project aims to ensure that there is no generation of by-products during the denitrification of domestic wastewater using elemental sulfur and limestone, which can represent a potential risk for the environment. More specifically, it was necessary to ensure that there is no reduction of sulfates into aqueous and/or gaseous sulfides during the infiltration of the denitrified wastewater through soils having different permeabilities at a pilot scale.

3.5 Materials and methods

3.5.1 Experimental set-up

Pilot-scale experiments were conducted at an experimental wastewater treatment station located in Rivière-du-Loup (Quebec, QC, Canada). Figure 3-1 presents a schematic diagram of the septic system used at the experimental treatment station. During the sampling period, the average temperature in the city varied between -29.8 and $+22.7^\circ\text{C}$ (Gouvernement du Canada, 2014-2015). However, for decentralized residential sites, the temperature of the raw wastewater exiting a house rarely drops below 10°C .

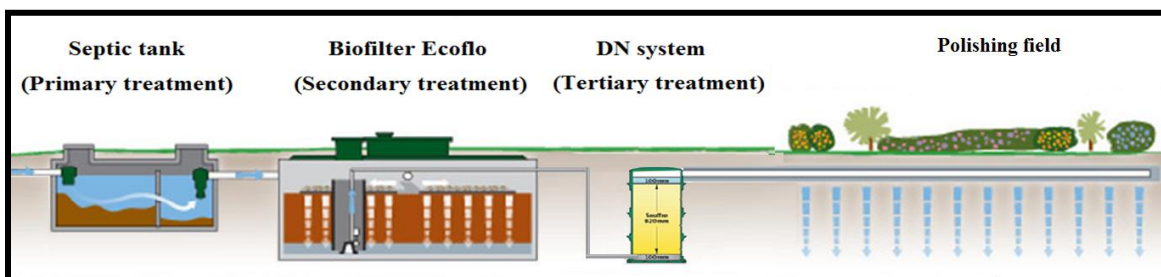


Figure 3-1 Schematic representation of the septic system used (modified from PTA, 2015)

As shown in Figure 3-2 (a, b), two 200-L-capacity reactors (internal diameter of 58 cm and height of 95 cm) made of high-density polyethylene (HDPE) were installed at the experimental wastewater station. These experiments were carried out over a year using two different soil samples [sandy (100% sand) and sandy loam (85% sand-15% loam)]. The sand used for these experiments was obtained from Biomix (Quebec, QC, Canada), while the loam fraction used in the soil mixture was collected along the St. Charles River (Quebec, QC, Canada) and passed through a 53- μm sieve. The loam fraction was then mixed with a beach sand fraction (15%-85%) to obtain the targeted properties of a permeable soil. The gravel, devoid of its fine particles, represents the distribution system over the infiltration area and was of a size greater than or equal to 1.5 cm. Approximately 180 kg of sand was used to fill the first reactor (60 cm in height), while a mixture of 105.5 kg of sand and 18.6 kg of loam was used to fill the second reactor (30 cm in height). Actually, our septic field design was based on the regulation established by the Province of Quebec (MDDELCC, 2015). According to this regulation, soil height depends on its permeability (highly permeable and permeable soils require 60 and 30 cm of natural soil, respectively). Moreover, this regulation indicates that the septic field should be composed of back fill (60 cm), gravel (30 cm) and natural soil (30 or 60 cm), which represents at least 120 cm depth (3.93 ft depth). Bulk densities were measured according to the real diameter of 50 cm instead of 58 cm (presence of tarpaulin and plastic layers). Thus, sand reactor density was estimated at 1.52 g/cm^3 (calculated by using the diameter of 50 cm and the height of 60 cm for the volume and 180 000 g for the mass), while, the bulk density of the sandy loam reactor was estimated at 2.1 g/cm^3 (calculated by using the diameter of 50 cm and the height of 30 cm for the volume and 124 100 g for the mass).

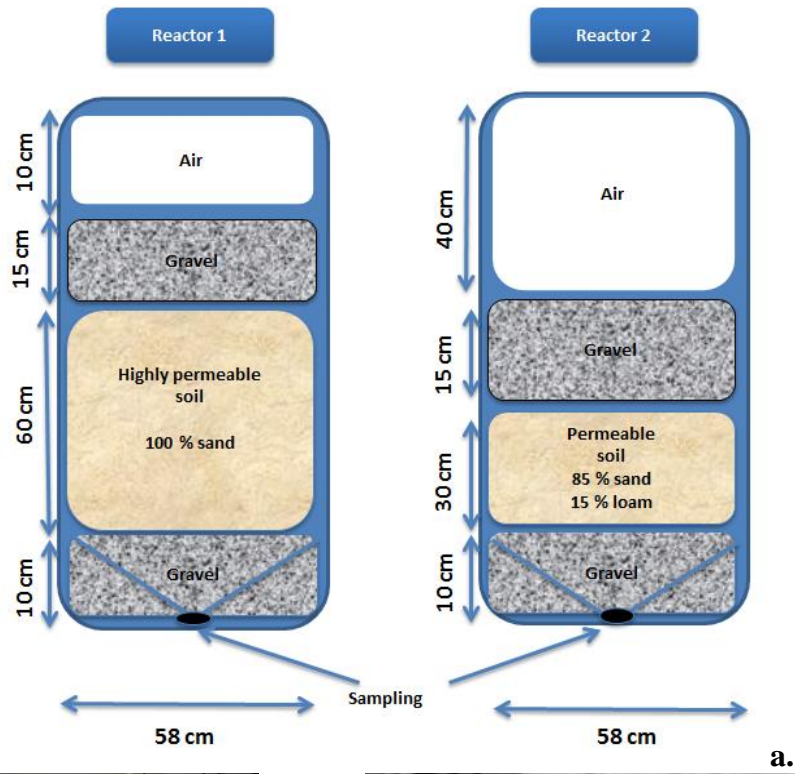


Figure 3-2 Experimental design used for pilot scale experiments : a. Schematic representation of the composition of the different reactors, b. Photography of the reactors and c. Photography of the denitrified wastewater distribution system

3.5.2 Denitrified domestic wastewater

The pilot-scale reactors were fed in semi-continuous mode with DW emerging from a decentralized wastewater treatment plant, producing approximately 1 500 L/d (representative of a residence with three bedrooms) (MDDELCC, 2015). Table 3-2 summarizes the main characteristics of this DW (the influent of our study) which was completely characterized at the beginning of the experiments. Then, the reactors were daily supplied with fresh denitrified wastewater, which was twice a week collected and characterized with reactors effluents during the 365 days of experiments. The entire process chain consisted of a septic tank, an organic-based biofilter and a sulfur- and limestone-based autotrophic denitrification reactor (Figure 3-1). This latter allows to reach nitrate concentration, during the sampling period, under $5 \text{ NO}_3^- \text{N-mg/L}$.

To simulate a conventional infiltration of the treated wastewater through the soil, two multichannel peristaltic pumps were used to deliver the wastewater continuously into the reactors during the feeding period via a system that allowed for homogeneous distribution over the entire surface of the reactor, thus avoiding the surface effect (Figure 3-2c.). The feeding period (supply sequences) lasted 3 h each day (from 8 a.m. to 9 a.m., from 10 a.m. to 11 a.m. and from 12 p.m. to 1 p.m.). In the present study, the wastewater loading rates were based on an isolated three-bedroom household (MDDELCC, 2015). Based on the regulation established by the Province of Quebec concerning the infiltration of domestic wastewater (MDDELCC, 2015), the infiltration of denitrified wastewater through different soils using typical hydraulic loading rates (HLR) ($65 \text{ L/m}^2/\text{d}$ for the highly permeable soil and at $35 \text{ L/m}^2/\text{d}$ for the permeable soil) has already been studied at laboratory scale (Ghorbel et al., 2016). The results obtained at laboratory scale showed that no important sulfide generation occurs after 104 days of experiments. Thus, we decided to double the HLR to get results in a reasonable experimental timeframe but also to afford favorable conditions for sulfide generation (higher sulfate and organic matter concentrations) (Lowe and Siegrist, 2008). Therefore, the daily HLRs were set at 130 and $70 \text{ L/m}^2/\text{d}$ for the highly permeable and permeable soils, respectively. Twice a week,

samples of approximately 240 mL were collected from the bottom of the reactors. Various parameters were measured on-site at the inlet and outlet of the reactors.

Table 3-2 Denitrified wastewater characterization at the beginning of the experiments (n = 1)

Parameters	pH	ORP (mV)	T (°C)	DO (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	COD (mg/L)	H ₂ S _(g) (ppm)	H ₂ S _(aq) (mg S ²⁻ /L)	DOC (mg/L)	BOD ₅ (mg/L)	NO ₃ ⁻
Values	6.7 ± 0.2	- 40 ± 5	11.4	5.6 ± 1.0	138 ± 43	63 ± 15	0.2 ± 0.1	0.18 ± 0.001	9.8 ± 1.8	4 ± 1	5 ± 2
Typical wastewater values (Zhang and Shan, 1999)	6,4 - 7,6				300 - 400	< 30		1.5 - 10			
Parameters	Na (mg/L)	Ca (mg/L)	S (mg/L)	K (mg/L)	Mg (mg/L)	Si (mg/L)	P (mg/L)	Fe (mg/L)	Al (mg/L)		
Values	144	50.4	50.6	16.9	7.56	3.77	2.83	0.13	0.10		

3.5.3 Determination of soil sample permeability

The hydraulic conductivities of both sandy and sandy loam soils were determined using a constant load test according to Darcy's Law based on Longpré-Girard et al. (2016) and Martel and Gélinas (1996). For this purpose, a 2.54-cm-diameter and 45-cm high column was used. The soil was gradually introduced into the column and compacted to obtain a relative soil density of 1.8 g/cm³. Two types of saturation were then applied to the system. First, carbon dioxide (CO₂) was circulated at low pressure (3 - 5 psi) for 30 min, and then, upward flowing water saturation was applied using a Mariotte vessel (Musy and Soutter, 1991). The first CO₂ saturation was applied to remove the oxygen, while the second water saturation was conducted to provide a constant pressure head on the tested material. According to Darcy's Law, the permeability (Ks) was determined by measuring the outlet flow from the column as follows: (Equation 3-5)

Equation 3-5 $K = \frac{Q L}{S \Delta h}$

where Ks is the permeability coefficient (cm/s), S is the cross-sectional area of the column (cm²), L is the column length (cm), Δh is the loading difference between the input and output (cm) and Q is the outlet flow rate (cm³/s).

3.5.4 Analytical methods

A laser particle sizer (Partica Laser Scattering LA-950V2, Laser Particle Size Analyzer, Tokyo, Japan) was used to determine the particle size distribution of the different soil samples.

The concentration of gaseous hydrogen sulfide was measured at the outlet of the autotrophic denitrification system, at the inlet and above each reactor using a H₂S detector (ToxiRAE Pro, San Jose, CA, USA). As the reactors were buried, the H₂S detector was carefully introduced above the soil in air compartment to perform the measure.

The concentration of the organic carbon present in the soils was determined using a CHNS Leco Analyzer (TruSpec Micro, Michigan, MI, USA). During each series of measurement, two certified control powders have been used (Sulfamethazine from USA and OAS from UK) to check the accuracy of the results. The concentration of the dissolved organic carbon present was determined using a TOC-analyzer (TOC-VCPH model, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). A certified control solution (100 µg/mL) from SCP Science (Canada) was used to control of the accuracy of the results. Using a H₂S detector (ToxiRAE Pro, San Jose, CA, USA), the gaseous hydrogen sulfide was measured at the outlet of the autotrophic denitrification system, at the inlet and above each reactor. As reactors were buried, H₂S detector was introduced carefully above the soil in air compartment to perform the measure.

The pH, ORP and DO were measured using a Thermo Scientific Orion STAR A322 conductivity portable meter. Before each series of pH measurements, a Ag/AgCl reference cell was calibrated using certified solution (pH = 2.00, 4.00, and 7.00). The ORP cell was verified before each series of measurements using a certified solution (ORP = 470 mV).

All colorimetric methods used for the determination of sulfate, sulfide and COD contents were performed using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary® 50, Varian Inc., Mississauga, ON, Canada). The sulfate analyses were performed using a modified version of the method described by Bertolacini et al. (1957). A certified control solution (Multi-element Ion Chromatography standard sol II in H₂O, Fluka, Sigma Aldrich, Canada) and an ammonium sulfate solution (10 000 µg S/mL, Plasma Cal SCP Science, Canada) were used to validate the accuracy of the measurements.

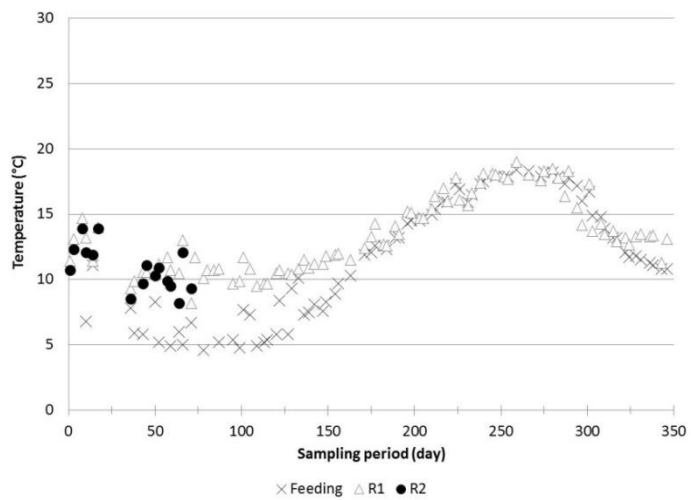
The dissolved sulfide analyses were also performed using a modified colorimetric method according to Cline (1969). The chemical oxygen demand (COD) was determined according to the method MA. 315 - COD 1.1 developed by the CEAEQ (MDDEFP, 2014). The calibration curve was prepared from a potassium biphthalate stock solution (10 000 mg O₂/L). Additionally, a certified control solution (500 mg/L solution, calibration standard, RTC) was used to ensure the quality of the results for each series of measurements.

3.6 Results and discussion

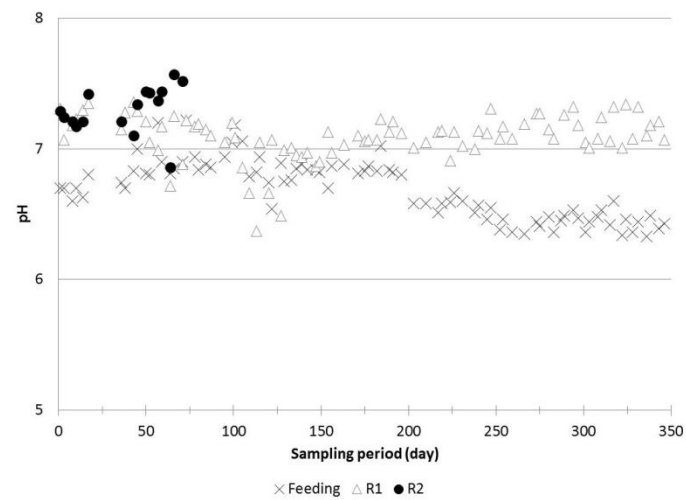
3.6.1 Pilot-scale experiments

In the following study, the pilot-scale experiments were carried out on two different soil samples (highly permeable and permeable). According to the particle size distribution (Ghorbel *et al.*, 2016), the mean particle size was estimated to be 378 and 269 μm , whereas the D_{10} values were approximately 163 and 30 μm for the highly permeable and permeable soils, respectively, indicating that the latter contained higher amounts of small particles than the highly permeable soil. Their hydraulic conductivities (K_s) were estimated at 0.028 cm/s for the highly permeable soil (100% sand) and 0.0013 cm/s for the permeable soil (85% sand-15% silt) (Gouvernement du Québec, 2015). The experiments were conducted on the highly permeable soil (reactor R1) over a single year, but the assays carried out on the permeable soil (reactor R2) were stopped after 10 weeks of operation due to a clogging phenomenon. The factors that affected this clogging are discussed in section 3.3.2.

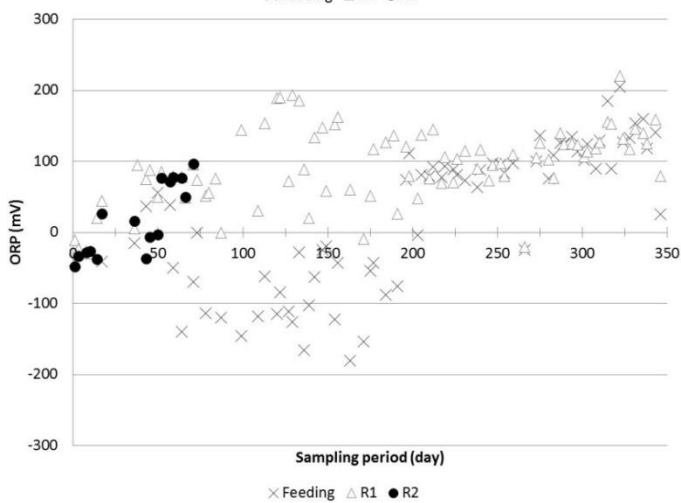
The evolution of the various parameters studied for both reactors (R1 and R2) are presented in Figures 3-3 and 3-4. Table 3-2 shows the main characteristics of the feed solution (sampled from a 20-L-capacity storage tank of DW produced by the denitrification system) collected at the beginning of the experiments. According to these results, the ORP value was approximately -40 mV, and the DO was estimated at 5.59 mg/L. These values were different from the ORP (-300 mV) and DO (< 2 mg/L) of the DW measured directly in the denitrification system, which were very low (Ben-Khaled, 2016). The storage tank was closed tightly and directly connected by pipes to the denitrified reactor. The DW from the tank then passed through the top of our reactors, simulating the infiltration of DW through the soil.



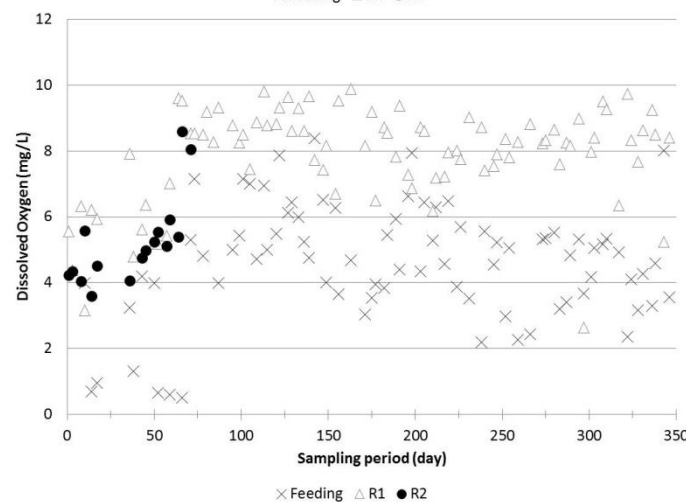
a.



b.

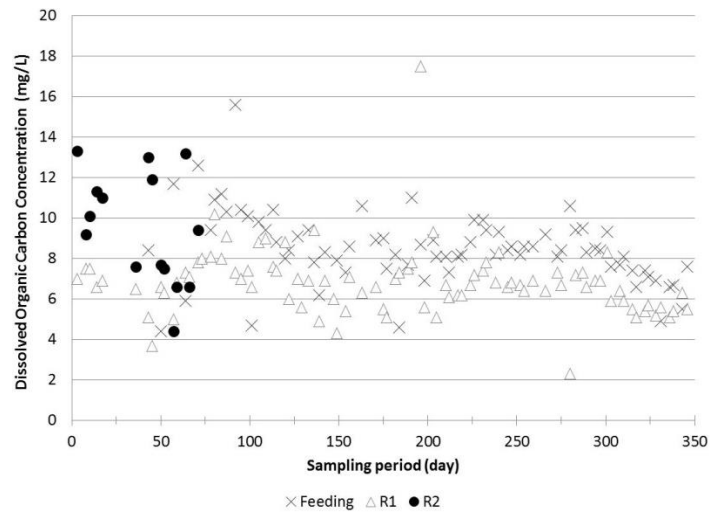


c.

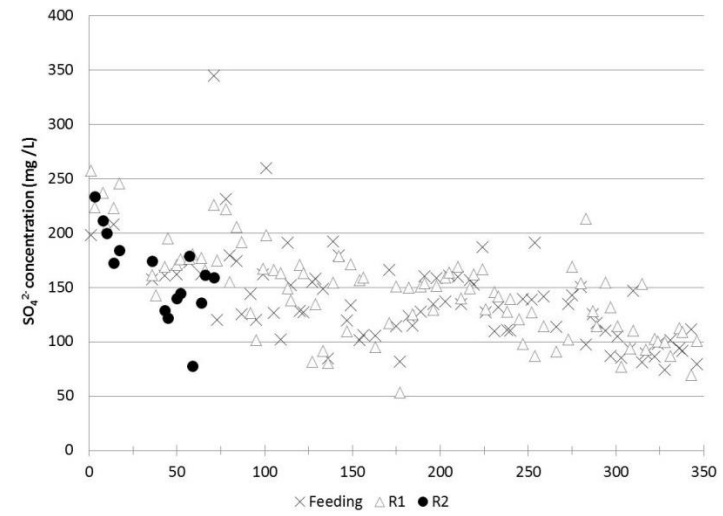


d.

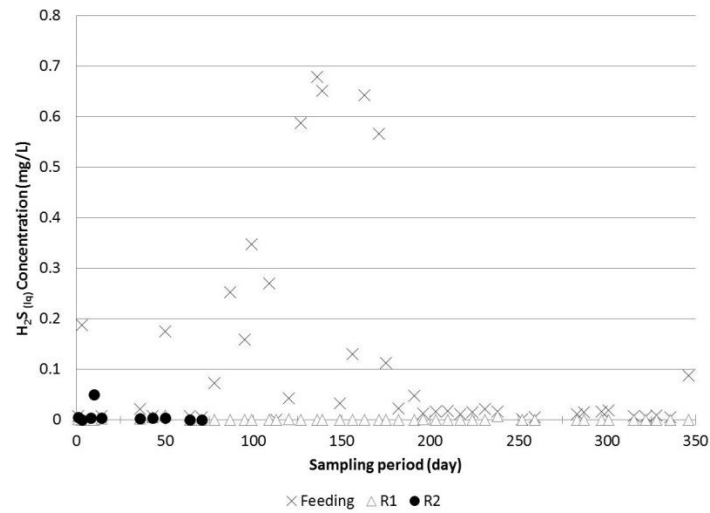
Figure 3-3 Evolution of the temperature (a.), pH (b.), ORP (c.) and Dissolved Oxygen (d.) during the infiltration of denitrified wastewater (feeding solution) through highly permeable soil (R1) and permeable soil (R2)



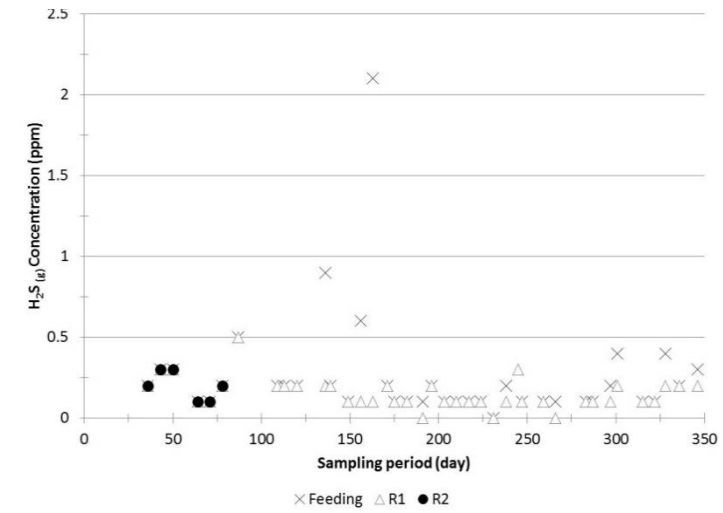
a.



b.



c.



d.

Figure 3-4 Evolution of the concentrations of DOC (a.), SO_4^{2-} (b.), $\text{H}_2\text{S}_{(lq)}$ (c.) and $\text{H}_2\text{S}_{(g)}$ (d.) during denitrified wastewater (feeding solution) infiltration through highly permeable soil (R1) and permeable soil (R2)

Despite that no open-channel flow was used from the pump to the reactor and that only closed-conduit flows were used, we have noticed that dissolved oxygen values increased between the denitrified wastewater and those directly measured in the denitrification reactor. Thus, the pipes ensure the aeration/oxygenation of the DW, which is very beneficial to avoid sulfide generation. This can also be achieved by installing a drain field, as it is separated from the wastewater distribution box by pipes (Service des eaux municipales, 2007). Sulfide generation is highly dependent on the environmental conditions of the medium such as temperature, pH and ORP. The evolution of temperature, pH, ORP and DO of the feed solution (DW) and of the effluents from R1 and R2 during sampling are presented in Figure 3-3.

According to our results presented in Figure 3-3a, the temperature of the feed solution (DW) and of the effluents from the reactors R1 and R2 did not reach below 4.6°C during the winter (day 1 to 163), while the outside temperature reached -20°C (Figure 3-3a). The system was underground and insulated by the soil, which prevented its freezing. During the summer (day 164 to 346), the highest temperature recorded for the effluents from R1 and R2 was 19°C. According to Huan et al. (2013), low temperatures (lower than 7°C) could highly affect and delay the generation of gaseous and aqueous sulfides. However, an increase in the temperature from 15 to 38°C lead to a 7% increase in the sulfide production, reaching its maximum at 30°C (Huan et al., 2013). Indeed, in the present study, while the temperature gradually increased during summer, a generation of aqueous and gaseous sulfides was recorded for the feed solution with levels reaching 0.7 mg/L and 2.1 ppm, respectively.

Another important parameter has also been emphasized by many authors, who indicated that a wide range of pH (4.5 and 9.2) seemed to be suitable for the generation of sulfide (Benedetto et al., 2005; Cervantes et al., 2006; Gutierrez et al., 2009; Holland and Turekian, 2010; Liu et al., 2015). According to Figure 3-3b, the pH of the feed solution (DW) and of the effluent emerging from the highly permeable (R1) and permeable (R2) soils were quite stable over the period of 365 days, with average values estimated at 6.68 for the feed solution (DW), 7.00 for the effluent of R1 and 7.30 for the effluent of R2.

As shown in Figure 3-3, there was an obvious correlation between the pH and the temperature in the feeding solution. Actually, the higher temperatures of the summer caused an increase in molecular vibration, which consequently led to a decrease of hydrogen bonds being formed, leading to an increase of H^+ and a decrease in pH (Down and Lehr, 2005). An increase of the performances of the denitrification process with the increase of temperature (conditions favorable for the activity of SRB) might be responsible of the decrease of pH (increase of H^+ ions released in water due to the reduction of nitrates). However, the increase of pH values for the effluents emerging from the reactors occurred due to the basic initial soil pH (8.40 and 9.95 for the highly permeable and permeable soils, respectively). In addition, a slight increase of the pH values can be due to the release of CO_2 into the environment during microbial activity as explained by Deepa et al. (2012) and Yuan et al. (2013). The latter has previously been mentioned by Deepa et al. (2012) for treated municipal wastewater (pH varying between 7.4 and 8.0) after they passed through columns containing soil with an initial pH of 6.8. Moreover, such results have also been mentioned by Yuan et al. (2013) in a similar study with an increase of pH values from the top (7.0-7.5) to the bottom of the soil column (8.5-9.0). However, pH values were still in the optimum range mentioned by Yeh (2000) for the production of sulfide due to the reduction of sulfates by SRB.

The values of the ORP measured for the feed solution (DW) varied over the sampling period. The ORP values measured downstream and into the denitrification reactor were estimated at -40 mV and -180 mV, respectively (Figure 3-3c). Indeed, a large variation in the ORP values was observed at the beginning, with a significant decrease from the 64th to the 191st day, and then an average value of -94 ± 45 mV ($n = 25$) was attained. After this period, the ORP values of the feed solution (DW) increased, becoming positive with an average value of $+101 \pm 42$ mV ($n = 40$). Moreover, it appeared that ORP is highly dependent on the pH value and on the temperature (James et al., 2004). We can hypothesize that the decrease in pH (due to the increase in the temperature), starting from the 200th day, had a large impact on the ORP values, causing them to increase. Actually, ORP and temperature are correlated as they depend both on bacterial activity.

Despite the fluctuation observed at the beginning of the experiments, the ORP values of both R1 and R2 effluents increased throughout the sampling period, with average values of $+103 \pm 45$ ($n = 77$) and $+75 \pm 15$ ($n = 6$) mV, respectively. Such ORP values indicate an environment that is insufficiently reducing to generate sulfide formation (Annable *et al.*, 2008). Indeed, many authors have noted that ORP values of at least -100 mV are required for the SRB activity (Abhilash *et al.*, 2015; Huan *et al.*, 2013). The same observation can be made for the evolution of the DO of the feed solution (DW) over the sampling period. Indeed, the results revealed an important fluctuation of the DO at the beginning of the experiments, followed by an increase after the 66th day. The average DO concentration was estimated at 4.9 ± 1.4 mg/L ($n = 71$) over the one-year sampling period. The concentration of the DO measured in both the R1 and R2 effluents were always higher at 7.8 ± 1.5 and 5.2 ± 1.4 mg/L, respectively, than that of the feed solution (4.9 mg/L), indicating that the system aerated the water. According to several studies, these conditions of high ORP values and DO concentrations prevent the production of sulfide, as the SRB need very low ORP values and anaerobic conditions to grow (Annable *et al.*, 2008). In contrast to clay soils, sandy and sandy loam soils, mainly composed of large and coarse grains, are well known for their good water percolation and gas exchange abilities. These qualities reduce the development of anaerobic zones and, consequently, the reduction of sulfates to sulfides by the SRB (Anderson and Halsey, 1980).

Figure 3-4 presents the evolution of the concentration of DOC, sulfate and aqueous ($\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})}$) and gaseous sulfide ($\text{H}_2\text{S}_{(\text{g})}$). Despite the high hydraulic conductivity of sandy soils, and the short residence time of the DW (Sandhu, 2013), a slight purification was observed during the infiltration of the DW (DOC = 8.5 ± 1.8 mg/L; $n = 77$) through the highly permeable soil (R1), leading to further degradation of the remaining organic matter (DOC = 6.8 ± 1.7 mg/L; $n = 90$) (Figure 3-4a). Regarding the sandy loam soil, the average value of the DOC (9.5 ± 3.2 mg/L; $n = 15$) was higher than the values measured for the feed solution (DOC = 8.5 ± 1.8 mg/L; $n = 77$). This difference could be explained by the quantity of the organic carbon initially present in this soil (0.33%) in comparison to the sandy soil (< 0.05%) and by the release of organic matter from the silt present in a higher proportion in the sandy loam soil. Moreover,

the concentrations of the sulfates measured in the R1 and R2 effluents, 146 mg/L and 161 ± 39 mg/L ($n = 15$), respectively, were similar to that of the feed solution (137 ± 43 mg/L; $n = 81$), indicating that the SRB did not reduce sulfates to sulfide in both types of soils (Figure 3-4b).

Denitrified wastewater was measured at the output of the denitrification process before reaching the storage tank from which we supplied the reactors. Over the one-year sampling period, the highest level of $\text{H}_2\text{S}(\text{g})$ recorded was around 14 ppm for the output directly of the denitrification reactor and at 2.1 ppm for the feeding solution (DW pumped from the storage tank) (Figure 3-4d). This sulfide concentration (14 ppm) represents an offensive and foul odor (Chou, 2003). According to the Canadian Centre for Occupational Health and Safety (2005), a concentration of 100 ppm causes severe symptoms such as respiratory tract, eye irritation and loss of smell. The concentration of gaseous hydrogen sulfide in reactors R1 and R2 did not exceed 0.5 ppm, indicating that no hydrogen sulfide was produced during the infiltration of DW through both the highly permeable and permeable soils. This observation was confirmed by the evolution of the sulfate concentrations over the sampling period, which remained similar to the initial concentration of the feed solution.

Although the $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ ratio occasionally reached 2.3 (on the 308th day), which is higher than the minimal ratio of 0.67 indicated in other studies for the production of H_2S (Biswas, 2012; Dar et al., 2008; Velasco et al., 2008), no sulfide generation occurred. Theoretically, there was enough organic matter in the DW (up to a ratio of 2.3) to promote the activity of the SRB and therefore generate sulfide. However, the two soils used during these experiments (highly permeable and permeable) enabled increases both of the DO (7.9 and 5.3 mg/L) and the ORP values (+103 and +75 mV), which are critical parameters for the activity of the SRB and therefore the production of sulfide.

There are some differences between natural soils and the artificially-created soils used in the present study that can affect the observation made related to the generation of sulfide during the infiltration of denitrified wastewater through the soils. Natural soils have a high spatial

heterogeneity with respect to their physical, chemical and biological properties. Natural soils are made of solid matter, water and air. The solid matter could be composed of organic or mineral material. The bulk density ranges from values lower than 0.5 g/cm^3 in organic soils to 1.8 g/cm^3 in mineral soils (Reddy and DeLaune, 2008). Depending on the season, these soils could be under drained or flooded conditions, which highly affect air-filled pore space of soil and thereby the soil aeration by oxygen diffusion. This latter governs most of the biogeochemical reactions. Thus, from a biological point of view, facultative and obligate anaerobes bacteria predominate when the oxygen is depleted, generally in poorly drained soils with fine-textured soils. The oxidized compounds are reduced through chemical and biological processes, whereas aerobic bacteria predominate in well-drained, coarser-textured soils and oxidize the reduced forms present in soils. Moreover, compared to the artificial soil columns (mineral soil), oxygen governs most of the biogeochemical reactions. It is important to mention that the oxygen in soil is needed for microbial respiration but also to plant root respiration through diffusion and mass flow. Moreover, the application of animal waste, compost, sewage sludge or fertilizer can also result in oxygen depletion in the soil (Reddy and DeLaune, 2008).

3.6.2 Clogging phenomenon

The accumulation of treated wastewater at the surface of the reactor (persistent ponding) was first detected in the sandy loam soil after 37 days of continuous flow rate infiltration. Once the overflow occurred, wastewater feeding was stopped, and the water level was monitored at a reference point. Figure 3-5 shows the ponding depth (level of the liquid accumulated on the surface) for a period of 35 days. According to the results, over time, the clogging of the system led to a decrease in the infiltration rate. The numerous reasons responsible for this clogging phenomenon will be explored below. During the first 15 days after ponding, the system was fed with 17.2 L of DW per day and then stopped; the infiltration rate of the wastewater was followed. According to the results, the infiltration velocity of the DW into the soil was estimated to be approximately 1.6 cm/day from day 0 to day 15. Thereafter, the pump was switched on, and the permeable soil reactor was fed with the DW for another 7 days. However, the ponding

phenomenon persisted, and the infiltration velocity decreased, leading to an average value of 0.5 cm/day that tended to reach a steady state. As mentioned by Lowe and Siegrist (2008), this state is called the “end state”. This state occurred in the reactor R2 (sandy loam soil) after 9 weeks of infiltration, while the 1st reactor R1 (sandy soil) never reached the end state. When the reactor R2 reached this end state, the feeding of this reactor was completely stopped, and the soil profile was analyzed to understand why the clogging phenomenon occurred.

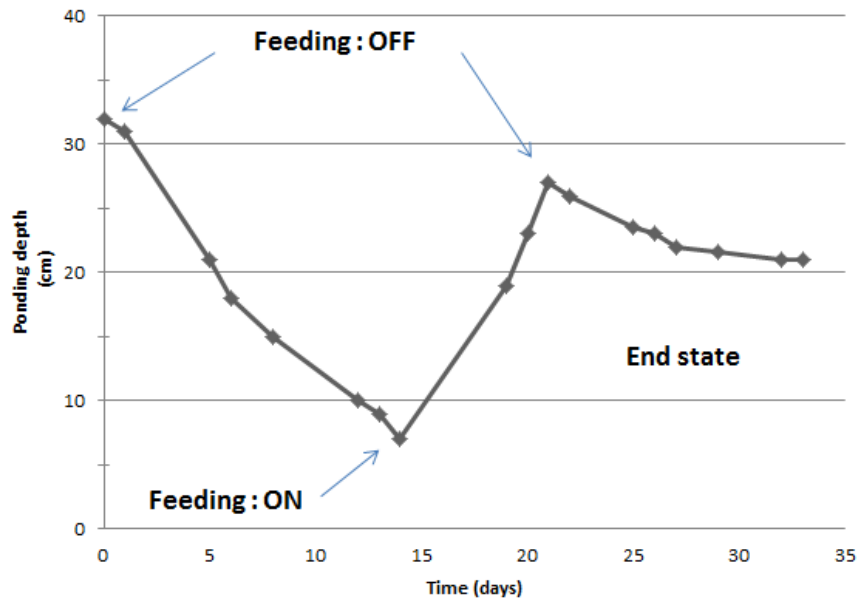


Figure 3-5 Infiltration rate of treated wastewater through the sandy loam soil (R2) during the clogging period

For the same soils, no rapid and severe clogging had occurred during previous laboratory-scale experiments carried out by Ghorbel et al. (2016). These differences between laboratory and pilot scales might be due to the higher loading rate that can lead to a decrease in the infiltrative capacity and a loss of permeability, as discussed by Hargett et al. (1981). Several hypotheses were explored to explain the clogging phenomenon, which occurred in the second reactor with the permeable soil at pilot scale. The reactor was fully dismantled and soil cores were sampled

as a function of depth in several separate sections of about 1 cm each. Thus, tests were conducted on thin soil sections collected at 17 different depths. The particle size distribution, moisture and organic carbon contents of these thin sections were measured to identify the chemical or physical changes. The results are presented in Figure 3-6.

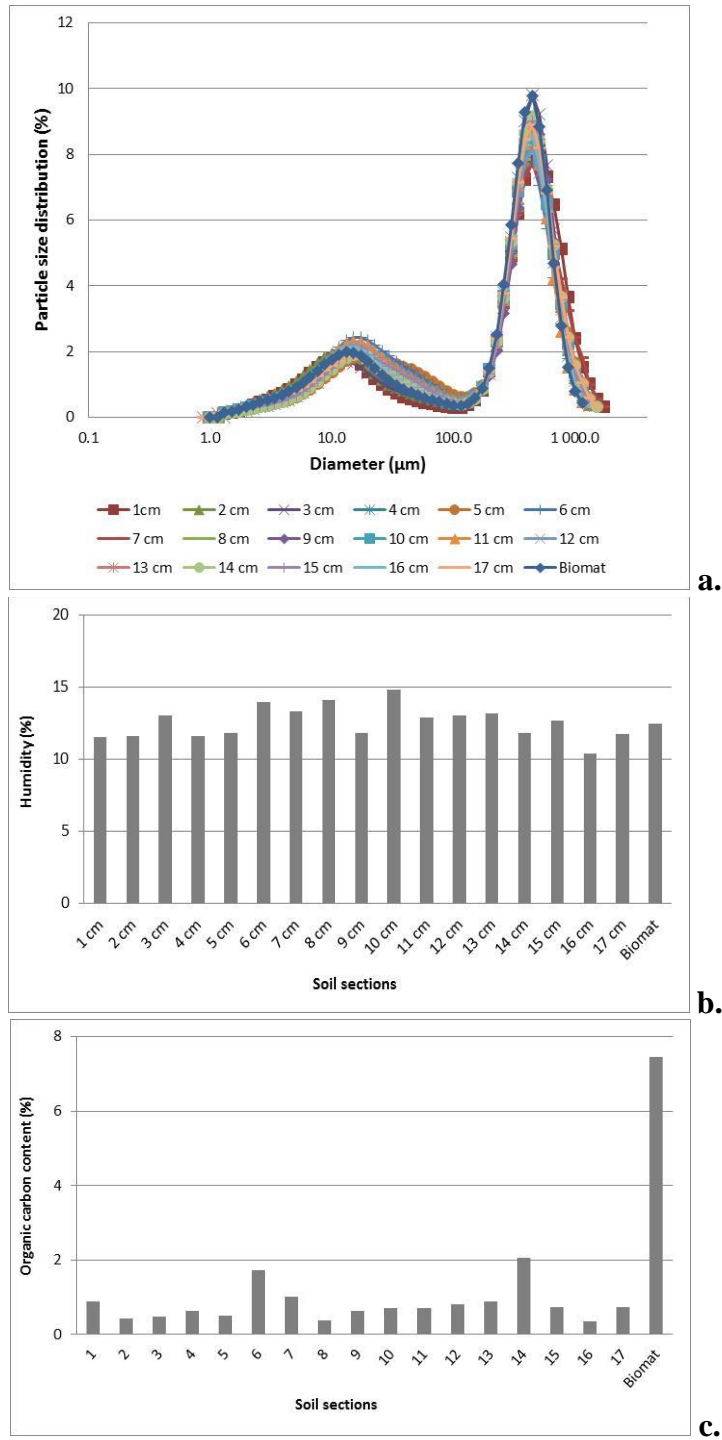


Figure 3-6 Investigation of soil sections to explain the clogging phenomenon : Particle size distribution (a.), Humidity content (b.) and Organic carbon content (c.)

First, the potential migration of the fine particles through the sandy particles (thereby limiting the infiltration of the DW) was explored. Figure 3-6a shows the particle size distribution of the 17 different soil sections of the second reactor as a function of the particle diameter. Regardless of the depth of the sections, the results showed a good superposition of the particle size distribution curves, indicating that no fine particles had migrated to the gravel at the bottom of the reactor. Therefore, it was concluded that the observed clogging phenomenon was not due to the migration of fine particles creating an impermeable layer.

Figure 3-6b presents the moisture content measured for the 17 different thin soil sections collected. Regardless of the depth of the sections, an average humidity content of $12.5 \pm 1.1\%$ ($n = 17$) was measured for almost all soil samples. Unfortunately, these results did not allow for the detection of variations in humidity contents in the soil profile.

Next, further investigations were carried out to explain the clogging effect. Lowe and Siegrist (2008) assumed that clogging is a highly time-dependent process during which wastewater pollutants such as humic matter fills the pore of the soil. Other authors found that biological activities, especially under aerobic conditions, lead to the formation of by-products such as an extra polymeric substance (EPS), which cause the clogging phenomenon (McKinley and Siegrist, 2011; Winstanley and Fowler, 2013). Additionally, many studies have shown that the presence of organic carbon in the infiltration surface causes substantial soil clogging (Siegrist and Thresher, 1985; Winstanley and Fowler, 2013). Figure 3-7a shows a thin brown layer of approximately 5 mm, which formed on the infiltration surface of the reactor R2. This thin layer had a different color than the rest of the soil profile, which was similar to the color of the initial soil. This layer, also referred to as a biomat, is generally due to the deposition of organic matter. It usually influences the infiltration capacity of a soil regardless of its initial permeability (White and West, 2003). The organic carbon analysis, performed on the different soil samples collected, showed that the quantities of organic carbon were similar across all of the 17 soil samples (less than 2.0%). However, the biomat layer showed a high enrichment of organic matter with a quantity of organic carbon reaching 7.5% (Figure 3-6c). Therefore, the biomat highly influenced the infiltration of treated wastewater through the soil by clogging the surface.



Figure 3-7 Formation of biomat layer (a.) and iron ochre (b.), responsible of clogging phenomenon

During the complete dismantling of the second reactor (permeable soil), a red and gelatinous layer was found at the bottom, which prevented the complete removal of the DW from the reactor (Figure 3-7b). A complete analysis of this sludge showed that its ferric content of 112 g/kg was 14 times higher than the 7.7 g/kg of the initial soil sample. As described by Ford (1985), iron sludge can play an important role in the clogging phenomenon. Moreover, Smart and Herbertson (1992) correctly described this red-brown gelatinous material as iron ochre. Ferrous iron compounds were oxidized deep in the soil to insoluble ferric oxide (Fe_2O_3),

blocking pipes and causing the clogging phenomenon (Smart and Herbertson, 1992). According to Lindbo et al. (2014), the biological oxidation of iron requires free oxygen, a source of organic matter and iron and a temperature above 5°C. Other key factors for soil saturation and iron redox reactions include retention time and soil depth (Lindbo et al., 2014). The presence of stagnant water favors anaerobic conditions. Thus, the ferrous iron present in soil migrates to the ponding-water using the iron-reducing bacteria (Ford, 1985), followed by their oxidation in the interface between the anaerobic and aerobic zones, forming a layer. This process also depends on the chemical species present in the submerged soil and on the second law of thermodynamics (change in Gibbs free energy or ΔG°). Following a precise order of preference, bacteria first use oxygen (O_2) to oxidize the organic matter, followed by nitrates (NO_3^-), oxide of manganese (MnO_2), oxide of iron (Fe_2O_3), sulfate (SO_4^{2-}) and, finally, CO_2 for methane fermentation (Reddy and DeLaune, 2008). Because iron ions precede sulfates, the presence of ferrous ions limits the formation of sulfide ions (Baveye et al., 1998).

Therefore, unlike for the small scale (Ghorbel et al., 2016), where much lower sulfide occurred (<0.15 ppm and <0.2 mg/L for gaseous and aqueous sulfide, respectively), a slight emission of H_2S was observed in the feed solution, while temperature increased. This emission of H_2S seemed proportionally related to changes in temperature and pH. Although the increase of both temperature and pH is slight and restricted to the feed solution, this was responsible of the increase of the solubility of organic compounds which were more available for the microorganisms, leading to an increase of the speed of both biological reactions and conversion.

Moreover, the study of the infiltration in sandy soil proved that no clogging and sulfide generation occurred whereas, we highlighted that, for the permeable soil, a biomat layer appeared on the infiltrative surface followed by the formation of iron ochre at the bottom of the reactor both causing the clogging phenomenon. Additionally, the biomat itself indirectly led to the formation of the iron ochre. Actually, the appearance of the biomat layer first led to flood the soil which became depleted in oxygen. This state allowed the ferric ions present in the soil to migrate in water by means of iron-reducing bacteria (Ford, 1985) followed by the

oxidation of the latter in contact with air (bottom of reactor). This resulted in the formation of iron ochre at the bottom of the reactor R2. Thus, these two phenomena are responsible for the phenomenon of clogging observed in the reactor R2. Moreover, the reduction of ferrous ion ($\Delta G^0 = -115.0$ kJ/mol) avoided sulfide generation in the same time as the sulfates reduction ($\Delta G^0 = -104.7$ kJ/mol) for the permeable soil. High hydraulic loading rate could also be one of the reasons that can be responsible to the clogging phenomenon observed for the reactor R2. Actually, the high hydraulic loading rate induces the presence of high organic matter content to the reactor, which may have accelerated the biomat formation in the infiltration surface.

Finally, we could assume that no important sulfide was generated downstream the autotrophic-denitrification system during the infiltration of DW through highly permeable soil over one year sampling. As mentioned by Sierra et al. (2007), we can also confirm that a further treatment step (cascade aeration with a sand field) is important for a safe infiltration of the denitrified soil, as long as the organic matter is present at a low amount. Indeed, a wastewater with low BOD₅ will ensure the oxygen flow to the system (Erickson, 2000).

3.7 Conclusion

This study focused on the behavior of artificially-created soils infiltrated by treated wastewater containing large quantities of sulfates from a decentralized domestic wastewater treatment process based on autotrophic sulfur denitrification. The results indicated that the wastewater treated by the autotrophic sulfur-limestone process did not lead to the production of problematic amounts of aqueous or gaseous sulfide ($\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})} < 0.1 \text{ mg/L}$ and $\text{H}_2\text{S}_{(\text{g})} < 0.5 \text{ ppm}$) in the outflow. The concentration of sulfide in the feeding solution (denitrified wastewater) did not exceed 0.7 mg/L of aqueous sulfide and 2.1 ppm of gaseous sulfide. This observation might be explained by the fact that the DO and ORP values did not reach target values conducive to the SRB activity. Moreover, because this process was installed downstream of a secondary process, there was less easily biodegradable residual organic carbon available for the SRB.

Another observation was the occurrence of a clogging phenomenon in the permeable soil. Many hypotheses were proposed to explain the loss of permeability, which involved the formation of a biomat layer on the infiltration surface, and the formation of iron ochre in the sandy loam soil. To avoid these problems during the operation of a functioning full-scale wastewater infiltration system, a further treatment step (cascade aeration) with a sand field is important for a safe infiltration of the denitrified wastewater.

Further experiments should be performed with different hydraulic loading rates including typical hydraulic loading rates (65 L/m²/day for the highly permeable soil and at 35 L/m²/day for the permeable soil) and the same hydraulic loading rates as those used in this study (130 L/m²/day for the highly permeable soil and at 70 L/m²/day for the permeable soil) to further understand the formation of the clogging phenomenon. Moreover, denitrified wastewater infiltration into a real soil (with higher organic matter and the presence of plants) would be very interesting to have a better comprehension of the mechanisms responsible of the potential sulfide generation.

3.8 Acknowledgments

The writers are grateful for the financial and technical support of Premier Tech Aqua, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Research Funds of Quebec

Nature and Technology. Mrs. Ginette Bélanger and Mrs. Myriam Chartier are acknowledged for their significant contribution. Sincere thanks are extended to Mrs. Jihen Ben Khaled and Mr. André Ouellet.

3.9 References

- Abhilash, Pandey, B.D., Natarajan, K.A. (2015). "*Microbiology for minerals, metals, materials and the environment*". CRC Press, Boca Raton, NY, USA, 608 p.
- Anderson, J.L., Halsey, C.F. (1980). "*Evaluating soil texture for a house site*". Agricultural Extension Service, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA.
- Annable, M.D., Teodorescu, M., Hlavinek, P., Diels, L. (2008). "*Methods and techniques for cleaning-up contaminated sites*". Springer, Dordrecht, Netherlands, 196 p.
- Barton, L., Hamilton, W.A. (2007). "*Sulphate-reducing bacteria : environmental and engineered systems*". Cambridge University Press, Cambridge, NY, USA, 552 p.
- Baveye, P., Vandevivere, P., Hoyle, B.L., DeLeo, P.C., de Lozada, D.S. (1998). "Environmental Impact and Mechanisms of the Biological Clogging of Saturated Soils and Aquifer Materials". *Crit.Rev. Environ. Sci. Technol.* 28, 123-191.
- Beauchamp, R.O., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Andjelkovich, D.A., Leber, P. (1984). "A Critical Review of the Literature on Hydrogen Sulfide Toxicity." *Crit.Rev. Toxicol.* 13:25-97.
- Ben-Khaled J. (2016). "*Couplage de la dénitrification autotrophe sur soufre aux systèmes de traitement biologique des eaux usées domestiques applicables au secteur de l'assainissement décentralisé*". Thesis report, INRS, University of Quebec, Quebec, QC, Canada, 199 p.
- Benedetto, J.S., de Almeida, S.K., Gomes, H.A., Vazoller, R.F., Ladeira, A.C.Q. (2005). "Monitoring of sulfate-reducing bacteria in acid water from uranium mines". *Minerals Eng.* 18, 1341-1343.
- Bertolacini, R.J., Barney, J.E., (1957). "Colorimetric determination of sulfate with barium chloranilate." *Anal. Chem. American Chem. Soc.* 29, 281–283.
- Biswas, T. (2012). "Effect of Linoleic Acid and COD/SO₄²⁻ Ratio on Anaerobic Sulphate Reduction in Semi-Continuous Reactors". Thesis report, University of Windsor, Windsor, ON, Canada, 119 p.
- Buchanan, J.R. (2014). "3.13 - Decentralized Wastewater Treatment". In: Ahuja, S. (Ed.), *Comprehensive Water Quality and Purification*. Elsevier, Calabash, NC, USA, 1536 p.
- Canadian Centre for Occupational Health and Safety (2016) *CHEMINFO database*. Canadian Centre for Occupational Health and Safety, Hamilton, ON, Canada. Available at the following address: <http://www.ccohs.ca/products/databases/cheminfo.html>.
- Cervantes, F.J., Pavlostathis, S., Van Haandel, A.C. (2006). "Advance biological treatment processes for industrial wastewaters principles and applications." IWA Publishing, London, Available at the following address: <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3120870>
- Chou, C.H.S.J. (2003). "Hydrogen Sulfide". World Health Organization, Geneva, Swiss.

- Christianson, L., Lepine, C., Tsukuda, S., Saito, K., Summerfelt, S. (2015). "Nitrate removal effectiveness of fluidized sulfur-based autotrophic denitrification biofilters for recirculating aquaculture systems". *Aquacultural Eng.* 68, 10-18.
- Cline, J.D., (1969). "Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters." *Limnol. Oceanogr.* 13, 454-458.
- Dar, S.A., Kleerebezem, R., Stams, A.J.M., Kuenen, J.G., Muyzer, G. (2008). "Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 1045-1055.
- Deepa, K., Krishnaveni, M., (2012). "Water quality performance of soil aquifer treatment (SAT) using municipal treated wastewater of Chennai city, India." *J. Environ. Hydrol.* 20, 1-9.
- Down, R.D., Lehr, J.H. (2005). "*Environmental instrumentation and analysis handbook*". Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, USA.
- Erickson, T.E.J. (2000). "*Soil Oxygen Delivery to Wastewater Infiltration Surfaces*". Conference Proceedings National Onsite Wastewater Recycle Association, USA, pp. 91-96.
- Ford, H.W. (1985). "*Iron ochre and related sludge deposits in subsurface drain lines*". Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL, USA.
- Ghorbel, L., Coudert, L., Gilbert, Y., Mercier, G., Blais, J.F. (2016). "Assessment of sulfide production risk in soil during the infiltration of domestic wastewater treated by a sulfur-utilizing denitrification process". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1-13.
- Glass, D.C. (1990). "A review of the health effects of hydrogen sulphide exposure." *Annals of Occupational Hygiene* 34: 323-327.
- Gouvernement du Canada (2016), Rapport de données quotidiennes Rivière-du-Loup (2014-2015) : http://climate.weather.gc.ca/climateData/dailydata_f.html?StationID=8539 , consulté le 18-04-2016
- Gouvernement du Québec (2015). "*Règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées*", Government of Quebec, Québec, QC, Canada.
- Gutierrez, O., Park, D., Sharma, K.R., Yuan, Z. (2009). "Effects of long-term pH elevation on the sulfate-reducing and methanogenic activities of anaerobic sewer biofilms". *Water Res.* 43, 2549-2557.
- Hargett, D.L., Tyler, E.J., Siegrist, R.L., Project, S.S.W.M. (1981). "*Soil infiltration capacity as affected by septic tank effluent application strategies. Small Scale Waste Management Project*". University of Wisconsin, Madison, WI, USA, 13 p.
- Holland, H.D., Turekian, K.K. (2010) "Isotope Geochemistry a derivative of the Treatise on Geochemistry." Elsevier Science, Burlington. Available at the following address: http://www.123library.org/book_details/?id=37397

- Huan, N.H., Hai, Yem, Tuan, N.N. (2013). "Factors effect to the sulfide generation rate in the To Lich River, Vietnam." *ARPJ. Eng. Appl. Sci.* 8, 190-199.
- James, C.N., Copeland, R., Lytle, D.A. (2004). "*Relationships between oxidation-reduction potential, oxidant, and pH in drinking water*". In: US EPA (Ed.), AWWA WATER Quality Technology Conference, San Antonio, TX, USA.
- Kimura, K., Nakamura, M., Watanabe, Y. (2002). "Nitrate removal by a combination of elemental sulfur-based denitrification and membrane filtration". *Water Res.* 36, 1758-1766.
- Lens, P.N.L., Hulshoff Pol, L. (2004). Environmental technologies to treat sulfur pollution : principles and engineering. IWA Publishing, London, United Kingdom, 550 p.
- Liang, C.C.V. (2008). "*Reduced sulphur compounds in ambient air and in emissions from wastewater clarifiers at a kraft pulp mill*". Thesis report, University of Toronto, Toronto, ON, Canada, 245 p.
- Lindbo, D.L., Amoozegar, A., Anderson, Vick Jr., D.R.L., Vepraskas, M.J. (2014). "*Understanding and Interpreting Oxyaquic Conditions, Innovation in Soil-Based Onsite Wastewater Treatment*". Soil Science Society of America, Albuquerque, NM, USA.
- Liu, Z.H., Maszenan, A.M., Liu, Y., Ng, W.J. (2015). "A brief review on possible approaches towards controlling sulfate-reducing bacteria (SRB) in wastewater treatment systems". *Desalin. Water Treat.* 53, 2799-2807.
- Longpré-Girard, M., Martel, R., Robert, T., Lefebvre, R., Lauzon, J.M. (2016). "2D sandbox experiments of surfactant foams for mobility control and enhanced LNAPL recovery in layered soils." *J. Contam. Hydrol.* 193, 63-73.
- Lowe, K., Siegrist, R. (2008). "Controlled Field Experiment for Performance Evaluation of Septic Tank Effluent Treatment during Soil Infiltration". *J. Environ. Eng.* 134, 93-101.
- Martel, R., Gélinas, P.J. (1996). " Surfactant Solutions Developed for NAPL Recovery in Contaminated Aquifers." *Groundwater* 34, 143-154.
- McKinley, J.W., Siegrist, R.L. (2011). "Soil Clogging Genesis in Soil Treatment Units Used for Onsite Wastewater Reclamation: A Review". *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 2186-2209.
- MDDEFP (2014). "*Détermination de la demande chimique en oxygène : Méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium, MA. 315 – DCO 1.1, Rév. 3*". Ministère du Développement Durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, Quebec, QC, Canada, 11 p.
- MDDEFP (2013). "*Étude d'impact économique du projet de règlement modifiant le règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées*". Ministère du Développement Durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, Quebec, QC, Canada, 15 p.

- MDDELCC (2015). "*Règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées*". Government of Quebec, Quebec, QC, Canada.
- Musy, A., Soutter, M. (1991). "Physique du sol". *Presses polytechniques et universitaires romandes*, Lavoisier, Lausanne, Paris, France.
- Nielsen, P.H., Raunkjær, K., Hvitved-Jacobsen, T. (1998). "Sulfide production and wastewater quality in pressure mains". *Water Sci. Technol.* 37, 97-104.
- Partlo, L.A., Sainsbury, R.S., Roth, S.H. (2001). "Effects of Repeated Hydrogen Sulphide (H₂S) Exposure on Learning and Memory in the Adult Rat." *NeuroToxicology* 22:177-189.
- PTA (2015) PremierTech, Rivière du Loup, QC, Canada. Site internet de la compagnie disponible à l'adresse suivante: <http://www.premiertechaqua.com/assainissement-traitement-eaux-usees>. Consulté le 17-03-2015.
- Reddy, K.R., DeLaune, R.D. (2008). "*Biogeochemistry of wetlands : science and applications*". CRC Press, Boca Raton, NY, USA, 800 p.
- Reiffenstein, R.J., Hulbert, W.C., Roth, S.H. (1992). "Toxicology of Hydrogen Sulfide." *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:109-134.
- Sandhu, C., Fichtner, T., Hasan, I., Gräber, P.W. (2013). "Predicting the Impact of Treated Wastewater Infiltration on Groundwater Recharge by Simulating Reactive Transport in the Unsaturated Zone". HYDRUB Workshop, 10 p.
- Service des eaux municipales (2007). "*Traitement des eaux usées des résidences isolées guide technique. Service des eaux municipales*". Direction des politiques de l'eau, Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs, Québec, QC, Canada.
- Siegrist, R.L., Thresher, J.E. (1985). "*Microanalysis of Wastewater Amended Vadose Zone Soils*". The National Water Well Conference, p. 9.
- Sierra-Alvarez, R., Beristain-Cardoso, R., Salazar, M., Gómez, J., Razo-Flores, E., Field, J.A. (2007). "Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment". *Water Res.* 41, 1253-1262.
- Simard, M., Masson, S., Mercier, G., Benmoussa, H., Blais, J., Coudert, L. (2015). "Autotrophic Denitrification Using Elemental Sulfur to Remove Nitrate from Saline Aquarium Waters". *J. Environ. Eng.* 141, 04015037.
- Smart, P., Herbertson, J.G. (1992). "Drainage design". Blackie, Glasgow, United Kingdom.
- Soares, M.I.M. (2002). "Denitrification of groundwater with elemental sulfur". *Water Res.* 36, 1392-1395.
- Soil Science Society of America (2014). "*Innovation in soil-based onsite wastewater treatment*". Conference Proceedings; April 7 - 8, 2014, Albuquerque, NM, USA, 325 p.
- Statistics Canada (2011). Households and the Environment. Statistics Canada and Ministry of Industry, Ottawa, ON, Canada, 227 p.

- Van Der Hoek, J.P., Kappelhof, J.W.N.M., Hijnen, W.A.M. (1992). "Biological Nitrate Removal from Ground Water by Sulfur/Limestone Denitrification". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 54, 197-200
- Velasco, A., Ramírez, M., Volke-Sepúlveda, T., González-Sánchez, A., Revah, S. (2008). "Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation". *J. Hazard. Mater.* 151, 407-413.
- White, K.D., West, L.T. (2003). "In-Ground Dispersal of Wastewater Effluent: The Science of Getting Water into the Ground". *Small Flows Quarterly* 4, 28-35.
- Winstanley, H.F., Fowler, A.C. (2013). "Biomat Development in Soil Treatment Units for On-site Wastewater Treatment". *Bull. Math. Biol.* 75, 1985-2001.
- Xu, Y., Chen, N., Feng, C., Hao, C., Peng, T. (2016). "Sulfur-based autotrophic denitrification with eggshell for nitrate-contaminated synthetic groundwater treatment". *Environ. Technol.*, 1-10.
- Yeh, E. (2000). "Raw sludge as substrate for sulphate-reducing bacteria". Thesis report, University of Toronto, Toronto, ON, Canada, 146 p.
- Yuan, H., Nie, J., Zhu, N., Miao, C., Lu, N. (2013). "Effect of temperature on the wastewater treatment of a novel anti-clogging soil infiltration system". *Ecological Eng.* 57, 375-379.
- Zhang, J.S.A.T.C., 1998. "Septic tank effluent denitrification with sulfur/limestone processes". Conference on Hazardous Waste Research, Utah, UT, USA, p. 15.
- Zhang, T.C., Shan, J. (1999). "In Situ Septic Tank Effluent Denitrification Using a Sulfur-Limestone Process". *Water Environ. Res.* 71, 1283-1291.
- Zhou, W., Sun, Y., Wu, B., Zhang, Y., Huang, M., Miyanaga, T., Zhang, Z. (2011). "Autotrophic denitrification for nitrate and nitrite removal using sulfur-limestone". *J. Environ. Sci.* 23, 1761-1769.

4 CHAPITRE 4

Determination of critical operational conditions favoring sulfide production from domestic wastewater treated by sulfur-utilizing denitrification process

Détermination des conditions opératoires critiques favorable à la production de sulfures lors de l'infiltration des eaux usées issues d'un procédé de dénitrification sur soufre

Revue : *Journal of Environmental Management*

Soumis le 28-09-2016

Auteurs

Leila Ghorbel Étudiante au doctorat, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-4677, Fax: (418) 654-2600, Email: leila.ghorbel@ete.inrs.ca

Lucie Coudert Associée de recherche, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-3793, Fax: (418) 654-2600, Email: lucie.coudert@ete.inrs.ca

Yan Gilbert Gestionnaire de projet, PREMIER TECH, 1 avenue Premier Campus Premier Tech, Rivière-du-Loup, QC, Canada, G5R 6C1, Phone: (418) 867-8883, Fax: (418) 862-6642, email: gily@premiertech.com

Guy Mercier Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-2633, Fax: (418) 654-2600, Email: guy.mercier@ete.inrs.ca

Jean-François Blais Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique (Centre Eau, Terre et Environnement), Université du Québec, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9, Tél: (418) 654-2575, Fax: (418) 654-2600, Email: blaisjf@ete.inrs.ca

Note

L'étudiante est le premier auteur de cet article. Toutes les manipulations, le traitement des données ainsi que la rédaction ont été effectués par l'étudiante sous la supervision des autres co-auteurs.

Modifications exigées par le comité de lecture

Les révisions de cet article n'ont pas encore été reçues.

4.1 Résumé

L'objectif de cette étude consistait à déterminer les conditions opérationnelles critiques conduisant à la génération de sulfures (aqueux ou gazeux) dans une eau usée domestique traitée par un processus de dénitrification utilisant du soufre. L'influence de la température, de la teneur en sulfates (SO_4^{2-}) et en carbone organique dissous (COD) et de la demande chimique en oxygène (DCO) sur la réduction des sulfates présents dans l'eau usée domestique dénitrifiée en sulfures a été étudiée. Les expériences ont été réalisées en mode batch avec des eaux usées domestiques dénitrifiées contenant des quantités variables de matière organique et de sulfates. Les résultats préliminaires ont montré que le sulfure aqueux est apparu pour des concentrations en COD et sulfates supérieures à 56 mg/L et 371 mg/L, respectivement, alors que des concentrations en COD et en sulfates de 77 mg/L et 412 mg/L ont été respectivement nécessaires pour permettre la libération de H_2S gazeux. Des corrélations ont également été obtenues entre les concentrations (production) de sulfure gazeux et les valeurs de POR et de COD tandis que les concentrations en sulfures dissous produits sont corrélées avec les valeurs de POR et la concentration en sulfates. Des expériences supplémentaires ont été réalisées en utilisant la méthodologie des plans d'expériences en surface de réponses de type Box-Behnken afin de déterminer si la production de sulfures aqueux ou gazeux peut être prédite en fonction du COD (de 50 à 90 mg/L), des sulfates (de 160 à 380 mg/L) à des températures comprises entre 5 et 25°C. La plus importante production de sulfures ($\text{H}_2\text{S}_{(g)} = 84,8$ ppm et de $\text{H}_2\text{S}_{(aq)} = 2,42$ mg S^{2-} /L) a été observée à 25°C avec une concentration en COD et en sulfates à partir de 90 mg/L et de 270 mg/L, respectivement. Ces résultats indiquent que la production de sulfures provenant des eaux usées domestiques dénitrifiées requière des conditions qui sont peu susceptibles d'être rencontrées dans un effluent d'une unité de dénitrification autotrophe à la suite d'un traitement secondaire.

Mots-clés : eaux usées domestiques; dénitrification autotrophe; conditions critiques; production de sulfures.

4.2 Abstract

The aim of this study was to determine the critical operational conditions leading to the generation of sulfide (aqueous or gaseous) in a domestic wastewater treated by a sulfur-utilizing denitrification process. The influence of the temperature, the sulfate content (SO_4^{2-}), the chemical oxygen demand (COD) and dissolved organic carbon content (DOC) on the reduction of the sulfates present in denitrified domestic wastewaters to sulfide was studied. Experiments were carried out in batch mode with denitrified domestic wastewaters containing various amounts of both organic matter and sulfates. Preliminary results showed that aqueous sulfide was generated for DOC and sulfate contents higher than 56 mg/L and 371 mg/L, respectively, while DOC and sulfate contents of 77 mg/L and 412 mg/L, respectively, were required to allow the release of gaseous H_2S . Good correlations were also obtained between gaseous sulfide concentration and the values of ORP and DOC, while the amounts of dissolved sulfide produced are correlated with the ORP values and the concentration of sulfates. Additional experiments were conducted using a Box-Behnken methodology to determine if the production of aqueous or gaseous sulfide can be predicted depending on the DOC (from 50 to 90 mg/L) and sulfate contents (from 160 to 380 mg/L) at various temperatures ranging from 5 to 25°C. The highest sulfide generation ($\text{H}_2\text{S}_{(g)} = 84.8 \text{ ppm}$ and $\text{H}_2\text{S}_{(aq)} = 2.42 \text{ mg S}^2/\text{L}$) occurred at 25°C with DOC and sulfate concentrations starting from 90 mg/L and 270 mg/L, respectively. These results indicate that the production of sulfides from denitrified domestic wastewaters require conditions not likely to encountered with an effluent of a sulfur-based denitrification unit following secondary treatment.

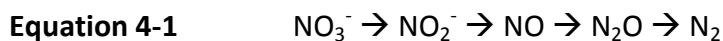
Keywords: domestic wastewater, autotrophic denitrification, critical conditions, sulfide production.

4.3 Abbreviations

BOD ₅	Biochemical oxygen demand after 5 days
COD	Chemical oxygen demand
DN	Denitrification
DOC	Dissolved organic carbon
ORP	Oxidation-reduction potential
SO ₄ ²⁻	Sulfate
SRB	Sulfate-reducing bacteria

4.4 Introduction

Despite scientific progress in domestic wastewater treatment, there is a constant need for new and improved technologies that will meet the constantly evolving environmental standards. In recent decades, numerous processes have been developed to remove nitrate from wastewater, including biological and chemical processes such as reverse osmosis, ion exchange and electrodialysis. According to [Ben-Khaled \(2016\)](#), these physicochemical methods are not selective and produce sub-products that are difficult and costly to valorize and/or dispose of. Biological processes are based on the ability of some groups of bacteria to use nitrate as an electron acceptor instead of oxygen, with atmospheric nitrogen (N₂) and biological sludge as end products. Therefore, biological treatments using nitrate-reducing bacteria represent an interesting option ([Ghafari et al., 2008](#), [Lampe et Zhang, 1996](#)). Depending on the organic or inorganic nature of the electron source, the denitrification process is called heterotrophic (organic source) or autotrophic (inorganic source) ([Liu et al., 2009](#)). In both cases and under anoxic conditions, bacterial species widely distributed among diverse bacterial genera such as *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Thiobacillus* have the capacity to reduce nitrate ions into atmospheric nitrogen, going through many transformation steps ([Equation 4-1](#)) ([Hiscock et al., 1991](#)).



Even if heterotrophic denitrification is much more widely used than autotrophic denitrification ([WHO, 2004](#)), the latter is more suitable for the treatment of wastewater containing low organic matter contents and high concentrations of nitrogen, with a lower biomass production ([Chung et al., 2014](#), [Sun, 2012](#)). In sulfur-based autotrophic denitrification processes, sulfur is used as a source of microbial energy and limestone is used as a buffering agent. According to [Gayle et Boardman\(1989\)](#), this technology has been operated in Europe (Paris) for more than thirty years by [Blecon \(1985\)](#). Since that time, many scientific studies related to the treatment

of potable, ground or wastewater have been carried out to improve the performance of the autotrophic denitrification processes (Van der Hoek *et al.*, 1992, Koenig et Liu, 2002, Lv *et al.*, 2014, Sahinkaya et Kilic, 2014, Zhang et Shan, 1999, Zhou *et al.*, 2011). Despite encouraging results in terms of nitrate removal efficiencies, the oxidation of elemental sulfur by bacteria generates sulfate ions (Chung *et al.*, 2014, Sahinkaya et Kilic, 2014). According to Sahinkaya et Kilic (2014), the reduction of 1 mg of nitrate (NO_3^- -N) to nitrogen (N_2) leads to the production of 7.54 mg of sulfates (SO_4^{2-}). Therefore, considering an average nitrate content of 30 mg/L in treated wastewater (US EPA, 2012) and a nitrate removal of approximately 80%, the expected production of sulfate is nearly 180 mg/L. This value is lower than the maximum sulfate concentration established for drinking water (500 mg/L) by the Canadian Drinking Water Quality (1994, updated in October 2014). Despite the fact that the sulfate present in denitrified domestic wastewater does not in and of itself represent a threat to the environment, it may result in the formation of hydrogen sulfide in the presence of sulfate-reducing bacteria (SRB). Sulfide compounds are well-known for their toxic effects on the humans and the environment (Health Canada, 1992). Therefore, it is particularly important to determine the critical conditions leading to the production of sulfides from denitrified domestic wastewater in order to avoid their generation during the infiltration of denitrified domestic effluents through the soil.

Ghorbel *et al.* (2016) demonstrated that no alarming amounts of sulfide ($\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})} < 0.25 \text{ mg S}^{2-}/\text{L}$ and $\text{H}_2\text{S}_{(\text{g})} < 0.15 \text{ ppm}$) were generated during the infiltration of denitrified domestic wastewater through the soil. Despite the fact that several factors (pH, ORP, Temperature, SO_4^{2-}) were favorable for sulfide generation, undetectable sulfide production was explained by the low amount of organic matter present in the treated domestic wastewater (COD = 100 mg/L, $\text{BOD}_5 = 5 \text{ mg O}_2/\text{L}$ and $\text{DOC} = 7 \text{ mg/L}$), with an average COD/ SO_4^{2-} ratio of 0.47. According to several studies, a minimum COD/ SO_4^{2-} ratio of 0.67 is necessary for the reduction of sulfate to sulfide by the SRB (Lens *et al.*, 1998, Neculita et Zagury, 2008; Velasco *et al.*, 2008), supporting the results obtained. Moreover, methanogenic bacteria also compete with SRB in wastewater for the consumption of organic matter. According to Byun *et al.* (2004), SRB are predominant at a COD/ SO_4^{2-} ratio less than 0.4, while methane-producing bacteria are predominant at a ratio

greater than 1.7. However, it is important to confirm the observation reported by [Ghorbel *et al.* \(2016\)](#) with a COD/SO₄²⁻ ratio of 0.47 to assess the risk of sulfide production in case of wastewater treatment system failure, leading to an increase in organic matter content in the treated wastewater.

The aim of this work is to determine the conditions favoring the production of sulfide from domestic wastewater treated by a sulfur-utilizing denitrification process. Therefore, the production of sulfide from domestic wastewater containing different proportions of undenitrified and denitrified wastewater was investigated in batch mode to determine the influence of organic matter content. Moreover, the potential production of sulfide was studied for three different sulfate concentrations (160, 270 and 380 mg/L) and DOC contents (50, 70 and 90 mg/L) at various temperatures (5, 15 and 25°C) using a response surface methodology.

4.5 Experimental

4.5.1 Undenitrified and denitrified wastewater samples collection and characterization

Experiments were conducted using undenitrified (the effluent of the primary treatment) and denitrified wastewater samples from an experimental domestic wastewater treatment station located in Rivière-du-Loup (QC, Canada). The on-site wastewater treatment process consisted of a primary treatment (septic tank), a biological secondary process and a sulfur-based autotrophic denitrification (DN) unit ([Figure 4-1](#)). At the beginning of each series of experiments, characterization of the undenitrified (S1) and denitrified (S2) domestic wastewater samples was performed by measuring several parameters: pH, ORP, sulfates, DOC and COD contents.

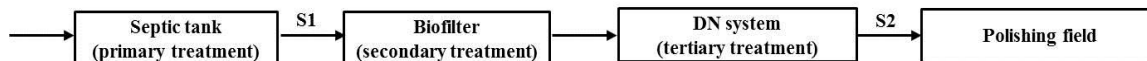


Figure 4-1 Schematic representation of the process used in the domestic wastewater treatment station located in Rivière-du-Loup (Québec, Canada)

4.5.2 Acclimatization of the bacterial microflora

Bacterial microflora were cultured using raw domestic wastewater obtained from the same experimental wastewater treatment process (Rivière-du-Loup, QC, Canada). A mixture of raw wastewater and Postgate B nutrient medium with a ratio fixed at 1/1 (v/v) was introduced in a 2-L flask. The Postgate B nutrient medium was prepared using 0.5 g/L KH_2PO_4 , 1.0 g/L NH_4Cl , 1.0 g/L CaSO_4 , 2.0 g/L $\text{mgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.5 g/L sodium lactate, 1.0 g/L yeast extract, 1.0 g/L ascorbic acid, 0.1 g/L thioglycolic acid and 0.5 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. This Postgate B medium was prepared in 1 L of deoxygenated water, and the pH was adjusted to 7.0 using a solution of NaOH (1 M). After the addition of both raw wastewater and Postage B medium, the system was tightly closed to avoid any oxygen input and to thereby maintain anaerobic conditions. During 39 days of acclimatization, the system was kept at room temperature (20-25°C), and 20-mL samples were regularly collected to monitor various parameters (pH, ORP and sulfate concentration).

4.5.3 Experimental set-up

Experiments were performed in batch mode, at laboratory scale, in 1-L-capacity reactors containing mixtures of undenitrified and denitrified wastewaters in different proportions and an inoculum (bacteria microflora – section 2.2) (Table 4-1).

The undenitrified wastewater sample represented the effluent of the septic tank (sample S1 from Figure 4-1), while the denitrified wastewater sample was collected after the tertiary treatment unit (sample S2 from Figure 4-1). In all reactors, gaseous nitrogen (N_2) was injected over a 15-min interval to create an anoxic environment conducive to SRB growth. Aluminum

foil was used to seal the reactors to prevent SRB exposure to light and avoid the growth of photosynthetic organisms such as purple sulfur bacteria, which oxidize sulfide in anaerobic environments. Reactors weren't agitated during the experiments.

Table 4-1 Composition of the liquid in different reactors used in the preliminary experiments

Reactor	Inoculum		Undenitrified wastewater		Denitrified wastewater	
	Proportion (%)	Volume (mL)	Proportion (%)	Volume (mL)	Proportion (%)	Volume (mL)
Reactor 1	5.0	50	0.0	0.00	95	950
Reactor 2	5.0	50	5.0	50.0	90	900
Reactor 3	5.0	50	10	100	85	850
Reactor 4	5.0	50	20	200	75	750
Reactor 5	5.0	50	40	400	55	550
Reactor 6	5.0	50	60	600	35	350
Reactor 7	5.0	50	80	800	15	150
Reactor 8	5.0	50	90	900	5.0	50.0

4.5.4 Preliminary experiments

Preliminary experiments were conducted in eight 1-L reactors, each containing different proportions of undenitrified and denitrified domestic wastewaters in the presence of 5% (v/v) inoculum (Table 4-1). These experiments were conducted to determine if critical conditions (high concentrations of organic matter and/or sulfates) in wastewater can lead to the production of sulfide under anaerobic conditions in the presence of SRB. The different systems

(reactors 1 to 8) were maintained at room temperature (20-25°C), and 35-mL aliquots were taken every two weeks to monitor the system pH, ORP and the concentrations of sulfates, aqueous and gaseous sulfide and DOC. After removing each series of aliquots, each reactor was filled to the top with deoxygenated water to ensure that the conditions remained anaerobic.

4.5.5 Determination of the influence of DOC and sulfate contents using a Box-Behnken methodology

Based on the preliminary results, further experiments were conducted in the dark using different proportions of undenitrified and denitrified domestic wastewaters in the presence of 5% (v/v) inoculum. A Box-Behnken methodology was used to study the influence of several parameters (temperature, DOC and sulfate contents) on the generation of hydrogen sulfide by making only a few assays. The number of assays (N) required for the use of a Box-Behnken design can be calculated using [Equation 4-2](#). The results were analyzed and interpreted using the software Design-Expert 8.0 (StateEase, USA).

Equation 4-2 $N = 2 k \cdot (k - 1) + C_0$

where k is the number of factors and C₀ is the number of central points

In the present study, three factors that could potentially influence the generation of sulfide (temperature, sulfate concentration and dissolved organic carbon content) were initially chosen, and the experimental domain of each factor was selected based on the results of the preliminary assays. [Table 4-2](#) shows the selected factors and their levels. In the present study, 17 assays, including 5 replicates carried out in the center of the experimental region, were performed. Every week, 35-mL aliquots were collected, and the following parameters were analyzed: pH, ORP, gaseous and aqueous sulfide contents, sulfate and DOC concentrations.

Table 4-2 Selected factors and their levels

Factors	Unit	Low level (-1)	Center level (0)	High level (+1)
Temperature	°C	5	15	25
Sulfate concentration	mg/L	160	270	380
Dissolved organic carbon content	mg/L	50	70	90

At the end of the experiments, a second-degree polynomial model had been established between the response (amounts of sulfide produced) and the different variables (temperature, DOC and sulfate contents) using the software Expert Design 8.0, as described in [Equation 4-3](#) ([Kamoun, 2011](#)).

Equation 4-3

$$y_i = b_0 + \sum_{j=1}^n b_j X_{ij} + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{\substack{m=2 \\ m>j}}^k b_{jm} X_{ij} X_{im} + \sum_{j=1}^k b_{jj} X_{ij}^2$$

Where y_i = response calculated at the i^{th} experiment, X_{ij} = level of the factor j in the i^{th} experiment, b_0, b_j, b_{jm}, b_{ij} = model coefficients.

Three additional experiments were conducted in triplicate to confirm the experimental conditions that are most favorable to the production of dissolved sulfide (i.e., optimum conditions). These experiments were conducted at room temperature (25°C) in the presence of a DOC concentration of 90 mg/L with various sulfate concentrations from 160 to 380 mg/L.

4.5.6 Analytical techniques

The pH and the ORP were both measured using a Fischer Scientific apparatus (Accumet, XL 600, dual channel pH/ORP, Fisher Scientific). Before each series of measurements, the Ag/AgCl reference cell used for the pH measurements was calibrated using certified solutions (pH = 2.00, 4.00, and 7.00). The ORP cell was calibrated before each series of measurements using a certified solution (ORP = 470 mV).

The concentration of dissolved organic carbon (DOC) was performed using a TOC-analyzer (TOC-VCPH model, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). Gaseous hydrogen sulfide was measured using a H₂S detector (ToxiRAE Pro, San Jose, USA).

All of the following analyses were performed using colorimetric methods and a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary® 50, Varian, Inc., Mississauga, ON, Canada). Aqueous sulfide analyses were performed according to [Cline \(1969\)](#) directly after the sampling as sulfides are unstable compounds subject to oxidation in the presence of oxygen. Sulfate analyses were performed using a method described by [Bertolacini et al. \(1957\)](#). The determination of chemical oxygen demand (COD) was performed according to the MA. 315 - COD 1.1 CEAEQ analysis method ([MDDEFP, 2014](#)).

4.6 Results and discussion

4.6.1 Wastewater characterizations

[Table 4-3](#) shows the relevant characteristics of the wastewaters from the domestic wastewater treatment plant ([Figure 4-1](#)) used in this work. The comparison of the characteristics of both wastewaters studied highlighted that the effluent of the primary treatment (undenitrified wastewater) contained a higher level of organic matter (BOD₅ = 53 mg/L, COD = 285 mg/L and DOC = 57 mg/L) than the denitrified wastewater (BOD₅ = 5.0 mg/L, COD = 47 mg/L and DOC = 9.4 mg/L).

Table 4-3 Characterization of the different wastewaters used

Parameters	Unit	Udenitrified wastewater (S1)	Denitrified wastewater (S2)
pH	-	7.1	6.8
BOD ₅	mg O ₂ /L	53	5.0
SS	mg/L	33	4.0
N _{tot}	mg/L	24	7.9
NO _x	mg/L	0.3	5.5
SO ₄ ²⁻	mg/L	34.5	274
COD	mg/L	285	47
DOC	mg/L	57	9.4

4.6.2 SRB inoculation

During the acclimatization phase, which lasted 36 days, the growth of SRB was confirmed by the changes in ORP and the residual concentration of sulfate. The concentration of sulfate and the ORP values decreased from 675 to 172 mg/L and from -188 to -370 mV, respectively, during the acclimatization period. With a low ORP value (< -100 mV) and a DOC of approximately 1200 mg/L, the SRB were able to reduce sulfate to sulfide. Moreover, the presence of SRB was confirmed by the gradual accumulation of a black sulfide sediment and by the pronounced odor of hydrogen sulfide, as mentioned by [Chang *et al.* \(2008\)](#).

4.6.3 Preliminary experiments

The main difference in these preliminary experiments was the concentration of organic matter initially present in the reactors, ranging from 42 to 87 mg DOC/L. [Figure 4-2](#) presents the concentrations of gaseous and aqueous hydrogen sulfide and the ORP values in the different reactors studied.

There was no production of either aqueous or gaseous sulfide during the two-month sampling period in reactors 1 through 4. The production of aqueous sulfide was only observed in reactors 5 through 8 after two weeks of incubation, with values reaching 0.4 to 0.8 mg S²⁻/L. The maximum values were measured on the 4th week, with 1.1 and 1.0 mg S²⁻/L for reactors 7 and 8, respectively. Gaseous sulfide (H₂S) was generated only in reactors 7 and 8, with maximum values of 84 and 100 ppm, respectively, obtained after two weeks of incubation. The generation of aqueous and gaseous sulfide occurred in reactors with a pH of approximately 7.5, which corresponds to an optimum pH value for SRB activity (Liu *et al.*, 2015, Yeh, 2000). Moreover, the production of aqueous and gaseous sulfide was accompanied by a decrease in ORP values from -25 mV to -320 mV in reactor 8. An initial DOC concentration higher than 56 mg/L and a DOC/SO₄²⁻ ratio of 0.15 were required for the production of aqueous sulfide, whereas an initial DOC concentration of 77 mg/L and a DOC/SO₄²⁻ ratio of 0.18 were required for the production of gaseous sulfide. Chemical oxygen demand (COD) was also measured, but the values showed considerable variability. Many authors have suggested that a theoretical COD/SO₄²⁻ ratio of 0.67 is necessary for the SRB activity (Greiben *et al.*, 2007). These results were in agreement with the observations made in the present study. Indeed, the production of gaseous sulfide occurred in reactor 7, which had an initial COD/SO₄²⁻ ratio of 0.53. Higher sulfide generation occurred in reactor 8, which had an initial COD/SO₄²⁻ ratio of 0.80.

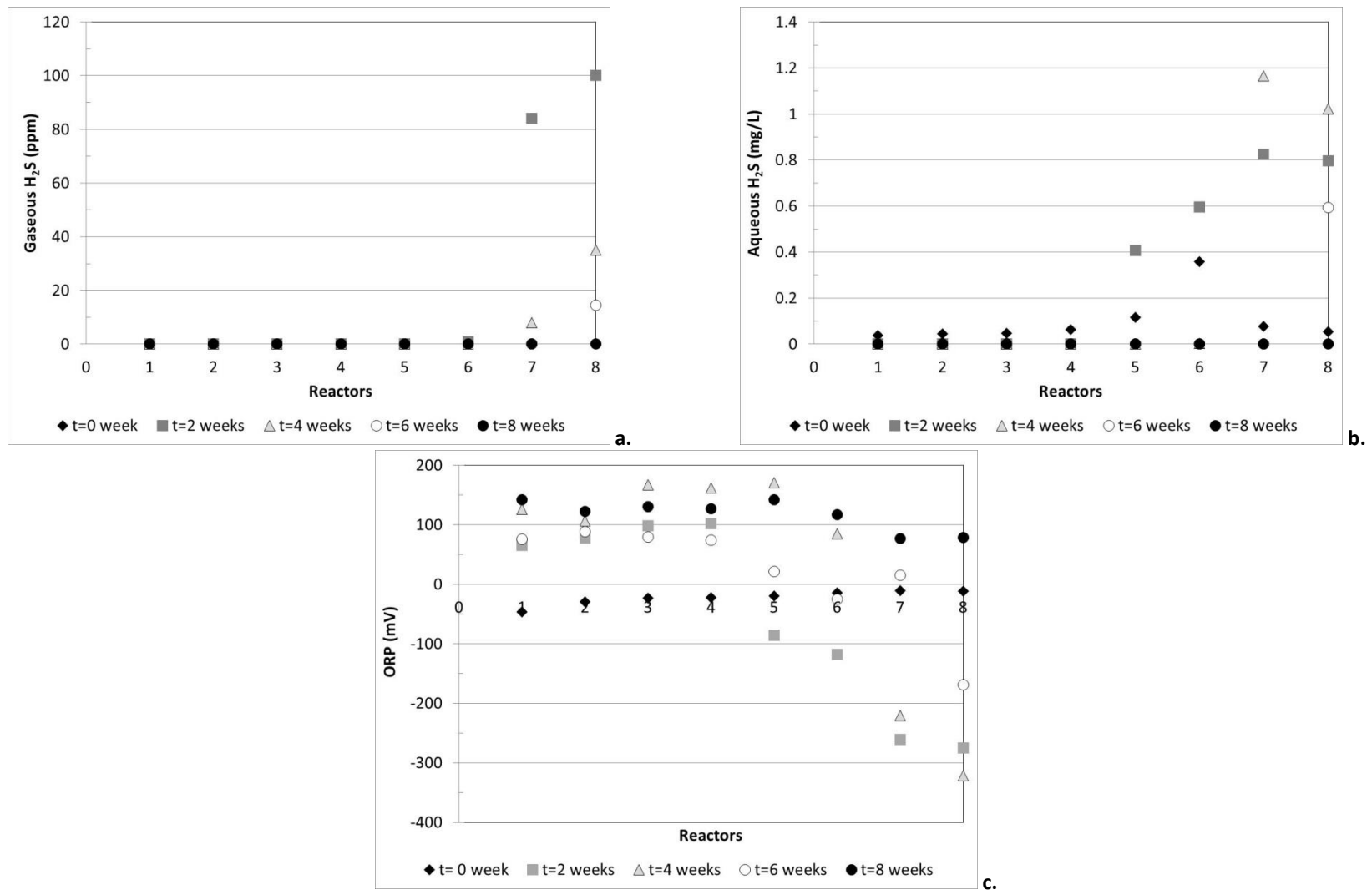


Figure 4-2 Gaseous (a) and aqueous (b) hydrogen sulfide production and ORP values (c) observed in bioreactors containing different proportions of undenitrified and denitrified domestic wastewaters

At the beginning of the experiment, the ORP values initially ranged from -11 to -46 mV. After 14 days of incubation, the ORP values began to decrease, though only in reactors 5 through 8 (Figure 4-2). Figure 4-3 presents the ORP values and DOC concentrations measured in the different reactors after 14 days of incubation and the relationship between these two parameters. A decrease in the ORP values (< -85 mV) was observed after 14 days of incubation in the bioreactors that initially contained a DOC concentration higher than 56 mg/L (Figure 4-3a). A decrease in ORP, which is an important indicator of the SRB activity, was dependent on the amount of organic carbon available for the development of SRB in the reactors, as shown in Figure 4-3b, after 14 days of fermentation. A linear relationship was found between the ORP values measured after two weeks of incubation and the DOC content ($R^2 = 0.938$).

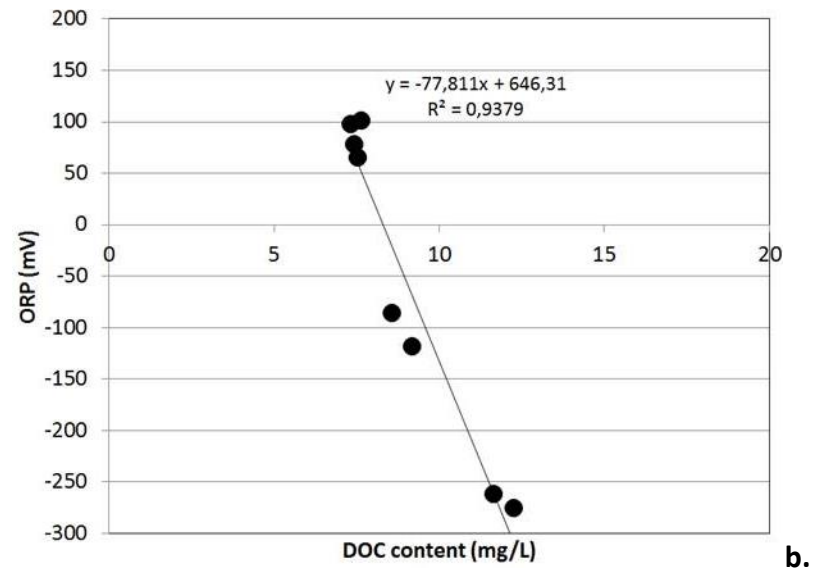
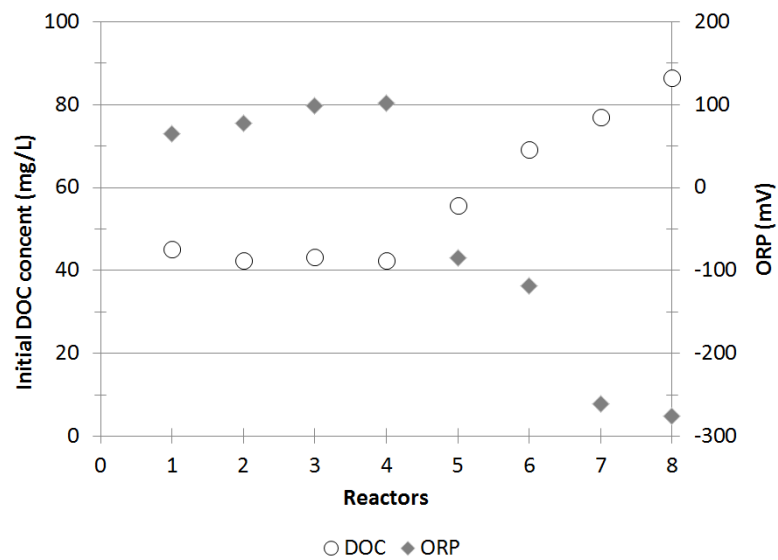


Figure 4-3 Relationships between ORP values after 14 days of incubation measured in the different reactors versus (a) initial DOC concentrations and (b) DOC concentrations after 14 days of incubation

According to the study carried out by [Huan *et al.* \(2013\)](#), the production of hydrogen sulfide mainly depends on the DOC and the ORP values. Therefore, the results obtained after 14 days of incubation for the 8 reactors studied were used to develop a regression that could predict the potential production of gaseous H₂S. Linear regression was applied ($\alpha = 0.05$) to the production of gaseous hydrogen sulfide and both ORP value and initial DOC content ($p=0.0181$ and 0.0014 , respectively), with a correlation coefficient (R^2) of 0.969 ([Equation 4-4](#)).

Equation 4-4
$$\text{H}_2\text{S} = 0.29 \text{ ORP} + 43 \text{ DOC} - 350$$

Many authors have also reported a close relationship between ORP values and the logarithm of the sulfide/sulfate ratio ([Chang *et al.*, 2008](#), [Delgado *et al.*, 1999](#), [Huan *et al.*, 2013](#)). [Delgado *et al.* \(1999\)](#) first showed the importance of predicting sulfide amounts in wastewater based on the ORP and sulfate values according to [Equation 4-5](#).

Equation 4-5
$$\text{ORP} = f \left(\log \left(\frac{[\text{H}_2\text{S}_{\text{aq}}]}{[\text{SO}_4^{2-}]} \right) \right)$$

Based on the results obtained for reactor 8, in which high sulfide generation occurred, a linear regression ($R^2=0.94$) was found, according to [Equation 4-5](#), between ORP values and both the amounts of aqueous sulfide produced and the concentration of sulfate ([Figure 4-4](#)).

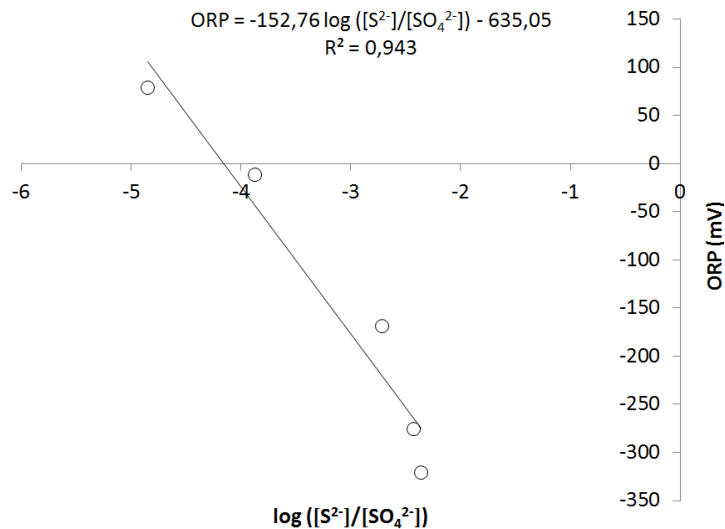


Figure 4-4 Relationship between the ORP values and $\log ([\text{H}_2\text{S}_{\text{aq}}]/[\text{SO}_4^{2-}])$ obtained for reactor 8 every 14 days of incubation

4.6.4 Prediction of sulfide production using a Box-Behnken design

A Box-Behnken design was used to investigate the impact of three factors (temperature, sulfate concentration and DOC content), coded at three different levels (-1, 0, +1), on the production of sulfide. The choice of the operating parameters during these experiments was not randomly assigned. Based on the preliminary data, the experimental domain was chosen for each parameter according to [Table 4-2](#).

The highest dissolved and gaseous sulfide generation occurred after 1 and 2 weeks of fermentation, respectively. Experimental data correlated well with the mathematical model described below ([Equation 4-6](#)) for both weeks (Week 1: CV = 35.9%, $p = 0.0169$, $R^2 = 0.93$; Week 2: CV = 16.6 %, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.99$).

Equation 4-6

$$H_2S_{aq} = 0.208 + 0.164 A + 0.351 B + 0.978 C + 0.551 AB + 0.172 AC + 0.354 BC \\ + 0.355 A^2 + 0.231 B^2 + 0.486 C^2$$

where A , B and C = Temperature, Sulfate concentration and DOC content, respectively.

The reactors reached equilibrium after 2 weeks, the same duration as in the preliminary experiments. It was thus decided to only discuss the results obtained after the 2nd week. The production of gaseous sulfide (85 ppm) was only observed after two weeks in the reactor containing an initial sulfate concentration of 270 mg/L and an initial DOC of 90 mg/L incubated at 25°C. These results suggest that the production of gaseous sulfide requires conditions that are not likely to occur at the effluent of a sulfur-based denitrification unit following a secondary treatment (high DOC and sulfate content). Actually, equilibrium occurred for sulfide between both phases (gaseous and aqueous), as described by Henry's law. Reaching a saturation state at a constant temperature, gas solubility in the liquid was proportional to the gaseous phase (partial pressure). Gaseous sulfide generation depended on Henry's constant, which depends on many parameters such as pressure, temperature, agitation, duration, and liquid nature. Moreover, total sulfide generation depended indirectly on ORP values and the amounts of sulfate. Actually, these parameters directly influenced the SRB activity and thereby indirectly influenced the amount of sulfide. However, no mathematical relationship between the amounts of gaseous sulfide produced and the parameters studied could be found.

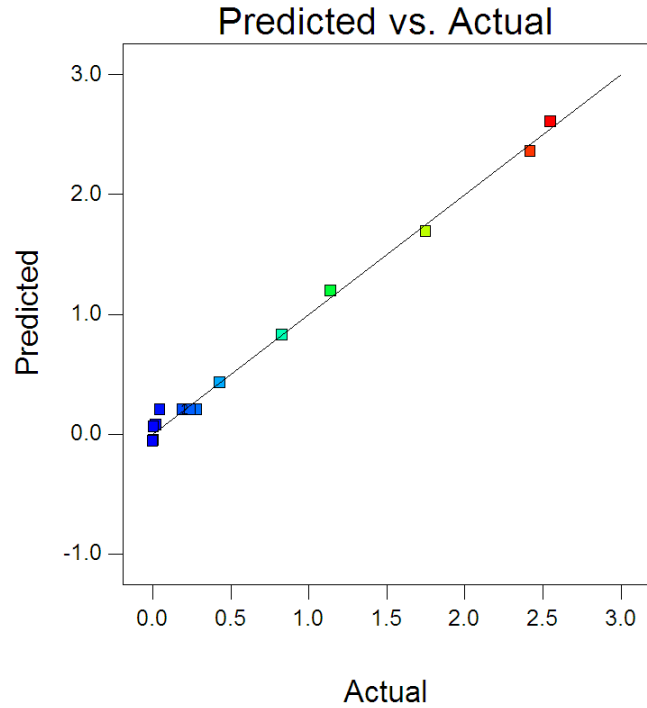
The results discussed in this study only concern the production of aqueous sulfide after 2 weeks of incubation. Runs 11 and 15 were removed from the analyses because the values obtained were outliers according to the results of the ANOVA and the representation of the predicted versus actual values. Using multiple linear regression and the method of least squares, a second-degree polynomial was established to model the experimental values obtained for the production of aqueous sulfide after two weeks of experiments. A quadratic function was

suggested by the software to predict the production of aqueous sulfide as a function of the temperature and the initial concentration of both sulfates and DOC (Equation 4-6).

According to Kamoun (2011), three main steps are needed in order to confirm the adequacy of the mathematical model established by the software. First, an evaluation of the adjustment quality of the model was made. For that, statistical tools (ANOVA and mathematical regressions) were used to determine if the model fit well with the experimental results. The regression coefficients were in the range of 0.98-0.99. These values mean that 99% of the experimental values could be explained by the mathematical model and that 98% of the variability confirms the adjustment quality of the model. Another statistical tool used to evaluate the adjustment quality of the model is the representation of the predicted values versus actual (experimental) values (Fig. 4-5a.) and the graphic analysis of the residuals by the normal probability plot (Fig. 4-5b.). These diagrams showed that the residuals are normally distributed around 0.00 and that the experimental values fit well with the predicted value, estimated using the model established. Thus, the adjustment quality of the model was judged to be satisfactory.

Design-Expert® Software
Dissolved sulfide (mg/L)

Color points by value of
Dissolved sulfide (mg/L):



Design-Expert® Software
Dissolved sulfide (mg/L)

Color points by value of
Dissolved sulfide (mg/L):

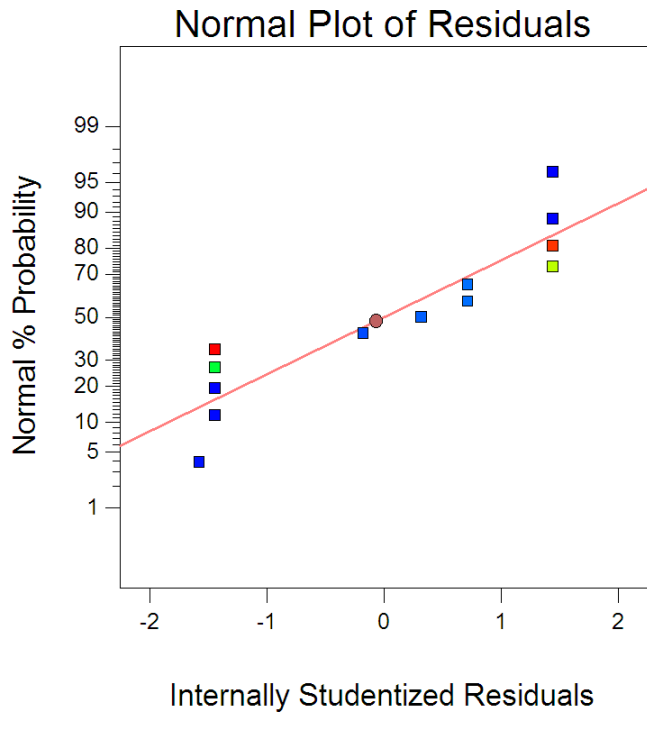


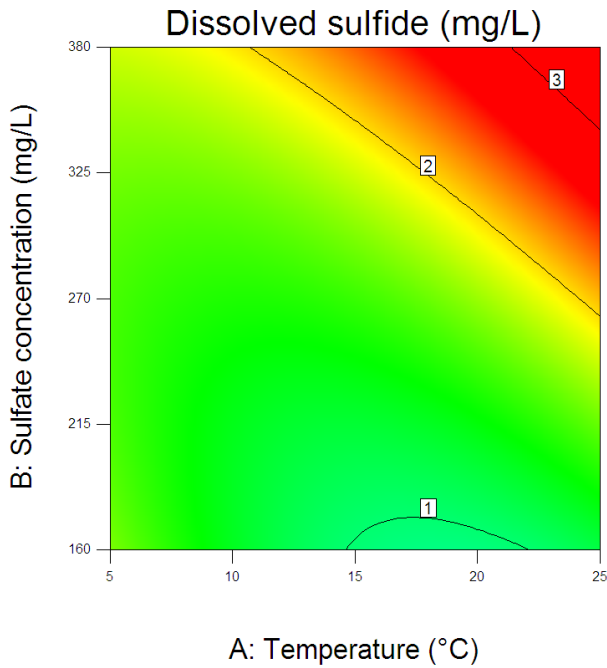
Figure 4-5 Variance between the experimental and the predicted dissolved sulfide concentrations: (a) predicted versus actual values and (b) Normal plot of residuals

Second, a validation of the model was required. This means that the model has to be in good agreement with the experimental value on the entire experimental domain studied. For that purpose, the lack of fit of the model was evaluated using a complete analysis of variance (ANOVA). According to the ANOVA results, the model F-value of 94.4 implied that the model was significant and that there was only 0.01% chance that that F-value could occur due to noise ($p < 0.0001$). Moreover, the lack of fit F-value and p-value were estimated at 2.85 and 0.17, respectively, which implied that the lack of fit was not significant. Moreover, the adequate precision was approximately 28.8, which was greater than the value of 4 (desirable ratio). According to these results, it can be concluded that the mathematical model established to predict the amount of aqueous sulfide produced was significant (Model p-value < 0.0001 , $R^2 = 0.994$) and fit the experimental results well (lack of fit non-significant).

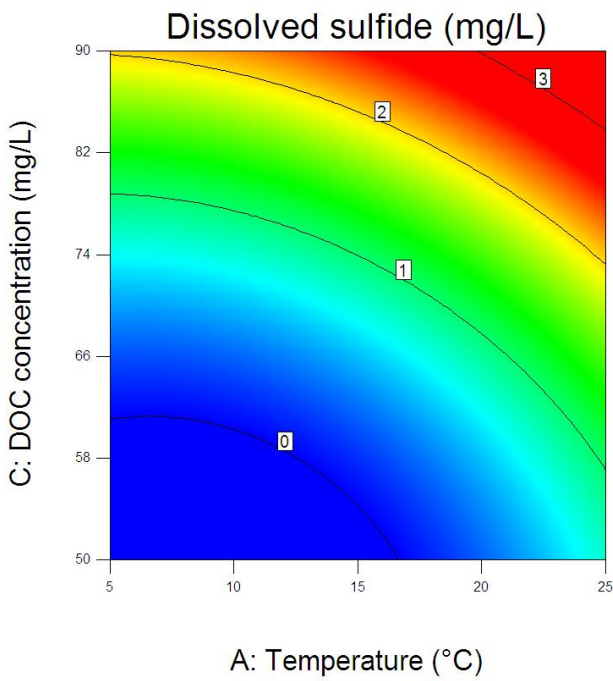
Once the quality of the mathematical model is confirmed using statistical tools, an exploitation of the model is required. Equation 4-6 presents the mathematical relationship, expressed in coded factor, obtained to predict the response depending on the factors tested. According to the ANOVA (results not shown), all terms (A, B, C, AB, AC, BC, A^2 , B^2 and C^2) were significant (p-value < 0.05). The sign of each coefficient in Equation 4-6 indicated the influence of the different factors and their interaction on the response. The production of aqueous sulfide was positively influenced by each of the factors studied (temperature, DOC and sulfate contents). Moreover, it appeared that the DOC content was the main parameter influencing the production of aqueous sulfide followed by the concentration of sulfate and the temperature.

Figure 4-6 presents the representation of the response (amount of aqueous sulfide produced) depending on two variables (temperature, DOC content and/or sulfate concentration). These representations show the positive influence of the temperature, the sulfate concentration and the DOC content on aqueous sulfide generation.

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Dissolved sulfide (mg/L)
 2.55
 0.001
 X1 = A: Temperature (°C)
 X2 = B: Sulfate concentration (mg/L)
 Actual Factor
 C: DOC concentration (mg/L) = 87.30



Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Dissolved sulfide (mg/L)
 2.55
 0.001
 X1 = A: Temperature (°C)
 X2 = C: DOC concentration (mg/L)
 Actual Factor
 B: Sulfate concentration (mg/L) = 371.08



Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Dissolved sulfide (mg/L)
 2.55
 0.001
 X1 = B: Sulfate concentration (mg/L)
 X2 = C: DOC concentration (mg/L)
 Actual Factor
 A: Temperature (°C) = 21.49

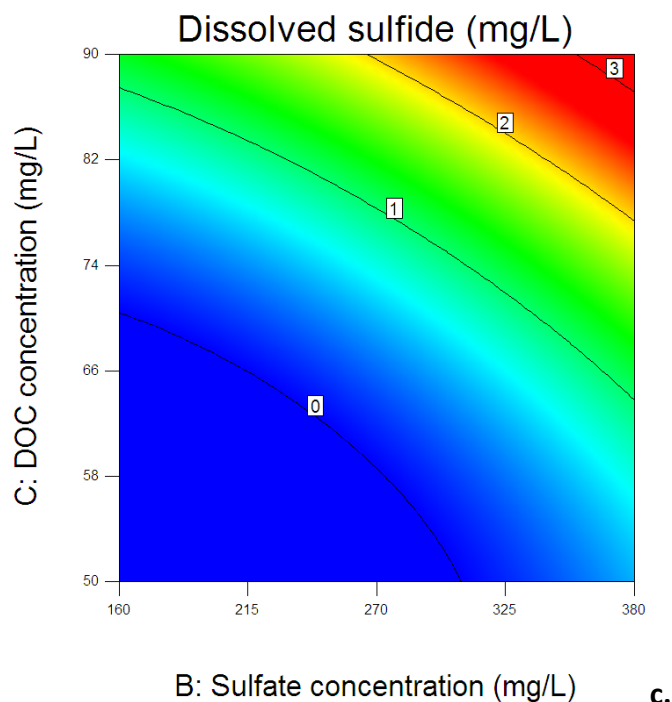


Figure 4-6 Response surface contour plot showing the effects of different variables on sulfide generation: (a) effect of the temperature and SO_4^{2-} concentration for a DOC content of 87.3 mg/L; (b) effect of the temperature and the DOC content for a SO_4^{2-} concentration of 371 mg/L and (c) effect of both SO_4^{2-} and DOC at a temperature of 21.5°C

Three additional experiments were conducted in triplicate to confirm the good provisional quality of the model and the experimental conditions favorable to the production of sulfide ($T = 25^\circ\text{C}$, initial DOC content = 90 mg/L and initial sulfates concentration = 160, 270 and 380 mg/L). Because of the difficulty of controlling all the parameters during biological assays, only two of three replicates produced sulfide. The 3rd replicate of each triplicate was thus removed from the analyses because no sulfide generation occurred. With 160 mg/L of sulfate, the highest amount of gaseous (24.0 ± 11.5 ppm) and aqueous (2.75 ± 0.95 mg S^{2-} /L) sulfide was produced after one week, whereas it occurred after 3 weeks for the experiments carried out in the presence of 270 and 380 mg SO_4^{2-} /L. For these two experiments, a gaseous sulfide

concentration of 100 ± 0 ppm and aqueous sulfide concentrations of 2.99 ± 0.50 and 2.61 ± 0.06 mg S^{2-} /L were observed.

Using Expert Design 8.0 software, numerous conditions allowing the generation of huge amounts of aqueous sulfides were suggested. Among them, it appeared that the following conditions ($T = 25^{\circ}\text{C}$, $[\text{SO}_4^{2-}] = 270$ mg/L and $[\text{DOC}] = 90$ mg/L) lead to a predicted amount of aqueous sulfide of 2.36 mg/L. Among the conditions proposed by the software, the conditions cited previously were the closest to the conditions that can occur during the infiltration of wastewater through the soil. Additional experiments were performed using the conditions cited previously to verify the amounts of aqueous and gaseous sulfide produced ($[\text{SO}_4^{2-}] = 270$ mg/L, $T = 25^{\circ}\text{C}$ and $[\text{DOC}] = 90$ mg/L). For the same period of fermentation (two weeks), the amount of aqueous sulfide produced (2.29 ± 0.07 mg S^{2-} /L) was very close to the value predicted by the mathematical model described in [Equation 4-6](#) (2.36 mg S^{2-} /L) for the following tested conditions: $T = 25^{\circ}\text{C}$, DOC content = 90 mg/L and sulfate concentration = 270 mg/L. The variance between the experimental and the predicted values obtained for the production of aqueous sulfide was estimated at 3.02%, allowing the validation of the critical conditions favorable to the production of sulfide from wastewater. All of the observations and the model developed during this study apply to a two-week fermentation using a specific inoculum and using domestic wastewater having specific characteristics. Sulfide generation using another wastewater could diverge from predicted values since the nature and the biodegradability of the organic matter could be different than that of the water tested in this study.

4.7 Conclusion

This study evaluated the critical operational conditions leading to sulfide generation in domestic wastewater treated by a sulfur-based denitrification process. Preliminary results showed that gaseous sulfide depends on the ORP and DOC values, while the dissolved sulfide depends on the ORP value and the sulfate concentration ($\text{ORP versus } \log([\text{H}_2\text{S}_{\text{aq}}]/[\text{SO}_4^{2-}])$). As initial ORP values could not be fixed and as ORP values depended on DOC, only DOC and sulfate values were fixed using a Box-Behnken design to determine if the production of gaseous and/or aqueous hydrogen sulfide could be predicted. The results highlighted that the production of gaseous sulfide requires high DOC and sulfate contents and that the production of aqueous

sulfide was significantly and positively influenced by the DOC content. The optimum tested conditions, from which a significant production of gaseous (100 ppm) and aqueous (2.29 mg S²⁻/L) sulfide was observed, were a temperature of 25°C, an initial DOC content of 90 mg/L and an initial concentration of sulfate of 270 mg/L. Comparing the critical operational conditions to those met in the effluent of the sulfur-utilizing denitrification process (DOC content = 9.4 mg/L), a higher DOC content (90 mg/L) was needed for the generation of sulfide at 25°C. These conditions are not likely to occur at the effluent of a sulfur-based denitrification process following a secondary treatment, suggesting that the risks to encounter sulfide and odor production during soil infiltration are very low.

4.8 Acknowledgments

The authors want to acknowledge the financial and technical support of Premier Tech Aqua as well as the financial support of the Research funds of Quebec Nature and Technology. The Natural Science and Engineering Research Council of Canada has also contributed to this research. We also thank Myriam Lazaar, who helped during her training for the preliminary experiments.

4.9 References

- Ben-Khaled, J. (2016). Couplage de la dénitrification autotrophe sur soufre aux systèmes de traitement biologique des eaux usées domestiques applicables au secteur de l'assainissement décentralisé. Thesis report, INRS, University of Quebec, Quebec, QC, Canada, 199 p.
- Bertolacini, R.J., Barney, J.E., 1957. Colorimetric determination of sulfate with barium chloranilate. *Anal. Chem. American Chem. Soc.* 29, 281–283.
- Blecon, G., 1985. Dénitrification autotrophique par *Thiobacillus denitrificans* sur soufre - Aspects microbiologiques et mise au point technologique. Thesis report, ENSC, Rennes, France.
- Byun, I.G., Lee, T.H., Kim, Y.O., Song, S.K., Park, T.J., 2004. Activity of sulphate reducing bacteria according to COD/SO₄⁽²⁻⁾ ratio of acrylonitrile wastewater containing high sulphate. *Water Sci. & Technol.* 49, 229-235.
- CEAEQ, 2016. Détermination de la demande chimique en oxygène : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium, MA. 315 – DCO 1.1, Rév. 4, Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques du Québec, Québec, QC, Canada, 12 p.
- Chang, Y.J., Chang, Y.T., Hung, C.H., 2008. The use of magnesium peroxide for the inhibition of sulfate-reducing bacteria under anoxic conditions. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.* 35, 1481-1491.
- Chung, J., Amin, K., Kim, S., Yoon, S., Kwon, K., Bae, W., 2014. Autotrophic denitrification of nitrate and nitrite using thiosulfate as an electron donor. *Water Res.* 58, 169-178.

- Cline, J.D., 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 13, 454-458.
- Delgado, S., Alvarez, M., Rodriguez-Gomez, L.E., Aguiar, E., 1999. H₂S generation in a reclaimed urban wastewater pipe. case study: Tenerife (Spain). *Water Res.* 33, 539-547.
- EPA, 2012. Water: Monitoring & Assessment. United States of Environmental Protection Agency, Available at the following adress: <http://water.epa.gov/type/rsll/monitoring/vms57.cfm>. Consulted on 20 09 2016.
- Gayle, B.P., Boardman, G.D., 1989. Biological denitrification of water. *Environ. Eng.* 115, 930-943.
- Ghafari, S., Hasan, M., Aroua, M.K., 2008. Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater—A review. *Bioresource Technol.* 99, 3965-3974.
- Ghorbel, L., Coudert, L., Gilbert, Y., Mercier, G., Blais, J.F., 2016. Assessment of sulfide production risk in soil during the infiltration of domestic wastewater treated by a sulfur-utilizing denitrification process. *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi: 10.1007/s11356-016-6979-4:1-13.
- Greben, H.A., Baloyi, L.J., Venter, S.N., 2007. Grass cellulose as cost-effective energy source for biological sulphate removal. *Water SA* 33, 729-734.
- Health Canada, 1992. Sulphide, Health Canada, Canada, 6 p.
- Hiscock, K.M., Lloyd, J.W., Lerner, D.N., 1991. Review of natural and artificial denitrification of groundwater. *Water Res.* 25, 1099-1111.

- Huan, N.H., Hai, N.X., Yem, T., Tuan, N.N., 2013. Factors effect to the sulfide generation rate in the TO LICH river, Vietnam. *ARPN J. Eng. Appl. Sci.* 8, 190-199.
- Kamoun, 2011. *Plans d'expériences et traitements de surface - Méthodologie des surfaces de réponses (MSR)*, Technique de l'ingénieur, Paris, France, 31 p.
- Koenig, A., Liu, L.H., 2002. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: continuous flow experiments in pilot-scale packed bed reactors. *J. Biotechnol.* 99, 161-171.
- Lampe, D.G., Zhang, T.C., 1996. Evaluation of sulfur-based autotrophic denitrification, *Proceedings of the HSRC/WERC Joint Conference on the Environment*, Albuquerque, New Mexico, USA, pp. 444-458.
- Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H, Pol, L.W.H, Lettinga, G., 1998. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 28, 41-88.
- Liu, H., Jiang, W., Wan, D., Qu, J., 2009. Study of a combined heterotrophic and sulfur autotrophic denitrification technology for removal of nitrate in water. *J. Hazard. Mater.* 169, 23-28.
- Liu, Z.H., Maszenan, A.M., Liu, Y., Ng, W.J., 2015. A brief review on possible approaches towards controlling sulfate-reducing bacteria (SRB) in wastewater treatment systems. *Desalination Water Treatment* 53, 2799-2807.
- Lv, X., Shao, M., Li, J., Xie, C., 2014. Nitrate removal with lateral flow sulphur autotrophic denitrification reactor. *Environ. Technol.* 35, 2692-2697.

- MDDEFP. 2014. Détermination de la demande chimique en oxygène : Méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium, MA. 315 – DCO 1.1, Rév. 3, Ministère du Développement Durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, Québec, QC, Canada, 11 p.
- Neculita, C.M., Zagury, G.J., 2008. Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization. *J. Hazard. Mater.* 157, 358-366.
- Sahinkaya, E., Kilic, A., 2014. Heterotrophic and elemental-sulfur-based autotrophic denitrification processes for simultaneous nitrate and Cr(VI) reduction. *Water Res.* 50, 278-286.
- Sun, Y., 2012. Denitrification and desulfurization with elemental sulfur and hydrogen sulfide. Thesis report, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada, 98 p.
- Van der Hoek, J.P., Hijnen, W., Van Bennekom, C.A., Mijnaerends, B.J., 1992. Optimization of the sulphur-limestone filtration process for nitrate removal from groundwater. *Aqua* 41, 209-218.
- Velasco, A., Ramírez, M., Volke-Sepúlveda, T., González-Sánchez, A., Revah, S., 2008. Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation. *J. Hazard. Mater.* 151, 407-413.
- WHO, 2004. Rolling revision of the WHO guidelines for drinking water quality. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 18 p.

Yeh, E., 2000. Raw sludge as substrate for sulphate-reducing bacteria. Thesis report, University of Toronto, Toronto, ON, Canada, 146 p.

Zhang, T.C., Shan, J., 1999. *In-situ* septic tank effluent denitrification using a sulfur-limestone process. Water Environ. Res. 71, 1283-1291.

Zhou, W., Sun, Y., Wu, B., Zhang, Y., Huang, M., Miyanaga, T., Zhang, Z., 2011. Autotrophic denitrification for nitrate and nitrite removal using sulfur-limestone. J. Environ. Sci. 23, 1761-1769.

ANNEXE 1

RÉCAPITULATIF DES PRINCIPAUX AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES PROCÉDÉS DE DÉNITRIFICATION AUTOTROPHE ET HÉTÉROTROPHE

	Dénitrification hétérotrophe	Dénitrification autotrophe
Avantages	<ul style="list-style-type: none">• Taux de croissance des bactéries hétérotrophes rapide• Cinétique de réaction rapide	<ul style="list-style-type: none">• Ne nécessite pas l'ajout de source de carbone organique• Faible coût• Autonomie (nécessite peu de maintenance)
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">• Nécessite une source de carbone organique (méthanol, éthanol, acide acétique, etc.)• Nécessite un post-traitement pour éliminer le carbone résiduel• Nécessite un entretien et une maintenance réguliers	<ul style="list-style-type: none">• Taux de croissance des bactéries autotrophes relativement lent• Production de sulfates par oxydation du soufre élémentaire

ANNEXE 2

CHOIX DU SABLE UTILISÉ POUR RECONSTITUER LES SOLS PERMÉABLE ET PEU PERMÉABLE

Taille des particules	D10	D60/D10	< 80 µm	> 2,5 mm
Sable filtrant	0,25 à 1,00 mm	≤ 4,5	< 3%	< 20%
Sable de construction	0,133 X	2,85 v	4,5 X	0 v
Sable de plage	0,25 v	1,94 v	0 v	0 v
Sable séché	0,215 X	2,41 v	1,56 v	0 v
Sable de jeu	0,19 X	2,72 v	1,77 v	0 v

v : Conforme **x : Pas conforme**

ANNEXE 3

CARACTÉRISATION INITIALE DES DIFFÉRENTS RÉACTEURS UTILISÉS POUR ÉVALUER L'INFLUENCE DES TENEURS EN SULFATES ET COD SUR LA PRODUCTION DE SULFURES

Réacteurs	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	7,5	7,7	7,7	7,8	7,7	7,6	7,5	7,5
POR (mV)	-46,2	-29,6	-23,4	-22,4	-19,4	-14,2	-10,8	-11,2
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	308	340	284	352	371	390	412	410
COD (mg/L)	45	42	43	42	56	70	77	86
DCO (mg/L)	190	162	203	251	248	152	220	327
N _{tot} (mg/L)	13	11	14	15	15	20	17	25
NH ₄ (mg/L)	8	7	10	12	13	18	16	24
NO _x (mg/L)	4	3	4	3	1	0,5	0,2	0,2
H ₂ S aqueux (mg S ²⁻ /L)	0,039	0,045	0,047	0,063	0,116	0,359	0,076	0,053
H ₂ S gazeux (ppm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

ANNEXE 4

ÉVOLUTION DES TENEURS EN SULFURES AQUEUX ET GAZEUX MESURÉS POUR LES DIFFÉRENTS RÉACTEURS EN FONCTION DU TEMPS

Temps (semaines)	Réacteurs	1	2	3	4	5	6	7	8
t=0	POR (mV)	-46,2	-29,6	-23,4	-22,4	-19,4	-14,2	-10,8	-11,2
	H ₂ S aqueux (mg/L)	0,039	0,045	0,047	0,063	0,116	0,359	0,076	0,053
	H ₂ S gazeux (ppm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
t=2	POR (mV)	65,3	78,2	98,3	102	-85,3	-118	-261	-276
	H ₂ S aqueux (mg/L)	0	0	0	0	0,406	0,595	0,823	0,795
	H ₂ S gazeux (ppm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,8	84	100
t=4	POR (mV)	126	107	167	161	171	84,8	-221	-321
	H ₂ S aqueux (mg/L)	0	0	0	0	0	0,002	1,166	1,022
	H ₂ S gazeux (ppm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	8	35
t=6	POR (mV)	75,6	88,3	79,9	74,2	21,8	-24,8	14,9	-169
	H ₂ S aqueux (mg/L)	0	0	0	0	0	0	0	0,616
	H ₂ S gazeux (ppm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	14,6
t=8	POR (mV)	142	123	1301	127	142	117	76,6	79,0
	H ₂ S aqueux (mg S ²⁻ /L)	0	0	0	0	0	0	0	0
	H ₂ S gazeux (ppm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

ANNEXE 5

CONCENTRATIONS EN SULFURES AQUEUX ET GAZEUX MESURÉES APRÈS 2 SEMAINES D'EXPÉRIMENTATION POUR LES 17 ESSAIS DU PLAN D'EXPÉRIENCES BOX-BEHNKEN

Run	Température (°C)	Concentration en sulfate (mg/L)	Concentration en COD (mg/L)	Concentration en sulfures aqueux (mg S ²⁻ /L)	Concentration en sulfures gazeux (ppm H ₂ S)
1	15	380	50	0,001	0,1
2	5	270	90	1,75	4,5
3	15	160	90	1,14	1,3
4	5	270	50	0,021	0,1
5	15	270	70	0,28	0,1
6	25	270	90	2,42	84,8
7	5	160	70	0,83	0,9
8	15	270	70	0,19	0,1
9	5	380	70	0,43	0,1
10	25	270	50	0,005	0,1
11	25	160	70	0,763	0,1
12	15	380	90	2,55	0,1
13	15	270	70	0,24	0,1
14	15	270	70	0,048	0,1
15	25	380	70	0,0159	0,1
16	15	160	50	0,0064	0,1
17	15	270	70	0,287	0,1

ANNEXE 6

CONCENTRATIONS EN SULFURES AQUEUX ET GAZEUX MESURÉES APRÈS 2 SEMAINES

D'EXPÉRIMENTATION POUR LES ESSAIS DE CONFIRMATION

(T = 25°C, [SO₄²⁻] = 270 mg/L, [COD] = 90 mg/L)

Triplicat	Température (°C)	Concentration en sulfate (mg/L)	Concentration en COD (mg/L)	Concentration en sulfures aqueux (mg S ²⁻ /L)	Concentration en sulfures gazeux (ppm H ₂ S)
1	25	270	90	0	0
2	25	270	90	2,23	100
3	25	270	90	2,34	100