

Université du Québec

Thèse

présentée à

l'Institut National de la Recherche Scientifique

(INRS-Eau)

comme exigence partielle

pour l'obtention du grade

de Philosophiae Doctor (Sciences de l'Eau)

par

Jean-François Blais

B. Sc. Biochimie

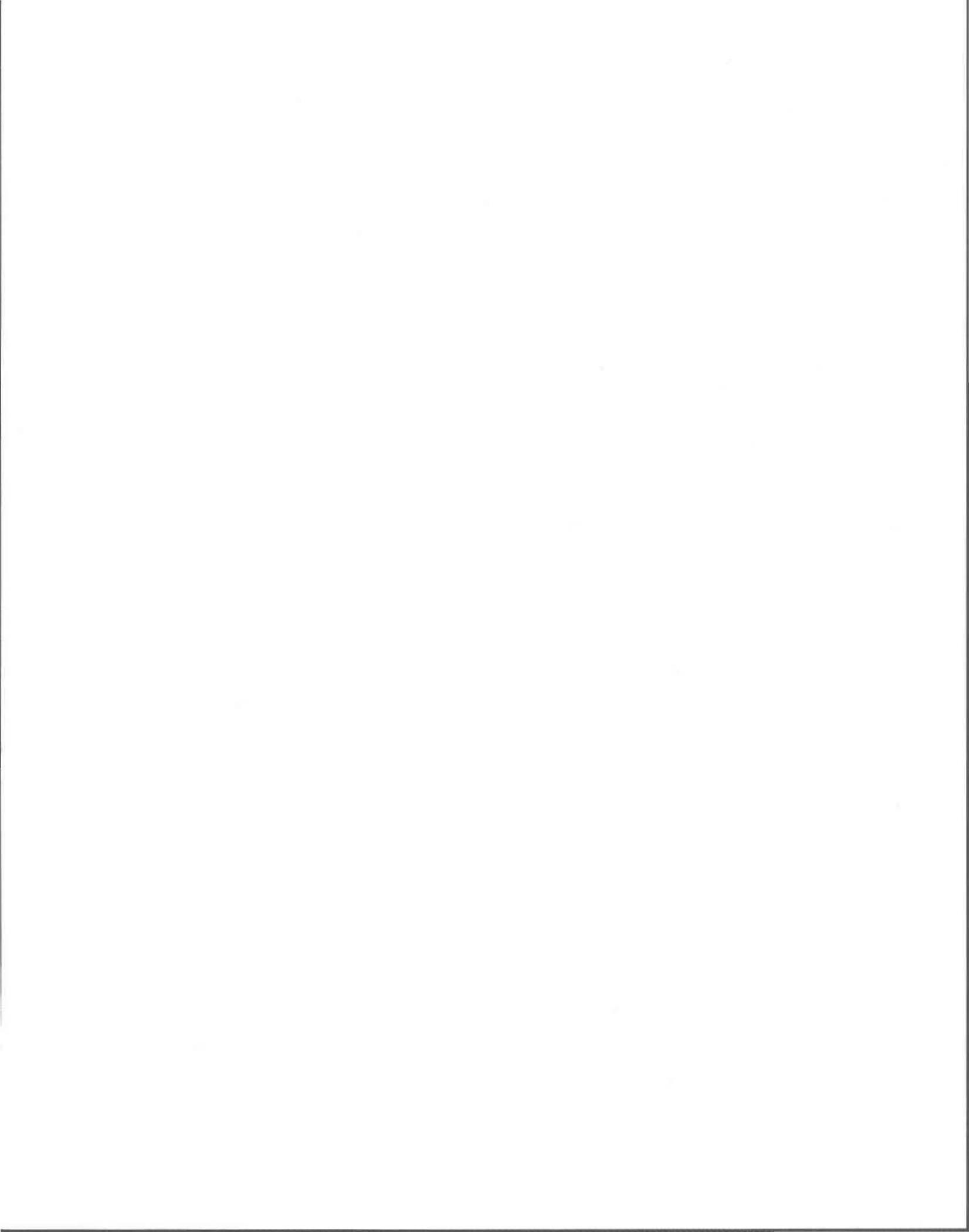
M. Sc. Microbiologie

Biolixiviation des métaux lourds des boues d'épuration municipales

I. Aspects microbiologiques

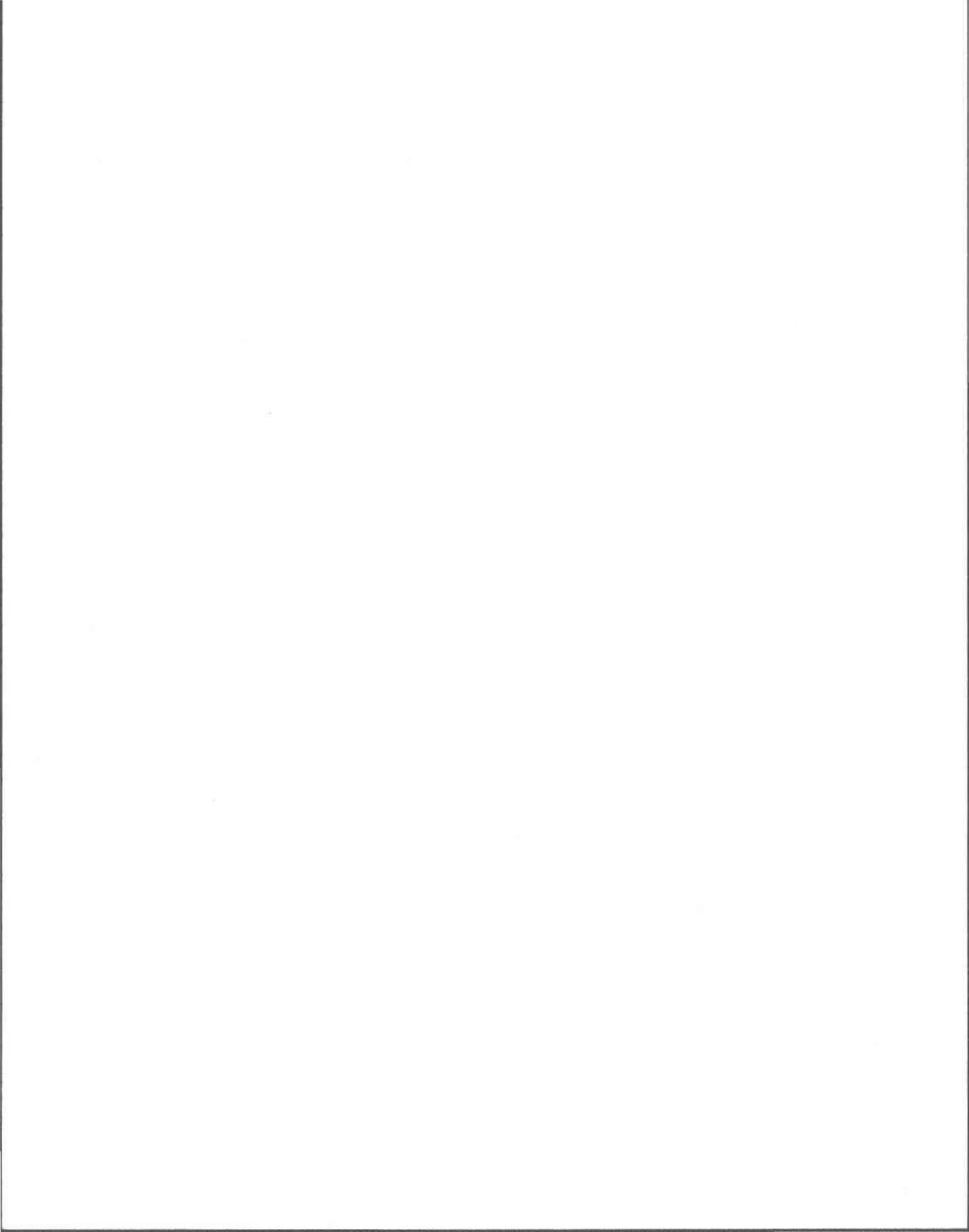
avril 1992

© Droits réservés de Jean-François Blais 1992



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr R.D. Tyagi mon directeur de thèse, et le Dr J.-C. Auclair mon codirecteur de thèse. J'ai apprécié leur disponibilité de tout instant et l'encouragement qu'ils m'ont apporté tout au long de mes travaux. Je remercie les professeurs R. Guay, M. Lavoie, P.G.C. Campbell et J.-L. Sasseville pour leur appui, ainsi que pour les commentaires pertinents qu'ils m'ont livrés. Je voudrais également témoigner de ma gratitude envers Monsieur R. Lafleur et Monsieur A. Pusterla, des gens forts compétents, pour leur aide et leurs précieux conseils. Je ne peux passer sous silence l'excellente contribution technique apportée par Mesdames A. Gravel et L. Deschênes et Monsieur S. Blackburn. Une grande reconnaissance également au personnel de l'INRS-Eau, le dévouement à leur travail leur fait honneur. J'aimerais remercier chaleureusement mon amie, Nathalie, pour le soutien moral et l'aide qu'elle m'a apportés tout au long de mes études. Finalement, je remercie l'INRS-Eau pour son soutien financier.



## PRÉFACE

Le développement de technologies biologiques efficaces et peu coûteuses d'enlèvement des métaux lourds présents dans les boues d'épuration municipales s'avère une avenue prometteuse pour faire face au problème croissant que représente la gestion de ces déchets d'origine domestique et industrielle. La présente étude a contribué significativement à la mise au point d'un tel procédé biologique notamment par la préparation d'un brevet d'invention déposé en avril 1991 (Tyagi R.D., J.F. Blais et J.C. Auclair (1991a) Semi-continuous bacterial leaching process. Brevet déposé au Canada et aux États-Unis, 30 avril, No. 07/693,65). Les travaux réalisés ont donné lieu également à la préparation de plusieurs articles scientifiques dont huit ont déjà été acceptés pour publication dans des revues internationales:

**Blais J.F., J.C. Auclair et R.D. Tyagi (1992) Cooperation between two *Thiobacillus* strains for heavy metals removal from municipal sludge. Can. J. Microbiol. 38, (sous presse).**

**Blais J.F., R.D. Tyagi et J.C. Auclair (1992) Bioleaching of metals from sewage sludge by indigenous sulfur-oxidizing bacteria. J. Environ. Eng. (ASCE), (sous presse).**

**Blais J.F., R.D. Tyagi, J.C. Auclair et M.C. Lavoie (1992) Indicator bacteria reduction in sewage sludge by a metal bioleaching process. Wat. Res. 26, 487-495.**

**Blais J.F., R.D. Tyagi, C.P. Huang et J.C. Auclair (1992) Comparaison of acid and microbial leaching for metal removal from municipal sludge. Wat. Sci. Technol. (sous presse).**

**Blais J.F., R.D. Tyagi et J.C. Auclair (1992) Bioleaching of metals from sewage sludge: Effects of temperature. Wat. Res. (sous presse).**

**Blais J.F., R.D. Tyagi et J.C. Auclair (1992) Bioleaching of metals from sewage sludge: Microorganisms and growth kinetics. Wat. Res. (sous presse).**

**Blais J.F., R.D. Tyagi et J.C. Auclair (1992) Metals removal from sewage sludge by indigenous iron-oxidizing bacteria. J. Environ. Sci. Hlth. (sous presse).**

Tyagi, R.D., **J.F. Blais**, N. Meunier et D. Kluepfel (1992) Biolixiviation des métaux lourds et stabilisation des boues d'épuration. Essai en bioréacteur opéré en mode cuvée. Can. J. Civ. Eng. (sous presse).

Plusieurs autres articles scientifiques ont été soumis à des revues spécialisées de niveau international et sont présentement en cours d'évaluation:

**Blais J.F.**, R.D. Tyagi et J.C. Auclair (1992) The effect of elevated metals and solids concentrations, and pH on thiobacilli growth and metal solubilization in sewage sludge. J. Wat. Pollut. Control Fed.

**Blais J.F.**, R.D. Tyagi, J.C. Auclair et R. Guay (1992) Extracellular appendages production by sulfur-oxidizing bacteria during colonization of elemental sulfur. Can. J. Microbiol.

Ravishankar B.R., **J.F. Blais**, H. Benmoussa et R.D. Tyagi (1992) Microbial oxidation of elemental sulfur on bioleaching of metals from sewage sludge. Can. J. Microbiol.

Benmoussa H, P.G.C. Campbell, R.D. Tyagi et **J.F. Blais** (1992) Lixiviation biologique des métaux toxiques et stabilisation des boues municipales. Wat. Pollut. Res. J. Can.

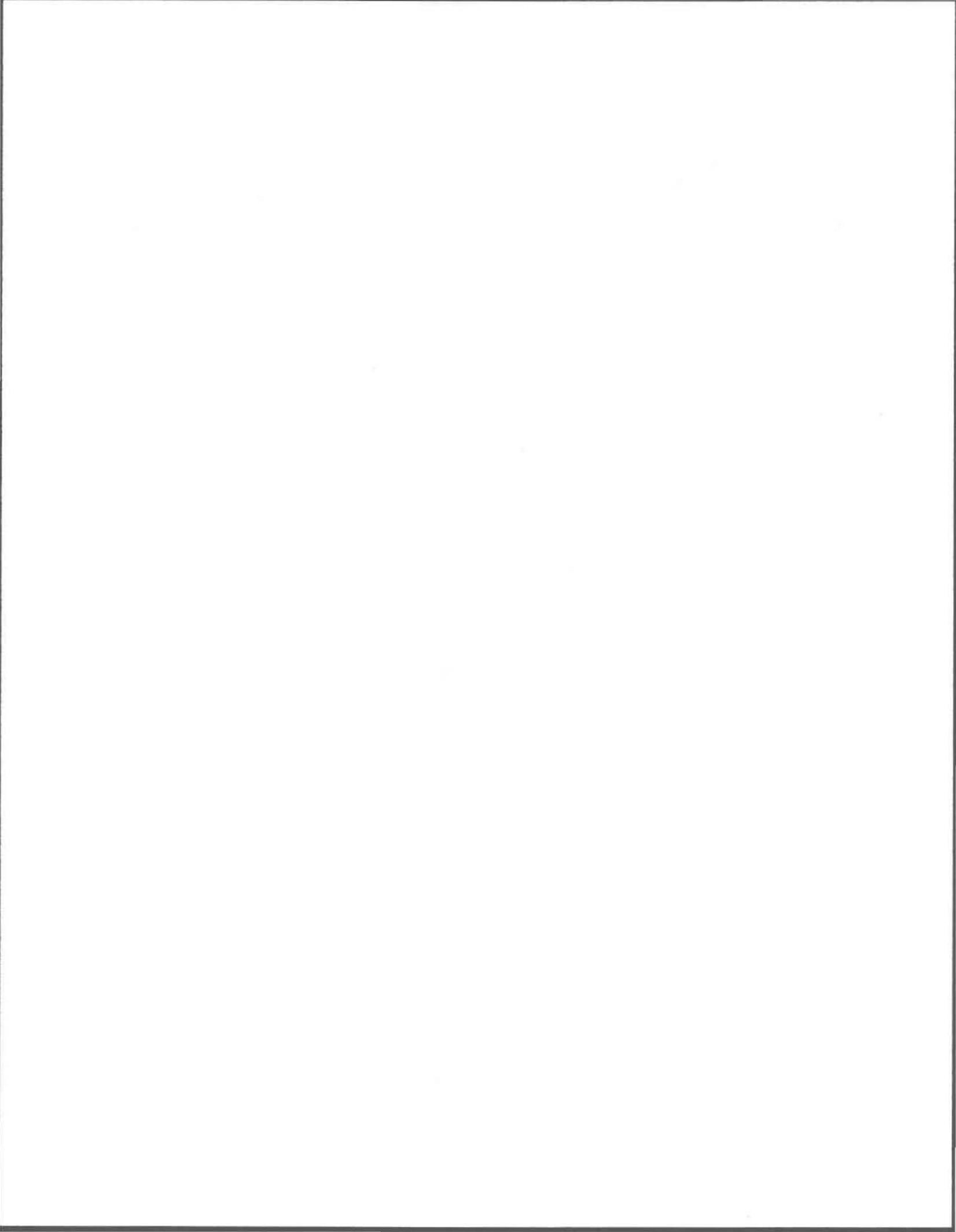
Tyagi R.D., **J.F. Blais** et J.C. Auclair (1992) Bacterial leaching of metals from sewage sludge by indigenous iron-oxidizing bacteria. Environ. Pollut.

Tyagi R.D., **J.F. Blais** et J.C. Auclair (1992) Simultaneous municipal sludge digestion and metal leaching. J. Environ. Sci. Hlth.

Tyagi R.D., **J.F. Blais**, L. Deschênes et J.P. Villeneuve (1992) Bioleaching of metals from sewage sludge: Metabolism of sulfur and thiosulfate oxidation. J. Environ. Qual.

Les travaux effectués au cours de ce projet de recherche ont également été présentés lors de diverses réunions scientifiques (conférence, congrès, symposium) tenues au Québec et à l'étranger:

- Blais J.F.**, R.D. Tyagi et J.C. Auclair (1990) Caractérisation de souches bactériennes actives pour l'enlèvement des métaux lourds des boues municipales. 6<sup>e</sup> Congrès régional de l'Est, Association Canadienne pour la Recherche sur la Pollution de l'Eau et sa Maîtrise, Compte rendu, 1 novembre, Montréal, Canada.
- Blais J.F.**, R.D. Tyagi, J.C. Auclair et A. Gravel (1990) Utilisation d'un procédé biologique de lixiviation des métaux lourds pour le remplacement de la stabilisation des boues municipales. 13<sup>e</sup> Symposium International sur le traitement des eaux usées et 2<sup>e</sup> Atelier sur l'eau potable, Compte rendu, 20-21 novembre, Montréal, Canada.
- Blais J.F.**, R.D. Tyagi et N. Meunier (1992) Microbial colonization of elemental sulfur in sewage sludge in relation to metal leaching. Water Quality International '92, IAWPRC 16th Biennial Conference & Exposition, Compte-rendu, 24-30 mai, Washington, D.C., U.S.A.
- Tyagi R.D., **J.F. Blais** et J.C. Auclair (1991) Simultaneous municipal sludge digestion and microbial metal leaching. 26<sup>e</sup> Symposium Canadien pour la Recherche sur la Pollution de l'Eau (ACRPEM), Compte rendu, 13-14 février, Burlington, Canada.
- Tyagi R.D., **J.F. Blais** et J.C. Auclair (1991) Simultaneous municipal sludge digestion and microbial metal leaching. Second Topical Pollution Prevention Conference, American Institute of Chemical Engineering, Compte rendu, 18-21 août, Pittsburgh, PA, U.S.A.
- Tyagi R.D., **J.F. Blais** et J.C. Auclair (1991) Simultaneous sludge digestion and microbial metal leaching. *Dans Heavy Metals in the Environment. International Conference.* Vol. 2, J.G. Farmer (Éditeur), CEP Consultants Ltd., Compte rendu, Edinbourg, Écosse, pp. 91-94.
- Deschênes L., R.D. Tyagi, **J.F. Blais**, P. Lafrance et J.P. Villeneuve (1991) Oxydation du soufre élémentaire dans la biolixiviation des métaux des boues d'épuration par la microflore indigène. 7<sup>e</sup> Congrès régional de l'Est, Association Canadienne pour la Recherche sur la Pollution de l'Eau et sa Maîtrise, Compte rendu, 16 septembre, Rimouski, Canada.



## RÉSUMÉ

La présence de teneurs élevées en métaux lourds dans les boues d'épuration est un facteur important limitant l'épandage agricole de cette biomasse. Au cours des dernières années, quelques techniques microbiologiques d'extraction des métaux lourds ont été examinées. Cette recherche a été destinée à établir les bases microbiologiques utiles au développement d'un procédé de biolixiviation des métaux toxiques associés aux boues municipales.

L'acclimatation de la microflore indigène au soufre et à l'ion ferreux, réalisées sur 23 échantillons de boue d'épuration provenant de 11 stations d'épuration du Québec, de l'Ontario, du Delaware et du Maryland a démontré que des populations microbiennes oxydant ces deux substrats sont présentes et actives dans toutes les boues d'épuration. Les essais de lixiviation des métaux effectués avec ces boues et les deux substrats ont donné des rendements adéquats quant à la décontamination des boues. De plus, les microflores acclimatées présentèrent un potentiel élevé de solubilisation des métaux dans les différents types de boues produites lors du traitement des eaux usées municipales (primaires, secondaires, digérées aérobies, digérées anaérobies, fossés d'oxydation). Il est donc possible d'extraire les métaux lourds des boues d'épuration simplement à partir de la flore microbienne présente dans ces environnements, sans avoir recours à des souches spécialisées.

Des dosages chimiques par cyanolyse ont attesté que l'oxydation du soufre élémentaire dans les boues se fait sans accumulation dans le milieu d'intermédiaires soufrés (thiosulfate, tétrathionate, trithionate). De plus, l'isolement des souches lixiviantes et les observations en microscopie électronique à balayage ont révélé que la production d'acide est effectuée par une

flore bactérienne composée presque exclusivement de thiobacilles. En fait, la biolixiviation avec le soufre s'opère par la croissance successive de thiobacilles acidifiants (peu-acidophiles et acidophiles). Dans un premier temps, les thiobacilles peu-acidophiles présents initialement dans les boues prélevées se multiplient en entraînant une acidification des boues aux environs de pH 4.0. À partir de ce point, les thiobacilles acidophiles provenant de l'inoculum se multiplient en provoquant une acidification plus poussée de la boue (pH < 2). La chute du pH à des valeurs inférieures à 3.0 élimine pratiquement les thiobacilles peu-acidophiles, leur nombre chute à moins de  $10^3$  UFC/mL. Ce type de succession bactérienne a été observé dans cinq des boues étudiées. Lors de l'acidification des boues, les thiobacilles peu-acidophiles croissent plus rapidement ( $t_d$ : 6.7 à 8.8 heures) que les thiobacilles acidophiles ( $t_d$ : 8.8 à 10.3 heures). Les cinétiques de production de sulfate dans les cinq boues testées sont comparables avec des taux maximums de production de sulfate variant de 0.055 à 0.075 g  $SO_4^{2-}$  / L x heure et des taux spécifiques maximums de production de sulfate ( $V_{max}$ ) étant estimés entre 1.4 et 2.3 g  $SO_4^{2-}$  / g cellules x heure.

Une caractérisation de la microflore acidifiante par isolement de souches bactériennes de 21 boues d'épuration (88 peu-acidophiles et 26 acidophiles) a permis de mettre en évidence que plusieurs espèces de thiobacilles peu-acidophiles participent à l'acidification des boues. Cependant, *Thiobacillus thioparus* représente l'espèce bactérienne la plus importante en termes de fréquence d'isolement, de concentrations de cellules et d'activité acidifiante. D'un autre côté, *Thiobacillus thiooxidans* est apparue être la seule espèce impliquée dans le groupe de thiobacilles acidophiles. Des essais de lixiviation effectués avec une culture mixte de deux types de thiobacilles (*Thiobacillus thioparus* ATCC 55127 et *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 55128) ont permis de vérifier l'importance et le rôle de ces deux espèces dans le procédé utilisant le soufre comme substrat. L'équilibre de ces deux populations bactériennes lors de l'acidification de la boue, et les constantes cinétiques de croissance qui ont été calculées, attestent que la croissance de ces deux microorganismes constitue un modèle fiable de l'activité

microbienne responsable de l'abaissement du pH par les microflore indigènes. L'observation en microscopie optique des cultures de bactéries oxydant l'ion ferreux provenant des 23 boues suggère que la biolixiviation avec sulfate ferreux est réalisée par *T. ferrooxidans*, la présence de *Leptospirillum ferrooxidans* n'ayant pas été notée. Il a également été montré que l'activité lixiviane mesurée lors des essais d'extraction des métaux effectués avec le sulfate ferreux comme substrat, pourrait résulter de la croissance des bactéries indigènes oxydant l'ion ferreux présents initialement dans les boues, plutôt que de la croissance des souches de collection de *T. ferrooxidans* ajoutées aux boues.

L'effet de la température sur les cinétiques de croissance des populations lixiviantes et de solubilisation des métaux a été évalué à des températures variant de 7° à 42°C. Les deux procédés sont fortement influencés par la température d'incubation et conséquemment, les coefficients de température ( $Q_{10}^{7-28}$ ) pour la solubilisation du cadmium, du cuivre, du nickel, et du zinc varie de 1.6 et 2.5. Les énergies d'activation correspondantes ont été mesurées et se situent entre 30 et 64 kJ/mole. Pour les deux procédés, la solubilisation des métaux est influencée par la température et obéit à une cinétique de réaction d'ordre un. L'énergie d'activation a été estimée pour la croissance des deux types de thiobacilles (acidophiles et peu acidophiles) à 42 kJ/mole, et le coefficient ( $Q_{10}^{7-28}$ ) à 1.8.

Les données obtenues démontrent également que l'extraction des métaux avec le procédé au soufre peut être réalisée à des concentrations élevées en solides (70 g/L). Des essais réalisés avec des boues ajustées initialement à différents pH, ont montré que ce paramètre affecte peu le système biologique de lixiviation avec soufre. L'ajout de concentrations élevées d'ions métalliques ( $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ ) dans les boues ne supprime pas non plus l'activité biologique, indiquant ainsi que des boues très fortement contaminées peuvent être traitées par le procédé au soufre.

Les effets de la biolixiviation au soufre sur certaines caractéristiques physico-chimiques et biologiques des boues ont également été explorés. Les données obtenues en cultures discontinues sur une période de quatre et cinq jours montrent que l'importante production d'acide sulfurique ( $\text{pH} < 2.5$ ) cause une élimination complète ( $< 10^3$  UFC/100 mL) des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux. De plus, le procédé peut également permettre une réduction des matières en suspension. Il faut cependant noter que l'acidification excessive de la boue ( $\text{pH} < 2$ ) entraîne une solubilisation importante de la matière organique (carbone), de l'azote et du phosphore. Le pH final atteint lors de la lixiviation doit donc être contrôlé (entre 2.0 et 2.5) afin d'éviter une perte importante de la valeur fertilisante des boues.



## TABLE DES MATIÈRES (suite)

	<u>Page</u>
CHAPITRE 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	35
3.1 Échantillonnage des boues d'épuration.....	37
3.2 Caractérisation des boues .....	37
3.3 Acclimatation de la microflore indigène lixiviante.....	39
3.3.1 soufre .....	39
3.3.2 ion ferreux.....	40
3.4 Mesure du potentiel de lixiviation .....	40
3.5 Dénombrement des populations microbiennes lixiviantes.....	40
3.6 Isolement et identification des populations lixiviantes.....	42
3.6.1 microflore oxydant le soufre .....	42
3.6.2 microflore oxydant l'ion ferreux.....	42
3.6.3 microscopie électronique à balayage.....	43
3.7 Caractérisation des souches VA-4 et VA-7.....	44
3.7.1 physiologie et métabolisme.....	44
3.7.2 études ultrastructurales.....	46
3.7.3 détermination du contenu en G+C% molaire de l'ADN.....	46
3.7.4 cinétiques de croissance dans la boue .....	47
3.8 Effets des paramètres .....	48
3.8.1 température .....	48
3.8.2 contenu en solides et pH initial.....	48
3.8.3 disponibilité du soufre .....	49
3.8.4 concentration en métaux dans les boues .....	49
3.9 Modifications des caractéristiques de la boue.....	49
3.9.1 destruction des bactéries indicatrices.....	49
3.9.2 réduction des solides des boues.....	50
3.9.3 solubilisation de la matière organique .....	51
3.9.4 mesure de la production d'intermédiaires.....	51

## TABLE DES MATIÈRES (suite)

	<u>Page</u>
CHAPITRE 4      ACCLIMATATION ET POTENTIEL LIXIVIA NT DE LA MICROFLORE INDIGÈNE DES BOUES .....	53
4.1      Acclimatation de la microflore indigène lixivian te.....	55
4.1.1      soufre .....	56
4.1.2      ion ferreux.....	60
4.2      Essais de lixiviation.....	61
4.2.1      composition en métaux dans les boues .....	64
4.2.2      microflore oxydant le soufre .....	68
4.2.3      microflore oxydant l'ion ferreux.....	69
4.2.4      acide sulfurique .....	72
4.2.5      comparaison des procédés.....	73
 CHAPITRE 5      CARACTÉRISATION DE LA MICROFLORE INDIGÈNE LIXIVIAN TE .....	 89
5.1      Microflore lixivian te dans les boues brutes .....	91
5.2      Microflore acclimatée .....	96
5.3      Isolement et identification des populations lixivian tes .....	97
5.3.1      microflore oxydant le soufre .....	97
5.3.2      microflore oxydant l'ion ferreux.....	101
5.3.3      activité des isolats.....	102
5.4      Étude de la colonisation du substrat.....	103
5.4.1      microflore indigène dans les boues.....	107
5.4.2      cultures pures .....	111
5.5      Cinétiques de croissance des populations pendant la lixiviation .....	133
5.6      Caractérisation des isolats VA-4 et VA-7.....	139
5.6.1      physiologie et métabolisme.....	140
5.6.2      cinétique de croissance.....	140
5.6.3      solubilisation des métaux .....	151

## TABLE DES MATIÈRES (suite)

	<u>Page</u>
CHAPITRE 6    EFFETS DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LES CINÉTIQUES DE CROISSANCE DES POPULATIONS LIXIVIANTES .....	161
6.1    Température.....	163
6.2    Contenu en solides des boues .....	188
6.3    pH initial.....	194
6.4    Substrat.....	196
6.5    Concentration en métaux .....	203
CHAPITRE 7    IMPACTS DU PROCÉDÉ AVEC LE SOUFRE SUR LES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES BOUES D'ÉPURATION.....	211
7.1    Élimination des bactéries indicatrices .....	214
7.2    Modifications des solides des boues .....	223
CHAPITRE 8    CONCLUSIONS.....	231
8.1    Développement des connaissances .....	233
8.2    Limites et possibilités de la technologie .....	237
BIBLIOGRAPHIE.....	241

## LISTE DES TABLEAUX

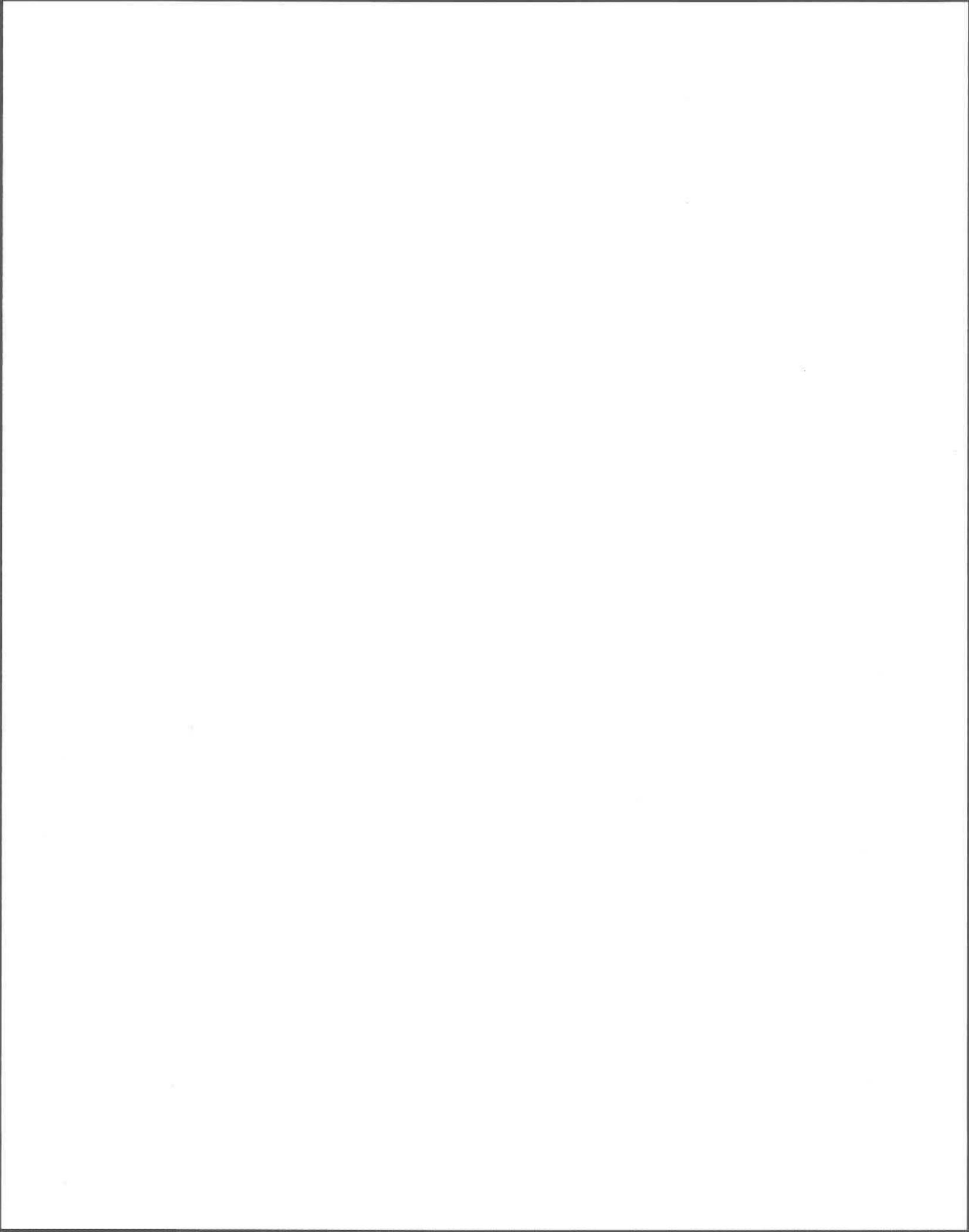
		<u>Page</u>
Tableau 1	Valeur fertilisante des boues d'épuration du Québec, des États-Unis et du Royaume-Uni (% de matière sèche) .....	11
Tableau 2.	Utilisation annuelle de l'azote, du phosphore et du potassium par différentes cultures végétales (EPA, 1981).....	11
Tableau 3.	Composition moyenne en métaux lourds des boues d'épuration et teneurs limites obligatoires et recommandées pour l'épandage agricole.....	15
Tableau 4.	Liste des espèces bactériennes retrouvées dans le genre <i>Thiobacillus</i>	25
Tableau 5.	Liste des boues d'épuration prélevées pour cette étude .....	38
Tableau 6.	Conditions expérimentales utilisées pour les procédés de lixiviation des métaux.....	41
Tableau 7.	Acclimatation microbienne mesurée par le temps requis (heures) pour l'acidification (pH 2) des boues par la microflore oxydant le soufre, et pour l'augmentation du potentiel d'oxydo-réduction (500 mV) par la microflore oxydant l'ion ferreux.....	57
Tableau 8	Contenu (mg/kg de boue sèche) en métaux des boues d'épuration utilisées dans cette étude et teneurs recommandées pour l'épandage agricole.....	65
Tableau 9	Contenu (mg/L de boue) en métaux des boues d'épuration utilisées dans cette étude .....	66
Tableau 10	Pourcentage de solubilisation des métaux toxiques requis pour permettre l'utilisation agricole des boues utilisées dans cette étude...	67
Tableau 11.	Rendements de solubilisation des métaux dans les boues après cinq jours de biolixiviation avec 0.5% de soufre ajouté .....	70
Tableau 12.	Production de sulfate, acidification et pourcentage de substrat oxydé après cinq jours de lixiviation microbienne avec la microflore oxydant le soufre .....	71
Tableau 13.	Rendements de solubilisation des métaux dans les boues après dix jours de biolixiviation avec 0.5% de sulfate ferreux.....	78

## LISTE DES TABLEAUX (suite)

		<u>Page</u>
Tableau 14.	Augmentation du POR et acidification après dix jours de lixiviation microbienne avec la microflore oxydant l'ion ferreux.....	79
Tableau 15.	Rendements de solubilisation des métaux après 24 heures de lixiviation chimique avec de l'acide sulfurique.....	80
Tableau 16.	Quantités d'acide requises pour acidifier les boues d'épuration.....	81
Tableau 17.	Valeurs de pH et de POR finales dans les groupes de boues obtenues par les trois procédés de lixiviation.....	83
Tableau 18.	Variation temporelle des populations de thiobacilles dans les boues d'épuration .....	95
Tableau 19.	Dénombrement des populations de thiobacilles dans les groupes de boues.....	96
Tableau 20.	Répartition des isolats dans les groupes de thiobacilles peu-acidophiles .....	101
Tableau 21.	Variation du pH, du POR et de la production de sulfate après cinq jours de lixiviation microbienne en présence de soufre .....	134
Tableau 22.	Rendements de solubilisation des métaux dans les boues après 5 jours de biolixiviation avec 0.5% de soufre ajouté .....	135
Tableau 23.	Paramètres cinétiques de croissance dans les boues des microflores oxydant le soufre .....	139
Tableau 24.	Paramètres cinétiques de croissance des isolats en milieu synthétique, et dans la boue autoclavée de Valcartier (boue S).....	151
Tableau 25.	Rendements de solubilisation des métaux dans les boues après 5 jours de lixiviation avec les souches VA-4 et VA-7 .....	153
Tableau 26.	Temps de biolixiviation requis (heures) pour atteindre 60% de solubilisation des métaux ( $t_{60\%}$ ) à différentes températures.....	174
Tableau 27.	Temps de génération ( $t_d$ ) et taux spécifiques maximums de croissance ( $\mu_{max}$ ) des thiobacilles dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) à différentes températures .....	175

## LISTE DES TABLEAUX (suite)

		<u>Page</u>
Tableau 28.	Constantes cinétiques ( $\text{jour}^{-1}$ ) de solubilisation des métaux dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) aux différentes températures.....	186
Tableau 29.	Énergies d'activation ( $E_a$ ) et coefficient de température ( $Q_{10}$ ) de la solubilisation des métaux et de la croissance bactérienne pour l'intervalle de température 7 à 28 °C.....	187
Tableau 30.	Paramètres cinétiques de croissance de la microflore oxydant le soufre, dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) ajustée à différents pH et à différentes concentrations en solides.....	193
Tableau 31.	Rendements de solubilisation des métaux après 5 jours de biolixiviation dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) ajustée à différents pH et concentrations en solides.....	194
Tableau 32.	Réductions des coliformes totaux dans les boues d'épuration après 5 jours de biolixiviation avec 0.5% de soufre.....	222
Tableau 33.	Variations des solides dans les boues après cinq jours de biolixiviation avec 0.5% de soufre.....	225



## LISTE DES FIGURES

		<u>Page</u>
Figure 1.	Adaptation de la microflore oxydant le soufre déterminée par l'acidification de la boue de Beauceville. (A) secondaire (boue A); (B) digérée aérobie (boue B).....	58
Figure 2.	Adaptation de la microflore oxydant l'ion ferreux mesurée par l'augmentation du POR et par l'acidification de la boue (A) digérée aérobie de Black Lake (boue D); (B) digérée anaérobie de Valcartier (boue S3).....	62
Figure 3.	Variation du pH, production de sulfate et solubilisation des métaux dans la boue de Ste-Claire, pendant la biolixiviation avec la microflore oxydant le soufre. (A) secondaire (boue K); (B) digérée aérobie (boue L2).....	74
Figure 4.	Augmentation du POR, acidification et solubilisation des métaux dans la boue de Ste-Claire, pendant la biolixiviation avec la microflore oxydant l'ion ferreux. (A) secondaire (boue K); (B) digérée aérobie (boue L2).....	76
Figure 5.	Rendements de solubilisation des métaux pour les divers groupes de boues obtenus après lixiviation par les trois procédés.....	86
Figure 6.	Dénombrement des thiobacilles dans les boues d'épuration prélevées. (A) Peu-acidophiles; (B) Acidophiles.....	92
Figure 7.	Dénombrement des thiobacilles acidophiles dans la microflore des boues, adaptée à l'oxydation du soufre.....	98
Figure 8.	Abaissement du pH lors de la croissance de thiobacilles peu-acidophiles en présence de 0.5% de soufre. (A) en milieu synthétique; (B) dans la boue autoclavée digérée aérobie de Black Lake (boue D2); (C) dans la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S3).....	104
Figure 9.	Abaissement du pH lors de la croissance de thiobacilles acidophiles en présence de 0.5% de soufre. (A) en milieu synthétique; (B) dans la boue autoclavée digérée aérobie de Black Lake (boue D2); (C) dans la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S3)...	108

## LISTE DES FIGURES (suite)

		<u>Page</u>
Figure 10.	Augmentation du POR et acidification de la boue lors de la croissance des souches bactériennes en présence de 0.5% de sulfate ferreux. (A) dans la boue digérée aérobie de Black Lake autoclavée (boue D2); (B) dans la boue digérée anaérobie de Valcartier autoclavée (boue S3).....	112
Figure 11.	Photomicrographies électroniques à balayage montrant la surface du soufre lors de la lixiviation microbienne dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2). (A) avant lixiviation; (B) après cinq jours de lixiviation. ....	114
Figure 12.	Colonisation du soufre élémentaire par la microflore oxydant le soufre après 5 jours de lixiviation. (A) boue digérée aérobie de Cowansville (boue H); (B et D) boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2).....	117
Figure 13.	Colonisation du soufre élémentaire par <i>T. thiooxidans</i> après cinq jours d'incubation. (A) ATCC 55128 en milieu synthétique; (B) ATCC 19377 en milieu synthétique; (C et D) ATCC 55128 dans la boue de Valcartier autoclavée (boue S3).....	123
Figure 14.	Colonisation du soufre élémentaire par <i>T. thioparus</i> ATCC 55127 après cinq jours d'incubation. (A) en milieu synthétique; (B) dans la boue digérée anaérobie de Valcartier autoclavée (boue S3).....	129
Figure 15.	Production de sulfate, abaissement du pH et croissance des populations microbiennes oxydant le soufre dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2).....	136
Figure 16.	Photomicrographies électroniques montrant des sections minces de (A) isolat VA-7, (B à D) isolat VA-4.....	141
Figure 17.	Production de sulfate, abaissement du pH et croissance des isolats dans la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S)....	148
Figure 18.	Abaissement du pH de la boue digérée anaérobie de Valcartier (boue S) durant la croissance des souches VA-4 et VA-7 en présence de 0.5% de soufre. ....	154

## LISTE DES FIGURES (suite)

		<u>Page</u>
Figure 19.	Abaissement du pH de la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S) durant la croissance des thiobacilles en présence de 0.5% de soufre. ....	156
Figure 20.	Variation du pH, du POR et du fer soluble dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) pendant la biolixiviation avec sulfate ferreux aux diverses températures. ....	166
Figure 21.	Variation du pH, du POR et production de sulfate dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) pendant la biolixiviation avec soufre aux diverses températures. ....	168
Figure 22.	Solubilisation des métaux de la boue digérée aérobie de Black lake (D2) aux diverses températures pendant la biolixiviation avec sulfate ferreux. (A) Cadmium; (B) Cuivre; (C) Manganèse; (D) Nickel; (E) Zinc. ....	170
Figure 23.	Solubilisation des métaux de la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) aux diverses températures pendant la biolixiviation avec soufre. (A) Cadmium; (B) Cuivre; (C) Manganèse; (D) Nickel; (E) Zinc..	172
Figure 24.	Croissance des microorganismes oxydant le soufre dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) durant la biolixiviation aux diverses températures. (A) Peu-acidophiles; (B) Acidophiles.....	176
Figure 25.	Courbes d'Arrhénius des taux de solubilisation des métaux pour le procédé de lixiviation microbienne avec sulfate ferreux dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2). (A) Cadmium; (B) Cuivre; (C) Nickel et (D) Zinc.....	180
Figure 26.	Courbes d'Arrhénius des taux de solubilisation des métaux pour le procédé de lixiviation microbienne avec soufre dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2). (A) Cadmium; (B) Cuivre; (C) Nickel et (D) Zinc.....	182
Figure 27.	Courbes d'Arrhénius des taux spécifiques maximums de croissance dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) des microorganismes oxydant le soufre. (A) Peu-acidophiles; (B) Acidophiles.....	184

## LISTE DES FIGURES (suite)

		<u>Page</u>
Figure 28.	Cinétiques de production de sulfate (B), d'abaissement du pH (A) et de croissance des microorganismes oxydant le soufre (C, D) dans la boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2) ajustée à différentes concentrations de solides.....	190
Figure 29.	Cinétiques de production de sulfate (B), d'abaissement du pH (A) et de croissance des microorganismes oxydant le soufre (C, D) dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) ajustée à divers pH initiaux.....	197
Figure 30.	Variation du pH et production de sulfate lors de la lixiviation microbienne dans la boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2) avec 0.5% de différentes formes de soufre.....	200
Figure 31.	Effets de l'ajout de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) sur l'activité lixiviante de la microflore oxydant le soufre dans la boue digérée aérobie de Black lake (boue D2) .....	205
Figure 32.	Effets de l'ajout de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) sur l'activité lixiviante de la microflore oxydant le soufre dans la boue digérée aérobie de Black lake (boue D2) .....	208
Figure 33.	Variations des populations microbiennes, du pH et du POR dans la boue contrôle sans soufre de Black Lake (boue C).....	216
Figure 34.	Variations des populations microbiennes, du pH et du POR dans la boue non-concentrée (4,8 g/L) de Black Lake (boue C, additionnée de 0.5% de soufre).....	218
Figure 35.	Variations des populations microbiennes, du pH et du POR dans la boue concentrée (17,4 g/L) de Black Lake (boue C, additionnée de 0.5% de soufre).....	220
Figure 36.	Modifications des concentrations de carbone et de phosphore dans la fraction soluble de la boue lors de la lixiviation microbienne avec soufre. (A) boue secondaire de St-Georges (boue N); (B) boue digérée anaérobie de Valcartier (boue S3) .....	226
Figure 37.	Schéma proposé pour le procédé d'extraction des métaux toxiques des boues d'épuration par biolixiviation avec le soufre .....	229

## INTRODUCTION

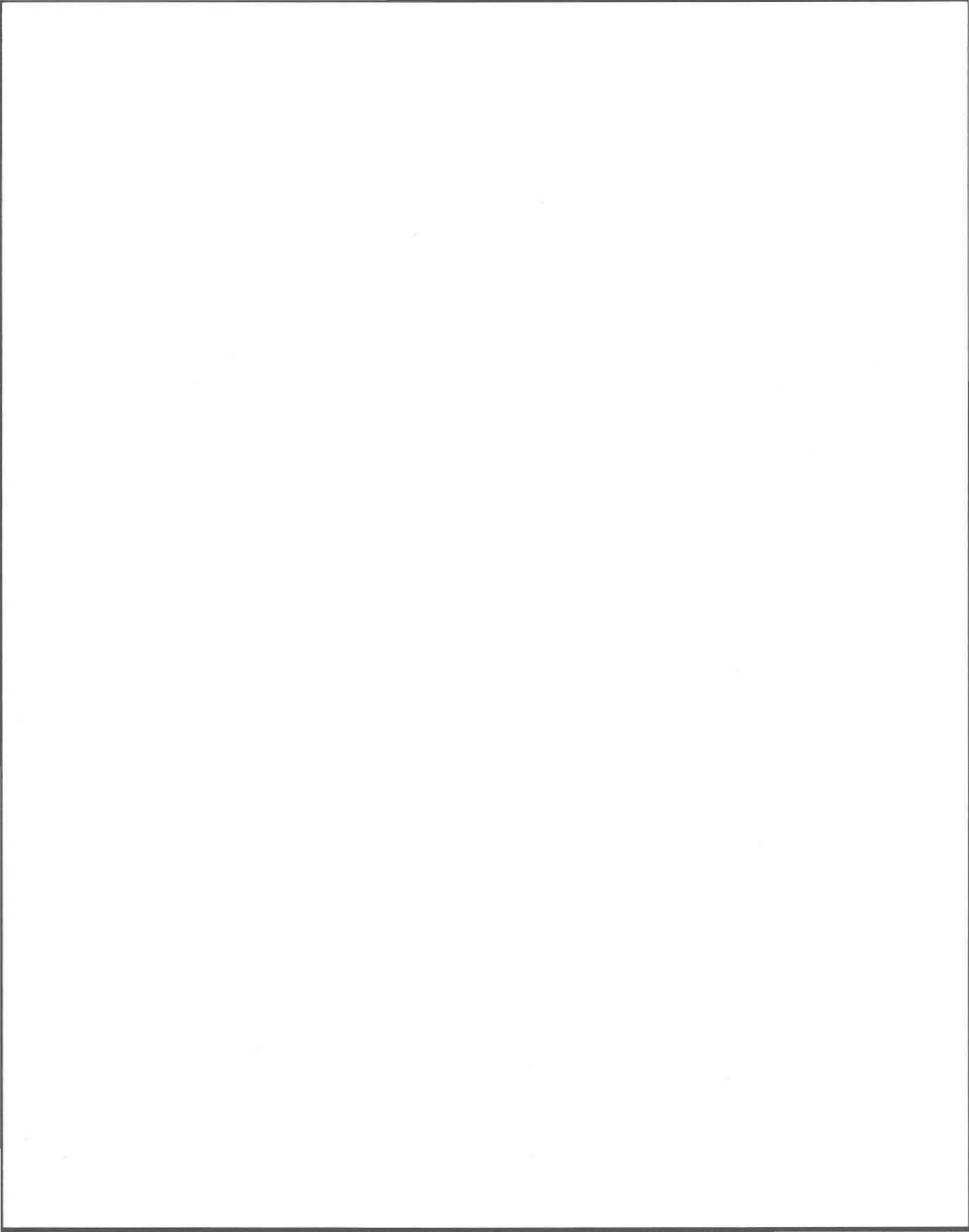
La vigilance accrue de la population en matière d'environnement a conduit les différentes autorités publiques à examiner différentes alternatives pour contrer les problèmes de pollution. Ainsi, dans la dernière décade, plusieurs programmes de redressement de la qualité de l'environnement ont été implantés. En ce qui a trait au problème de la pollution de l'eau, les gouvernements ont mis sur pied des programmes plus adéquats d'assainissement des eaux usées municipales. En considérant les différentes options possibles pour la gestion des boues d'épuration municipales, il appert que la disposition finale des boues peut être atteinte soit par la valorisation de cette biomasse ou par l'élimination de ces rejets. Le choix de l'une ou l'autre des solutions est guidé par la nécessité de tenir compte des conditions économiques, de facteurs sanitaires, des contraintes technologiques et des impacts environnementaux. À l'heure actuelle, l'application des boues sur les terres agricoles semble être l'option privilégiée par les autorités concernées. Néanmoins, l'usage de cette méthode de disposition, tout comme c'est le cas pour l'enfouissement sanitaire et l'incinération, est fortement inhibée par la présence des métaux lourds associés aux boues. L'enlèvement de ces éléments potentiellement toxiques est donc un préalable indispensable à la gestion adéquate de ces déchets urbains.

Depuis 1975, plusieurs procédés chimiques ont été examinés, mais jusqu'à maintenant, aucun procédé simple, économique et efficace n'a été implanté pour le traitement des boues provenant d'eaux usées municipales. La biolixiviation des métaux des boues est étudiée depuis quelques années à l'INRS-Eau; ces recherches ont cependant été centrées sur l'optimisation de procédés d'extraction des métaux. La mise en opération d'une biotechnologie à l'échelle industrielle requiert toutefois une connaissance de base des processus biologiques associés au

procédé, afin d'établir les limites d'opération de la technologie, et de prédire et de corriger plus aisément certaines difficultés opératoires. La présente étude est donc consacrée au développement des connaissances microbiologiques et des notions écologiques associées à la biolixiviation des métaux lourds des boues d'épuration.

La démarche expérimentale a consisté tout d'abord à démontrer le potentiel lixiviant de la microflore indigène des boues d'épuration. Par la suite, les microorganismes responsables de la solubilisation des métaux toxiques ont été isolés et caractérisés. Les cinétiques de croissance des populations lixiviantes durant le procédé ont été évaluées, ainsi que la coopération entre les espèces microbiennes. Les effets de quelques paramètres sur la croissance des microorganismes ont également été mesurés. Finalement, les impacts de la biolixiviation sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des boues ont été examinés dans le cadre d'une disposition finale des boues en agriculture.

## CHAPITRE 1



## CHAPITRE 1

### PROBLÉMATIQUE DE LA DISPOSITION DES BOUES D'ÉPURATION

Le traitement des eaux usées des usines d'épuration municipales permet le rejet, dans le milieu, d'une eau de qualité acceptable, mais génère inévitablement un résidu appelé boue résiduaire. L'élimination de ces boues, constituées de matières organiques riches en éléments nutritifs, représente l'un des plus importants défis auxquels les ingénieurs et gestionnaires sanitaires doivent faire face actuellement.

#### 1.1 Production et élimination des boues

Les quantités croissantes de boues générées par le traitement des eaux usées municipales posent de sérieux problèmes quant à la disposition de ces résidus. Ainsi, la production annuelle de boues au Canada pour la fin du siècle devrait atteindre le million de tonnes, dont environ 20% origine du Québec (Webber, 1986). De même, la production américaine et européenne pour l'année 1990 est estimée à 8 et 10 millions de tonnes respectivement (EPA, 1990; Scheltinga, 1987), et elle devrait doubler d'ici la fin du siècle (Bowen et al., 1989). En 1981, environ 50% de la population canadienne bénéficiait de stations d'épuration des eaux usées. Actuellement, en Colombie Britannique, en Alberta, en Saskatchewan, au Manitoba, en Ontario, à l'île-du-Prince-Édouard et au Yukon, toutes les eaux usées transportées par des réseaux d'égouts sont épurées. Ce n'est pas le cas au Québec,

au Nouveau-Brunswick, en Nouvelle-Écosse, à Terre-Neuve et dans les Territoires du Nord-Ouest. Au Québec, les eaux usées brutes déversées dans les cours d'eau et les lacs ont causé de sérieux problèmes de pollution (Webber, 1988). Le programme d'assainissement des eaux du Gouvernement du Québec prévoit que le traitement des eaux usées touchera 85% de la population d'ici la fin du siècle (Couillard et al., 1986; Crowley et al., 1986).

Les coûts de traitement et d'élimination des boues pouvant représenter plus de 50% du budget de la station d'épuration (Vesilind, 1980), il est donc indispensable de trouver des solutions économiques pour faire face à l'accroissement de la production de boues lors du traitement des eaux usées municipales. Les programmes d'épuration des eaux usées ayant comme objectif principal d'améliorer la qualité de l'environnement, l'élimination du sous-produit de ce traitement doit également demeurer conforme à cette vision. Plusieurs alternatives sont actuellement à l'étude pour amener des solutions au problème de l'élimination finale des boues. Néanmoins, en pratique, les modes de disposition utilisées sont l'enfouissement sanitaire, l'incinération, le rejet en mer, et l'épandage agricole.

#### 1.1.1 Enfouissement sanitaire

L'enfouissement des boues dans des décharges contrôlées a longtemps été et continue d'être une technique de disposition des boues largement utilisée; près de 40% des boues produites en Europe, et 20% aux États-Unis sont ainsi éliminées (Bowden, 1987; EPA, 1990). Toutefois, la réduction du nombre de sites appropriés et la hausse de la taxe d'enfouissement causent une diminution appréciable de l'intérêt pour cette option (EPA, 1984; Webber, 1986). Ainsi, au Canada 37% des boues produites étaient enfouies en 1981, alors qu'en 1987 cette proportion passait à environ 20%. La contamination des eaux souterraines par les métaux lourds présents dans les boues constitue également un facteur exerçant de plus en plus de pressions pour que cesse cette pratique (EPA, 1984; Webber, 1986).

### 1.1.2 Incinération

L'incinération offre certes des avantages significatifs par rapport aux autres moyens de disposition des boues; elle réduit à environ 20% le volume que constitue les solides des boues, et élimine quelques problèmes environnementaux potentiels en détruisant complètement les organismes pathogènes et en dégradant plusieurs composés organiques toxiques. Les métaux, cependant, se retrouvent dans les cendres compromettant ainsi la disposition sécuritaire de ces résidus (EPA, 1984). L'incinération est une pratique particulièrement onéreuse (> \$ 500 Can/ tm, EPA (1984)) car la déshydratation, la combustion et l'épuration des substances toxiques des gaz de carneau requièrent des quantités appréciables d'énergie. L'entretien des installations est également dispendieux et l'opération du four ne peut être assignée qu'à du personnel hautement qualifié (EPA, 1984; Webber, 1986). L'émission possible de mercure et de cadmium lors de la combustion des boues représente aussi une contrainte à cette usage. Près de 14% des boues d'épuration générées aux États-Unis sont incinérées (EPA, 1984).

### 1.1.3 Rejet en mer

L'élimination des boues par rejet en océan a été largement utilisée par les grandes villes côtières américaines et britanniques. Toutefois, les problèmes environnementaux associés à cette pratique contraignent les autorités à bannir cette usage. Ainsi, le 18 novembre 1988, le congrès américain légiférait en ce domaine en interdisant tout déversement de boues d'épuration dans les océans, à partir du 31 décembre 1991 (Jacobs et Silver, 1990). À l'heure actuelle, environ 5% des boues produites en Europe et aux États-Unis sont encore éliminées de cette manière (Bowden, 1987; EPA, 1990). La contamination bactérienne de la mer, et la pollution par les métaux lourds constituent des dangers potentiels pour l'homme et les espèces marines (Bruce et Davis, 1989; EPA, 1984). La capacité de survie et d'adaptation des bactéries

pathogènes rejetées dans l'environnement marin est un phénomène maintenant bien admis (Bonfont et al., 1990; Gauthier et Breittmayer, 1990). De plus, la contamination des sédiments marins par des effluents industriels et urbains contenant de hautes concentrations de métaux lourds peut provoquer la sélection de souches bactériennes résistantes à certains antibiotiques (Timoney et al., 1978).

#### 1.1.4 Utilisation en agriculture

Les différentes méthodes de disposition présentées jusqu'à maintenant ne permettent que l'élimination des boues, sans prendre avantage des propriétés physiques et chimiques que possède cette biomasse. L'augmentation du coût de l'énergie de même que l'intérêt grandissant pour la cause de l'environnement ont accru l'attrait de l'utilisation des boues comme fertilisants agricoles (Webber, 1988). Ainsi, aux États-Unis en 1976 cette pratique a été utilisée pour la disposition de 26% des boues générées, alors qu'elle passait à 56% en 1989 (Elliot, 1986; EPA, 1990). En Europe, 37% des boues sont utilisées en agriculture (Bruce et Davis, 1989), alors que 29% du volume total estimé de boues produites au Canada est déposé sur des terres agricoles (Webber, 1988).

L'épandage des boues d'épuration sur des terres agricoles est justifiable. Les boues contiennent des éléments fertilisants et possèdent des propriétés recherchées pour l'amendement des sols. Le tableau 1 indique les teneurs moyennes en azote, phosphore et potassium des boues résiduelles de quelques stations d'épuration de la province de Québec (Gouvernement du Québec, 1984), des États-Unis (EPA, 1983) et du Royaume-Uni (Doyle et al., 1978).

En comparant la composition en éléments fertilisants des boues d'épuration avec les besoins nutritifs de différents végétaux (tableau 2), il apparaît que la teneur des boues en azote

et en phosphore représente un intérêt agronomique certain. De plus, comme amendement organique, les boues contribuent à équilibrer le bilan humique du sol. En particulier, elles améliorent la structure du sol, le pouvoir de rétention d'eau, la capacité d'échange ionique et l'activité biologique (Environnement Canada, 1985; Gouvernement du Québec, 1984; Hattori, 1988).

Si la valorisation agricole des boues résiduelles semble être l'avenue la plus prometteuse comme méthode de disposition, les concentrations élevées de métaux lourds et la présence de microorganismes pathogènes retrouvés dans ce rejet urbain constituent les principaux obstacles à la pratique de cette activité (Bruce et Davis, 1989; Mininni et Santori, 1987; Scheltinga, 1987). Le cuivre, le nickel et le zinc sont phytotoxiques et leurs concentrations élevées dans le sol peuvent affecter fortement le rendement des récoltes (Davis et Carlton-Smith, 1984; Lester et al., 1983; Sommers et Nelson, 1981; Webber, 1986). L'accumulation des métaux dans les plantes à la suite de l'épandage de boues d'épuration a été démontrée pour le cadmium, le cuivre, le nickel, le plomb et le zinc (Adamu et al., 1989; Davis et Carlton-Smith, 1980; Levine et al., 1989). La présence de ces métaux dans la partie comestible des végétaux peut causer une contamination de la chaîne alimentaire humaine. Le cadmium est particulièrement redouté puisque la phytotoxicité de cet élément apparaît à des concentrations près de 10 fois supérieures à celles causant la zootoxicité (Coker et Matthews, 1983). Chez l'homme et les animaux, l'absorption excessive de cadmium cause une accumulation dans les reins et le foie, où il peut causer des dommages histologiques et fonctionnels graves. Les effets biologiques du cadmium incluent aussi des interférences avec des systèmes enzymatiques fondamentaux, tel la phosphorylase oxydative, par blocage des groupements thiols. Cet élément toxique interfère également avec la synthèse des acides nucléiques (Doyle et al., 1978). Le temps de demi-vie du cadmium chez l'humain se situe entre 10 et 30 ans. Le plomb présente également un potentiel de zootoxicité plus élevé que de phytotoxicité. Cependant, puisque les plantes en absorbent peu, le potentiel de contamination

de la chaîne alimentaire par ce vecteur est moindre (Coker et Matthews, 1983). Toutefois, des effets toxiques ont été rapportés chez des animaux domestiques (bovins) ayant mangé de la terre amendée avec des boues fortement polluées par le plomb (Webber, 1986). Tout comme le cadmium, le plomb interfère avec le métabolisme de plusieurs systèmes enzymatiques et forme des complexes avec les acides nucléiques entravant ainsi leur synthèse. Il semble également que ce métal ait une activité cancérogène (Mininni et Santori, 1987).

TABLEAU 1. Valeur fertilisante des boues d'épuration du Québec, des États-Unis et du Royaume-Uni (% de matière sèche)

	Azote Total	Phosphore Total	Potassium
Québec	5.1	2.0	0.2
États-Unis	3.9	2.5	0.4
Royaume-Uni	2.4	1.3	0.3

TABLEAU 2. Utilisation annuelle de l'azote, du phosphore et du potassium par différentes cultures végétales (EPA, 1981)

Culture	Rendement (t. ha <sup>-1</sup> )	Besoins nutritifs (kg ha <sup>-1</sup> )		
		N	P	K
avoine	3.5	128	18	134
blé	7.3	194	36	130
laitue	49.1	106	13	184
patate	29.4	128	20	213
pomme	36.8	111	20	166
raisin	36.8	117	20	115
tomate	73.6	278	36	443

### 1.1.5 Autres modes de disposition

Les différentes options exposées jusqu'à maintenant sont utilisées pour la disposition de presque l'ensemble des boues générées par le traitement des eaux usées. Cependant, plusieurs alternatives sont à l'étude ou encore testées dans quelques industries. Les boues déshydratées ont été employées comme agent de substitution dans la fabrication de briques et de ciment (Tay, 1987), ainsi que dans la préparation de peinture ou de papier (Bowen et al., 1989; Harper et al., 1988). Quelques études ont été réalisées dans le but de convertir les boues en huile ou en différents carburants (Harper et al., 1988). Une autre alternative proposée est d'utiliser les boues comme nourriture en aquaculture (Bowen et al., 1989). Le recyclage des boues en sylviculture, bien que difficilement réalisable en pratique (EPA, 1984), semble être une voie attirante pour tirer profit de l'excellent fertilisant forestier que constituent les boues résiduaires (Couillard, 1988; Couillard et Grenier, 1987; Jokela et al., 1990). Ces techniques présentent certes des possibilités intéressantes d'un point de vue théorique, mais l'utilisation de celles-ci ne permettra pas de résoudre le problème grandissant, que représente le volume considérable de boues produites dans l'ensemble des unités de traitement des eaux usées. De plus, les métaux lourds associés aux boues continueront de constituer un danger potentiel et ce peu importe l'option choisie (Alleman et al., 1990; EPA, 1984).

### 1.2 Les métaux lourds dans les boues d'épuration

La présence dans les boues de métaux toxiques constitue donc un obstacle important pour la disposition finale de ces déchets urbains dans l'environnement. L'enlèvement de ces toxiques représente une étape essentielle à la gestion adéquate de ces rejets. Pour être en mesure de convenir de la technologie à développer pour résoudre ce problème, il faut tout d'abord

considérer les concentrations de métaux présents dans les boues, et les rendements de décontamination souhaités en tenant compte des contraintes d'ordre économique.

### 1.2.1 Concentrations et normes

Lors de l'épuration des eaux usées, les métaux lourds sont concentrés dans les boues des décanteurs primaires et secondaires (Stephenson et Lester, 1987a, 1987b). Une fraction importante des métaux particuliers est enlevée durant la décantation primaire (Sterrit et Lester, 1984). Lors du traitement secondaire (boues activées), il se produit une formation de complexes entre les métaux et les polymères extracellulaires, responsables de la structure du biofloc (Brown et Lester, 1979). Les métaux sont également adsorbés passivement sur les cellules ou encore simplement emprisonnés dans le biofloc (Stephenson et Lester, 1987a, 1987b). Ces mécanismes physiques et biochimiques sont responsables de l'enlèvement de 80% à 90% de la quantité totale de métaux lourds de l'effluent originel. Les concentrations de métaux lourds observées dans les boues varient selon le type de traitement des eaux usées, la présence de certaines industries, les habitudes de vie de la population desservie, le degré de contamination des eaux de ruissellement urbaine et rurale, l'état des conduites des eaux usées, etc. Le tableau 3 présente la composition moyenne en métaux lourds déterminée pour un ensemble de 34 municipalités québécoises (St-Yves et Beaulieu, 1988), 40 villes américaines (EPA, 1982), ainsi que les concentrations moyennes observées dans une vingtaine d'études scientifiques menées à travers le monde (Mininni et Santori, 1987). Les normes québécoises (Flynn et al., 1987) et de la communauté économique européenne (CEE) (Davis, 1987), concernant les concentrations maximales de métaux lourds acceptables dans les boues destinées à l'épandage agricole, sont également indiquées. Si les boues au Québec semblent peu contaminées par les métaux lourds en comparaison à ce qui a été mesuré à l'étranger, il demeure toutefois que plus de 52% des boues produites au Québec dépassent les normes

obligatoires pour l'épandage agricole (St-Yves et Beaulieu, 1988). Cette proportion s'élève à 85% si l'on tient compte des teneurs en métaux recommandées. Le cuivre et le manganèse représentent les métaux les plus problématiques au Québec, avec des concentrations surpassant les teneurs recommandées dans 53% et 41% des cas respectivement. En Ontario, Wong et Henry (1984) ont estimé que plus de 50% des boues ne respectent pas les normes ontariennes; alors qu'aux États-Unis, Wozniak et Huang (1982) ont évalué que de 50% à 60% des boues dépassent les normes de l'EPA, qui sont pourtant parmi les plus permissives au monde. Au Royaume-Uni entre 82% et 85% des boues ne seraient pas conformes aux normes établies (Lester et al., 1983).

TABLEAU 3. Composition moyenne en métaux lourds des boues d'épuration et teneurs limites obligatoires et recommandées pour l'épandage agricole

Composition		(mg/kg de boue sèche)				
		Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
St-Yves et Beaulieu (1988)		4	699	21	98	595
EPA (1982)		69	602	135	369	1594
Mininni et Santori (1987)		16	634	77	417	2126
Normes						
Québec	O <sup>a</sup>	15	1000	180	500	2500
	R <sup>b</sup>	10	600	100	300	1750
CEE	O	40	1500	400	1000	3000
	R	20	1000	300	750	2500

a obligatoires

b recommandées

Les teneurs obligatoires et recommandées, présentées au tableau 3, témoignent bien de la grande variabilité dans les normes. Les normes pour le Québec se situent parmi les plus strictes, avec les pays scandinaves, alors que celles de la communauté économique européenne (CEE) et de l'agence de protection de l'environnement américaine (EPA) sont moins sévères (Tyagi et Couillard, 1989). Par exemple, la norme aux Pays-Bas pour le cadmium est de 5 mg/kg de boues sèches, alors qu'elle est de 25 et 20 respectivement pour les États-Unis et le Royaume-Uni (Davis, 1987; Tjell, 1986).

### 1.2.2 Provenance et contrôle à la source

La réduction des quantités de métaux retrouvés dans les boues peut être réalisée par deux types d'interventions; l'enlèvement des métaux lors de l'épuration des eaux usées et le contrôle à la source des rejets industriels. Cette dernière option, bien que souhaitable, est coûteuse et difficile à appliquer, car elle requiert une connaissance précise et un contrôle rigoureux de la pollution émise par chaque industrie. De plus, s'il est possible de réduire le contenu en métaux des boues par surveillance des industries, il demeure qu'une bonne partie de cette biomasse est toujours contaminée (Tjell, 1986). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré qu'une grande partie des métaux provient des résidences et du ruissellement urbain (Davis, 1987; Tjell, 1986; Wozniak et Huang, 1982). Par exemple, une étude menée au début des années 1970 a démontré que 49% du Cd, 47% du Cu et 42% du Zn provenaient des résidences (Klein et al., 1974). Les résultats obtenus de cette étude indiquent également que le ruissellement urbain contribuait pour 31% du Zn et 14% du Cu alors que 20% de ce dernier provenait des conduites d'eaux potables. D'après Förstner et Wittmann (1979), le ruissellement urbain est une source majeure de plomb et de zinc. Par ailleurs, Davis et Jacknow (1975) ont rapporté que près de 63% du cadmium entrant à l'usine d'épuration, provenaient des résidences. Les métaux présents dans les eaux usées domestiques proviennent

de nombreuses sources: fèces, produits pharmaceutiques et cosmétiques, produits chimiques de nettoyage, peinture, etc. (Coker et Matthews, 1983; EPA, 1984; Wong et Henry, 1988).

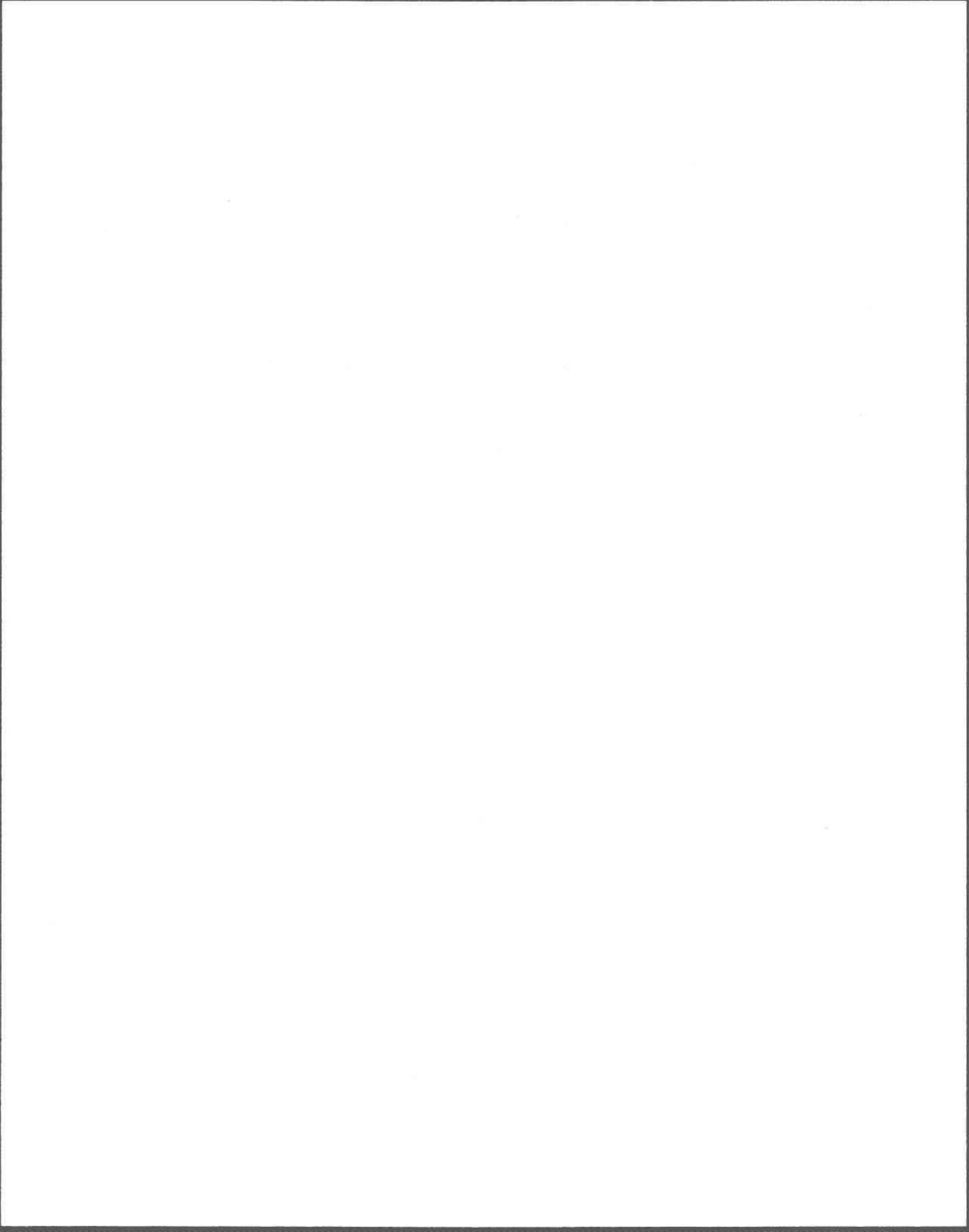
### 1.2.3 Extraction des métaux par voie chimique

L'intérêt d'extraire les métaux lourds des boues d'épuration est aujourd'hui un fait bien reconnu. Depuis 1975, plusieurs solutions à ce problème ont été examinées, mais jusqu'à maintenant, aucun procédé économique et efficace n'a été implanté pour le traitement des eaux usées municipales. Plusieurs tentatives de solubilisation chimique des métaux ont été étudiées: la chloration (Olver et al., 1975), l'échange d'ion (Cornwell et al., 1980), l'utilisation d'agents chelateurs tels l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et l'acide nitrilotriacétique (NTA) (Jenkins et al., 1981; Lo et Chen, 1990) et la digestion aérobie thermophile auto-chauffée (AATD) couplée à une acidification par l'acide chlorhydrique (Hayes et al., 1980). Les coûts élevés d'opération, certaines difficultés opératoires, et quelques fois des rendements insatisfaisants de lixiviation des métaux sont des contraintes à l'utilisation de ces techniques.

L'ajout de différents acides ( $H_2SO_4$ , HCl,  $HNO_3$ ,  $CH_3COOH$ ) aux boues est la technique qui a été la plus considérée par différents chercheurs (Bloomfield et Pruden, 1975; Lo et Chen, 1990; Logan et Feltz, 1985; McNulty et al., 1977; Scott et Horlings, 1975; Wozniak et Huang, 1982). Ces différentes variantes ne permettent pas une solubilisation efficace du cuivre et du plomb, malgré une acidification considérable (pH 1.5) des boues. La solubilité des métaux dans les boues est affectée principalement par le pH, mais aussi par d'autres facteurs tout aussi importants. Ce sont le potentiel d'oxydo-réduction du milieu (POR), la concentration des métaux et des ligands (anions et molécules non-chargées) et l'équilibre chimique entre les constituants (Tyagi et Couillard, 1989). La solubilisation du cuivre et du plomb dans les boues nécessite une augmentation importante du POR, ce qui ne peut être obtenue rapidement par oxydation chimique lors de l'aération des boues. L'ajout d'un

oxydant chimique est également à proscrire dans le cadre d'une utilisation potentielle des boues en agriculture (Tyagi et Couillard, 1989). Les quantités considérables d'acide nécessaires à la solubilisation chimique des métaux rendent ces techniques économiquement rebutantes (Oliver et Carey, 1976; Schönborn et Hartmann, 1978; Tyagi et Couillard, 1989; Wong et Henry, 1983).

## CHAPITRE 2



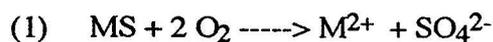
## CHAPITRE 2

### THÉORIE DE LA BIOLIXIVIATION DES MÉTAUX

Depuis l'apparition de la vie sur terre il y a près de 4 milliards d'années, certaines bactéries proliférant naturellement en milieu minéral sont capables d'extraire les métaux en les faisant passer en solution. Ce phénomène d'extraction dans l'eau est ce qu'on appelle la lixiviation bactérienne (Berthelin, 1987). Le chapitre suivant est consacré à la description des principaux mécanismes biochimiques et microorganismes impliqués dans la solubilisation des métaux. Le potentiel que peut représenter cette activité biologique pour la mise au point de diverses biotechnologies sera également présenté. De plus, l'état du développement technologique, en ce qui concerne la mise au point d'un procédé de biolixiviation des métaux lourds associés aux boues municipales, sera décrit, de même que les connaissances fondamentales acquises dans ce domaine. À partir de ces bases, les hypothèses de recherche ayant trait à la présente étude seront formulées, ainsi que les objectifs à atteindre.

#### 2.1 Mécanismes de la solubilisation biologique des métaux

La biolixiviation des métaux peut être atteinte directement par le métabolisme des microorganismes ou indirectement par les produits de leur métabolisme (Lundgren et Silver, 1980). Dans le mécanisme direct, les bactéries lixiviantes oxydent directement les sulfures de métaux insolubles en sulfates solubles, selon l'équation générale (1) suivante:

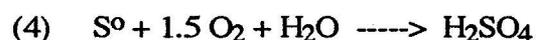


Cette oxydation directe des sulfures métalliques a été démontrée pour plusieurs métaux: NiS, ZnS, CoS, PbS, CuS (Hutchins et al., 1986). Les bactéries *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans* ont longtemps été considérées comme les principaux organismes impliqués dans ces réactions. Toutefois, plusieurs autres espèces bactériennes ont été identifiées comme participantes à cette activité.

La capacité métabolique que possède *T. ferrooxidans* de tirer son énergie de l'oxydation de l'ion ferreux en ion ferrique contribue au mécanisme indirecte de mise en solution des métaux. Les équations (2) et (3) décrivent ce mécanisme.



Si la réaction (2) requiert la participation de *T. ferrooxidans*, la réaction (3) s'effectue chimiquement; l'ion ferrique agissant comme un agent oxydant puissant en milieu acide. Le soufre élémentaire produit dans l'équation (3) est par la suite oxydé en acide sulfurique (équation 4), favorisant davantage la dissolution des métaux. Cette réaction est commune à presque toutes les espèces de thiobacilles (Kelly et Harrison, 1988).



Les thiobacilles ont également la capacité d'oxyder plusieurs autres composés soufrés réduits dont le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ), le thiosulfate ( $S_2O_3^{2-}$ ), le trithionate ( $S_3O_6^{2-}$ ), et le tétrathionate ( $S_4O_6^{2-}$ ) (Kelly and Harrison, 1988; Suzuki, 1974).

## 2.2 Microorganismes impliqués dans la biolixiviation

L'oxydation biologique de l'ion ferreux en ion ferrique à longterm a été associée au métabolisme de *Thiobacillus ferrooxidans*. Cependant, la bactérie spiralée *Leptospirillum ferrooxidans* isolée par Markosyan (1972) tire également son énergie de l'oxydation du fer. Récemment, Huber et Stetter (1989) ont démontré cette activité oxydative chez une nouvelle espèce de thiobacille (*T. prosperus*).

Le genre *Thiobacillus* regroupe un ensemble de microorganismes démontrant des caractéristiques nutritionnelles variées dans l'utilisation de substrats inorganiques et organiques. Toutefois, ces bactéries peuvent être divisées en deux groupes bien distincts soient les thiobacilles acidophiles et peu-acidophiles (Kelly et Harrison, 1988). Les espèces acidophiles ont un pH optimum de croissance se situant près de pH 3.0 et ne peuvent initier leur développement dans un milieu neutre ou alcalin (pH >5). D'autres part, les thiobacilles peu-acidophiles ne peuvent proliférer en milieu très acide (pH <3.0), leur croissance étant optimale à pH neutre (pH 6 à 8). Les différentes espèces de thiobacilles isolées et caractérisées à ce jour sont énumérées au tableau 4.

Les premières véritables études taxonomiques des thiobacilles ont été effectuées par Hutchinson et al. (1965, 1966, 1967, 1969) en utilisant un système d'analyse à plusieurs variables et en appliquant la taxonomie numérique. Jackson et al. (1968) et Guay et al. (1976) ont également contribué à l'étude taxonomique de ces microorganismes en déterminant le contenu en Guanine+Cytosine (%) de l'ADN de plusieurs espèces. Suite à ces recherches,

quelques autres espèces ont été isolées et nommées. En 1982, Katayama-Fujimura et al. ont suggéré une classification du genre *Thiobacillus* selon le nombre d'unités isoprènes (ubiquinone), la composition en acides gras cellulaires et le contenu en G+C (%) de l'ADN. Lane et al. (1985) ont apporté leur contribution en classifiant ces organismes selon leur séquence de nucléotides de l'ARN 5s. La difficulté d'obtenir des cultures pures de certains thiobacilles est la cause principale des complications notées dans la classification taxonomique de ce genre de bactéries.

TABLEAU 4. Liste des espèces bactériennes retrouvées dans le genre *Thiobacillus*

Groupes	Espèces	Références
Peu-acidophile	<i>T. aguaesulis</i>	Wood et Kelly, 1988
	<i>T. capsulatus</i>	Laishley <u>et al.</u> , 1988
	<i>T. delicatus</i>	Mizoguchi <u>et al.</u> , 1976
	<i>T. denitrificans</i>	Beijerinck, 1904
	<i>T. intermedius</i>	London, 1963
	<i>T. neapolitanus</i>	Parker et Prisk, 1953
	<i>T. novellus</i>	Starkey, 1934
	<i>T. perometabolis</i>	London et Rittenberg, 1967
	<i>T. rubellus</i>	Mizoguchi <u>et al.</u> , 1976
	<i>T. tepidarius</i>	Wood et Kelly, 1985
	<i>T. thermophilica</i>	Williams et Hoare, 1972
	<i>T. thioparus</i>	Beijerinck, 1904
	<i>T. thyasiris</i>	Wood et Kelly, 1989
<i>T. versutus</i>	Harrison, 1983	
Acidophile	<i>T. acidophilus</i>	Guay et Silver, 1975
	<i>T. albertis</i>	Bryant <u>et al.</u> , 1983
	<i>T. cuprinus</i>	Huber et Stetter, 1990
	<i>T. ferrooxidans</i>	Temple et Colmer, 1951
	<i>T. kabobis</i>	Reynolds <u>et al.</u> , 1981
	<i>T. organoparus</i>	Markosyan, 1973
	<i>T. prosperus</i>	Huber et Stetter, 1989
<i>T. thiooxidans</i>	Waksman et Joffe, 1922	

De nombreuses autres espèces de bactéries peuvent tirer leur énergie de l'oxydation du soufre élémentaire ou de certains composés soufrés réduits. Plusieurs espèces bactériennes retrouvées dans les familles *Chlorobiaceae*, *Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* et *Rhodospirillaceae* ont la capacité d'oxyder à divers degrés le H<sub>2</sub>S (Brune, 1989). Toutefois, ces microorganismes ne peuvent pas concourir efficacement à l'oxydation rapide du soufre élémentaire. D'autres organismes, tels *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Thermothrix*, *Thermus* et *Thiobacillus thermophilica* oxydent le soufre élémentaire en conditions thermophiles (Brannan and Caldwell, 1980; Caldwell et al., 1976). Certaines bactéries ne faisant pas partie du genre *Thiobacillus* ont la capacité d'oxyder lentement le thiosulfate, mais ne possèdent pas le système enzymatique requis pour l'oxydation du soufre élémentaire: *Aquaspirillum autotrophicum*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas* spp., *Xanthobacter autotrophicus*, *Achromobacter stutzeri* (Friedrich and Mitrenga, 1981; Tuttle et al., 1974). Certaines bactéries isolées couramment du sol (*Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp.) de même que certaines moisissures (*Penicillium* spp., *Sordaria* spp., *Cladosporium herbarium*) oxydent le soufre en thiosulfate et même en sulfate, mais cette activité métabolique est nettement moindre que chez les thiobacilles (Wainwright, 1978, 1984, Yagi et al., 1971). Les deux espèces de *Thiomicrospira* isolées à ce jour ne sont sans doute pas impliquées dans les procédés de biolixiviation; *T. pelophila* est sensible à l'acide, et *T. denitrificans* ne croît que si la concentration d'oxygène du milieu est très faible (Kuenen and Tuovinen, 1981). Les thiobacilles semblent donc les seuls microorganismes, isolés à ce jour, à posséder le système enzymatique apte à l'oxydation rapide du soufre élémentaire en conditions mésophiles.

### 2.3 Écologie des thiobacilles

Les thiobacilles sont des organismes souvent associés à des environnements riches en composés soufrés, tels les sites miniers et les dépôts de soufre élémentaire (Colmer et Hinkle, 1947; Hutchins et al., 1986; Laishley et al., 1988; Lundgren et Silver, 1980; Reynolds et al., 1981). Cependant, on retrouve également ces bactéries en concentrations appréciables dans divers habitats tels les eaux douces et les mers (Adair et Gundersen, 1969; Eashwar et al., 1990; Fernandez et Vilda, 1988; Tuttle et Jannasch, 1972), et différents types de sols (Gore et al., 1986; Lee et al., 1987; Mahmoud et al., 1977). Il semble également que ce type de microorganisme puisse être un bon indicateur de pollution urbaine (Fernandez et Vilda, 1988; Gore et al., 1986). En effet, les thiobacilles ont souvent été isolés à partir des eaux usées et boues d'épuration domestiques et industrielles (Hutchinson et al., 1969; Khalid and Malik, 1987; Kreye et al., 1973; Schönborn et Hartmann, 1978) et ont même été trouvés responsables de la corrosion des conduites d'égouts (Islander et al., 1991; Milde et al., 1983; Sand, 1987). Trois hypothèses ont été proposées pour expliquer la présence et la croissance des thiobacilles dans les conduites d'égouts: le rejet domestique de détergents avec des contenus élevés en composés soufrés (Milde et al., 1983); la réduction des sulfates en H<sub>2</sub>S dans les eaux usées des conduites (Sand, 1987); et la production de composés soufrés volatils résultant de la dégradation des acides aminés (Kadota et Ishida, 1972).

### 2.4 Utilisation potentielle des thiobacilles

L'intérêt industriel le plus important de l'utilisation des thiobacilles consiste sans doute en la récupération de métaux par lixiviation bactérienne de minerais et de résidus miniers (Brierley et LeRoux, 1978; Ehrlich et Brierley, 1990; Hutchins et al., 1986; Lundgren et Silver, 1980). Ainsi en 1989, plus de 25% du cuivre extrait aux États-Unis, soit l'équivalent

de 650 millions de dollars, a été obtenu par lixiviation biologique (Debus, 1989). Ces microorganismes présentent également un intérêt certain dans divers autres domaines d'application. Par exemple, la désulfuration du charbon, afin de réduire les émissions de dioxyde de soufre lors de la combustion, a été largement étudiée (Andrews et Maczuga, 1982; Beyer et al., 1987; Hoffmann et al., 1981; Huber et al., 1984; Kargi et Cervoni, 1983). La désulfuration biologique du gaz naturel semble également être possible (Sublette, 1987; Sublette et Silvester, 1987), ainsi que des cendres et scories de divers déchets industriels (Bosecker, 1986; Strayer et Davis, 1983). Meyer et Yen (1976) ont étudié pour leur part, la possibilité de solubiliser les schistes bitumineux par production d'acide par *Thiobacillus thiooxidans* afin de faciliter la récupération des huiles. La précipitation du fer présent dans les effluents miniers acides peut aussi être effectuée par oxydation biologique de l'ion ferreux en bioréacteur (Nakamura et al., 1986; Olem et Unz, 1977). Récemment, la décontamination de l'air pollué par quelques composés soufrés réduits (méthylmercaptan, sulfure d'hydrogène, sulfure de diméthyle, etc.), suite à certaines activités industrielles (pâtes et papiers, raffinage des huiles, compostage, etc.), a été explorée par oxydation de ces polluants par *Thiobacillus thioparus* (Kanagawa et Kelly, 1986; Kanagawa et Mikami, 1989). L'extraction des métaux toxiques des boues de dragages a aussi été examinée par biolixiviation avec *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans* (Calmano et al., 1985). Ces quelques exemples démontrent bien le rôle de premier plan que peuvent exercer ces bactéries tant au point de vue économique que pour la protection de l'environnement.

## **2.5 Biolixiviation des métaux des boues d'épuration municipales**

Suite aux différentes contraintes techniques et économiques rencontrées avec les procédés chimiques d'enlèvement des métaux associés aux boues municipales, l'intérêt de mettre au point un procédé biologique d'extraction est apparu. Les premières études de

biolixiviation ont été réalisées par Schönborn et Hartmann (1978) sur des boues digérées anaérobies. Les essais furent effectués en flacons Erlenmeyers, à 30°C, avec des souches de *T. ferrooxidans* et de *T. thiooxidans*. Les résultats obtenus démontrèrent que les thiobacilles pouvaient croître dans les boues d'épuration si un substrat énergétique était ajouté (S°, FeS, CuS) et si le milieu était aéré et acidifié initialement à un pH < 5. Toutefois, les temps d'incubation requis pour l'oxydation biologique des substrats et donc de l'acidification de la boue étaient très long (22 à 37 jours). Les essais de biolixiviation réalisés par Wong et Henry (1983, 1984) indiquèrent que la solubilisation des métaux dans les boues digérées anaérobies, préalablement ajustées à pH 4.0, peut être accomplie par *T. ferrooxidans* sans ajout de substrat. Dans ce cas, les sulfures de métaux présents dans les boues sont utilisés comme substrats pour les thiobacilles. Il faut noter que les boues utilisées dans ces études étaient très fortement contaminées en métaux et contenaient ainsi des concentrations appréciables de sulfures métalliques. Les rendements de solubilisation obtenus après dix jours de lixiviation en systèmes discontinus étaient de l'ordre de 80-86% Cd, 65-80% Cu, 70-87% Ni, 84-90% Zn.

Au cours des six dernières années, la biolixiviation avec *T. ferrooxidans* (ATCC 19859) a largement été étudiée, mais avec un apport de substrat (3 à 5 g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) pour la croissance des bactéries lixiviantes. Cette addition d'ion ferreux est nécessaire pour réduire le temps d'incubation requis à la solubilisation des métaux, et également parce que les boues d'épuration contiennent habituellement des concentrations de sulfures insuffisantes à la prolifération des thiobacilles. Trois différents types de réacteurs ont été testés pour la lixiviation biologique des métaux associés aux boues: cuve agitée en système discontinu, cuve agitée en continu (CSTR) et réacteur à air pulsé (air-lift). Les essais effectués, sur des boues digérées aérobies dans un réacteur de 30 litres en mode discontinu et maintenu à 20 °C, démontrèrent les rendements suivants de solubilisation avec un temps de séjour de deux jours: 40-71% Cd, 0% Cr, 47-80% Cu, 81-89% Mn, 42-60% Ni, 0-8% Pb et 74-86% Zn (Couillard et Chartier, 1991). Un réacteur de cinq litres opéré en mode continu sans recyclage

de boues a été employé pour le traitement de boues digérées anaérobies (Tyagi et Tran, 1991). Un temps de résidence de cinq jours avec un tel réacteur est requis pour un rendement de solubilisation adéquat des métaux. Le recyclage partiel des boues (20%), dans un réacteur de 30 litres, a permis l'obtention d'un court temps de résidence (0.75 jour) (Couillard et Mercier, 1991a; Tyagi et al., 1990). Dans ces essais, les rendements de solubilisation obtenus étaient: 67% Cd, 8% Cr, 91% Cu, 93% Mn, 67% Ni, 7% Pb, et 94% Zn. Les tests de biolixiviation effectués en bioréacteur à air pulsé ont permis des taux et des rendements de solubilisation semblables, pour un même temps de résidence (Couillard et Mercier, 1991a; Tran, 1989; Tyagi et al., 1989).

L'avantage principal de cette nouvelle biotechnologie en comparaison avec l'acidification chimique provient de la réduction considérable des quantités d'acides nécessaires à la solubilisation des métaux, et donc de la réduction des coûts d'opération (Tyagi et al., 1988; Wong et Henry, 1988). Il faut noter également que les boues traitées biologiquement sont faciles à déshydrater et conservent une bonne valeur fertilisante (Couillard et Mercier, 1991b). Toutefois, la nécessité d'ajuster le pH des boues entre 4 et 4.5 (demande d'acide), et les rendements peu élevés de solubilisation du plomb et du chrome, sont des problèmes ayant stimulé la recherche d'améliorations du procédé de lixiviation bactérienne envisagé. La mise au point d'un procédé permettant conjointement l'extraction des métaux lourds, la réduction des matières en suspension et la destruction des microorganismes pathogènes à des niveaux compatibles avec une utilisation agricole intensive des boues ou pour toute autre moyen de disposition, est évidemment souhaitable. Cette technologie pourrait ultérieurement se substituer aux procédés conventionnels de stabilisation des boues, et ainsi réduire de façon considérable les temps de rétention et les coûts inhérents aux traitements des boues d'épuration. Les résultats obtenus par Henry et al. (1988, 1991) indiquent toutefois que le procédé de lixiviation avec *Thiobacillus ferrooxidans* ne permet pas l'élimination efficace des bactéries indicatrices de pathogènes (coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux).

L'ajout de ce procédé d'extraction des métaux dans l'unité de traitement des eaux usées ne pourrait donc permettre l'élimination de l'étape de stabilisation aérobie ou anaérobie des boues. De plus, les travaux de Couillard et al. (1991) indiquent également que l'étape de stabilisation des boues ne peut être combinée avec le procédé de biolixiviation avec *T. ferrooxidans* et le sulfate ferreux. Ainsi, si l'ajout d'un tel procédé d'extraction des métaux en aval de la stabilisation conventionnelle des boues est fortement recommandable d'un point de vue écologique, celui-ci hausserait nécessairement les coûts assignés aux traitements des eaux usées.

Depuis maintenant trois années, la biolixiviation des métaux des boues par utilisation de soufre en remplacement de l'ion ferreux est étudiée à l'INRS-Eau. Les objectifs généraux de cette étude sont de développer un procédé simple, peu onéreux, et efficace pour l'extraction des métaux lourds des boues, et de récupérer ceux-ci pour, par la suite, les recycler en industrie métallurgique. Les caractéristiques principales visées pour la mise au point de cette biotechnologie sont les suivantes: fonctionnelle au pH initial des boues (6.0 à 8.0); temps de résidence le plus court possible afin de diminuer le volume du bioréacteur; solubilisation des métaux à des niveaux acceptables pour l'utilisation agricole des boues ou pour toute autre moyen de disposition; utilisation d'un substrat peu coûteux pour la croissance bactérienne, lequel peut être entreposé et transporté facilement; destruction efficace des microorganismes pathogènes afin de pouvoir éliminer l'étape de stabilisation conventionnelle des boues; de plus, l'activité maximale des souches lixiviantes doit être rapidement atteinte et doit être peu influencée par les modifications apportées au système ( $T^{\circ}$ , teneurs en solides, composition des boues en métaux lourds et autres composés toxiques, activité microbienne hétérotrophe). Les premiers essais de lixiviation avec le soufre ont été effectués avec de la boue digérée anaérobie de Valcartier, laquelle était acidifiée initialement à pH 4.0 avec de l'acide sulfurique et inoculée avec *T. thiooxidans* (ATCC 19377). Par la suite, il a été observé que cette boue pouvait être acidifiée microbiologiquement à des pH inférieures à 2.0 sans inoculation et également sans

une acidification initiale de la boue (Jain et Tyagi, 1992; Tyagi et al., 1990). Les effets de différents paramètres (% d'inoculation, % de solides totaux, % de substrat, pH initial) sur la lixiviation des métaux lourds par la culture mixte développée ont été étudiés à l'INRS-Eau par Boulanger (résultats non publiés). Ces essais ont été réalisés avec différents types de boues (boue primaire, secondaire, digérée aérobie, digérée anaérobie) prélevées dans plusieurs usines d'épuration (Valcartier, St-Étienne-de-Beaumont, Toronto, Cowansville, Beauceville). Les résultats obtenus démontrèrent que l'inoculation des différentes boues avec la culture mixte entraînait une acidification rapide de celles-ci, avec une solubilisation des métaux lourds à des niveaux compatibles avec l'utilisation agricole des boues.

Ces essais de lixiviation bactérienne avec du soufre ont donné des rendements de solubilisation des métaux lourds (Cd, Cu, Mn, Ni, Zn) comparables au procédé avec addition d'ions ferreux. L'acidification plus importante atteinte par l'oxydation du soufre (pH < 2.5) que par l'oxydation de l'ion ferreux (pH 2.5 à 3.5) a donné une meilleure solubilisation du chrome et du plomb. Cette capacité d'acidification plus grande permettait d'espérer que cette technologie puisse concourir à l'élimination des organismes pathogènes, et donc de se substituer aux procédés peu efficaces (Dudley et al., 1980; Martin et al., 1990; Pahren, 1987), et coûteux (\$ 70 Can/ tonne métrique, EPA 1984)) de stabilisation des boues d'épuration. De plus, la croissance des microorganismes lixivians pouvant être réalisée à partir du pH normal des boues, la mise au point d'un procédé simultané de stabilisation-lixiviation des boues semble possible.

## 2.6 Hypothèses de recherche

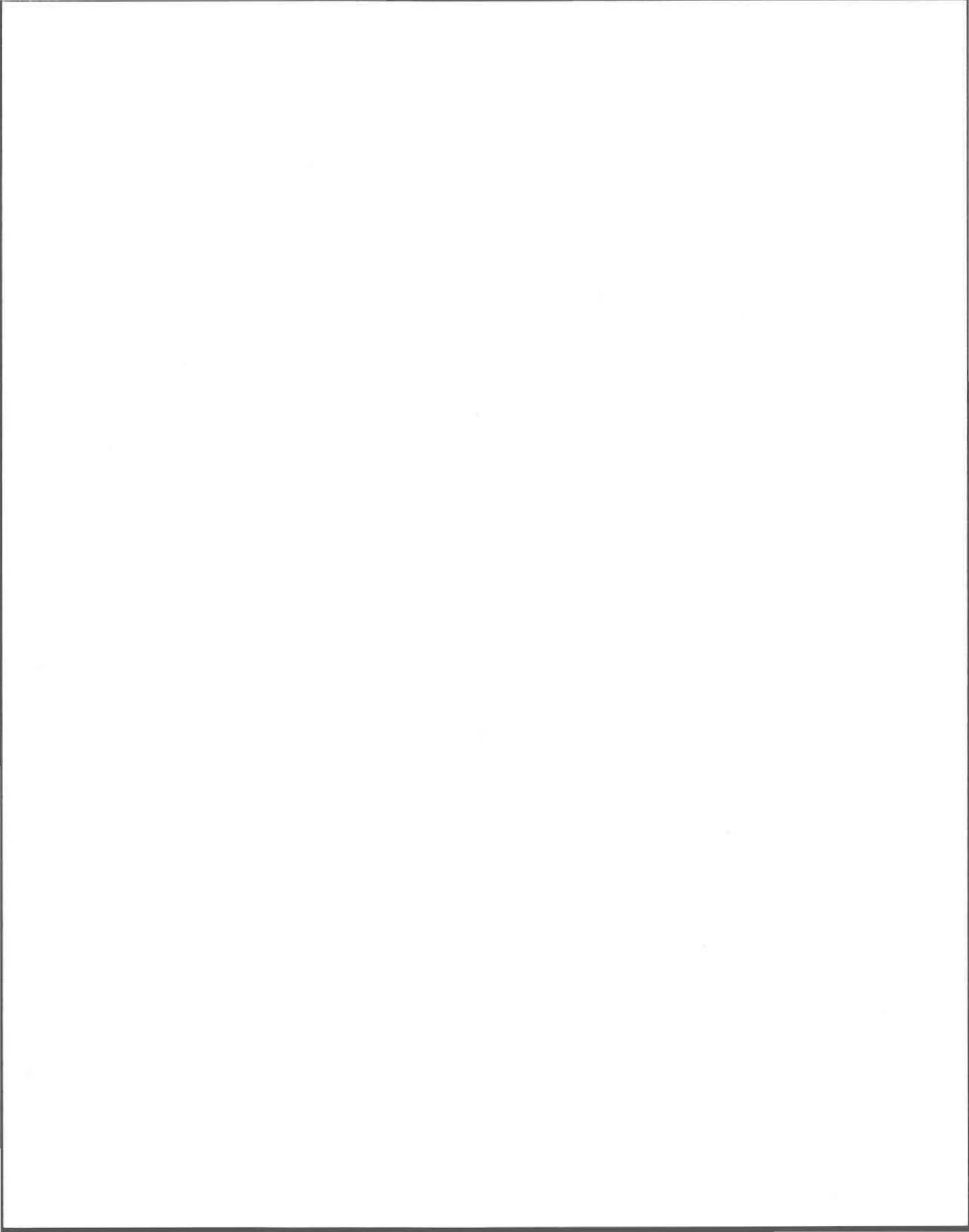
Les différentes études complétées à ce jour sur la biolixiviation des métaux lourds ont été axées sur l'évaluation de la performance et l'optimisation de bioréacteurs en termes de rendements de décontamination, et de possibilités de transfert technologique (coûts d'implantation, frais d'opération, caractéristiques des boues produites, simplicité du procédé, etc). À ce niveau, les deux procédés de lixiviation microbienne des métaux présentement à l'étude semblent prometteurs. Toutefois, la mise à l'échelle industrielle de bio-procédés requiert, à tout le moins, une compréhension de base des processus microbiologiques afférents à l'activité recherchée. L'objectif global du présent projet de recherche est donc d'approfondir les connaissances microbiologiques et les notions écologiques associées aux procédés de lixiviation microbienne des métaux lourds des boues d'épuration. " There have been no definitive ecological studies of metal-leaching systems. Systematic study of this area is required to define both processes and uses of microbial leaching " (Hutchins et al., 1986). Trois hypothèses de recherche sont proposées pour parvenir à cette démonstration.

- 1) Les microflores indigènes des boues d'épuration peuvent être acclimatées et enrichies pour l'oxydation rapide du soufre élémentaire et de l'ion ferreux, et ainsi permettent une solubilisation efficace des métaux toxiques.
- 2) La biolixiviation des métaux associés aux boues est effectuée par plusieurs espèces microbiennes, dont la croissance simultanée et/ou successive entraîne une acidification importante de la boue et ainsi la solubilisation des métaux.
- 3) La croissance des populations microbiennes lixiviantes est affectée par les caractéristiques physico-chimiques des boues, et l'acidification de la boue durant la lixiviation modifie les propriétés physiques et biologiques des boues.

## 2.7 Objectifs spécifiques

- 1) Démontrer la présence dans divers types de boues d'épuration d'une microflore apte à la biolixiviation des métaux par oxydation de soufre élémentaire et de l'ion ferreux.
- 2) Acclimater et enrichir ces microflores et montrer que celles-ci permettent une décontamination adéquate des métaux dans les diverses boues testées.
- 3) Isoler et identifier les microorganismes responsables de la lixiviation et mesurer l'activité de ces isolats.
- 4) Déterminer les concentrations de cellules lixiviantes présentes naturellement dans les boues et celles obtenues après la phase d'acclimatation.
- 5) Étudier la colonisation microbienne du soufre élémentaire dans les boues en termes d'aspects morphologiques des cellules et d'interactions cellule-cellule et cellule-substrat.
- 6) Évaluer les cinétiques de croissance des populations lors du procédé de lixiviation des métaux.
- 7) Modéliser le procédé de biolixiviation avec soufre à l'aide d'une culture mixte constituée de souches caractérisées.
- 8) Mesurer les effets de quelques paramètres sur la croissance des microorganismes responsables de la lixiviation (température, contenu en solides des boues, pH initial, disponibilité du substrat, concentration en métaux dans les boues).
- 9) Évaluer les impacts de la biolixiviation des métaux avec soufre sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des boues.

## **CHAPITRE 3**



## CHAPITRE 3

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 3.1 Échantillonnage des boues d'épuration

Les boues utilisées dans cette étude ont été prélevées dans onze usines d'épuration d'eaux usées municipales de la province de Québec, de l'Ontario (Canada), et des états du Delaware et du Maryland (É.U.): Beauceville, Black Lake, Cowansville, Granby, Sainte-Claire, Saint-Étienne, Saint-Georges, Valcartier, Toronto, Cecil County, et Wilmington. Les échantillons ont été prélevés dans des contenants en polypropylène et étaient conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Les caractéristiques des différentes boues utilisées dans cette étude sont présentées au tableau 5.

#### 3.2 Caractérisation des boues

Les caractéristiques physiques des boues d'épuration (solides totaux (ST) et volatils (SV), matières en suspension totales (MES) et volatiles (MESV)) ont été déterminées selon les méthodes approuvées (APHA et al., 1989). Les teneurs en métaux des boues ont été mesurées après digestion par HNO<sub>3</sub>, HF, HClO<sub>4</sub>, et HCl selon les protocoles de l'APHA et al. (1989). Cette méthode a été vérifiée par digestion d'un matériel de référence MESS-1, préparé par la conseil national de recherches du Canada.

TABLEAU 5. Liste des boues d'épuration prélevées pour cette étude

Code	Origine	Types	Date (mois-année)	Solides totaux (g/L)	Métaux excédants les valeurs prescrites <sup>a</sup>
A	Beauceville	SEC <sup>b</sup>	03-90	14,0	
B	Beauceville	D AER <sup>c</sup>	03-90	3,9	
C	Black Lake	SEC	05-90	4,8	Cu
C2	Black Lake	SEC	05-91	3,2	Cu, Ni
C3	Black Lake	SEC	06-91	2,5	Cu, Ni
C4	Black Lake	SEC	07-91	3,2	Cu, Ni
D	Black Lake	D AER	05-90	24,4	Cr, Cu
D2	Black Lake	D AER	11-90	22,8	Cu
D3	Black Lake	D AER	04-91	21,9	Cu, Ni
D4	Black Lake	D AER	05-91	22,5	Cu
D5	Black Lake	D AER	06-91	20,4	Cu
D6	Black Lake	D AER	07-91	17,1	Cu
E	Cecil County	SEC	04-91	4,9	
F	Cecil County	D AER	04-91	10,2	
G	Cowansville	SEC	03-90	14,8	Mn
H	Cowansville	D AER	03-90	30,4	Mn
I	Granby	SEC	03-90	14,3	Cu, Mn
J	Granby	D AER	03-90	31,3	Cu, Mn
K	Sainte-Claire	SEC	06-90	1,7	Cu
L	Sainte-Claire	D AER	06-90	40,7	
L2	Sainte-Claire	D AER	10-90	31,4	Mn
M	Saint-Étienne	FOSSE OX <sup>d</sup>	05-89	5,9	
N	Saint-Georges	SEC	03-90	7,1	
O	Toronto	PR D ANA <sup>e</sup>	05-89	24,2	Cd
P	Toronto	SEC D ANA <sup>f</sup>	05-89	27,5	Cd
Q	Toronto	PRIM <sup>g</sup>	05-89	26,0	Cd
R	Valcartier	SEC	08-90	2,8	Cu
S	Valcartier	D ANA <sup>h</sup>	09-89	14,0	Cu
S2	Valcartier	D ANA	06-90	15,6	Cu, Pb
S3	Valcartier	D ANA	08-90	13,2	Cu
S4	Valcartier	D ANA	04-91	15,3	Cu
T	Wilmington	SEC	04-91	19,1	Ni
U	Wilmington	D ANA	04-91	28,2	Ni

a Flynn *et al.* (1987)

b boue secondaire

c boue digérée aérobie

d boue de fossé d'oxydation

e boue primaire digérée anaérobie

f boue secondaire digérée anaérobie

g boue primaire

h boue digérée anaérobie

Les concentrations en métaux étaient déterminées par spectrophotométrie à émission de plasma (ICP), modèle Atom Scan 25 de Thermo Jarrell Ash Corporation. Les mesures de pH et de potentiel d'oxydo-réduction (POR) étaient effectuées à l'aide d'un pH-mètre Fisher Accumet 805 MP. L'électrode à POR était calibrée avec une solution de quinhydrone (Kodak Ektachrome 217) ajustée à pH 4 et 7.

### **3.3 Acclimatation de la microflore indigène lixivante**

#### **3.3.1 Soufre**

Des volumes de 150 mL de chacune des boues étaient placés dans des flacons Erlenmeyers stériles de 500 mL. Une série de boue était utilisée comme témoin sans soufre, deux autres séries étaient additionnées de 1% (p/v) de soufre élémentaire en poudre (BDH) préalablement stérilisé par Tyndalisation (deux jours consécutifs à 105 °C, pendant une heure) dont une série avec des boues autoclavées et l'autre en utilisant des boues non-autoclavées. Les boues autoclavées étaient employées pour différencier entre l'oxydation chimique du soufre et l'oxydation d'origine microbienne. L'incubation des boues pour les essais d'acclimatation et de lixiviation avec le soufre a été effectuée à 28 °C sous une agitation de 200 révolutions par minute (rpm) dans un incubateur à agitation gyrotoire (modèle 26, New Brunswick Scientific). Les boues ont été incubées pendant une période variant de 12 à 22 jours, c'est à dire jusqu'à ce que l'acidification atteigne une valeur de pH inférieure à 2.0. Après l'abaissement initial du pH des volumes de 5% (v/v) des boues acidifiées étaient ajoutées à 150 mL des boues correspondantes additionnées de 1% de soufre, puis incubée. Cette étape a été répétée deux autres fois. À ce moment, la microflore indigène oxydant le soufre était présumée être enrichie et adaptée.

### 3.3.2 Ion ferreux

La démarche expérimentale suivie pour l'acclimatation de la microflore sur le soufre a été répétée pour l'acclimatation de la microflore oxydant l'ion ferreux. Toutefois, dans ce cas le pH initial des boues était ajusté à  $\text{pH } 4.0 \pm 0.2$  avec de l'acide sulfurique (2 N). Une concentration de 0.5% de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (BDH) était utilisée comme substrat. Les boues ont été incubées à 21°C avec une agitation de 125 rpm, jusqu'à ce que le POR des boues s'élève à une valeur supérieure à 500 mV.

### 3.4 Mesure du potentiel de lixiviation

Tous les essais de lixiviation ont été effectués avec des volumes de 200 mL de boue déposés dans des Erlenmeyers de 500 mL. Chacune des boues a été traitée selon les trois procédés de lixiviation décrits au tableau 6. Des échantillons de 15 mL étaient prélevés à des intervalles de 12 heures lors de la biolixiviation avec le soufre, et de 48 heures lors de la biolixiviation avec le sulfate ferreux. Les échantillons étaient centrifugés à 20 000 x g pendant 15 minutes, et la fraction liquide était conservée pour l'évaluation des concentrations de métaux lourds et de sulfate par spectrophotométrie à émission de plasma (modèle Atom Scan 25 de Thermo Jarrell Ash Corporation).

### 3.5 Dénombrement des populations microbiennes lixiviantes

Les populations bactériennes lixiviantes dans les boues ont été énumérées par la technique d'ensemencement directe sur milieu gélosé en utilisant les milieux synthétiques au thiosulfate pour thiobacilles peu-acidophiles (pH 7.0) et acidophiles (pH 4.0) décrit par Laishley et al. (1988) et Reynolds et al. (1981). Les populations de thiobacilles dans les boues

TABLEAU 6. Conditions expérimentales utilisées pour les procédés de lixiviation des métaux

Symboles	Description
S	Lixiviation microbienne avec le soufre élémentaire comme substrat (0.5% p/v), pH initial non-ajusté, incubation à 28 °C et 200 rpm pendant 120 heures.
F	Lixiviation microbienne avec le sulfate ferreux comme substrat (0.5% p/v), pH initial ajusté à 4.0 avec de l'acide sulfurique, incubation à 21 °C et 125 rpm pendant 240 heures.
A	Lixiviation chimique, pH initial ajusté à 1.5 avec de l'acide sulfurique, incubation à 21 °C et 200 rpm pendant 24 heures.

prélevées ont été dénombrées ainsi que les populations obtenues dans les boues après acclimatation sur le soufre. De même, la croissance des deux types de thiobacilles a été suivie dans cinq boues d'épuration (A, D2, L2, N, S3) pendant le procédé de biolixiviation. Ces essais ont été effectués en double, aux conditions décrites au tableau 6. La préparation des échantillons de boue a été effectuée selon la technique proposée par Dudley *et al.* (1980); des volumes de 1 mL de boue étaient dilués dans 14 mL de tampon phosphate (PBS: 0.01 M, pH 7.0) et mélangés à haute vitesse au Vortex pendant deux minutes dans un tube à centrifugation contenant approximativement 1 g de billes de verre stériles (4-5 mm). Les échantillons étaient par la suite dilués dans le tampon PBS, et des aliquots (0.1 mL) des

dilutions appropriées ont été déposés (en triple) à la surface des géloses, et étalées à l'aide de tige de verre. Les géloses étaient incubées à 28°C pendant deux semaines.

### **3.6 Isolement et identification des populations lixiviantes**

#### **3.6.1 Microflore oxydant le soufre**

L'isolement des populations lixiviantes peu-acidophiles a été réalisé à partir des géloses utilisées pour la détermination du nombre de thiobacilles peu-acidophiles dans les boues prélevées, alors que les populations acidophiles ont été isolées des géloses employées pour le dénombrement de thiobacilles acidophiles dans les microflores acclimatées à l'oxydation du soufre. Un échantillon de chaque type de colonie a été purifié par épuisement sur milieu gélosé. La capacité acidifiante de chaque isolat a été testée en milieu synthétique liquide (Barton et Shively, 1968) contenant 0.5% de soufre stérilisé (MS + S<sup>0</sup>) ou 0.5% de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O (MS + S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), pendant une période d'incubation de dix jours. Cette caractéristique physiologique constitue le plus important critère taxonomique dans la classification des thiobacilles peu-acidophiles (Hutchinson *et al.*, 1969; Kelly et Harrison, 1988). La capacité des isolats à croître en hétérotrophie a été examinée en ajoutant 1% (concentration finale) d'une solution de glucose stérilisée par filtration au milieu synthétique (MS + glu). La possibilité d'oxyder l'ion ferreux pour les isolats acidophiles a été vérifiée en milieu 9K (pH 2.5) contenant 44 g/L de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Silverman et Lundgren, 1959).

#### **3.6.2 Microflore oxydant l'ion ferreux**

La présence de microorganismes oxydant l'ion ferreux dans les boues acclimatées au sulfate ferreux a été vérifiée en inoculant 1 mL de boue dans 100 mL de milieu 9K. Les

échantillons ont été incubés pendant quatre semaines à 21°C et sous une agitation de 125 rpm. Deux souches bactériennes: BL-1, isolé de la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) et VA-1, isolé de la boue digérée anaérobie de Valcartier (S3) ont été purifiées sur milieu 9K gélosé (Manning, 1975).

### 3.6.3 Microscopie électronique à balayage

La colonisation du soufre élémentaire dans les boues digérées de Black Lake (D2) et de Cowansville (H) a été examinée après cinq jours d'incubation à 28 °C et 200 rpm, dans 100 mL de boue, contenant un inoculum de 5% de microflore adaptée et 1% de soufre sous forme de pastille. De même, l'attachement au soufre de quelques souches pures de *Thiobacillus* a été étudié dans 100 mL de la boue digérée anaérobie de Valcartier (S3) préalablement autoclavée et également en milieu synthétique (MS). Ces milieux ont été ajustés initialement à pH 7.0 pour *T. thioparus* ATCC 55127, et à pH 4.0 pour *T. thiooxidans* ATCC 55128 et ATCC 19377.

Les pastilles de soufre (0.35 cm d'épaisseur x 1 cm de diamètre) ont été préparées par précipitation à l'air de soufre fondu dans des moules en aluminium selon la technique de Bryant et al. (1984). Après la période d'incubation, les pastilles ont été retirées avec soin des Erlenmeyers, lavées à l'eau distillée et placées pendant 18 heures dans une solution de 2% (v/v) de glutaraldéhyde préparée dans du tampon PBS (0.01 M, pH 7.0). L'excès de glutaraldéhyde a été éliminé par trois lavages avec le tampon PBS. Les échantillons ont par la suite été traités avec 1% (v/v) de tétr oxyde de d'osmium dans le tampon PBS pendant deux heures, et lavés cinq fois dans le tampon. À ce moment, les échantillons ont été déshydratés dans un gradient d'éthanol (30, 50, 70, 90, 95 et 3 fois 99%) et séchés au point critique avec un appareil Samori PUT-3, avant d'être montés sur des supports en aluminium en utilisant de la peinture d'argent. Les pastilles ont été recouvertes d'une couche d'or-palladium de 400 à

500 A° et examinées sous un angle de 30° avec un microscope électronique à balayage (JEOL JSM-T330A).

### 3.7 Caractérisation des souches VA-4 et VA-7

#### 3.7.1 Physiologie et métabolisme

Les souches VA-7 et VA-4 ont été isolées de la boue digérée anaérobie de Valcartier (boue S) (Jain et Tyagi, 1992). La souche VA-7 a été obtenue à partir des géloses utilisées pour le dénombrement des thiobacilles peu-acidophiles dans la boue brute, alors que la souche VA-4 a été isolée à partir des géloses employées pour la numération des thiobacilles acidophiles dans les boues en présence de la microflore acclimatée. L'isolement des souches a été effectué lors d'ensemencement par épuisement sur gélose.

Le maintien des souches et l'évaluation de leurs caractéristiques physiologiques et métaboliques ont été réalisés selon les protocoles préconisés par Bryant et al. (1983), Laishley et al. (1988) et Reynolds et al. (1981). Les deux isolats et les souches provenant de la collection ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Md) ont été cultivés par transferts hebdomadaires de 1 mL de culture dans 100 mL de milieu synthétique liquide (MS) additionné de 0.5% de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O ou 0.5% de S<sup>0</sup> stérilisé. Le pH des milieux étaient ajustés à 4.0 (*T. thiooxidans* ATCC 19377, souche VA-4: *T. thiooxidans* ATCC 55128) et à 7.0 (*T. denitrificans* ATCC 23644, *T. intermedius* ATCC 15466, *T. neapolitanus* ATCC 23638, *T. thioparus* ATCC 8158, *T. thioparus* ATCC 55127).

Les cinétiques de croissance des deux isolats en milieu synthétique ont été déterminées après ensemencement de 150 mL de milieu MS + 0.5% S<sup>0</sup> et MS + 0.5% S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> avec un inoculum (1%) provenant d'une sous-culture de cinq jours. La croissance des deux isolats a été mesurée par dénombrement cellulaire sur chambre Petroff-Hausser et par ensemencement

sur des géloses au thiosulfate (Laishley *et al.*, 1988; Reynolds *et al.*, 1981). La capacité d'utiliser le  $S_4O_6^{2-}$ , le  $S_3O_6^{2-}$  et le  $SCN^-$  a été vérifiée en ajoutant ces substrats au milieu synthétique liquide à une concentration de 0.5%, et en incubant les cultures (28 °C, 200 rpm) pendant deux semaines. La production de sulfate en milieu synthétique a été mesurée par chromatographie ionique sur une colonne Dionex HPIC AS3, et un chromatographe Dionex Autoion 12. Les échantillons étaient filtrés sur des filtres de polycarbonate (0.45  $\mu$ m) avant l'analyse.

La capacité des souches à croître en hétérotrophie a été testée dans 25 mL de milieu MS additionné (1%) d'un des substrats suivants: arabinose, fructose, glucose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, ribose, sorbitol, xylose, lactate, glutamate, et 0.5% d'extrait de levure (BDH). L'utilisation de composés monocarbonés a été vérifiée en utilisant 0.5% de méthanol et formaldéhyde comme substrats. L'oxydation de l'ion ferreux par les deux souches a été examinée par addition de 0.5% de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  au milieu synthétique. Pour tous ces essais, les milieux ont été inoculés avec 1.0% d'une culture de cinq jours, et la croissance bactérienne a été suivie pendant deux semaines.

Les deux isolats ont été testés pour vérifier leur capacité de croître en anaérobiose par addition de 0.05% de  $NaHCO_3$  et 0.5% de  $KNO_3$  au milieu liquide synthétique. Des bouteilles hermétiques de 100 mL ont été remplies de ces milieux, et incubés à 28 °C après avoir été inoculés. La croissance de la souche VA-7 a été testée dans une gamme de pH initial variant de 3.5 à 9.5, et celle de la souche VA-4 a été testée entre pH 1.5 et 7.0. Des essais de croissance sur géloses ont été effectués à des températures variant entre 5 °C et 43 °C. L'effet de la présence des ions chlorures sur la croissance des deux souches a été testé par l'addition de  $NaCl$  (5%) au milieu liquide ( $MS + S_2O_3^{2-}$ ) après une période d'incubation de deux semaines. L'utilisation de diverses sources d'azote a été vérifiée par substitution du  $(NH_4)_2SO_4$  du milieu liquide au thiosulfate par 0.1% de chacun des composés suivants:  $KNO_3$ ,  $KNO_2$ , urée, glutamate et par l'azote gazeux atmosphérique.

### 3.7.2 Études ultrastructurales

Les cellules bactériennes des deux isolats (VA-4 et VA-7) ont été recueillies après cinq jours de croissance dans 500 mL de milieu synthétique liquide au thiosulfate incubés à 28 °C sous une agitation de 200 rpm. Les cultures ont été centrifugées à 12 000 x g pendant dix minutes. Les cellules bactériennes ont été lavées trois fois dans une solution saline (0.85% NaCl, pH 7.0) avant d'être fixées pendant quatre heures, par une solution de 2% glutaraldéhyde et 2% paraformaldéhyde préparée dans du tampon cacodylate (0.1 M, pH 7.3). Après lavage des culots dans le tampon, ceux-ci ont été enrobés dans une matrice de 4% agar. La postfixation des échantillons a été effectuée dans 3% (v/v) tétroxyde d'osmium pendant deux heures à 4 °C. Après rinçage, les cellules ont été colorées à l'acétate d'uranyle (5%) pendant deux heures à 4 °C, puis de nouveau rincées. La déshydratation des échantillons a été réalisée dans un gradient d'éthanol (30 à 100%) suivie d'un traitement à l'oxyde de propylène. Une section des culots a été placée dans une résine d'épon pendant 18 heures. Des coupes minces ont été préparées avec un couteau de diamant sur un microtome (Reichert OM V2). Les sections ont alors été récupérées et montées sur des grilles de cuivre (grandeur 200 HH). Les coupes ont été colorées pendant dix minutes avec une solution de 5% acétate d'uranyle et d'hydroxyde de plomb, et examinées avec un microscope électronique à transmission (Philips EM 300).

### 3.7.3 Détermination du contenu en G+C% molaire de l'ADN

Des cultures de dix litres de chacun des isolats (VA-4 et VA-7) ont été préparées dans le milieu synthétique au thiosulfate. Les cultures placées dans des contenants de 22 litres étaient aérées par un apport d'air compressé stérilisé par filtration. Après sept jours, les milieux ont été filtrés sur du papier filtre Whatman No. 1 (porosité  $\approx 20 \mu\text{m}$ ), afin d'enlever l'excès de précipité accumulé dans le liquide durant la croissance. Les filtrats ont été centrifugés à 12 000

x g pendant 15 minutes à 5° C. Les culots ont été resuspendus dans une solution saline (0.15 M NaCl, pH 7.0). L'ADN bactérien a été isolé selon la procédure de Marmur (1961) et le pourcentage G+C% molaire déterminé par la méthode spectrophotométrique de Ulitzur (1972). L'ADN isolé de *Escherichia coli* ATCC 16 a été utilisé comme référence.

#### 3.7.4 Cinétiques de croissance dans la boue

La croissance des deux isolats (VA-4 et VA-7) et des autres souches de collection (*T. intermedius*, *T. neapolitanus*, *T. thioparus*, *T. denitrificans*, *T. thiooxidans*) a été mesurée dans la boue digérée anaérobie de Valcartier (boue S), préalablement autoclavée ou non-autoclavée, dans la boue autoclavée digérée aérobie de Black Lake (boue D2), et dans la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S3). Un volume de 1% d'inoculum de cultures de cinq jours (MS + S<sup>o</sup>) a été déposé dans 150 mL de chacune des boues contenant 0.5% de soufre stérilisé. Le pH initial des boues était ajusté à pH 4.0 pour *T. thiooxidans* et la souche VA-4, et à pH 7.0 pour les autres souches. Les boues ont également étéensemencées avec des cultures mixtes (1% de chaque culture pure) des souches VA-4 et VA-7 et des souches *T. thioparus* ATCC 8158 et *T. thiooxidans* ATCC 19377. Les contrôles consistaient en 150 mL de boue autoclavée additionnée de 0.5% de soufre stérilisé, mais non-inoculée. La croissance des souches VA-4 et VA-7 dans la boue a été suivie par la technique d'ensemencement directe sur géloses tel que décrit précédemment.

### **3.8 Effets des paramètres**

#### **3.8.1 Température**

La lixiviation bactérienne des métaux avec le soufre et avec le sulfate ferreux a été testée à six différentes températures (7, 14, 21, 28, 35, et 42 °C) ( $\pm 1$  °C). Les essais ont été réalisés en double, sous une agitation de 200 rpm, dans des volumes de 200 mL de la boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2). La boue était additionnée de 0.5% de substrat ( $S^0$  ou  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) et inoculée avec 5% d'une microflore acclimatée ( $S^0$  ou ion ferreux) préparée par croissance à 28 °C. Pour les essais avec le sulfate ferreux, le pH initial des boues a été ajusté à pH 4.0. Des contrôles sans substrat étaient inclus à 7 °C et 42 °C. Des échantillons de 15 mL ont été prélevés à des périodes variant entre un demi et deux jours. La croissance des populations oxydant le soufre a été suivie selon les méthodes décrites auparavant.

#### **3.8.2 Contenu en solides et pH initial**

Des essais de lixiviation bactérienne avec le soufre ont été réalisés à différents pH initiaux (3, 4, 5, 6, 7) et à différentes concentrations en solides de boue (7.0, 22.8, 51.8 et 70.0 g/L). Le pH initial de la boue a été ajusté avec de l'acide sulfurique (2 N), alors que les concentrations en solides de la boue ont été ajustées par centrifugation de la boue et par dilution dans le surnageant de la boue. Des volumes de 200 mL de la boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2) ont été utilisés pour ces tests. Les conditions expérimentales sont décrites au tableau 6.

### 3.8.3 Disponibilité du soufre

Des essais de biolixiviation ont été effectués avec 0.5% (p/v) de trois formes de soufre (poudre, granulaire, bloc). La boue digérée de Black Lake (D2) a été utilisée pour ces expériences. Des volumes de 200 mL de boues ont étéensemencés avec 5% de la microflore acclimatée provenant de même boue, et ont été incubés à 28 °C sous une agitation de 200 rpm. Les blocs de soufre ont été préparés selon la technique énoncée précédemment. Les granules de soufre ont été formées par précipitation de soufre fondu dans de l'eau tiède (Laisley *et al.*, 1986). Les granules ont été tamisés et ceux dont les dimensions variaient entre 2.36 et 4 mm ont été conservés.

### 3.8.4 Concentration en métaux dans les boues.

Les effets de l'augmentation des concentrations ioniques de métaux sur le procédé de biolixiviation ont été examinés par addition à la boue (D2) de 0, 50, 100, 200 et 500 mg/L de Cu (CuSO<sub>4</sub>) et de Zn (ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O). Les conditions d'incubation sont présentées au tableau 6.

## 3.9 Modifications des caractéristiques de la boue

### 3.9.1 Destruction des bactéries indicatrices

La réduction de quatre indicateurs bactériens (hétérotrophes totaux, coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux) a été suivie pendant le procédé de biolixiviation dans la boue secondaire de Black Lake (boue C) ajustée à deux concentrations en solides (4.8 g/L et 17.4 g/L). Des volumes de 200 mL de boue (en triple) ont étéensemencés avec

5% de microflore acclimatée et 0.5% de soufre a été ajouté à la boue, excepté pour une série contrôle (sans soufre et sans inoculum) dans la boue non-concentrée. Les boues étaient incubées à 28 °C avec une agitation de 200 rpm. Des échantillons (5 mL) ont été prélevés aux 12 heures pendant quatre jours, pour les analyses microbiologiques et chimiques. Les populations bactériennes ont été dénombrées par la technique d'ensemencement directe sur gélose décrite précédemment. Les milieux de cultures provenaient des laboratoires Difco. Les coliformes totaux (CT) ont été énumérés sur m-Endo agar LES, les coliformes fécaux (CF) sur m-FC agar, les streptocoques fécaux (SF) sur m-*Enterococcus* agar, et les hétérotrophes aérobies totaux (HT) sur Standard plate count agar. La croissance des thiobacilles a été suivie sur les milieux gélosés au thiosulfate (Laishley et al., 1988; Reynolds et al., 1981). La réduction des coliformes totaux a aussi été évaluée après cinq jours de biolixiviation dans dix boues d'épuration (A, B, C, D, G, H, I, K, L, N). Les conditions expérimentales sont décrites au tableau 6.

### 3.9.2 Réduction des solides des boues

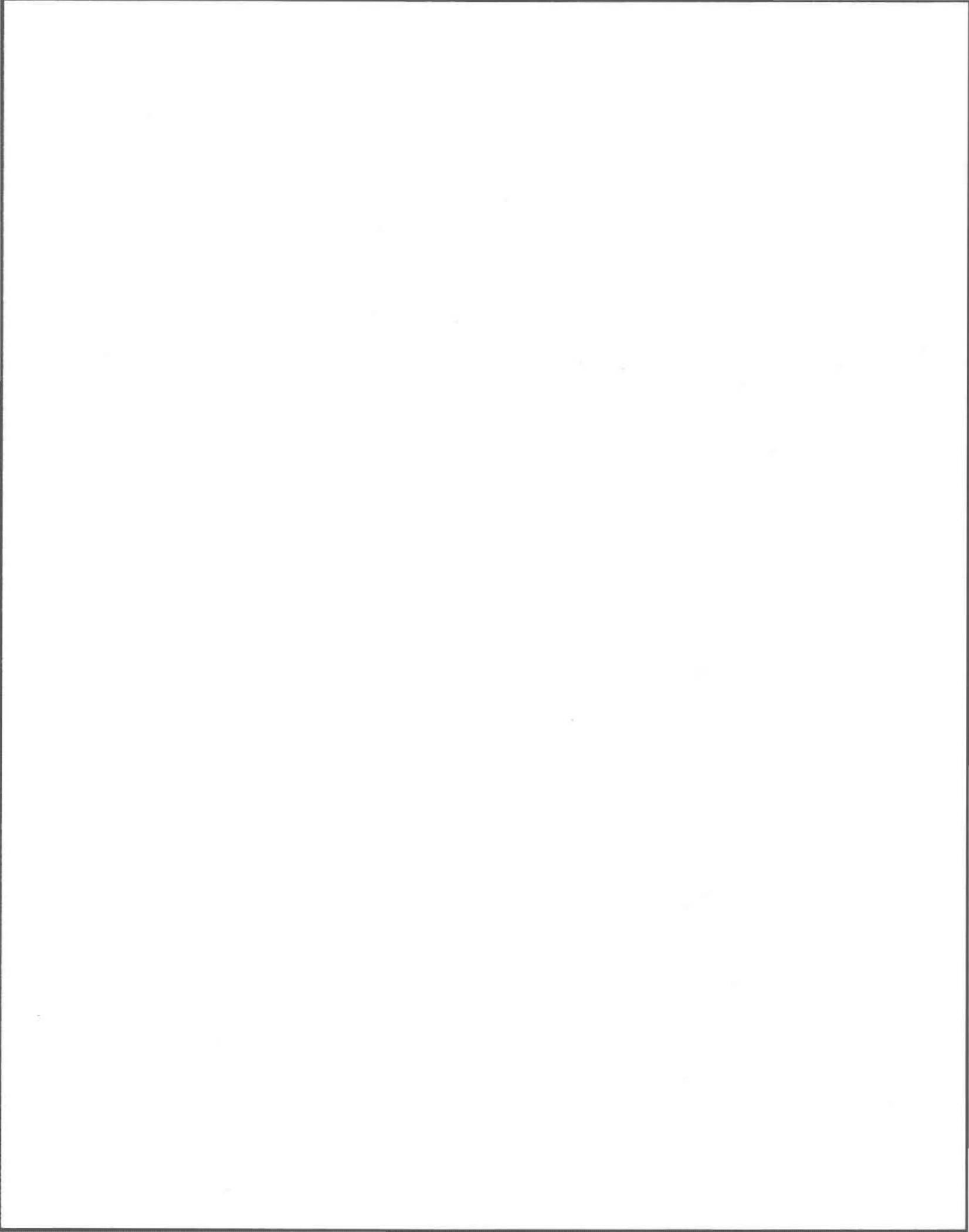
La capacité du procédé de biolixiviation à réduire la biomasse des boues a été évaluée par la mesure des solides volatils (SV) et des matières en suspension volatiles (MESV) avant et après une période de cinq jours de lixiviation. Ces tests ont été réalisés lors des essais de lixiviation faits avec les dix boues d'épuration (voir section 3.9.1). Les SV et MESV ont été mesurés selon les techniques standardisées (APHA et al., 1989).

### 3.9.3 Solubilisation de la matière organique

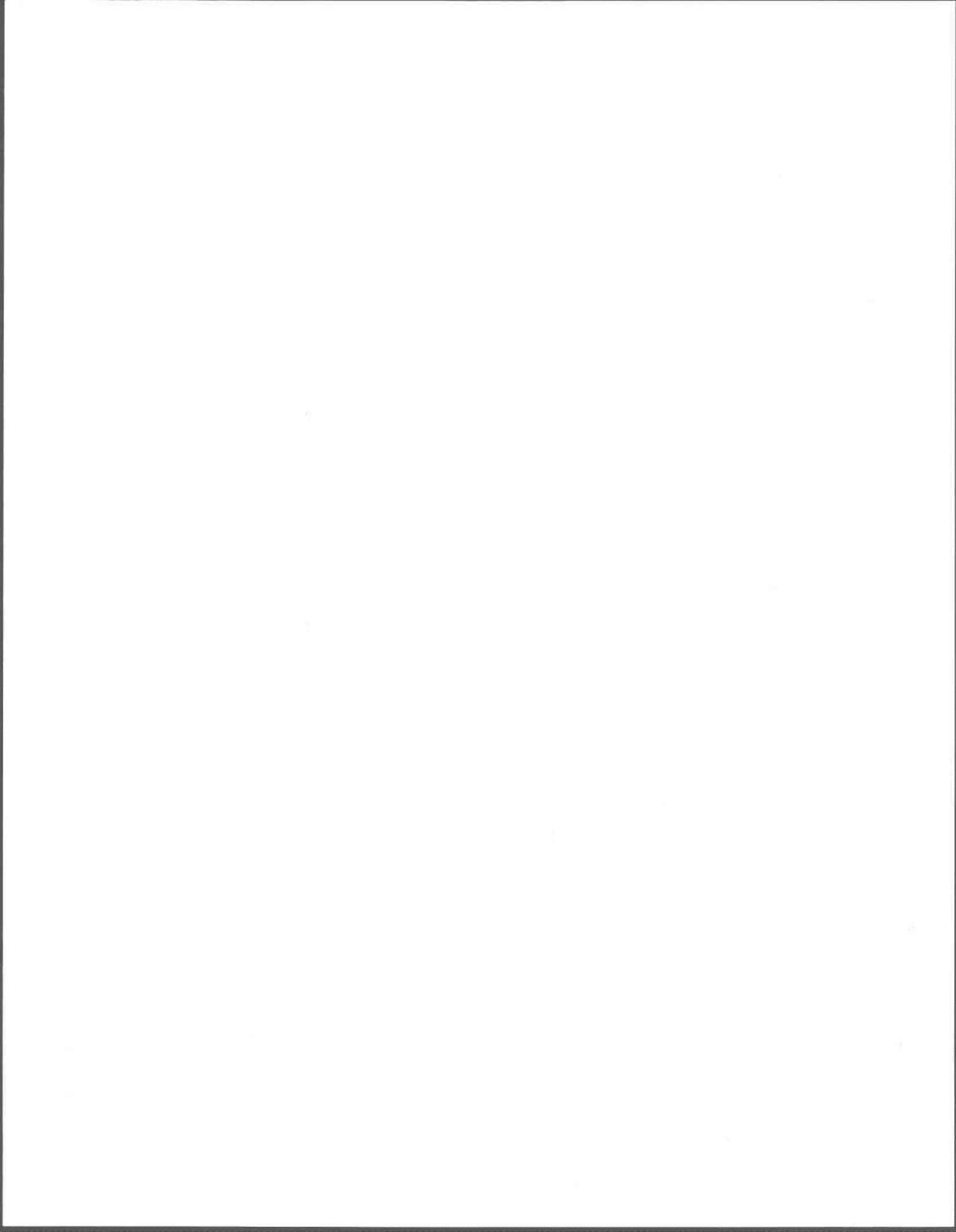
La solubilisation de la matière organique des boues lors de la biolixiviation a été mesurée lors des essais avec les dix boues d'épuration (voir section 3.9.1), et également dans presque tous les essais de biolixiviation réalisés dans cette étude. La concentration de carbone total mesurée en solution par spectrophotométrie à émission de plasma, a été utilisée comme évaluation de la solubilisation de la matière organique. L'échantillonnage a été effectuée à partir des prélèvements de boues pour la mesure des métaux solubilisés.

### 3.9.4 Mesure de la production d'intermédiaires

La production des intermédiaires soufrés (thiosulfate, trithionate, tétrathionate) lors de l'oxydation du soufre élémentaire dans les boues a été mesurée dans trois types de boues: boue secondaire de Beauceville (A), boue digérée aérobie de Sainte-Claire (L2) et boue digérée anaérobie de Valcartier (S3). Ces mesures ont été faites lors de l'étude de la cinétique de croissance des populations lixiviantes (voir section 3.5). L'accumulation des intermédiaires à également été vérifiée lors de croissance des souches VA-7 et VA-4 en milieu synthétique (MS + S<sup>0</sup> et MS + S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et dans la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S). Le S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sub>3</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> et S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> ont été dosés par la technique de la cyanolyse décrite par Kelly et al. (1969).



## CHAPITRE 4



## CHAPITRE 4

### ACCLIMATATION ET POTENTIEL LIXIVIAN DE LA MICROFLORE INDIGÈNE DES BOUES

Le développement de nouvelles biotechnologies requiert la mise au point de souches microbiennes bien acclimatées au milieu, et efficaces pour l'activité métabolique recherchée. En ce qui concerne la biolixiviation des métaux toxiques associés aux boues d'épuration municipales, les différents essais d'extraction des métaux réalisés à ce jour ont été effectués avec des cultures pures de *T. ferrooxidans* et *T. thiooxidans* préalablement adaptées à croître dans la boue étudiée. Si ces souches se sont montrées performantes, l'utilisation de celles-ci dans un procédé porté à l'échelle industrielle nécessiterait un entretien permanent des souches en laboratoire, pour rétablir la microflore lixiviane dans les cas de lessivage bactérien du bioréacteur ainsi que lors de variations importantes de la charge toxique des boues (inhibition des souches lixiviantes). Ce chapitre a été consacré à la démonstration que la décontamination adéquate des boues d'épuration peut être effectuée directement par la microflore indigène des boues.

#### 4.1 Acclimatation de la microflore indigène lixiviane

Cette section présente les résultats de l'acclimatation sur le soufre et l'ion ferreux de la microflore de 23 boues d'épuration de différents types et avec des contenus variés en solides.

#### 4.1.1 Soufre

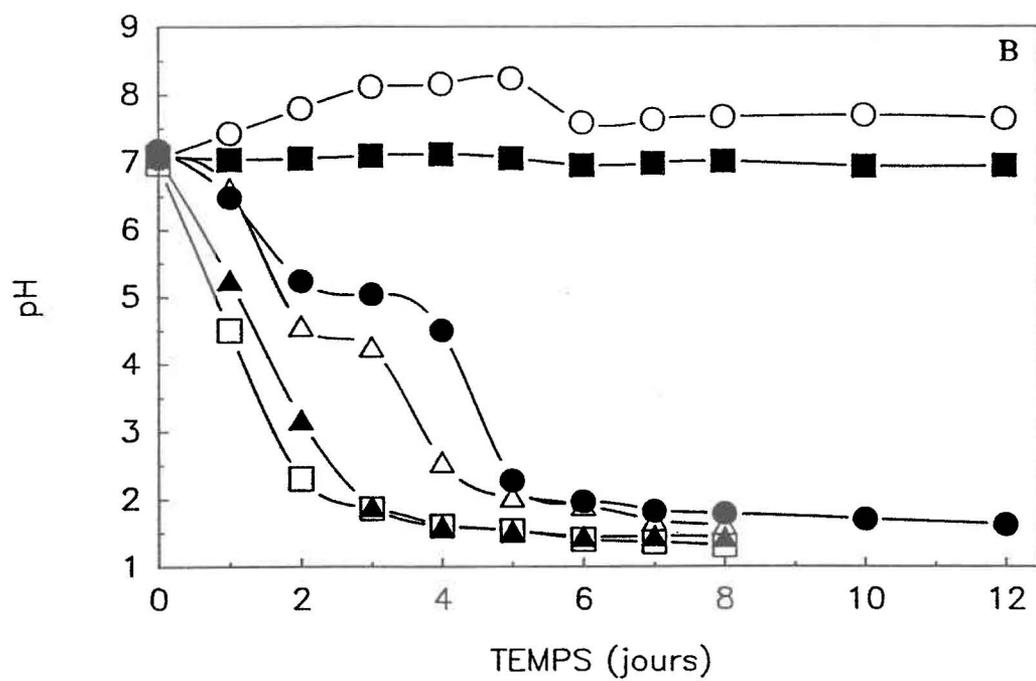
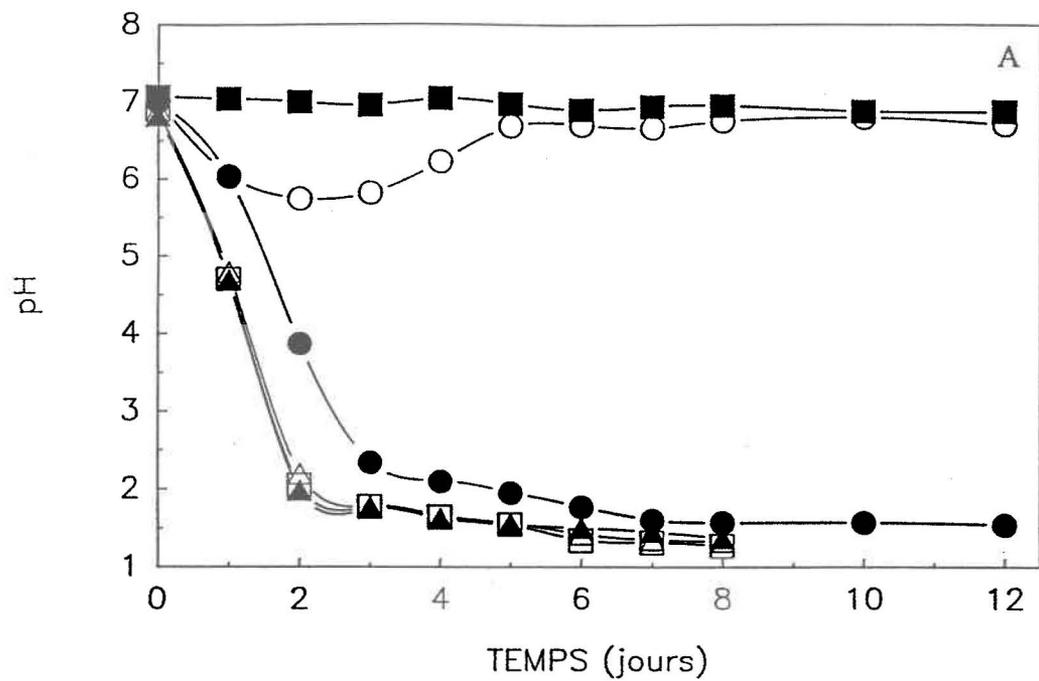
L'ajout initial de 1% de soufre élémentaire cause un abaissement du pH des boues de leur valeur initiale (6 - 8) à 2.0 dans une période de temps variant de 5 à 21 jours, et ce pour toutes les boues testées dans cette étude (tableau 7). L'adaptation et l'enrichissement de la microflore oxydant le soufre, par inoculation de chacune des boues avec 5% de la boue correspondante acidifiée, permet de réduire de un et demi à sept jours le temps requis pour atteindre un pH de 2.0. Les résultats présentés au tableau 7 indiquent que la microflore des divers types de boues d'épuration peut être acclimatée à l'oxydation rapide du soufre. Il apparait donc que les étapes de stabilisation aérobie et de digestion anaérobie des boues n'entravent pas la capacité d'acclimatation des microorganismes oxydant le soufre. Le contenu en solides totaux (tableau 5) ne semble pas être un facteur limitant puisque les boues digérées de Sainte-Claire (L2) et de Cowansville (H) qui ont des contenus élevés en solides (31.4 et 30.4 g/L respectivement) montrent une activité acidifiante élevée (tableau 7).

La figure 1 représente les deux différents types de schéma d'acclimatation de la microflore. Ainsi, certaines microflores, comme celle de la boue secondaire de Beauceville (figure 1A), atteignent leur optimum d'acclimatation au premier transfert. La chute initiale du pH de cette boue se fait rapidement et en une seule étape, indiquant que les microorganismes oxydant le soufre, présents initialement dans la boue, sont métaboliquement actifs. Pour d'autres boues, l'acidification s'effectue en deux étapes (figure 1B): dans un premier temps le pH est abaissé à des valeurs se situant entre quatre et cinq par des microorganismes peu-acidophiles, puis après une période de latence la croissance de la flore acidophile entraîne la chute du pH à des valeurs inférieures à 2.0. Le transfert successif des boues acidifiées dans les boues correspondantes permet d'accélérer la chute du pH et de réduire le temps de latence. Les contrôles sans soufre, et avec soufre dans des boues

TABLEAU 7. Acclimatation microbienne mesurée par le temps requis (heures) pour l'acidification (pH 2) des boues par la microflore oxydant le soufre, et pour l'augmentation du potentiel d'oxydo-réduction (500 mV) par la microflore oxydant l'ion ferreux

Boues	Soufre		Ion ferreux	
	avant adaptation	après adaptation	avant adaptation	après adaptation
A	120	48	468	48
B	144	55	456	84
C	120	48	456	120
D	192	48	276	120
E	154	59	672	240
F	156	72	672	228
G	133	55	444	48
H	161	76	504	144
I	196	72	552	144
J	216	168	672	132
K	168	66	564	168
L2	116	51	288	192
M	204	32	264	72
N	115	52	444	48
O	228	120	588	144
P	264	108	492	144
Q	312	168	636	144
R	168	96	384	72
S	504	96	480	48
S2	140	74	540	72
S3	166	105	456	72
T	168	48	336	192
U	228	110	336	228

**FIGURE 1.** Adaptation de la microflore oxydant le soufre déterminée par l'acidification de la boue de Beauceville. (A) secondaire (boue A); (B) digérée aérobie (boue B). Symboles: (○) contrôle sans soufre; (●) croissance initiale; (△) 1<sup>er</sup> transfert; (▲) 2<sup>ième</sup> transfert; (□) 3<sup>ième</sup> transfert; (■) contrôle stérile avec soufre.

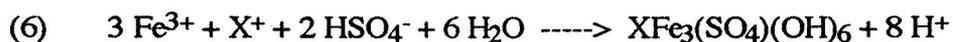


autoclavées, démontrent que la réduction du pH est causée par l'oxydation du soufre en acide sulfurique, et que celle-ci est réalisée par voie microbienne.

#### 4.1.2 Ion ferreux

L'addition de 0.5% de sulfate ferreux aux boues ajustées à pH 4.0 entraîne une augmentation importante du potentiel d'oxydo-réduction (POR) des boues (entre 500 et 600 mV). Une période d'incubation de 11 à 28 jours est requise pour l'augmentation initiale du POR à 500 mV dans les diverses boues testées (tableau 7). Après deux transferts, le temps d'incubation nécessaire à l'obtention d'un POR de 500 mV est abaissé entre deux et dix jours. Tel que démontré aux figures 2A et 2B, l'augmentation du POR dans la boue additionnée de sulfate ferreux est nettement supérieure à ce qui est observé dans les contrôles. Les résultats obtenus dans les boues stérilisées, avec et sans ajout de sulfate ferreux, démontrent que l'oxydation chimique de l'ion ferreux est lente. La hausse du POR de la boue est attribuée en grande partie à l'augmentation du rapport  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  (équation 5) et peut être utilisée sous différentes conditions de lixiviation microbienne comme mesure de l'activité biologique de l'oxydation de l'ion ferreux (Pesic et al., 1989). Dans l'équation 5, (R) représente la constante de gaz, (T) la température en degrés Kelvin, (F) la constante de Faraday, et (n) est le nombre d'électrons transférés dans le processus.

$$(5) \quad E = E^0 + (2.3 RT/nF) [\log (Fe^{3+}/Fe^{2+})]$$



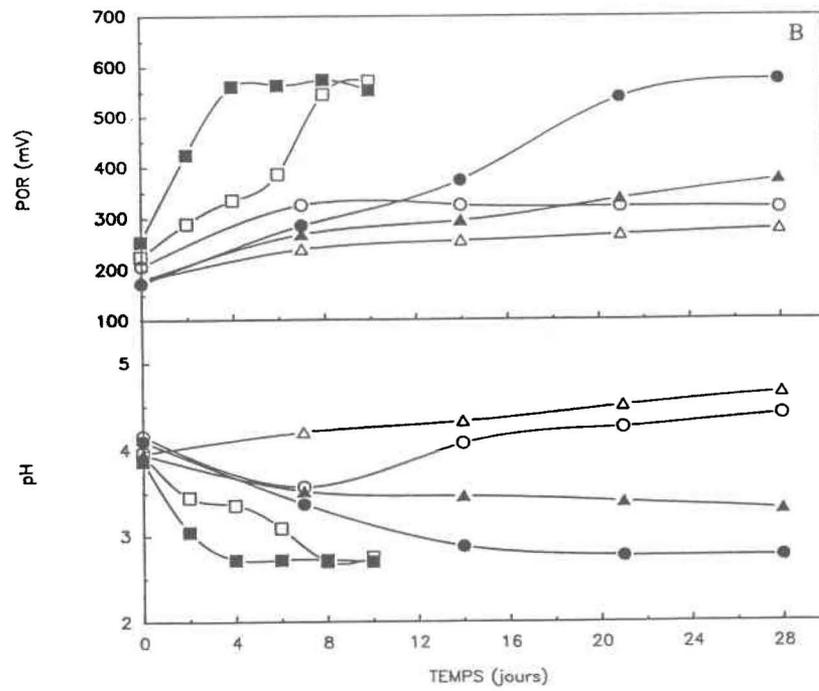
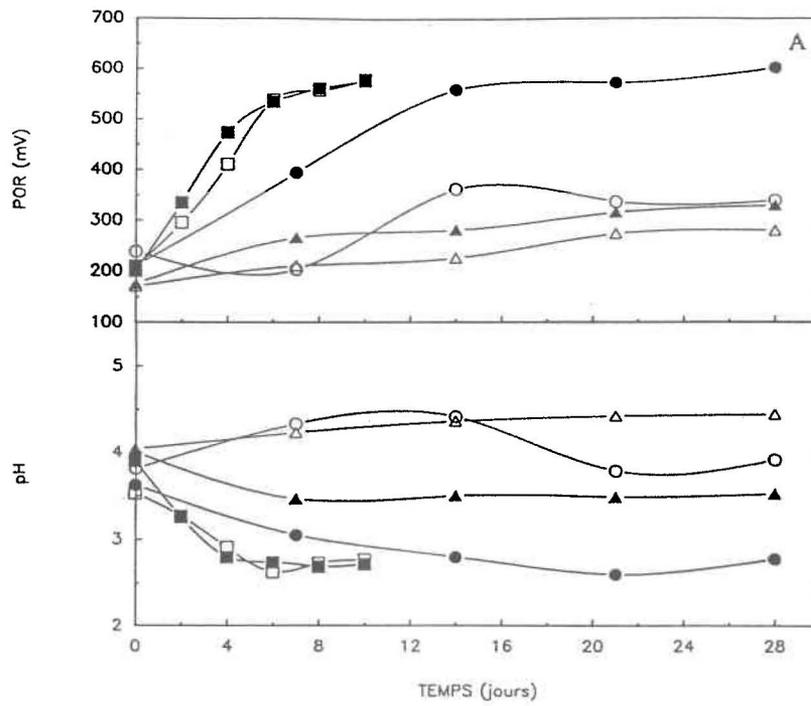
L'acidification des boues (figures 2A et 2B) peut être expliquée en partie par la précipitation, sous forme de jarosite, des ions ferriques générés par l'oxydation des ions ferreux (équation 6). La formation d'hydroxydes et de phosphates ferriques peut également contribuer à la réduction du pH des boues.

De façon semblable à ce qui est observé lors de l'acclimatation de la microflore oxydant le soufre, la microflore de tous les types de boues d'épuration peut être adaptée à l'oxydation de l'ion ferreux, et la concentration en solides ne semblent pas empêcher l'acclimatation de la flore microbienne. De même, deux schémas d'adaptation des microorganismes oxydant l'ion ferreux ont été observés: dans certaines boues (figure 2A) l'acclimatation est optimale après un premier transfert, indiquant ainsi que la flore indigène oxydant l'ion ferreux est métaboliquement active et bien adaptée. Dans d'autres boues (figure 2B) au moins deux transferts sont requis pour l'obtention d'une microflore bien acclimatée. Ceci démontre que les microorganismes oxydant l'ion ferreux ne sont pas initialement actifs dans ces boues et qu'une période de latence est nécessaire avant que la microflore soit en mesure de proliférer rapidement dans les boues. Il est donc clair que le temps de lixiviation requis pour la solubilisation des métaux (avec soufre ou ion ferreux) peut être réduit considérablement après une courte période d'acclimatation de la microflore indigène (deux ou trois transferts).

#### **4.2 Essais de lixiviation**

Les potentiels lixivians des microflores acclimatées à l'oxydation du soufre élémentaire et à l'oxydation de l'ion ferreux ont été examinés pour les 23 boues d'épuration, et ceux-ci ont été comparés à ce qui peut être obtenu par lixiviation chimique à l'acide sulfurique.

FIGURE 2. Adaptation de la microflore oxydant l'ion ferreux mesurée par l'augmentation du POR et par l'acidification de la boue (A) digérée aérobie de Black Lake (boue D); (B) digérée anaérobie de Valcartier (boue S3). Symboles: (○) contrôle sans sulfate ferreux; (●) croissance initiale; (□) 1<sup>er</sup> transfert; (■) 2<sup>ième</sup> transfert; (△) contrôle stérile sans sulfate ferreux; (▲) contrôle stérile avec sulfate ferreux.



#### 4.2.1 Composition en métaux dans les boues

L'efficacité des méthodes biologiques ou chimiques de solubilisation des métaux doit tenir compte des teneurs en métaux dans les boues et des rendements d'extraction souhaitables. Les tableaux 8 et 9 présentent le contenu en métaux des boues utilisées pour les divers essais de lixiviation effectués dans cette étude. Les pourcentages de réduction requis pour l'utilisation agricole des boues au Québec (Flynn et al., 1987) sont indiqués au tableau 10. L'aluminium et le fer sont les métaux retrouvés en plus fortes concentrations dans les 30 boues utilisées avec une moyenne respective de 26.7 et 17.5 g/kg de boue sèche. Cependant, aucune limite pour l'épandage agricole n'est imposée pour ces éléments. Le cuivre, le manganèse et le zinc sont également présents en concentrations appréciables (1130, 1010 et 783 mg/kg). Le chrome, le plomb et le nickel se retrouvent aux concentrations moyennes suivantes: 297, 206 et 99 mg/kg. La teneur moyenne en cadmium (7.3 mg/kg) est nettement inférieure à celle des autres métaux mesurés, toutefois; la présence de ce métal demeure particulièrement redoutée pour sa zootoxicité élevée. Les concentrations moyennes en métaux mesurées pour les boues sont légèrement supérieures à ceux de 34 boues québécoises (tableau 3) évaluées par St-Yves et Beaulieu (1988). Le cuivre est le métal dépassant le plus fréquemment les valeurs prescrites pour l'épandage agricole (Flynn et al., 1987), avec 50% des boues (15/30) (tableau 10). Les teneurs en nickel et en manganèse surpassent les valeurs recommandées dans 20% (6/30) et 17% (5/30) des cas. Le cadmium dépasse les normes en trois occasions (10%), alors que le chrome et le plomb excèdent les normes dans une seule boue (3%). Les teneurs en zinc sont respectées pour toutes les boues. Plus de 77% (23/30) des boues testées, outrepassent, pour au moins un métal, les valeurs préconisées.

TABLEAU 8. Contenu (mg/kg de boue sèche) en métaux des boues d'épuration utilisées dans cette étude et teneurs recommandées pour l'épandage agricole

Boues	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Beauceville (A)	27640	5.0	87	215	20600	933	28	110	419
Beauceville (B)	26300	2.6	66	200	16200	1050	42	234	392
Black Lake (C)	43600	9.2	401	1070	19500	445	141	278	413
Black Lake (C2)	21300	4.1	352	1280	14700	254	241	186	515
Black Lake (C3)	28100	5.7	258	1800	20000	379	319	248	936
Black Lake (C4)	26200	4.6	289	1540	15900	273	223	198	556
Black Lake (D)	24000	10.0	1720	1830	23200	395	177	336	596
Black Lake (D2)	22100	4.6	600	1600	18400	327	154	161	517
Black Lake (D3)	31100	6.4	609	2000	22300	444	195	222	615
Cecil County (E)	74100	1.4	50	178	6080	323	17	23	359
Cecil County (F)	77700	0.7	26	147	5100	365	13	15	285
Cowansville (G)	30900	4.5	124	737	23300	4610	30	177	379
Cowansville (H)	18600	4.0	87	625	23200	5700	26	129	343
Granby (I)	32500	2.3	99	1210	14000	2914	142	266	181
Granby (J)	18000	1.9	97	1280	12700	2450	151	225	151
Sainte-Claire (K)	28800	0.8	349	1020	11800	1460	50	43	1430
Sainte-Claire (L)	17200	10.7	515	627	16100	933	55	201	1510
Sainte-Claire (L2)	27400	7.7	321	603	15800	1520	45	118	1210
Saint-Étienne (M)	6630	7.0	136	426	4380	48	22	126	768
Saint-Georges (N)	41600	4.4	91	712	12600	393	69	209	869
Toronto (O)	18100	31.0	647	968	36800	255	67	178	1560
Toronto (P)	18500	29.0	602	947	32500	256	64	176	1500
Toronto (Q)	16700	23.0	473	723	34400	278	59	148	1180
Valcartier (R)	16800	0.9	89	2070	16400	1270	65	233	647
Valcartier (S)	21700	11.2	116	3680	14500	166	23	447	1020
Valcartier (S2)	12800	5.1	67	1580	6730	247	13	646	468
Valcartier (S3)	19300	7.9	98	2280	11200	444	17	321	708
Valcartier (S4)	11400	7.2	93	1780	9770	679	23	278	564
Wilmington (T)	13500	2.0	155	391	19000	418	222	106	1460
Wilmington (U)	27000	3.7	288	462	29000	1010	274	155	1930
Moyennes	26700	7.3	297	1130	17500	1010	99	206	783
Écarts-types	15700	7.6	333	785	8200	1310	89	124	479
Niveaux recommandés <sup>a</sup>	----- b	15	1000	1000	-----	1500	180	500	2500

<sup>a</sup> Flynn *et al.* (1987)

<sup>b</sup> Pas de valeur prescrite

TABLEAU 9. Contenu (mg/L de boue) en métaux des boues d'épuration utilisées dans cette étude

Boues	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Beauceville (A)	388	0.070	1.22	3.02	204	13.1	0.39	1.54	5.88
Beauceville (B)	102	0.010	0.26	0.77	63	4.08	0.16	0.91	1.52
Black Lake (C)	211	0.045	1.94	5.18	95	2.15	0.68	1.35	2.00
Black Lake (C2)	341	0.066	5.63	20.5	235	4.06	3.85	2.98	8.24
Black Lake (C3)	353	0.071	3.23	22.7	251	4.76	4.00	3.11	11.8
Black Lake (C4)	500	0.088	5.53	29.4	303	5.23	4.26	3.78	10.6
Black Lake (D)	585	0.244	41.9	44.6	567	9.64	4.31	8.20	14.5
Black Lake (D2)	505	0.105	13.7	36.7	420	7.46	3.50	3.68	11.8
Black Lake (D3)	682	0.141	13.4	44.0	488	9.74	4.28	4.87	13.5
Cecil County (E)	362	0.007	0.24	0.87	30	1.58	0.08	0.11	1.76
Cecil County (F)	790	0.007	0.26	1.50	52	3.71	0.13	0.16	2.90
Cowansville (G)	457	0.067	1.83	10.9	344	68.15	0.44	2.62	5.60
Cowansville (H)	565	0.122	2.65	19.0	707	173	0.78	3.92	10.4
Granby (I)	464	0.033	1.41	17.3	200	41.6	2.02	3.80	2.58
Granby (J)	566	0.060	3.04	40.2	397	76.8	4.72	7.05	4.73
Sainte-Claire (K)	49	0.001	0.59	1.72	20	2.46	0.08	0.07	2.41
Sainte-Claire (L)	699	0.435	21.0	25.5	654	38.0	2.25	8.18	61.6
Sainte-Claire (L2)	863	0.242	10.1	19.0	498	47.8	1.42	3.69	37.9
Saint-Étienne (M)	39	0.041	0.80	2.50	26	0.28	0.19	0.74	4.51
Saint-Georges (N)	296	0.031	0.65	5.07	89	2.80	0.49	1.49	6.19
Toronto (O)	439	0.752	15.7	23.5	893	6.17	1.63	4.30	37.9
Toronto (P)	507	0.796	16.5	26.1	892	7.03	1.76	4.83	41.2
Toronto (Q)	432	0.596	12.3	18.8	894	7.23	1.53	3.85	30.6
Valcartier (R)	48	0.003	0.25	5.85	46	3.58	0.18	0.66	1.83
Valcartier (S)	304	0.157	1.63	51.7	204	2.33	0.32	6.27	14.4
Valcartier (S2)	200	0.080	1.05	24.7	105	3.86	0.20	10.1	7.30
Valcartier (S3)	254	0.104	1.29	30.0	147	5.84	0.22	4.22	9.31
Valcartier (S4)	174	0.111	1.42	27.2	150	10.4	0.35	4.25	8.63
Wilmington (T)	259	0.039	2.97	7.49	364	8.00	4.25	2.03	27.9
Wilmington (U)	761	0.105	8.11	13.0	817	28.5	7.72	4.37	54.2
Moyennes	407	0.154	6.35	19.3	339	20.0	1.87	3.57	15.1
Écarts-types	224	0.211	8.92	14.6	285	35.1	1.98	2.54	16.3

TABLEAU 10. Pourcentage de solubilisation des métaux toxiques requis pour permettre l'utilisation agricole des boues utilisées dans cette étude

Boues	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
Beauceville (A)	--- <sup>a</sup>	---	---	---	---	---	---
Beauceville (B)	---	---	---	---	---	---	---
Black Lake (C)	---	---	7	---	---	---	---
Black Lake (C2)	---	---	22	---	26	---	---
Black Lake (C3)	---	---	45	---	44	---	---
Black Lake (C4)	---	---	35	---	20	---	---
Black Lake (D)	---	42	46	---	---	---	---
Black Lake (D2)	---	---	38	---	---	---	---
Black Lake (D3)	---	---	50	---	8	---	---
Cecil County (E)	---	---	---	---	---	---	---
Cecil County (F)	---	---	---	---	---	---	---
Cowansville (G)	---	---	---	68	---	---	---
Cowansville (H)	---	---	---	74	---	---	---
Granby (I)	---	---	18	49	---	---	---
Granby (J)	---	---	22	39	---	---	---
Sainte-Claire (K)	---	---	2	---	---	---	---
Sainte-Claire (L)	---	---	---	---	---	---	---
Sainte-Claire (L2)	---	---	---	2	---	---	---
Saint-Étienne (M)	---	---	---	---	---	---	---
Saint-Georges (N)	---	---	---	---	---	---	---
Toronto (O)	52	---	---	---	---	---	---
Toronto (P)	49	---	---	---	---	---	---
Toronto (Q)	35	---	---	---	---	---	---
Valcartier (R)	---	---	52	---	---	---	---
Valcartier (S)	---	---	73	---	---	---	---
Valcartier (S2)	---	---	37	---	---	23	---
Valcartier (S3)	---	---	57	---	---	---	---
Valcartier (S4)	---	---	44	---	---	---	---
Wilmington (T)	---	---	---	---	19	---	---
Wilmington (U)	---	---	---	---	35	---	---

<sup>a</sup> Teneur en métal sous la valeur prescrite

#### 4.2.2 Microflore oxydant le soufre

Les rendements de solubilisation calculés après cinq jours de lixiviation microbienne avec les microflores oxydant le soufre et en présence de 0.5% de soufre élémentaire sont présentés au tableau 11. Les concentrations de métaux toxiques dans la phase solide sont abaissées sous les valeurs recommandées pour l'utilisation agricole pour toutes les boues testées, excepté pour celle digérée aérobie de Black Lake (boue D) dont la concentration résiduelle de chrome est de 1080 mg/kg de boue sèche (niveau recommandé: 1000 mg Cr/kg de boue sèche). Une période de lixiviation un peu plus prolongée est donc requise pour le traitement de cette boue. La fraction de soufre oxydée après cinq jours de biolixiviation, déterminée par la quantité de sulfate produit, varie entre 6.2% et 68% (tableau 12), et le pH atteint est inférieur à 2.5 pour toutes les boues sauf la boue digérée aérobie de Granby (boue J) dont le pH était de 2.86. Le pourcentage moyen d'oxydation du soufre des 23 boues en fin de lixiviation est seulement de  $34 \pm 17\%$ . Deux exemples de cinétiques de solubilisation des métaux pendant la lixiviation sont présentés à la figure 3. La figure 3A montre la solubilisation des métaux obtenue avec une boue secondaire (Sainte-Claire, boue K) contenant seulement 1.7 g/L de solides totaux, alors que la figure 3B présente les résultats obtenus avec une boue digérée aérobie (Sainte-Claire, boue L2) contenant 31.4 g/L de solides. L'aspect des courbes de ces deux figures permet de conclure que le type de boue utilisé, et le contenu en solides de celle-ci, n'influencent pas de façon considérable le potentiel d'extraction des métaux du procédé. L'ordre de solubilisation des métaux (début de solubilisation) est également le même pour ces deux boues:  $Mn > Zn > Cd > Cu > Ni > Pb = Cr$ . Les moyennes de rendements de solubilisation des métaux obtenues pour les 23 boues (tableau 11) montrent que ce procédé est particulièrement efficace pour l'enlèvement du Mn ( $92 \pm 7\%$ ), Zn ( $85 \pm 10\%$ ), Cd ( $82 \pm 13\%$ ), Ni ( $79 \pm 16\%$ ) et Cu ( $75 \pm 21\%$ ), alors que le Pb ( $27 \pm 21\%$ ) et le Cr ( $31 \pm 19\%$ ) sont solubilisés à des niveaux moindres. Les rendements de solubilisation du manganèse, du zinc, du cadmium, du cuivre et du nickel sont similaires à ceux obtenus avec

des souches acclimatées de *Thiobacillus ferrooxidans* de la collection ATCC (Couillard et Mercier, 1990, 1991a; Tyagi et Tran, 1991; Tyagi et al., 1988, 1990, 1991a, b; Wong et Henry, 1984, 1988). Cependant, le procédé avec le soufre permettant une acidification plus grande de la boue que le procédé avec *T. ferrooxidans*, les niveaux de solubilisation du plomb et du chrome sont supérieurs. Les rendements de solubilisation atteints par biolixiviation avec le soufre indiquent que tous les types de boue d'épuration (primaire, secondaire, digérée aérobie ou anaérobie, fosse d'oxydation) peuvent être décontaminés de leurs métaux lourds à des teneurs prescrites pour l'épandage agricole.

#### 4.2.3 Microflore oxydant l'ion ferreux

Les rendements de solubilisation des métaux obtenus après dix jours de biolixiviation avec 0.5% de sulfate ferreux sont présentés au tableau 13. Ce procédé biologique s'avère efficace pour la solubilisation du Mn ( $89 \pm 8\%$ ), du Zn ( $82 \pm 12\%$ ), du Cd ( $74 \pm 13\%$ ), du Ni ( $63 \pm 19\%$ ) et du Cu ( $60 \pm 22\%$ ). Toutefois, le plomb et le chrome sont très peu solubilisés ( $9 \pm 8\%$  et  $7 \pm 8\%$ , respectivement). Ces niveaux de solubilisation correspondent aux résultats déjà obtenus avec des souches de *T. ferrooxidans* préalablement acclimatées à la boue (Couillard et Mercier, 1990, 1991a; Tyagi et Couillard 1987, 1989; Tyagi et Tran, 1991; Tyagi et al., 1988, 1990; 1991a, b; Wong et Henry, 1984, 1988). Il faut noter qu'une fraction des métaux est solubilisée lors de l'ajustement initial du pH à 4.0 (Mn: 31-86%; Ni: 0-67%; Cd: 0-58%; Zn: 0-58%; Cu: 0-37%). Après dix jours de biolixiviation, 19 des 23 boues d'épuration contenant initialement des concentrations en métaux dépassant les normes ont été décontaminées de façon à correspondre aux valeurs prescrites. La concentration finale de chrome dans la boue digérée de Black Lake (boue D) a été évaluée à 1550 mg/kg de boue sèche (valeur recommandée: 1000 mg Cr/kg de boue sèche). Pour la boue digérée aérobie de Cowansville, la teneur résiduelle en manganèse est de 1600 mg/kg de boue (valeur recommandée: 1500 mg Mn/kg de boue sèche). La concentration finale de cuivre dans la

TABLEAU 11. Rendements de solubilisation des métaux dans les boues après cinq jours de biolixiviation avec 0.5% de soufre ajouté

Boues	% de solubilisation						
	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	78	19	90	96	95	10	87
B	89	17	85	88	94	5	77
C	92	46	95	95	94	35	97
D	76	37	93	87	89	33	93
E	91	15	95	90	92	44	99
F	95	24	96	99	96	64	97
G	85	32	72	99	59	14	97
H	49	13	41	98	46	12	76
I	91	32	80	93	62	17	76
J	77	26	39	66	40	0	70
K	51	16	47	90	48	7	65
L2	86	44	71	96	89	45	98
M	92	65	96	94	72	62	96
N	83	45	94	96	97	63	80
O	68	3	43	91	58	2	78
P	66	4	45	89	59	1	76
Q	69	4	60	79	80	4	76
R	80	57	86	93	87	38	84
S	96	54	87	91	78	46	82
S2	80	46	86	94	89	40	87
S3	86	45	85	95	82	42	97
T	93	58	87	95	84	39	98
U	90	12	70	99	81	10	78
Moy.	82	31	75	92	79	27	85
Éc. types	13	19	21	7	16	21	10

TABLEAU 12. Production de sulfate, acidification et pourcentage de substrat oxydé après 5 jours de lixiviation microbienne avec la microflore oxydant le soufre

Boues	pH		Sulfate		% de soufre oxydé
	initial	final	initial	final	
A	7.61	2.02	504	2920	16.1
B	7.71	2.20	337	2930	17.3
C	6.60	1.71	392	3940	23.7
D	6.23	1.73	772	7350	43.8
E	7.00	1.34	484	10200	68.2
F	7.02	1.25	798	10200	68.1
G	7.39	1.98	543	3570	20.2
H	7.30	2.31	630	4870	28.3
I	6.50	2.19	529	4060	23.6
J	7.68	2.86	673	4140	23.1
K	6.96	2.32	129	1060	6.2
L2	7.50	1.86	471	8910	56.2
M	6.86	1.30	952	6230	41.5
N	6.87	1.60	468	6700	41.6
O	6.60	2.10	1600	4410	29.4
P	6.89	1.97	1770	5160	34.4
Q	6.69	1.74	1500	4700	31.3
R	6.82	1.90	182	2450	15.1
S	6.09	1.75	578	4730	27.7
S2	7.71	1.97	654	5120	29.7
S3	7.23	1.97	813	5310	30.0
T	6.08	1.38	745	8670	57.7
U	7.38	2.24	1210	8150	54.3

boue digérée anaérobie de Valcartier (boue S) a été estimée à 1110 mg/kg, alors que la teneur résiduelle en plomb de la boue S2 est de 575 mg/kg de boue. Pour ces deux métaux les valeurs exigées sont respectivement de 1000 et 500 mg/kg de boue sèche (Flynn *et al.*, 1987). Les deux boues employées pour évaluer les cinétiques de solubilisation des métaux lors du procédé avec le soufre (figure 3) ont été réutilisées pour montrer la solubilisation des métaux pendant le procédé avec le sulfate ferreux (figure 4). Tout comme pour le procédé avec le soufre, le contenu en solides de la boue et le type de boue semblent peu affecter le potentiel de lixiviation de ce procédé biologique. Ces affirmations peuvent également être confirmées par l'examen des rendements de solubilisation obtenus dans les différentes boues (tableau 13). Les valeurs initiales et finales de pH et de POR mesurées dans les boues lors des essais de lixiviation sont présentées au tableau 14. Le potentiel d'oxydo-réduction des boues augmente à des valeurs supérieures à 500 mV lors de la période d'incubation. Toutefois, dans quelques boues la précipitation des ions ferriques abaisse légèrement les valeurs de POR dans les derniers jours d'incubation. Pour les deux boues de Wilmington (boues T et U), la période d'incubation de dix jours a été insuffisante pour provoquer l'augmentation du potentiel d'oxydo-réduction. Une partie du fer utilisée comme substrat (1010 mg/L) précipite lors de l'ajout initial de sulfate ferreux. La concentration moyenne de fer soluble mesurée au temps zéro est de  $746 \pm 189$  mg/L, alors qu'à la fin de la période de lixiviation elle est de  $222 \pm 174$  mg/L. Les quantités d'acide sulfurique nécessaires à l'acidification des boues à pH 4.0 sont indiquées au tableau 16.

#### 4.2.4 Acide sulfurique

Des essais de lixiviation chimique ont été effectués avec les mêmes boues que lors des essais de biolixiviation avec soufre et ion ferreux. Les rendements de solubilisation des métaux atteints après 24 heures d'acidification à un pH 1.5 sont présentés au tableau 15. Les

moyennes d'extraction des métaux calculées pour les 23 boues sont les suivantes: Cd: 59%, Cr: 27%, Cu: 41%, Mn: 83%, Ni: 68%, Pb: 22% et Zn: 66%. Les quantités d'acide sulfurique requises pour l'acidification des boues à pH 4.0 et 1.5 sont montrées au tableau 16. Sur les 23 boues surpassant initialement les normes en métaux, cinq boues ont des concentrations résiduelles, après 24 heures de lixiviation chimique, supérieures aux valeurs préconisées pour l'épandage agricole: boue D (1150 mg Cr/kg de boue sèche), boue P (18.9 mg Cd/kg), boue Q (15.6 mg Cd/kg), boue S (2690 mg Cu/kg) et la boue S2 (523 mg Pb/kg). Un temps d'incubation plus prolongé serait donc requis pour le traitement de ces boues.

#### 4.2.5 Comparaison des procédés

Le potentiel d'extraction des métaux par les trois procédés a été comparé pour les 23 boues d'épuration. L'influence du contenu en solides et du type de boue a également été examinée. Dans un premier temps, il faut remarquer que les procédés biologiques permettent une économie importante en ce qui concerne la quantité d'acide requise pour la solubilisation des métaux. Pour l'acidification des boues à pH 1.5, une moyenne de 0.66 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> par gramme de boue sèche est requise, alors que pour le procédé avec le sulfate ferreux, une moyenne de 0.11 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> par gramme de boue sèche est nécessaire. Le procédé avec le sulfate ferreux représente donc une économie de 83% des coûts en acide, alors que le procédé avec soufre n'exige pas d'apport en acide. Pour l'étude de l'effet du contenu en solides, les 23 boues ont été divisées en trois groupes (< 10 g/L, 10-20 g/L, > 20 g/L). La même approche a été utilisée pour examiner le comportement des procédés dans les différents types de boues (non-digérée, digérée aérobie, digérée anaérobie).

FIGURE 3. Variation du pH, production de sulfate et solubilisation des métaux dans la boue de Ste-Claire, pendant la biolixiviation avec la microflore oxydant le soufre. (A) secondaire (boue K); (B) digérée aérobie (boue L2). Symboles: (○) pH; (●) sulfate; (△) Cd; (▲) Cr; (□) Cu; (■) Mn; (▽) Ni; (▼) Pb; (◇) Zn.

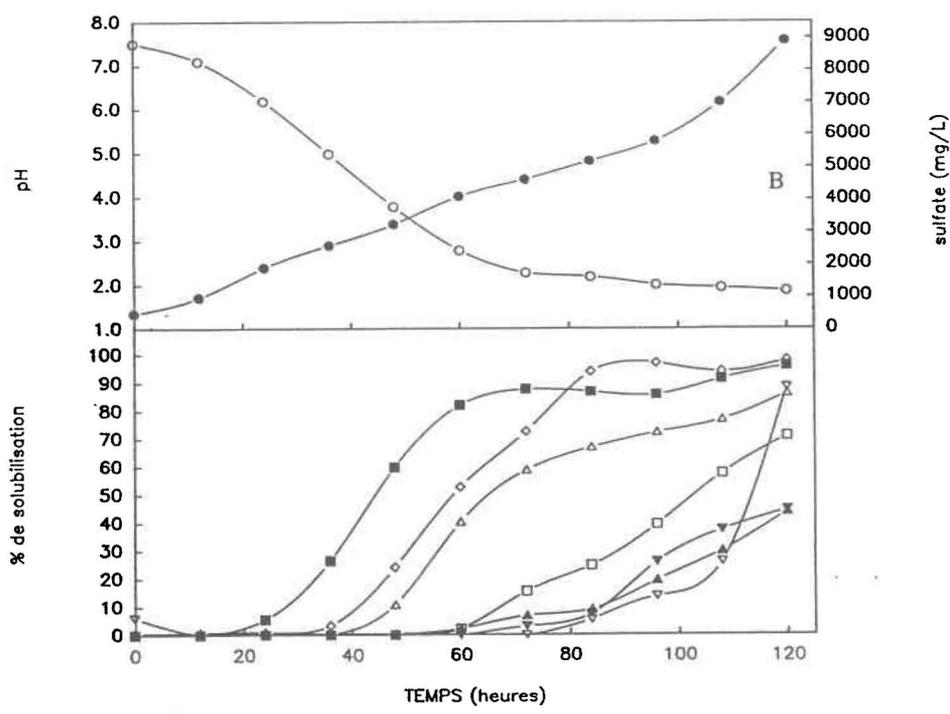
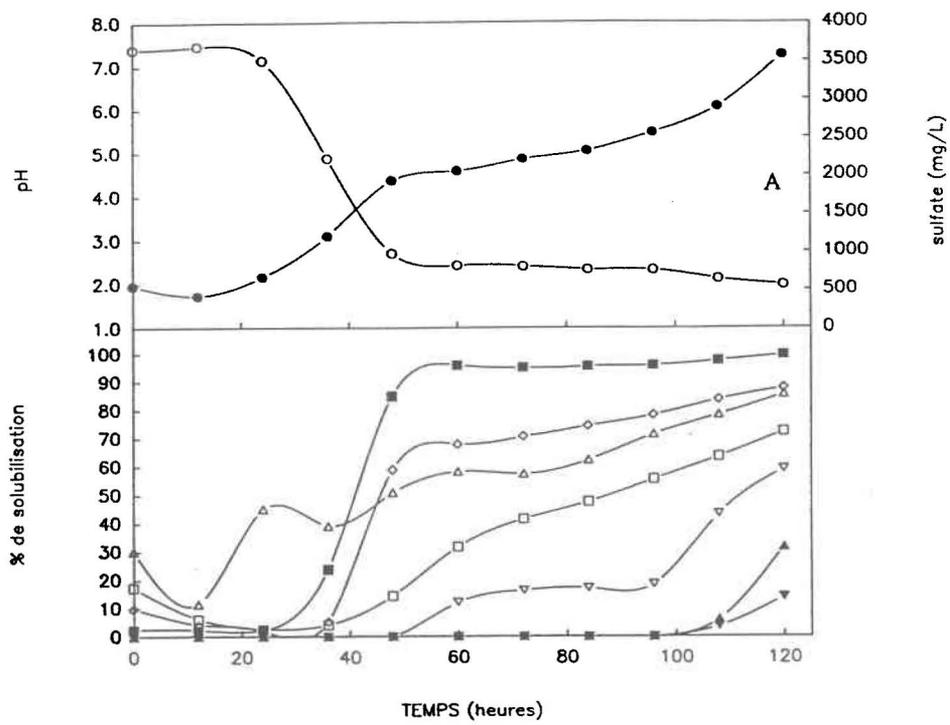


FIGURE 4. Augmentation du POR, acidification et solubilisation des métaux dans la boue de Ste-Claire, pendant la biolixiviation avec la microflore oxydant l'ion ferreux. (A) secondaire (boue K); (B) digérée aérobie (boue L2). Symboles: (○) pH; (●) POR; (△) Cd; (▲) Cr; (□) Cu; (■) Mn; (▽) Ni; (▼) Pb; (◇) Zn.

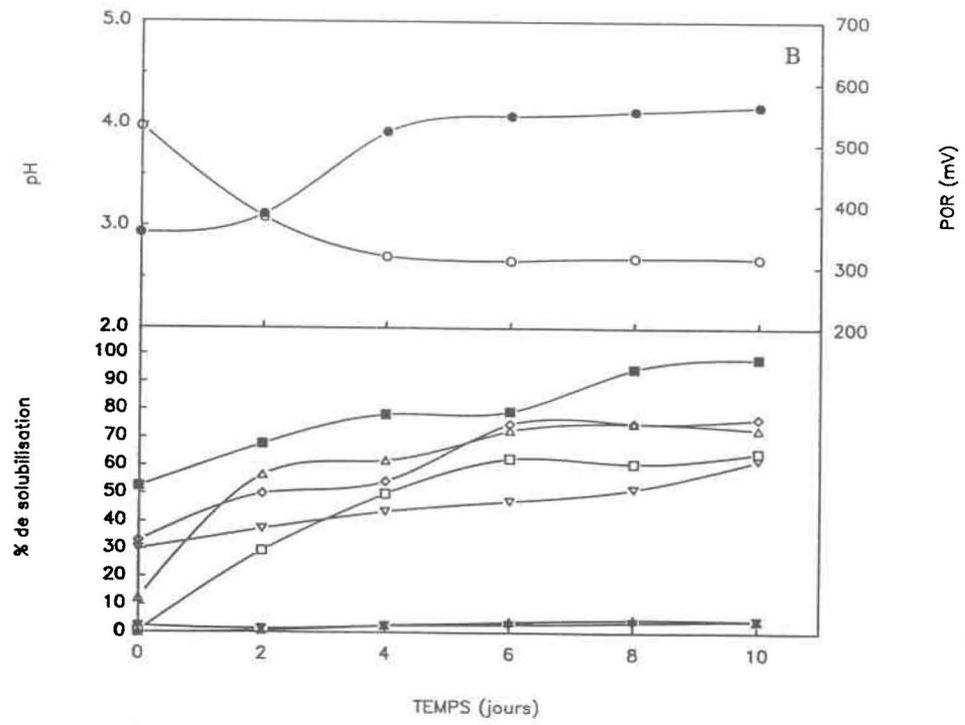
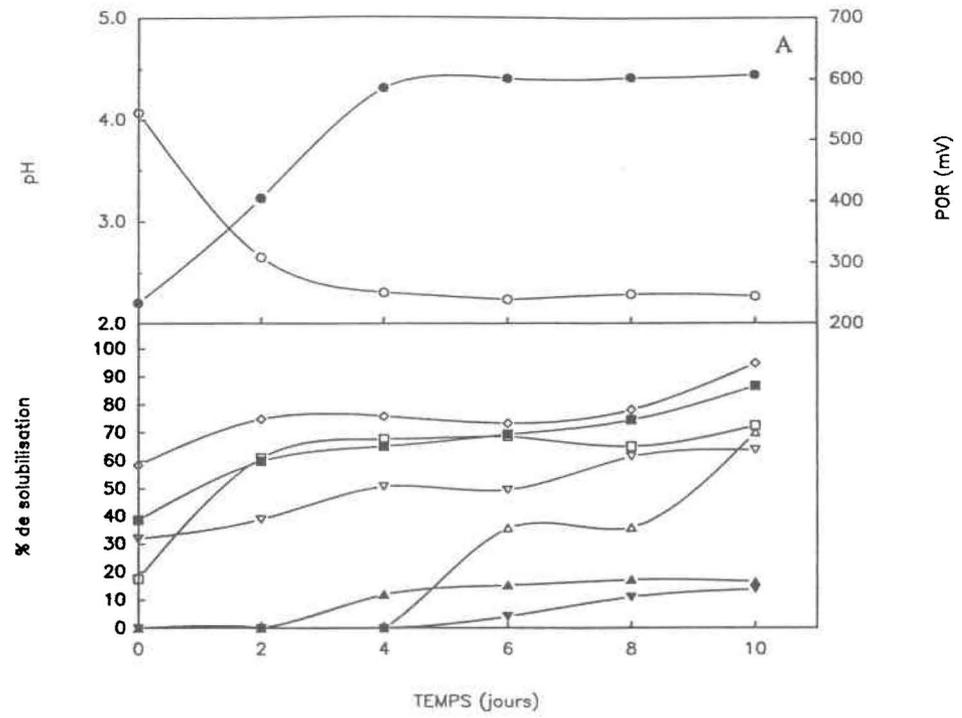


TABLEAU 13. Rendements de solubilisation des métaux dans les boues après dix jours de biolixiviation avec 0.5% de sulfate ferreux

Boues	% de solubilisation						
	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	77	15	71	95	89	10	87
B	69	10	81	93	87	14	95
C	88	19	87	90	70	21	85
D	83	10	70	71	43	5	74
E	86	0	50	91	76	0	79
F	55	3	39	85	46	0	72
G	85	8	72	96	55	11	88
H	55	5	43	72	37	6	78
I	46	0	61	86	56	7	40
J	68	0	30	90	13	3	80
K	70	16	72	87	64	14	95
L2	73	4	65	98	62	4	77
M	98	32	94	84	73	31	88
N	80	8	78	97	78	5	82
O	87	1	52	90	42	5	98
P	64	0	45	92	57	3	92
Q	55	1	40	72	74	4	66
R	70	15	88	96	78	27	78
S	84	5	70	95	88	13	91
S2	96	5	75	93	71	11	81
S3	72	5	63	97	75	14	80
T	78	1	5	88	52	1	94
U	69	1	24	96	64	1	92
Moy.	74	7	60	89	63	9	82
Éc. types	13	8	22	8	19	8	12

TABLEAU 14. Augmentation du POR et acidification après dix jours de lixiviation microbienne avec la microflore oxydant l'ion ferreux

Boues	pH		POR (mV)	
	initial	final	initial	final
A	3.95	2.56	375	500
B	3.97	2.53	242	548
C	3.93	2.39	316	544
D	3.98	2.63	230	558
E	4.12	3.07	138	485
F	3.93	3.54	120	461
G	3.98	2.49	258	477
H	3.97	2.85	193	527
I	4.00	3.41	215	460
J	3.93	3.93	374	482
K	4.07	2.27	234	608
L2	3.97	2.68	355	562
M	3.95	2.25	241	604
N	4.00	2.59	217	582
O	3.98	3.46	195	548
P	4.08	3.80	202	511
Q	4.00	2.98	198	520
R	3.90	2.29	237	563
S	3.93	2.62	382	477
S2	3.93	2.59	234	591
S3	3.97	2.63	236	560
T	4.02	3.78	52	252
U	4.05	3.76	69	258

TABLEAU 15. Rendements de solubilisation des métaux après 24 heures de lixiviation chimique avec de l'acide sulfurique

Boues	% de solubilisation						
	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	67	30	48	93	76	21	77
B	69	54	63	99	52	11	84
C	55	13	91	80	60	28	85
D	31	33	49	71	58	17	55
E	60	27	57	74	85	0	70
F	81	14	39	89	90	0	78
G	23	11	47	70	79	13	54
H	36	14	37	74	65	15	64
I	30	15	39	79	85	17	72
J	30	11	24	72	56	12	69
K	32	31	11	92	45	14	67
L2	98	41	15	94	61	49	90
M	29	5	22	79	57	2	88
N	79	51	47	91	79	24	78
O	65	27	20	73	73	17	75
P	35	24	17	81	54	16	71
Q	32	16	12	70	39	10	77
R	76	33	72	89	44	67	96
S	70	18	27	83	57	50	72
S2	96	25	37	80	81	19	61
S3	82	23	81	91	81	41	86
T	94	53	46	85	76	28	80
U	69	46	46	80	79	21	81
Moy.	59	27	41	83	68	22	66
Éc. types	24	14	22	8	15	17	16

TABLEAU 16. Quantités d'acide requises pour acidifier les boues d'épuration

Boues	(g) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / (g) de boue sèche		(g) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / L de boue	
	pH 1.5	pH 4.0	pH 1.5	pH 4.0
A	0.49	0.11	6.80	1.50
B	1.16	0.12	4.50	0.47
C	0.72	0.04	3.50	0.20
D	0.20	0.05	4.50	1.10
E	1.13	0.14	5.50	0.70
F	0.98	0.11	10.0	1.15
G	0.29	0.06	4.25	0.85
H	0.40	0.13	12.0	3.95
I	0.63	0.20	9.00	2.80
J	0.38	0.13	12.0	4.15
K	2.52	0.12	4.25	0.20
L2	0.25	0.06	7.80	1.80
M	0.60	0.03	3.50	0.20
N	1.01	0.18	7.20	1.25
O	0.26	0.06	6.20	1.50
P	0.22	0.05	5.90	1.25
Q	0.18	0.04	4.75	1.05
R	1.41	0.12	4.00	0.35
S	0.50	0.10	7.00	1.40
S2	0.42	0.14	6.50	2.15
S3	0.38	0.07	5.00	0.85
T	0.52	0.10	10.0	2.00
U	0.57	0.26	16.0	7.30
Moyennes	0.66	0.11	6.96	1.66
Écarts-type	0.53	0.06	3.22	1.63

Le tableau 17 présente les valeurs moyennes du contenu en solides des différents groupes de boues, ainsi que les valeurs de pH et de POR obtenues en fin de lixiviation. Les boues utilisées dans cette étude ont été classées selon leur contenu en solides (< 10 g/L, 10 à 20 g/L, > 20 g/L) et également selon le type de traitement (non-digérées, digérées aérobiquement, digérées anaérobiquement). La boue du fossé d'oxydation de St-Étienne (boue M) ainsi que la boue primaire de Toronto (boue Q) ont été incluses dans le groupe de boues non-digérées. Les résultats démontrent que les microflores oxydant le soufre et l'ion ferreux sont peu affectées par le type de boue et par le contenu en solides. Par exemple, les pourcentages moyens d'oxydation du soufre mesurés à la fin de la lixiviation sont presque semblables pour tous les groupes de boues (30.5% à 39.5%). Il faut toutefois noter que l'acidification et l'augmentation du POR sont légèrement supérieures dans les boues plus diluées (plus faibles concentrations en solides totaux). Ces écarts peuvent être expliqués par la plus faible capacité tampon de ces boues non-digérées, lesquelles sont légèrement plus acidifiées que les boues digérées. La méthode de digestion des boues (aérobie ou anaérobie) ne semble pas créer de différence appréciable en ce qui concerne la capacité d'acidification et d'augmentation du POR des microflores acclimatées à l'oxydation du soufre ou de l'ion ferreux.

La solubilité des métaux dans les boues étant régit principalement par le pH et le POR (Tyagi et Couillard, 1989), les résultats présentés au Tableau 17 devraient refléter les rendements (moyenne  $\pm$  intervalles de confiance de 95%) de solubilisation des métaux présentés à la figure 5. L'examen de cette figure montre que le contenu en solides des boues affecte peu la solubilisation de cadmium, du manganèse, du nickel et du zinc pour les trois procédés. Par contre, les deux procédés biologiques (S: procédé avec le soufre; F: procédé avec le sulfate ferreux) présentent des baisses de rendements de solubilisation avec l'augmentation du contenu en solides pour l'aluminium, le chrome, le cuivre et le plomb. Cet effet est moins prononcé avec le procédé chimique (procédé A) puisque le pH (1.5) est le même pour les trois groupes de boues (< 10 g/L, 10-20 g/L, > 20 g/L). Les niveaux de

TABLEAU 17. Valeurs de pH et de POR finales dans les groupes de boues obtenues par les trois procédés de lixiviation

Groupes de boues	Solides totaux (g/L)	pH final			POR (mV) final		
		Acide	Soufre	Fer	Acide	Soufre	Fer
Total (23) <sup>a</sup>	16.0 ± 17.2 <sup>b</sup>	1.5±0.1	1.9±0.7	2.9±1.0	392±96	371±84	503±165
<10 g/L (7)	4.4 ± 3.7	1.5±0.1	1.8±0.8	2.5±0.6	423±102	415±80	562±85
10-20 g/L (8)	14.4 ± 4.9	1.5±0.1	1.8±0.7	3.0±1.0	408±124	367±68	460±211
>20 g/L (8)	27.7 ± 6.3	1.5±0.1	2.1±0.7	3.3±1.1	351±41	335±74	496±194
Non-dig. (11)	10.5 ± 14.5	1.5±0.1	1.8±0.7	2.7±1.0	409±86	384±102	500±204
Dig. Aér. (6)	21.7 ± 25.5	1.5±0.1	2.0±1.2	3.0±1.2	365±66	362±97	523±90
Dig. Ana. (6)	20.4 ± 14.8	1.5±0.1	2.0±0.4	3.1±1.3	389±181	355±93	491±257

<sup>a</sup> nombre de boues utilisées

<sup>b</sup> moyennes ± intervalles de confiance de 95%

solubilisation des métaux atteints avec les trois procédés sont très peu affectés par le type de boue.

Une comparaison statistique des moyennes de rendements de solubilisation obtenus pour les 23 boues révèle que la lixiviation microbienne avec le sulfate ferreux (procédé F) est moins efficace que les deux autres procédés dans les conditions expérimentales utilisées, pour la solubilisation de l'Al ( $p < 0.05$ ), du Cr ( $p < 0.001$ ) et du Pb (A:  $p < 0.05$  et S:  $p < 0.01$ ). Le procédé chimique (F) est apparu être moins efficace que les deux procédés biologiques pour l'extraction du Cd (S:  $p < 0.01$  et F:  $p < 0.05$ ), du Cu (S:  $p < 0.001$  et F:  $p < 0.05$ ), Mn (S:  $p < 0.01$  et F:  $p < 0.05$ ) et du Zn ( $p < 0.01$ ). Pour la solubilisation du cuivre et du nickel, la biolixiviation avec soufre est supérieure ( $p < 0.05$ ) au procédé avec l'ion ferreux. Généralement, les différences de solubilisation des métaux entre les procédés sont légèrement

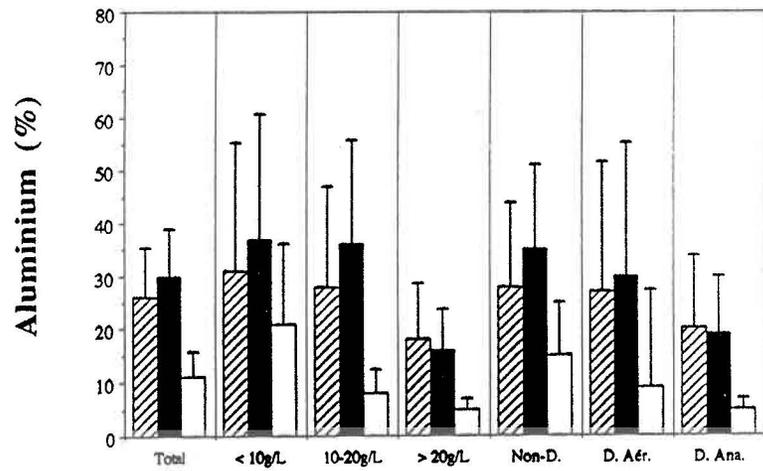
plus accentuées dans le groupe de boues avec un contenu élevé en solides. Le type de boue n'influence pas de façon notable les différences d'efficacité des procédés. Les moyennes de solubilisation des huit métaux mesurées dans cette étude sont les suivantes: 48.8% pour le traitement chimique (procédé A); 62.5% pour le procédé avec soufre (procédé S) et 49.5% pour le procédé avec sulfate ferreux (procédé F). Ces résultats indiquent que la biolixiviation avec la microflore oxydant le soufre est plus efficace ( $p < 0.01$ ) que les deux autres procédés de solubilisation des métaux dans les conditions de lixiviation employées.

La période d'incubation plus prolongée avec les procédés microbiens, que pour le traitement à l'acide, pourrait expliquer les meilleures rendements de solubilisation obtenus pour certains métaux. Toutefois, les travaux de Wozniak et Huang (1982) ont démontré que le maximum de solubilisation des métaux dans les boues d'épuration est atteint après 12 heures d'incubation à pH 1.5. L'oxydation biologique directe des sulfures de métaux présents dans les boues (Angelidis et Gibbs, 1989; Legret *et al.*, 1987; Lo et Chen, 1990) pourrait aussi favoriser l'enlèvement des métaux par voie microbienne (Tyagi et Couillard, 1989). Ce mécanisme biologique a été corroboré pour plusieurs sulfures métalliques: CoS, CuS, NiS, PbS, ZnS, etc. (Hutchins *et al.*, 1986). Les plus faibles rendements de solubilisation de l'aluminium, du chrome et du plomb atteints avec le traitement biologique, en utilisant l'ion ferreux, peuvent s'expliquer par l'acidification moins grande des boues qu'avec les deux autres procédés. La solubilisation de ces métaux par des acides inorganiques requiert une réduction du pH sous 2.5 (Groudev et Groudeva, 1986; Wozniak et Huang, 1982).

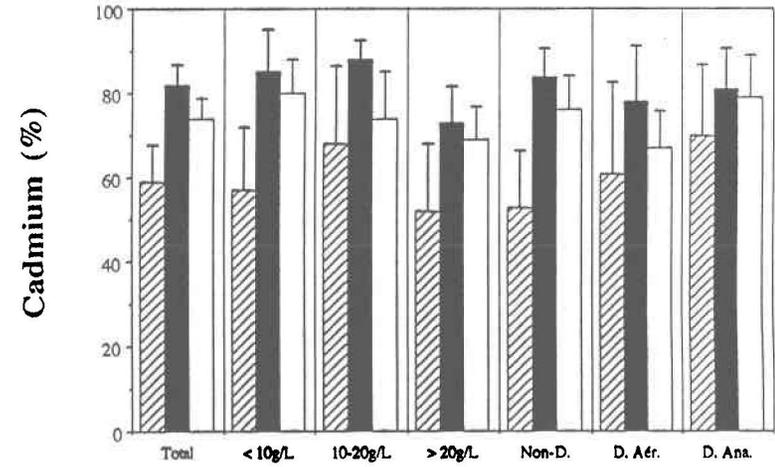
Les conclusions suivantes peuvent être tirées de cette étude. La microflore indigène de tous les types de boues d'épuration peut être acclimatée pour l'oxydation du soufre élémentaire ou de l'ion ferreux. Les souches développées peuvent être employées pour la solubilisation rapide et efficace des métaux toxiques associés aux boues. La croissance des microflores oxydant le soufre et l'ion ferreux permet la décontamination des métaux toxiques à des niveaux

acceptables pour l'utilisation agricole de tous les types de boues avec des concentrations variées en solides totaux.

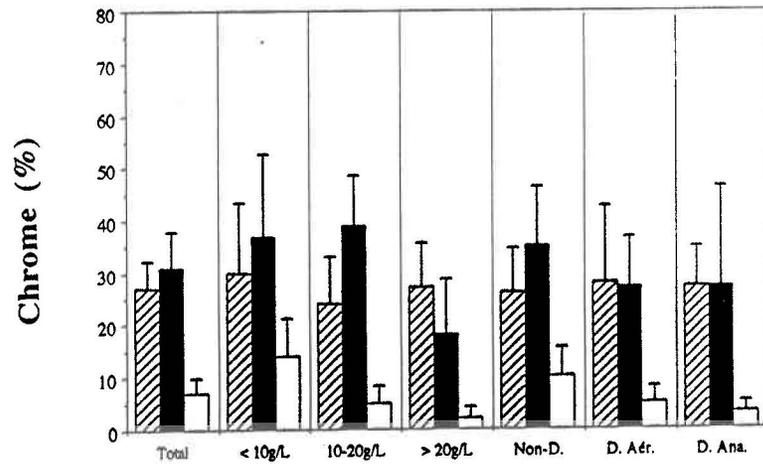
FIGURE 5. Rendements de solubilisation des métaux pour les divers groupes de boues obtenus après lixiviation par les trois procédés. Symboles: (▣) lixiviation avec acide (A); (■) lixiviation microbienne avec soufre (S); (□) lixiviation microbienne avec sulfate ferreux (F).



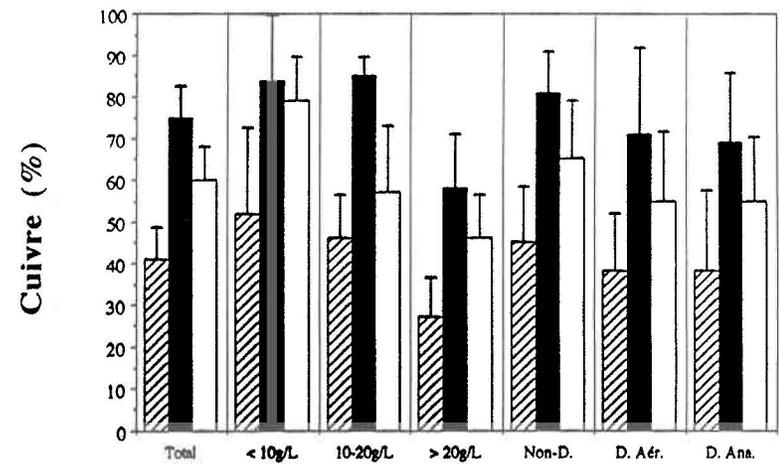
Groupes de Boue



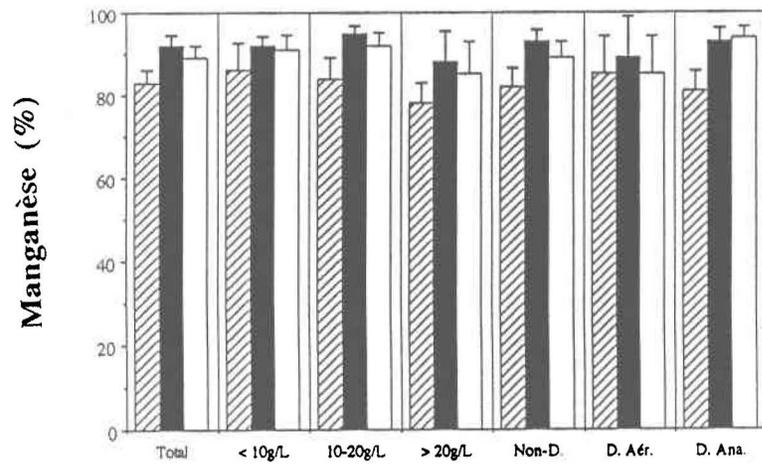
Groupes de Boue



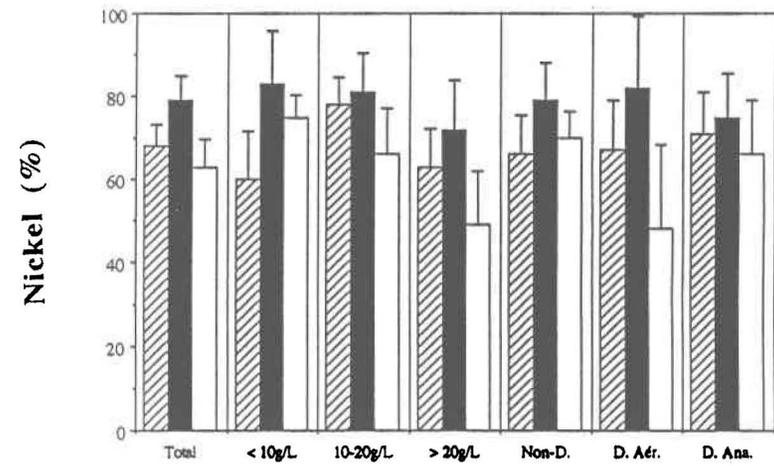
Groupes de Boue



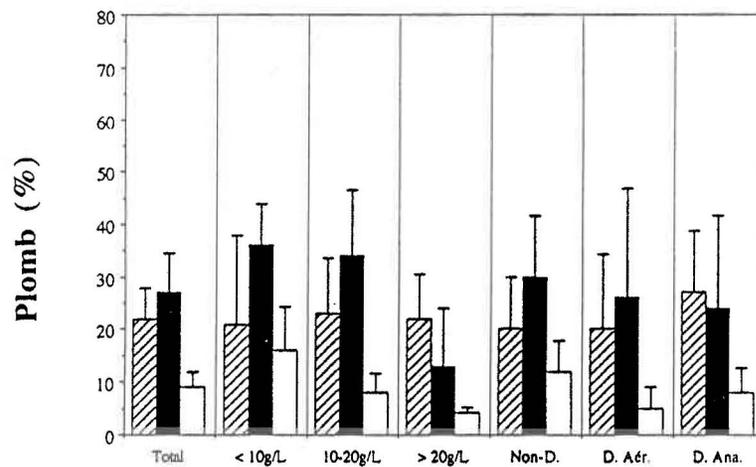
Groupes de Boue



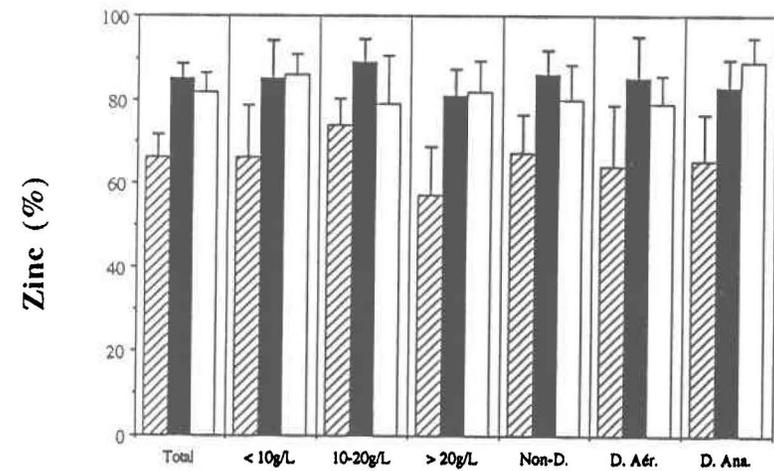
Groupes de Boue



Groupes de Boue

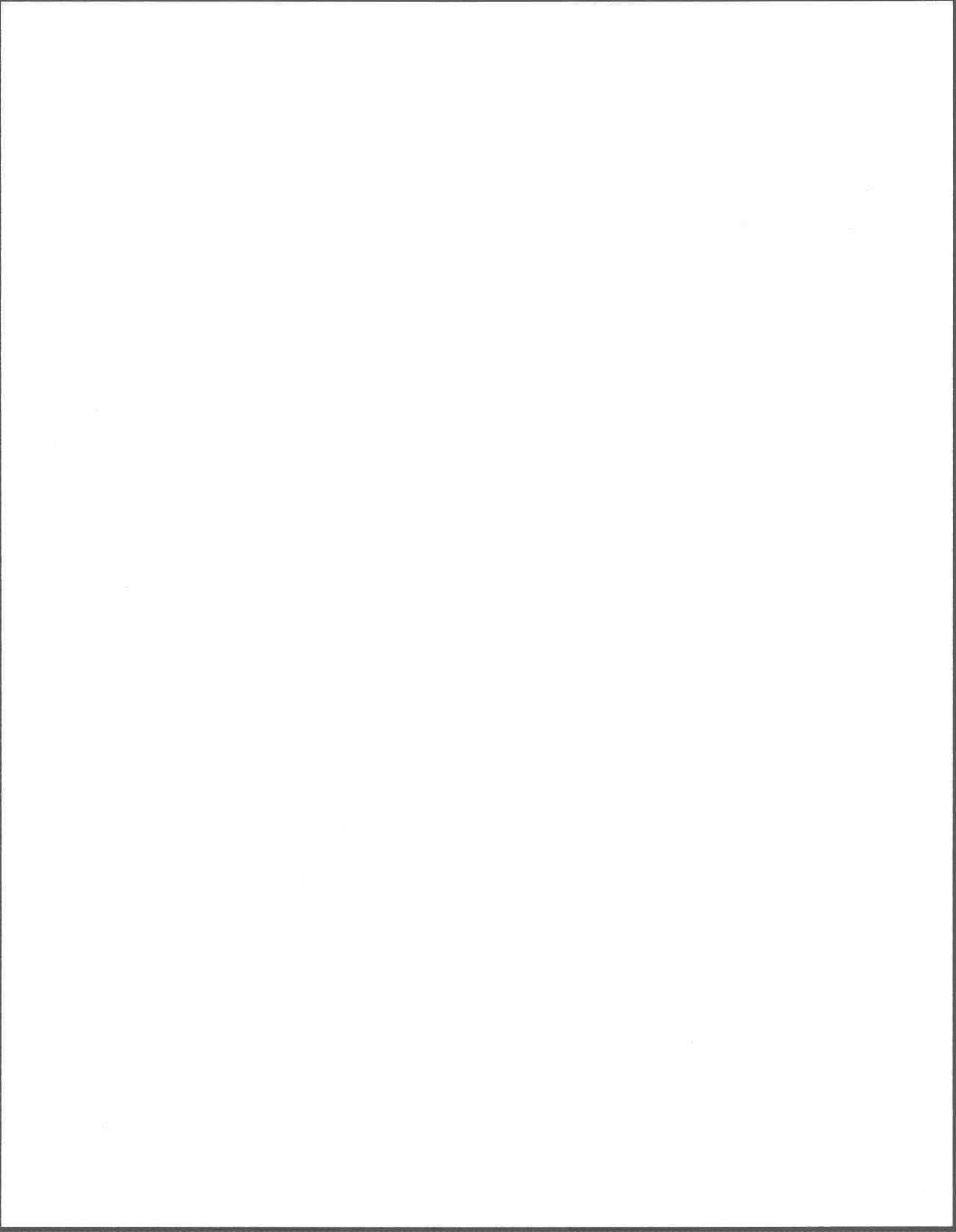


Groupes de Boue



Groupes de Boue

## CHAPITRE 5



## CHAPITRE 5

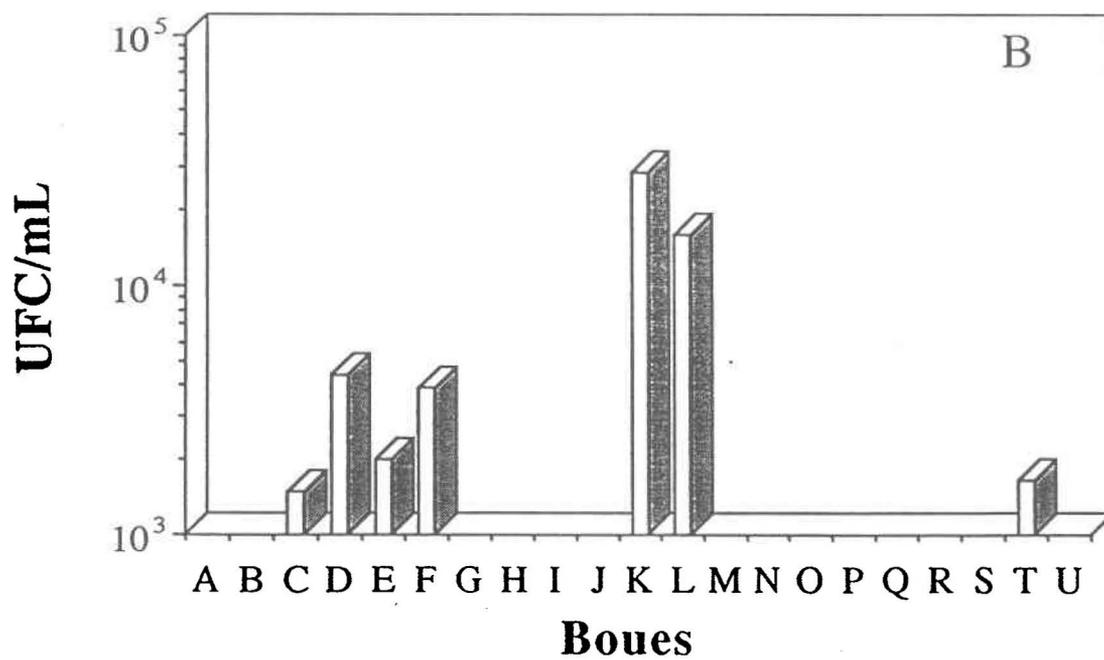
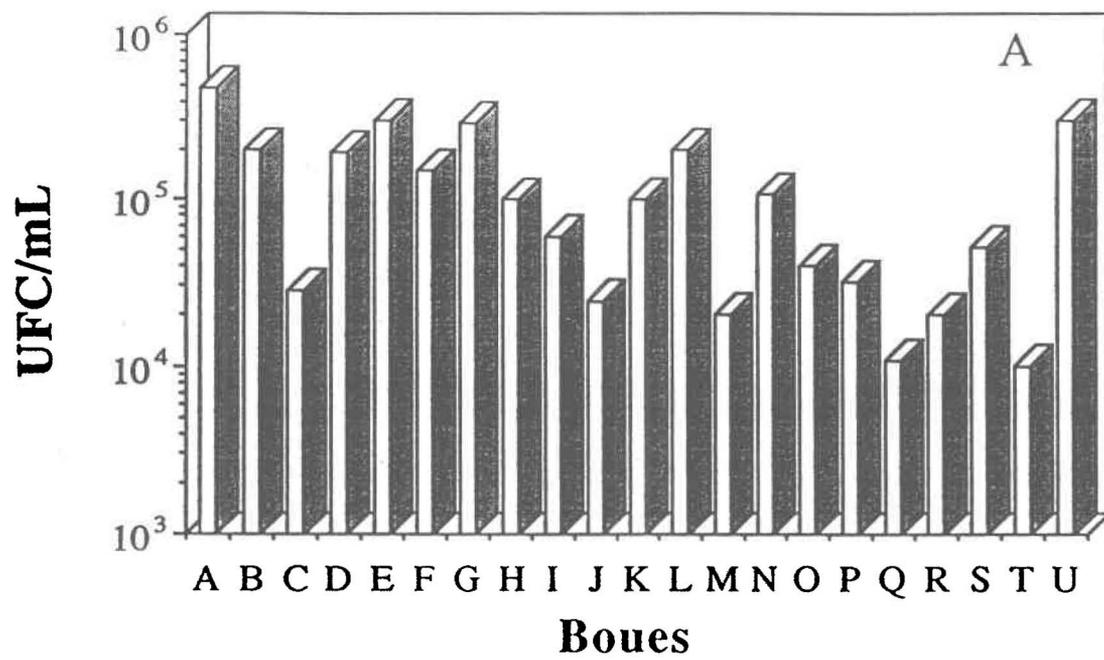
### CARACTÉRISATION DE LA MICROFLORE INDIGÈNE LIXIVIANTE

Les résultats présentés dans le chapitre précédent démontrent que la microflore indigène des boues d'épuration peut être utilisée pour l'extraction des métaux toxiques présents dans les boues. Ce chapitre est consacré à l'identification des espèces microbiennes impliquées dans la solubilisation des métaux, et également, à déterminer le rôle de ces microorganismes dans le processus d'acidification des boues. La cinétique de croissance des populations lixiviantes est également traitée. Cette étude a été axée principalement sur la microbiologie du procédé avec le soufre élémentaire.

#### 5.1 Microflore lixiviante dans les boues brutes

Les concentrations de thiobacilles présents initialement dans les boues d'épuration ont été déterminées sur deux types de géloses permettant la croissance des thiobacilles acidophiles (milieu gélosé au thiosulfate ajusté à pH 4.0) et des thiobacilles peu-acidophiles (milieu gélosé au thiosulfate ajusté à pH 7.0). Les populations de thiobacilles peu-acidophiles dans les boues prélevées sont relativement uniformes avec une variation maximale entre les boues de 1.7 cycle logarithmique (figure 6A). Les concentrations se situent entre  $10^4$  et  $10^6$  UFC/mL de boue.

FIGURE 6. Dénombrement des thiobacilles dans les boues d'épuration prélevées.  
(A) Peu-acidophiles; (B) Acidophiles.



Dans la majorité des boues, les concentrations de thiobacilles acidophiles sont inférieures à la limite de détection de  $10^3$  UFC/mL. Les variations des deux groupes de thiobacilles dans les boues de même type et de même provenance, mais prélevées à différents temps, sont présentées au tableau 18. Pour les trois types de boues examinées, aucune variation importante des populations n'est apparue lors des prélèvements. Ces données démontrent que ces bactéries font partie de la microflore indigène normale des boues d'épuration. Ces résultats appuient les travaux de Eashwar et al. (1990), Fernandez et Vilda (1988) et Gore et al. (1986) qui suggéraient que la présence de concentrations élevées de ces microorganismes en eaux douces ou marines constitue une indication fiable d'une pollution urbaine (égouts domestiques ou industrielles). Plusieurs souches de thiobacilles ont d'ailleurs été isolées à partir d'eaux usées domestiques ou de boues d'épuration (Hutchinson et al., 1965, 1966, 1967; Khalid et Malik, 1987). Les distributions des deux groupes de thiobacilles selon le contenu en solides des boues et le type de boue se retrouvent au tableau 19. Aucune relation évidente n'est apparue entre les teneurs en thiobacilles et ces deux paramètres. Il faut toutefois noter que les comptes des deux groupes de thiobacilles sont légèrement inférieurs dans les boues digérées anaérobies que dans les deux autres types de boues. Les thiobacilles étant des organismes aérobies stricts, sauf *T. denitrificans*, l'étape de digestion anaérobie des boues aurait pu favoriser l'élimination de ces microorganismes.

TABLEAU 18. Variation temporelle des populations de thiobacilles dans les boues d'épuration

Boues	Code	Peu acidophiles (UFC/mL) x 10 <sup>4</sup>		Acidophiles (UFC/mL) x 10 <sup>3</sup>	
		concentration	moy. ± éc. type	concentration	moy. ± éc. type
Black Lake (boue secondaire)	C	2.80		1.48	
	C2	1.22	1.53 ± 0.85	1.50	1.25 ± 0.28
	C3	1.05		- <sup>a</sup>	
	C4	1.05		-	
Black Lake (boue digérée aérobie)	D	19.2		4.40	
	D2	6.80		3.80	
	D3	4.73	9.18 ± 5.60	3.65	2.73 ± 1.47
	D4	9.00		-	
	D5	4.05		2.55	
	D6	11.3			
Valcartier (boue digérée anaérobie)	S	1.15		-	
	S2	5.24	3.95 ± 2.34	-	-
	S3	6.40		-	
	S4	3.00		-	

<sup>a</sup> sous la limite de détection (< 1.0 x 10<sup>3</sup> UFC/mL)

TABLEAU 19. Dénombrement des populations de thiobacilles dans les groupes de boues

Groupes de boues	Solides totaux (g/L)	Peu acidophiles (UFC/mL) x 10 <sup>4</sup>	Acidophiles (UFC/mL) x 10 <sup>3</sup>	Acidophiles (microflore adaptée) (UFC/mL) x 10 <sup>7</sup>
Total (21) <sup>a</sup>	16.7 ± 11.3 <sup>b</sup>	12.9 ± 12.8	3.4 ± 6.5	2.9 ± 2.0
< 10 g/L (7)	4.4 ± 1.8	14.9 ± 11.6	5.1 ± 10.1	2.5 ± 1.8
10-20 g/L (6)	14.4 ± 2.8	17.5 ± 18.1	1.6 ± 1.2	2.7 ± 1.9
> 20 g/L (8)	29.1 ± 5.3	7.6 ± 7.9	3.3 ± 5.3	3.4 ± 2.5
Non-dig.(11)	10.5 ± 7.7	15.8 ± 15.6	3.6 ± 8.1	2.3 ± 1.5
Dig. Aér. (6)	23.5 ± 13.9	14.4 ± 7.1	4.6 ± 5.8	3.8 ± 2.6
Dig. Ana. (4)	23.5 ± 6.6	2.3 ± 1.5	<1.0	3.3 ± 2.4

a nombre de boues utilisées

b moyenne ± écart type

## 5.2 Microflore acclimatée

Après acclimatation des microflores des boues sur le soufre, les concentrations de thiobacilles acidophiles sont augmentées dans la gamme 10<sup>7</sup> à 10<sup>8</sup> UFC/mL de boue (figure 7). L'acidification importante des 21 boues testées (pH<2) cause une diminution du nombre de thiobacilles peu-acidophiles sous la limite de détection, et ce pour toutes les boues. Le contenu en solides et le type de boues n'ont pas d'impact sur les concentrations de thiobacilles acidophiles mesurés dans les microflores acclimatées (tableau 19). La capacité des thiobacilles à croître dans des milieux riches en matières organiques, tels les boues d'épuration, semble à première vue surprenante pour ces organismes autotrophes. En effet, plusieurs études (Kelly,

1969; Lu et al., 1971; Matin, 1978; Rittenberg, 1969) ont démontré que les thiobacilles sont sensibles à de faibles concentrations de certains composés organiques (glucose, acétate, phénylalanine, etc.) . Toutefois, la capacité que possèdent ces microorganismes de croître dans des environnements riches en matières organiques a déjà été confirmée par plusieurs travaux de recherches (Kreye et al., 1973; Milde et al., 1983; Sand, 1987; Schönborn et Hartmann, 1978).

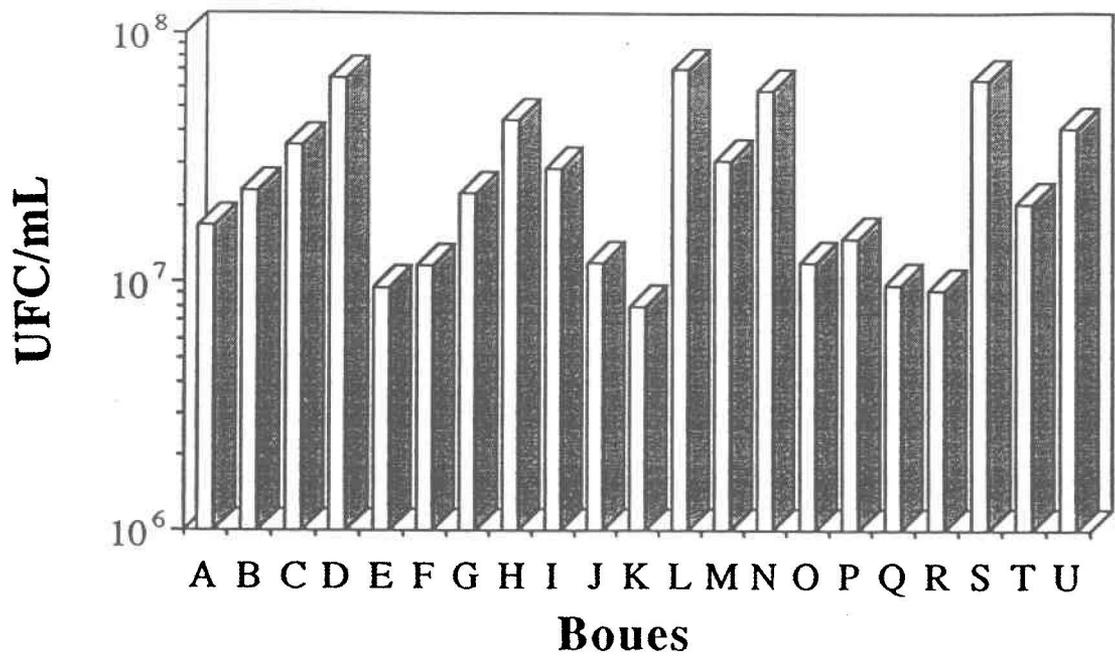
### **5.3 Isolement et identification des populations lixiviantes**

#### **5.3.1 Microflore oxydant le soufre**

La caractérisation de la microflore oxydant le soufre a été effectuée à partir des colonies de thiobacilles peu-acidophiles obtenues lors du dénombrement bactérien sur géloses à partir des boues prélevées. D'autre part, les colonies de thiobacilles acidophiles ont été prélevées à partir des géloses utilisées pour effectuer le compte total dans les boues contenant les microflores acclimatées.

Un total de 98 colonies de thiobacilles peu-acidophiles ont été isolées, soit entre trois et six colonies par échantillon de boue. Dix colonies de ce groupe n'ont pu être isolées sur à leur incapacité à être cultivées sur géloses. Pour les thiobacilles acidophiles, un total de 26 colonies ont été purifiées à partir des 21 boues. Toutes les souches bactériennes obtenues sont des bâtonnets à Gram négatif, non-sporulés, incapables de croître en hétérotrophie sur un milieu gélosé (Standard plate count agar), et ne contenant pas d'inclusion de soufre cytoplasmique visible. Aucun des isolats acidophiles n'avait la capacité d'obtenir son énergie de l'oxydation de l'ion ferreux. À partir de ces caractéristiques, tous les isolats ont pu être classés dans le genre *Thiobacillus*.

FIGURE 7. Dénombrement des thiobacilles acidophiles dans la microflore des boues, adaptée à l'oxydation du soufre.



Tous les isolats acidophiles abaissent le pH du milieu avec soufre entre 1.4 et 1.6, et acidifient le milieu avec thiosulfate entre pH 1.9 et 2.2. En ce qui concerne les souches peu-acidophiles, les limites d'acidification sont beaucoup plus variées. Les isolats ont donc été classés dans six différents groupes (tableau 20) selon les limites d'acidification décrites par Hutchinson et al. (1969) et Kelly et Harrison (1988).

Plus de 63% des isolats (56 sur 88) ont été classés dans le groupe acidifiant le milieu entre pH 3.5 et 4.5. La seule espèce de thiobacille peu-acidophile abaissant le pH dans cette gamme est *T. thioparus* (Kelly et Harrison, 1988). Le reste des isolats a été classé dans les cinq autres groupes. D'après la clé taxonomique proposée par Hutchinson et al. (1969) et Kelly et Harrison (1988), la composition microbienne des autres groupes est la suivante: groupe 6 (pH 2.0 à 2.8) = *T. intermedius* ; groupe 5 (pH 2.8 à 3.5) = *T. neapolitanus*, *T. perometabolis*, *T. delicatus* ; groupe 3 (pH 4.5 à 5.5) = *T. denitrificans*, *T. novellus*, *T. tepidarius*; groupe 2 (pH 5.5 à 6.8) = *T. versutus* .

Les représentants du groupe 4 (pH 3.5 à 4.5) ont été isolés de toutes les boues testées, alors que la fréquence d'isolement sur géloses des autres groupes est d'environ 30%. Les pourcentages de distribution de chaque groupe de colonies ont été évalués à partir des géloses utilisées pour les comptes bactériens (tableau 20). Les thiobacilles du groupe 4 constituent environ 83% de la microflore peu-acidophile présente dans les 21 boues échantillonnées avant acclimatation.

TABLEAU 20. Répartition des isolats dans les groupes de thiobacilles peu-acidophiles

Thiobacilles peu-acidophiles	pH final (MS + S <sup>0</sup> ) (MS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	Nombre d'isolats	Fréquence d'isolement (%)	% de distribution moy. ± éc. type
groupe 1	6.8 - 7.0	6	28.6	2.2 ± 4.3
groupe 2	5.5 - 6.8	6	28.6	2.6 ± 4.9
groupe 3	4.5 - 5.5	7	33.3	6.2 ± 10.1
groupe 4	3.5 - 4.5	56	100	83.4 ± 11.7
groupe 5	2.8 - 3.5	7	33.3	3.9 ± 7.0
groupe 6	2.0 - 2.8	6	28.6	1.7 ± 3.1

### 5.3.2 Microflore oxydant l'ion ferreux

Les microflores des 23 boues acclimatées à l'oxydation de l'ion ferreux ont été inoculées en milieu liquide 9K afin de vérifier l'oxydation biologique de l'ion ferreux. L'oxydation de l'ion ferreux en ion ferrique a été confirmée pour toutes les boues testées dans cette étude. Après deux transferts dans ce milieu, les cultures ont été observées par microscopie optique. La présence de bactéries sous forme de bâtonnets de morphologie similaire à *Thiobacillus ferrooxidans* a été constatée dans toutes les cultures. Aucune présence de bactérie spiralée comme *Leptospirillum ferrooxidans* n'a été notée.

### 5.3.3 Activité des isolats

La capacité de quelques isolats d'acidifier les boues en cultures pures, en présence de 0.5% de soufre élémentaire, a été vérifiée dans deux types de boues préalablement autoclavées (digérée aérobie de Black Lake et digérée anaérobie de Valcartier). L'acidification des boues par des cultures pures de souches de la collection ATCC a également été examinée. Des essais contrôles en milieu synthétique ont également été réalisés. Pour les souches peu-acidophiles, les milieux ont été initialement ajustés à pH 7.0 (figure 8), et pour les souches acidophiles les milieux ont été amenés à pH 4.0 (figure 9). Les résultats obtenus attestent que toutes les souches utilisées (indigènes et ATCC) peuvent croître dans les deux boues testées. La cinétique d'acidification des deux boues par les souches correspond bien à ce qui est observée en milieu synthétique. De plus, les pH finaux atteints après dix jours d'incubation dans les boues sont semblables à ce qui est mesuré en milieu synthétique. Ces courbes d'acidification démontrent bien que les boues d'épuration constituent un très bon milieu de culture pour la croissance de plusieurs espèces de thiobacilles. Les boues municipales présentent en effet des teneurs en azote, phosphore, magnésium, calcium, sodium, potassium et autres éléments nutritifs largement suffisantes pour permettre la croissance des thiobacilles (Flynn et al., 1984; Mercier, 1988). Nous verrons toutefois plus tard que certaines boues d'épuration ne permettent pas une croissance rapide des thiobacilles n'ayant pas été auparavant acclimatés à cet environnement.

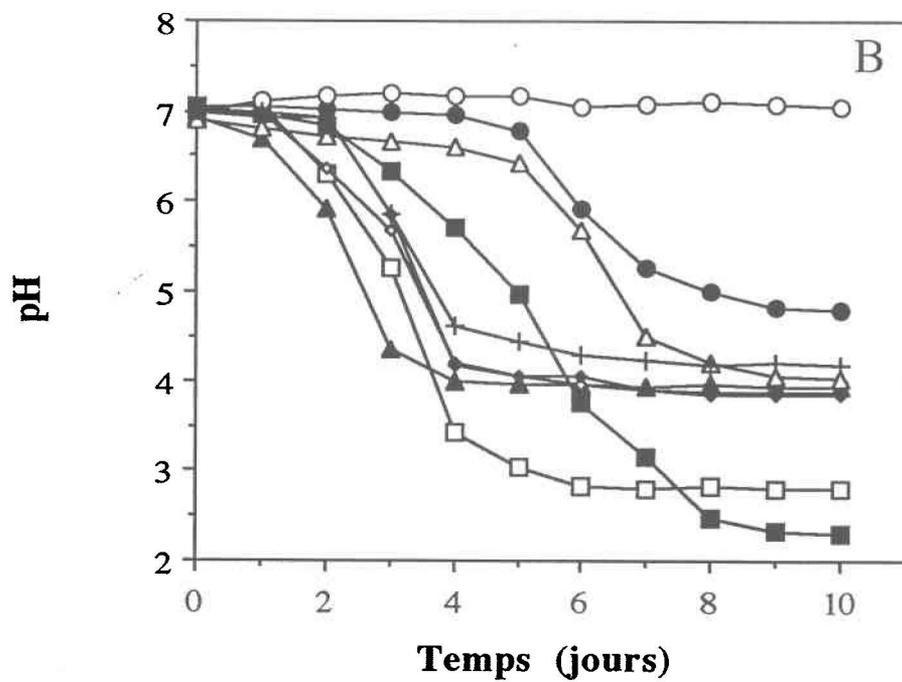
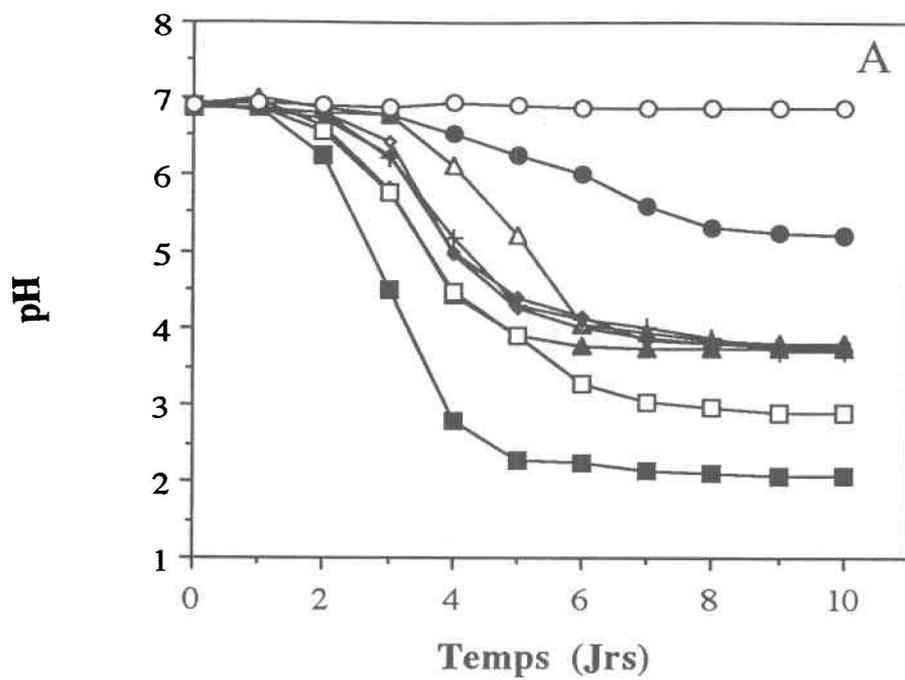
Deux souches de *T. ferrooxidans* ont été isolées des microflores acclimatées à l'oxydation de l'ion ferreux et purifiées sur milieu 9K gélosé (BL-1: isolé de la boue D2; VA-1 isolé de la boue S3). La croissance de ces souches a été suivie dans deux boues préalablement autoclavées (boues D2 et S3) en comparaison à deux souches de la collection ATCC (13661 et 19859). Les courbes de pH et de POR (figure 10) montrent que les souches isolées des boues (BL-1 et VA-1) ont une activité supérieure et sont donc mieux adaptées à ces

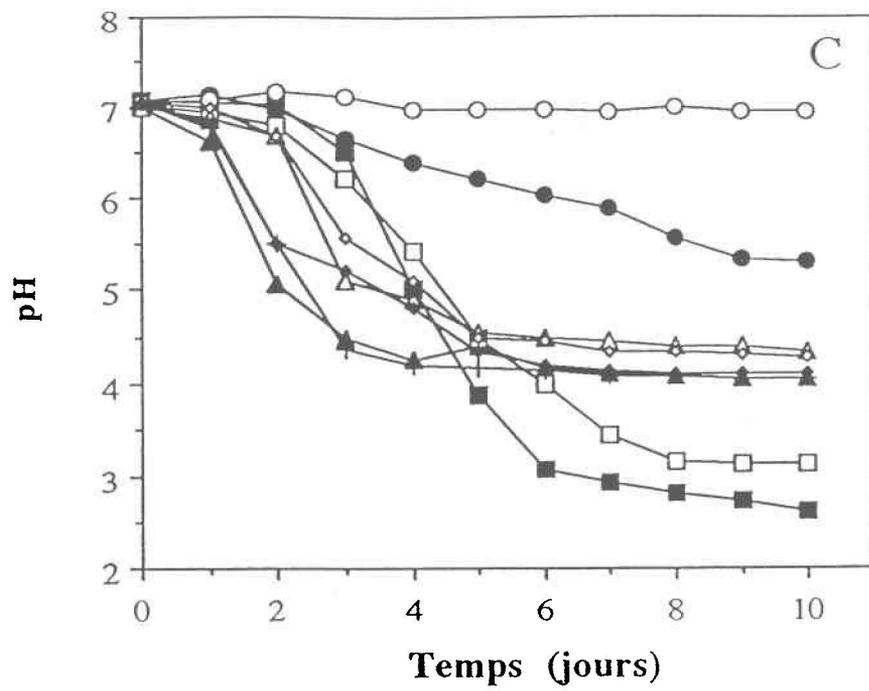
environnements que les souches ATCC. Plusieurs études ont déjà démontré que généralement la matière organique, et ce à de faible concentration, inhibait l'oxydation de l'ion ferreux par *T. ferrooxidans* (Matin, 1978; Tuovinen et al., 1971; Tuttle et Dugan, 1976). Ainsi, les souches bactériennes indigènes pourraient avoir développé une résistance aux matières organiques des boues. Les résultats obtenus laissent supposer que l'activité lixivante mesurée dans les essais de solubilisation des métaux effectués avec des souches de *T. ferrooxidans* ATCC (Couillard et Mercier, 1990, 1991a; Tyagi et al., 1988, 1991a, b; Wong et Henry, 1988) pourrait être attribuable à la croissance des bactéries indigènes oxydant l'ion ferreux.

#### **5.4 Étude de la colonisation du substrat**

Le soufre élémentaire étant un substrat solide à température ambiante, l'oxydation biologique de cet élément nécessite un attachement physique des cellules (Schaeffer et al., 1963; Vogler et Humbreit, 1941). Plusieurs études ont été réalisées afin d'identifier les mécanismes d'adhésion cellulaires à ce substrat. Weiss (1973) démontra que l'attachement de *Sulfolobus* au soufre est favorisé par la présence de pilis, mais que l'oxydation du soufre requiert une adhésion directe de la paroi cellulaire. Une étude en microscopie électronique à balayage (M.E.B.) effectuée par Baldensperger et al. (1974) a permis de visualiser la colonisation du soufre colloïdal par *Thiobacillus thiooxidans* et *Thiobacillus denitrificans*. Pour ces deux espèces, l'attachement des cellules semblait médié par une adhésion directe de la paroi cellulaire. Cependant, les micrographies de *T. denitrificans* révélaient la présence discrète de liens entre les cellules et le soufre. Plus tard, Takakuwa et al. (1979) démontrèrent que la fixation de *T. thiooxidans* se fait par interaction chimique entre les groupements

FIGURE 8. Abaissement du pH lors de la croissance de thiobacilles peu-acidophiles en présence de 0.5% de soufre. (A) en milieu synthétique; (B) dans la boue autoclavée digérée aérobie de Black Lake (boue D2); (C) dans la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S3). Symboles: (○) contrôle non-inoculé; (●) *T. denitrificans* ATCC 23644; (□) *T. neapolitanus* ATCC 23640; (■) *T. intermedius* ATCC 15466; (△) *T. thioparus* ATCC 8158; (▲) *T. thioparus* ATCC 55127; (◇) isolat PA-D1; (◆) isolat PA-L1; (+) isolat PA-N1.



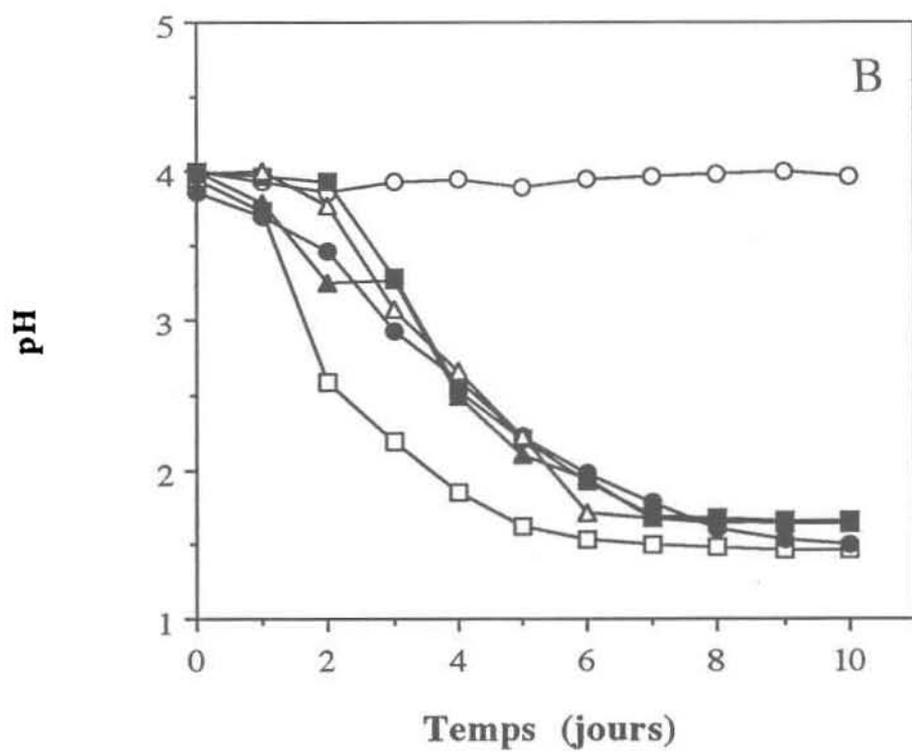
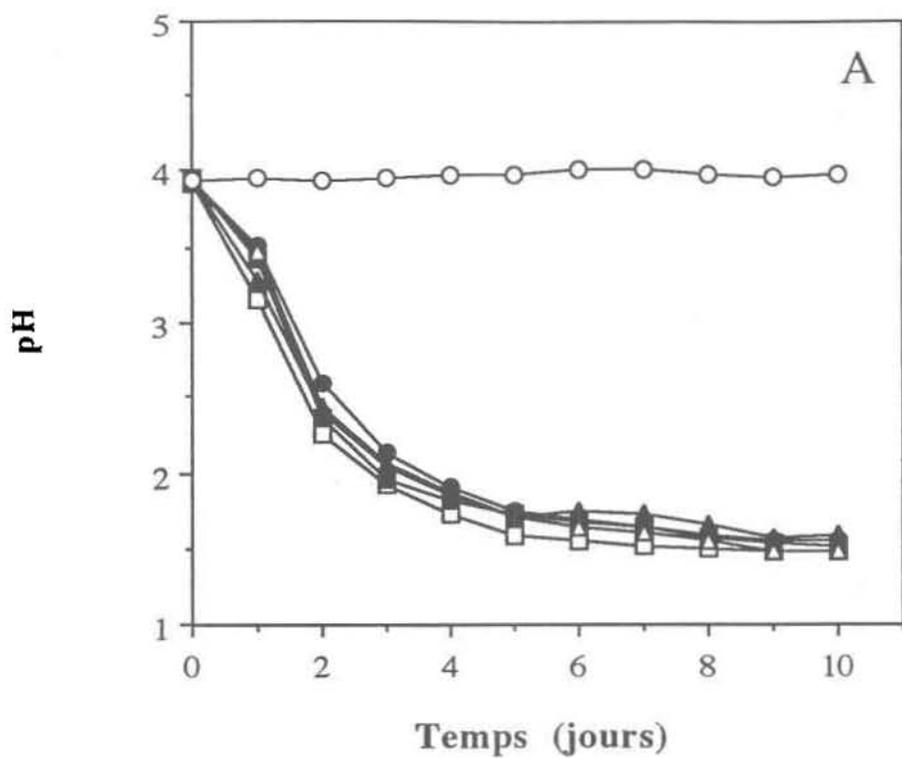


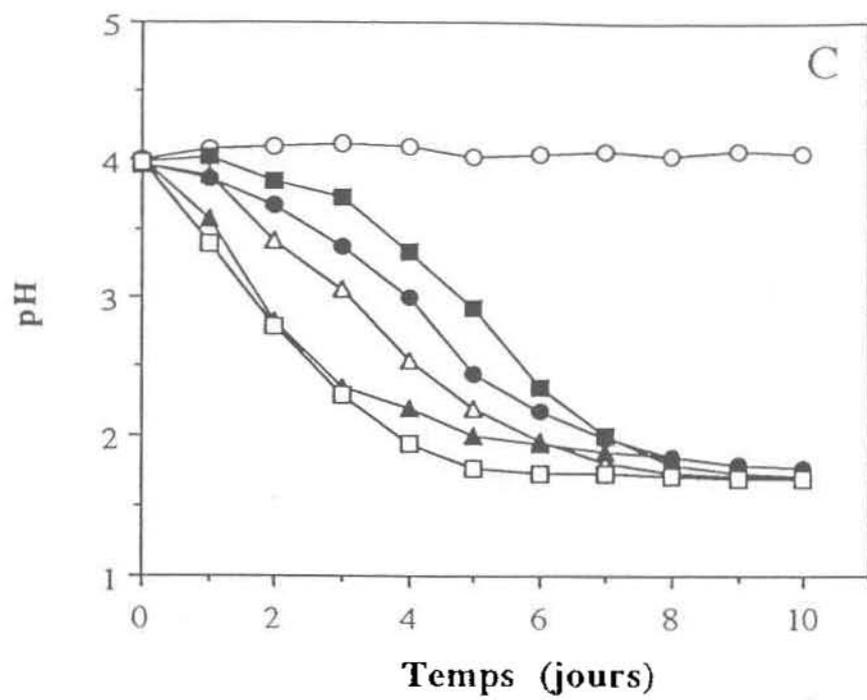
sulfhydryles de la paroi cellulaire et le soufre élémentaire. L'identification de la présence de glycocalice chez deux nouvelles espèces de thiobacilles, *T. albertis* (Bryant et al., 1983) et *T. capsulatus* (Laishley et al., 1988) a permis de mettre en évidence un nouveau type de mécanisme d'adhésion impliqué dans la colonisation du soufre chez les thiobacilles (Bryant et al., 1984; Laishley et al., 1986). La présence de ces polymères extracellulaires chez les autres espèces de thiobacilles n'a cependant jamais été observée adéquatement. De plus, le rôle de ces structures lors de la colonisation au soufre en milieu naturel n'a pas été vérifié. De fait, les diverses études d'adhésion bactérienne au soufre et aux sulfures de métaux réalisées à ce jour ont été effectuées avec des cultures pures dans des milieux synthétiques. La colonisation bactérienne du soufre en milieu synthétique et également dans des boues d'épuration a été étudiée dans la présente section. L'adhésion au soufre de souches pures de thiobacilles a été examinée, ainsi que la colonisation effectuée par la microflore indigène des boues.

#### 5.4.1 Microflore indigène dans les boues

Les pastilles de soufre préparées pour les essais de colonisation présentent une surface particulièrement poreuses favorisant ainsi l'implantation de la biomasse (figure 11A). À cet égard, la préparation du soufre par précipitation à l'air du soufre liquide permet d'obtenir une surface plus adéquate pour de telles études que les sphères de soufre orthorombique préparées par précipitation dans l'eau (Laishley et al., 1986). Ce type de surface permet également une oxydation biologique plus rapide du soufre par rapport aux sphères (voir section 6.4.2). Après cinq jours d'incubation dans les boues, une colonisation très dense et pratiquement complète de la surface du soufre par la microflore est observée. La figure 11B montre l'aspect général de la surface du soufre tel qu'observé sur l'ensemble de la pastille. La présence de matériel filamenteux agissant comme lien entre les cellules et entre les cellules et le

FIGURE 9. Abaissement du pH lors de la croissance de thiobacilles acidophiles en présence de 0.5% de soufre. (A) en milieu synthétique; (B) dans la boue autoclavée digérée aérobie de Black Lake (boue D2); (C) dans la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S3). Symboles: (○) contrôle non-inoculé; (●) *T. thiooxidans* ATCC 19377; (□) *T. thiooxidans* ATCC 55128; (■) isolat A-D1; (△) isolat A-L1; (▲) isolat A-N1.





soufre a été observée sur une grande partie des échantillons analysés (figures 12B à 12D). De plus, plusieurs liens sont souvent observés sur une même cellule. La presque totalité des cellules observées sur le soufre présentent des morphologies similaires aux thiobacilles. Les filaments observés sont comparables au matériel filamenteux du glycocalice de *T. albertis* dénoté par Bryant et al. (1983). Toutefois, dans le présent cas, les liens sont nettement plus allongés. Enfin, ce type de structures fibrillaires a déjà été observé lors de l'adhésion par d'autres microorganismes aux surfaces (Dempsey, 1981; Paerl, 1980; Wardell et al., 1984). Cependant, Wardell (1988) et Sutherland (1972) mentionnent que ces fibrilles pourraient être attribuées à la génération d'artéfacts lors de la préparation des échantillons. En fait, ils pourraient résulter de l'étirement de polymères extracellulaires condensés lors de la déshydratation des échantillons. Cette proposition a été utilisée par Bryant et al. (1984) pour expliquer la structure du glycocalice observée chez *T. albertis* sur le soufre. La présence de ce réseau filamenteux contribue certainement à maintenir la biomasse sur le soufre et pourrait également servir à l'adhésion initiale à cette surface (Costerton et al., 1978; Costerton et Irwin, 1981). Un réseau de filaments a également été observé sur le soufre dans la boue de Cowansville. La figure 12A illustre l'érosion de la surface du soufre par quelques cellules. On peut noter la présence de liens entre les cellules et le soufre, de même que la liaison de deux cellules par ce qui semble être des exopolymères de la paroi cellulaire (probablement du glycocalice).

#### 5.4.2 Cultures pures

Les figures 13A et 13B témoignent bien de la production de liens chez *T. thiooxidans* en croissance en milieu synthétique, semblables à ce qui est observé avec la microflore indigène des boues. La production de ces structures n'est donc pas seulement induite dans les boues mais également en milieu synthétique. Toutefois, la quantité et la longueur des liens ainsi

FIGURE 10. Augmentation du POR et acidification de la boue lors de la croissance des souches bactériennes en présence de 0.5% de sulfate ferreux. (A) dans la boue digérée aérobie de Black Lake autoclavée (boue D2); (B) dans la boue digérée anaérobie de Valcartier autoclavée (boue S3). Symboles: (○) contrôle sans sulfate ferreux; (●) contrôle avec sulfate ferreux; (△) *T. ferrooxidans* ATCC 19859; (▲) *T. ferrooxidans* ATCC 13661; (□) isolat BL-1; (■) isolat VA-1.

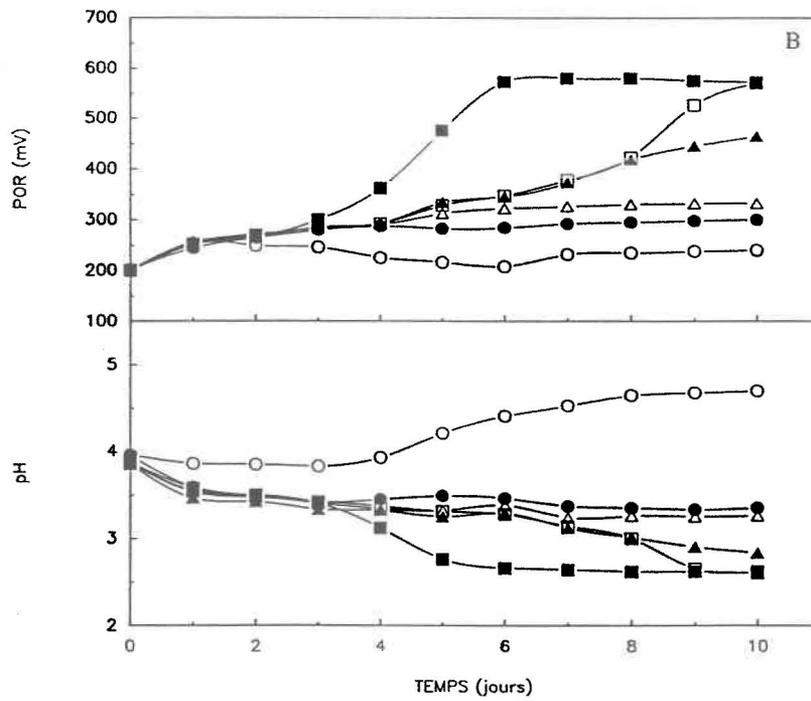
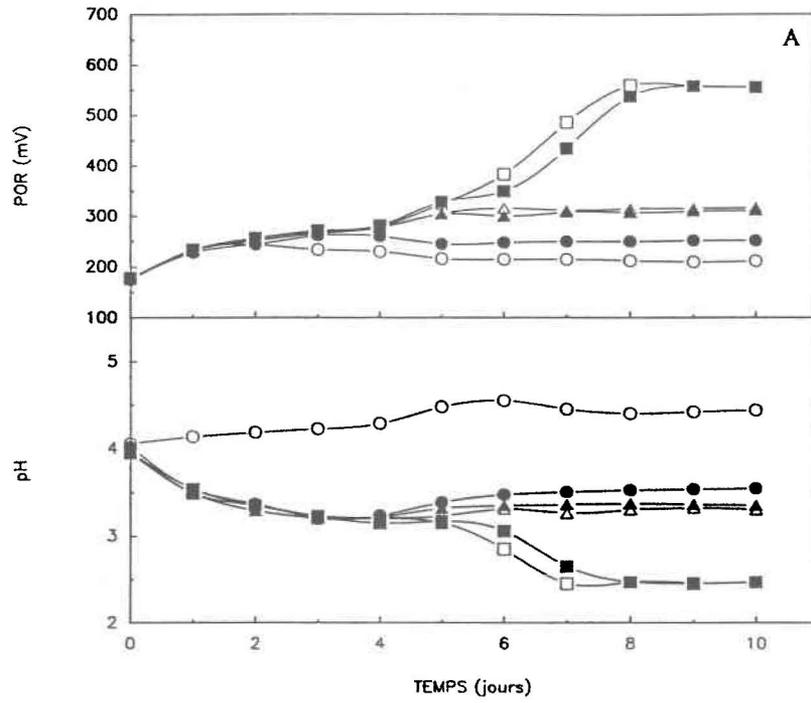


FIGURE 11. Photomicrographies électroniques à balayage montrant la surface du soufre lors de la lixiviation microbienne dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2). (A) avant lixiviation; (B) après cinq jours de lixiviation.

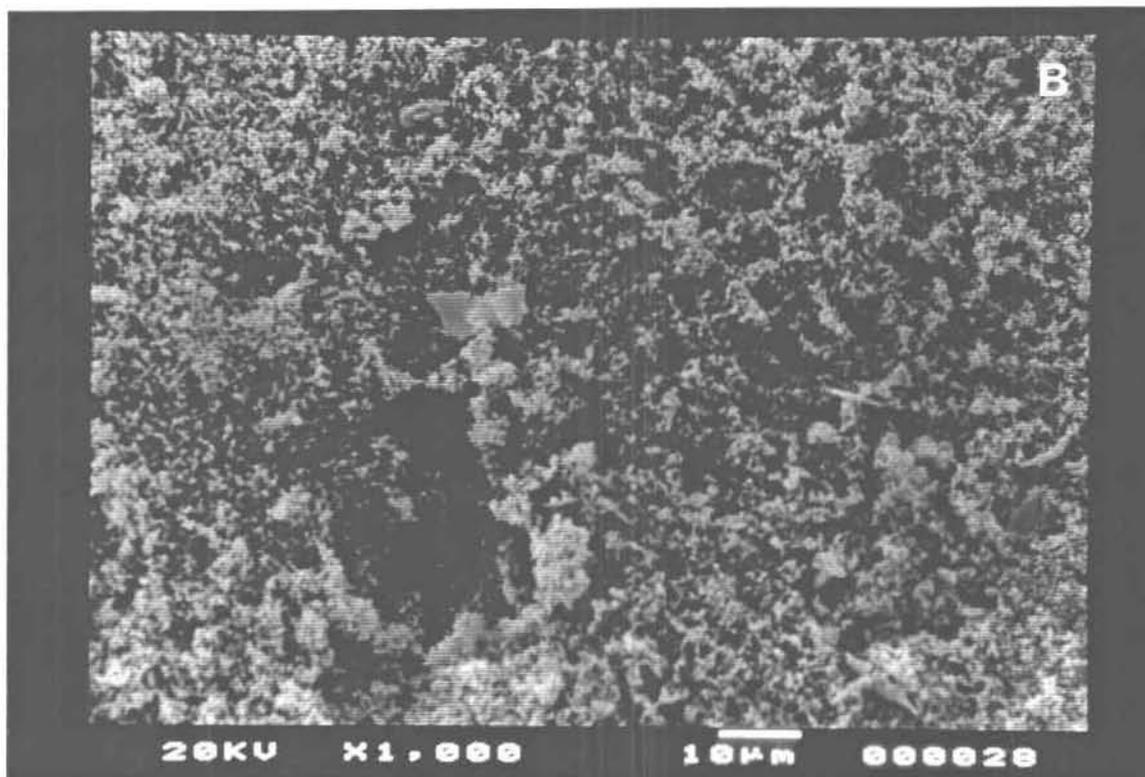
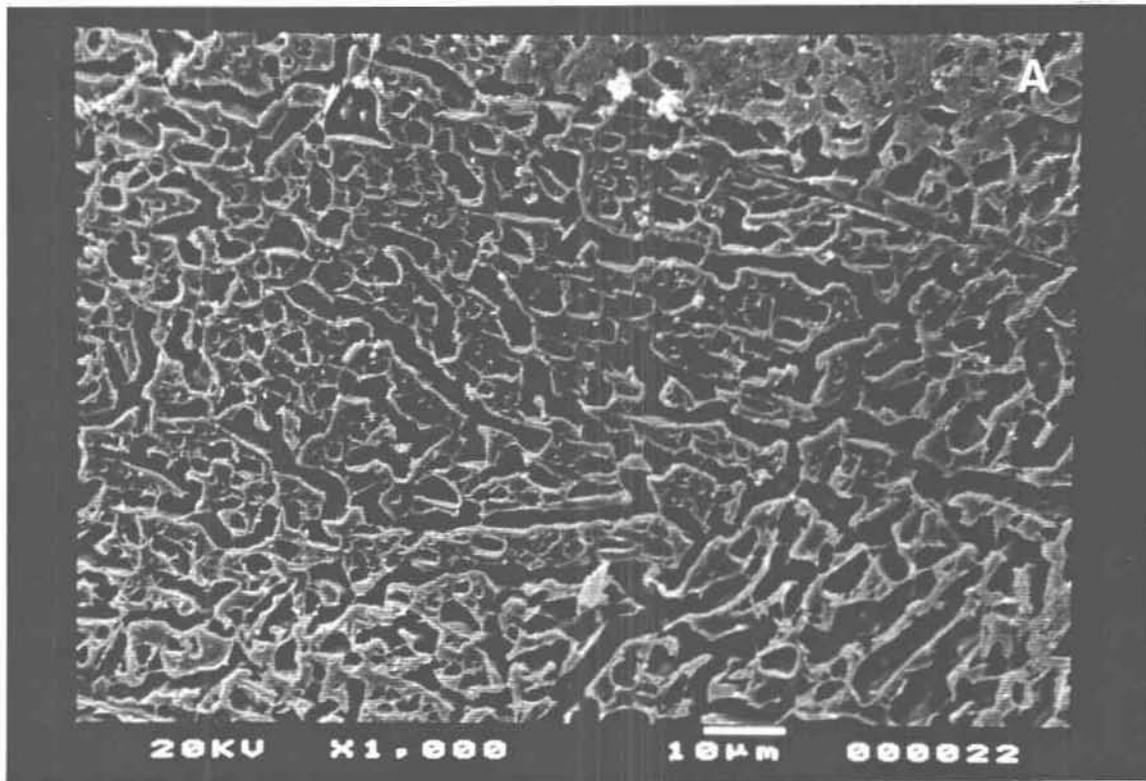
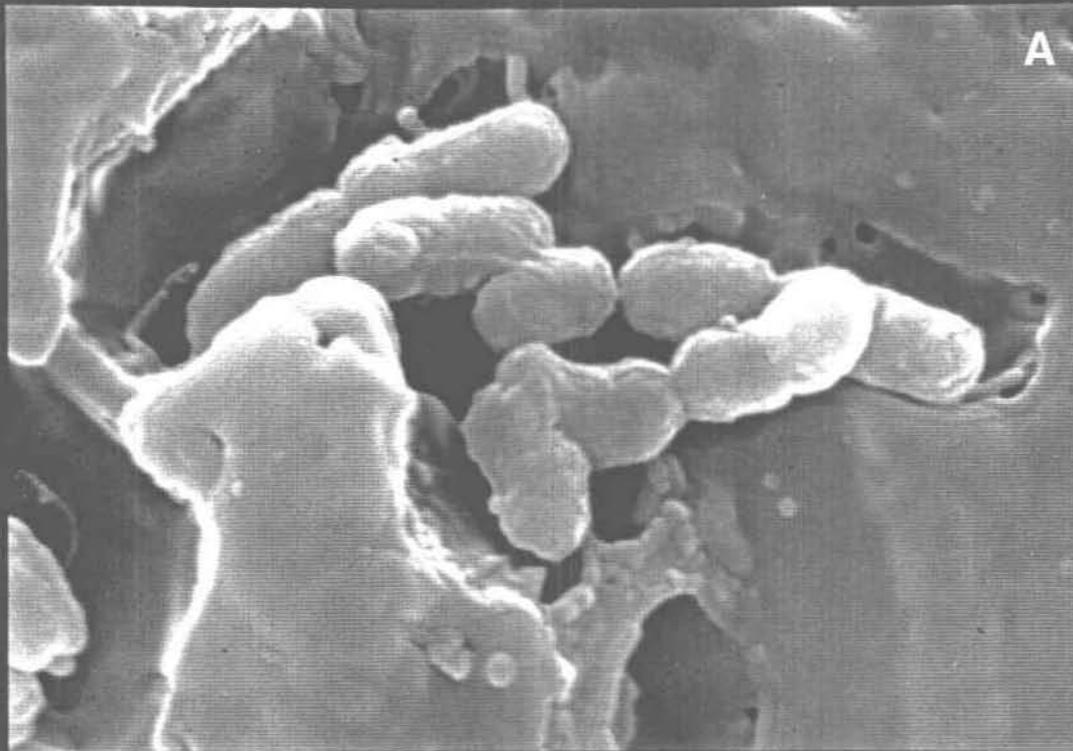
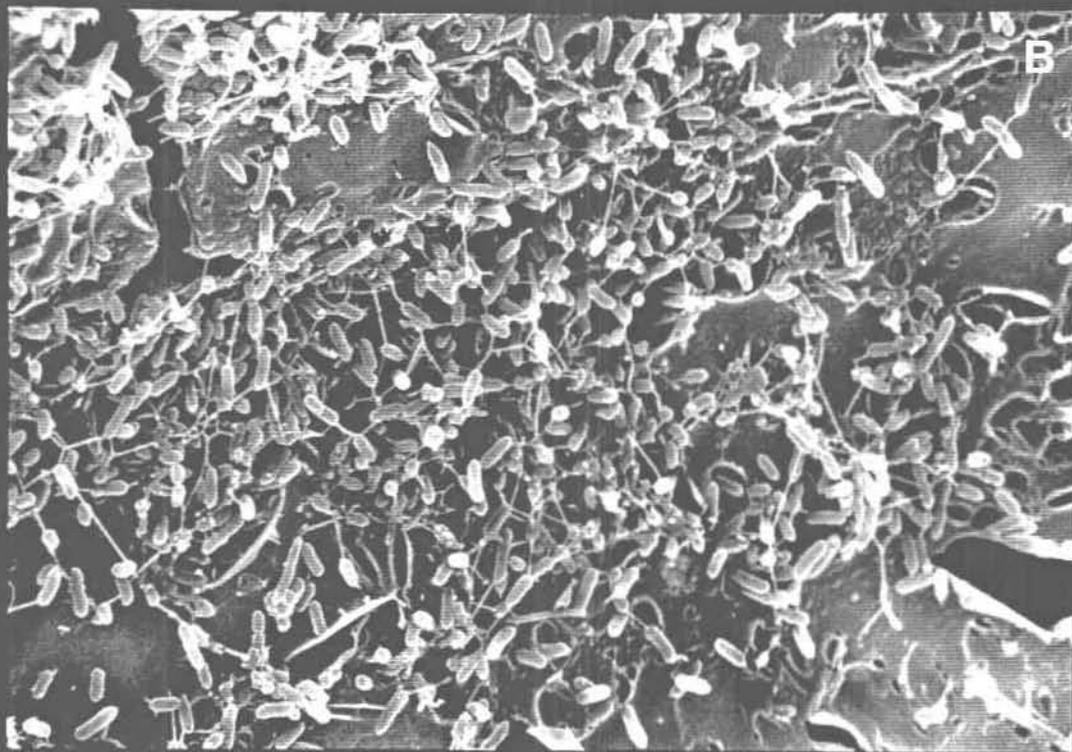


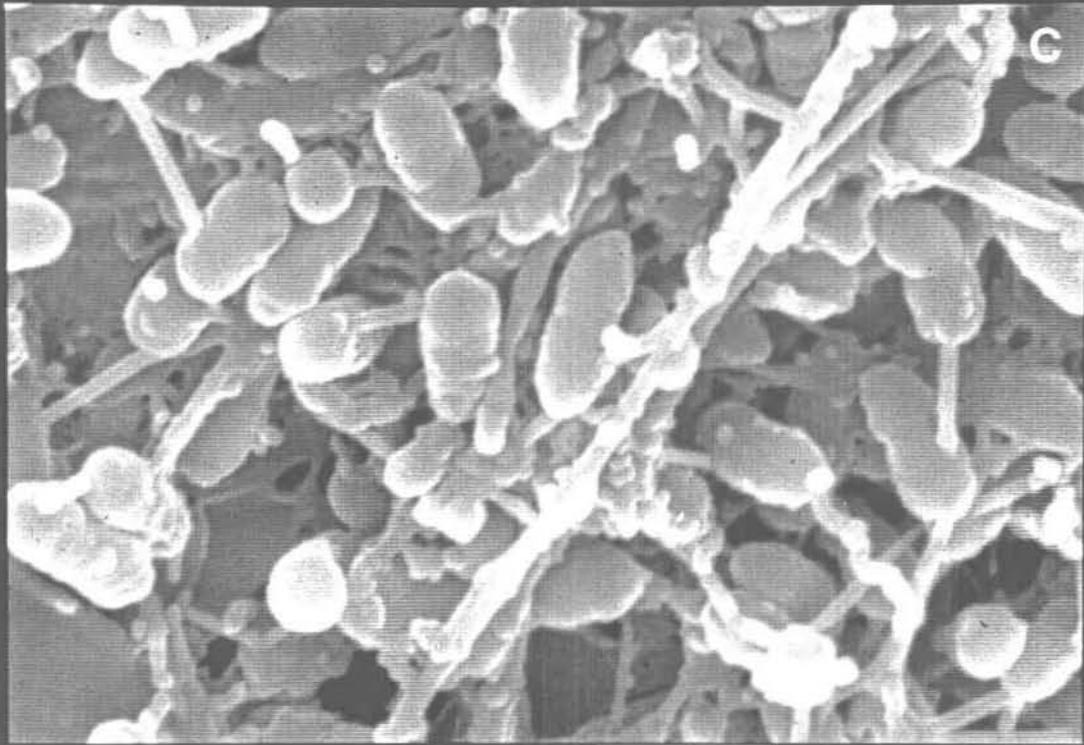
FIGURE 12. Colonisation du soufre élémentaire par la microflore oxydant le soufre après cinq jours de lixiviation. (A) boue digérée aérobie de Cowansville (boue H); (B à D) boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2).



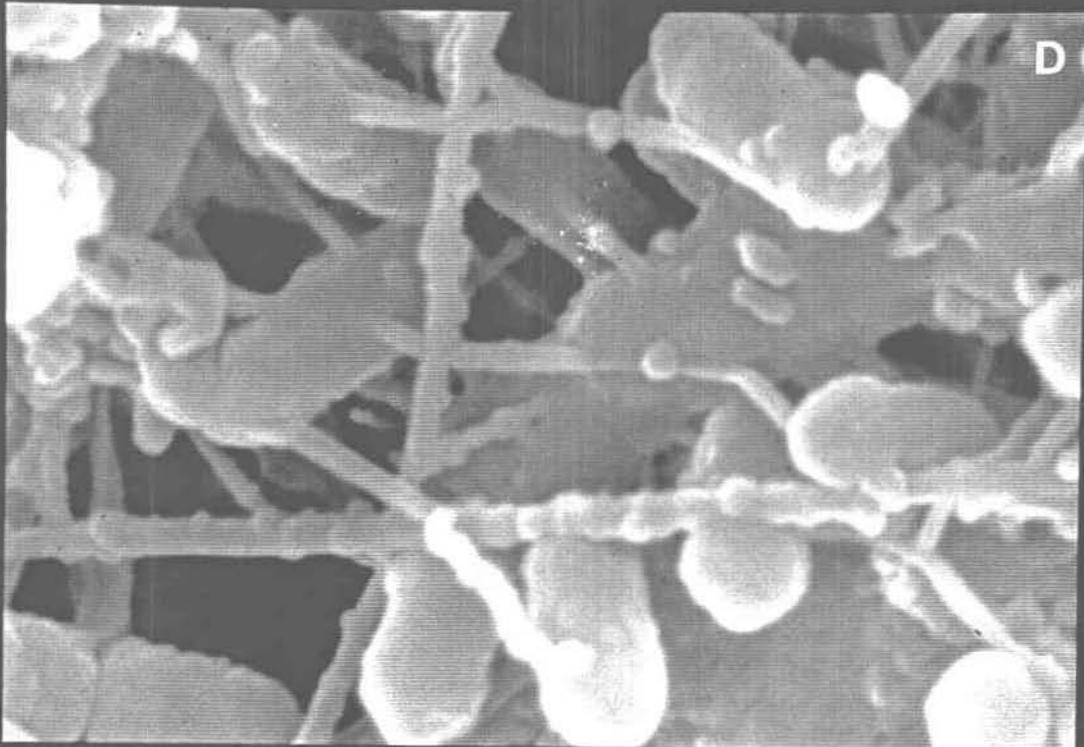
20KV X20,000 1µm 000019



20KV X3,500 5µm 000005

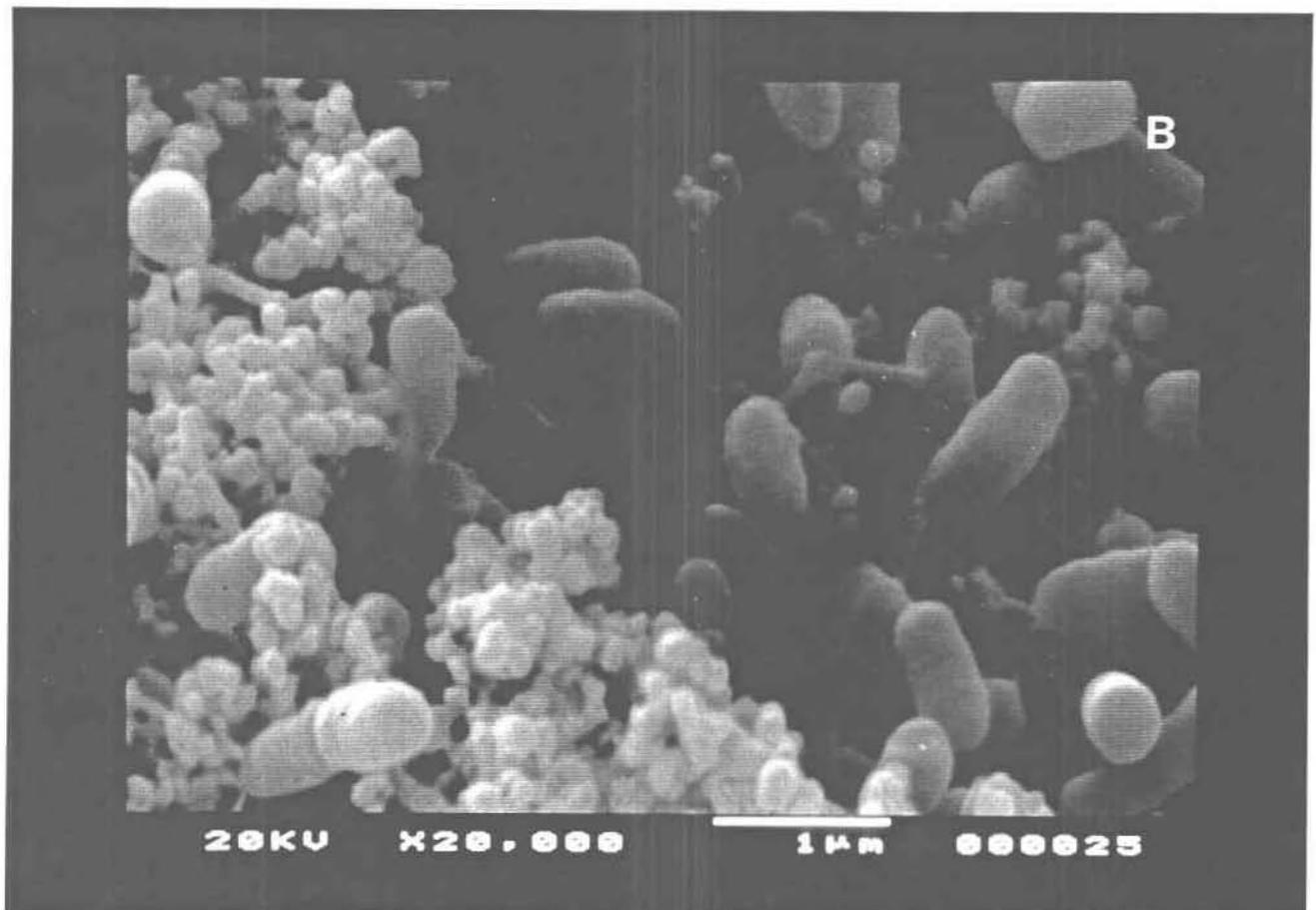
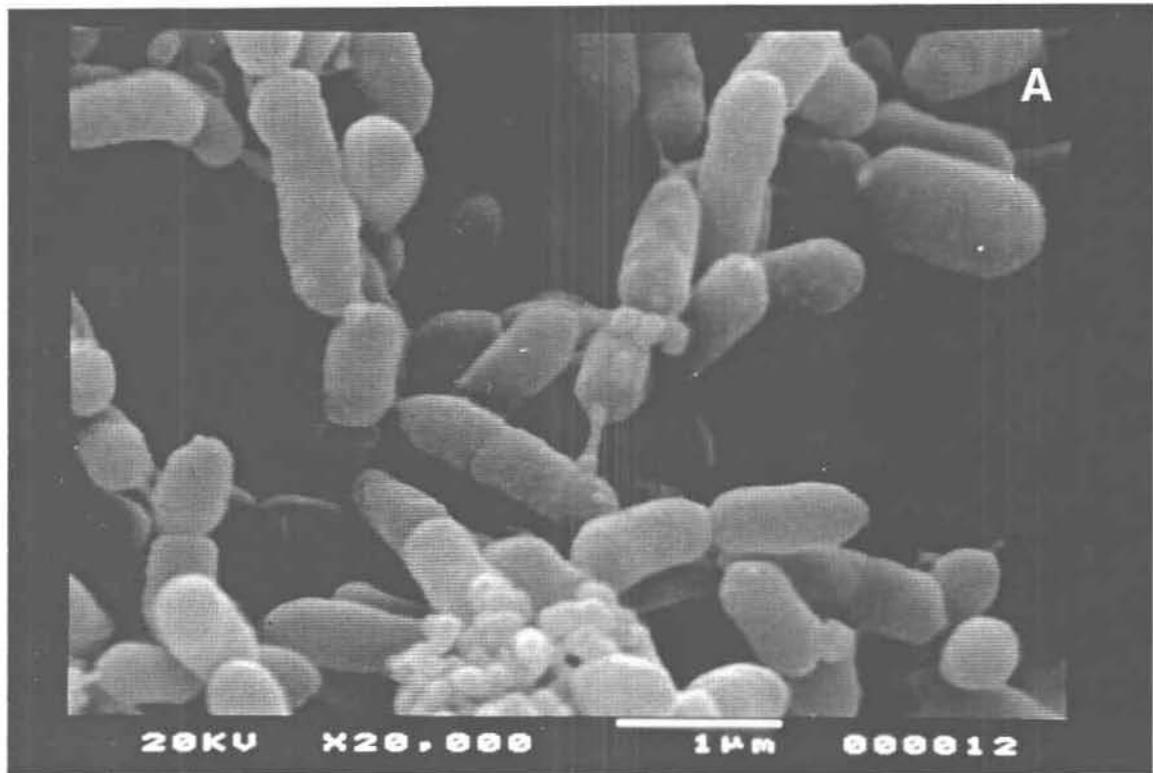


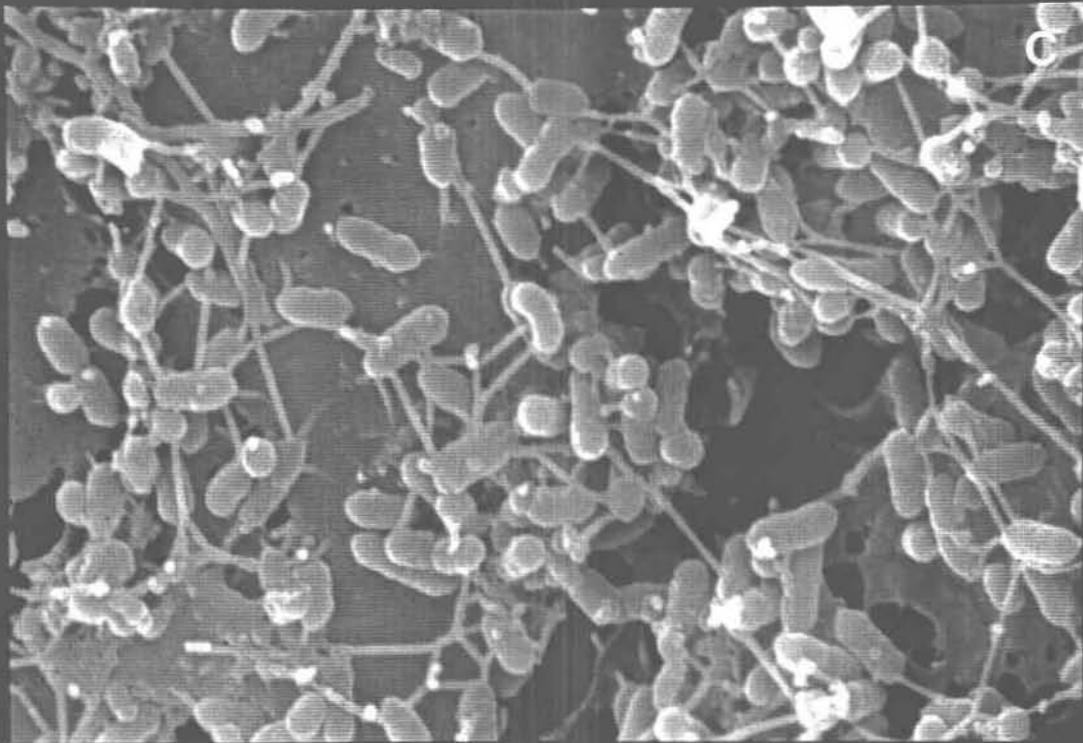
20KV X20,000 1µm 000012



20KV X35,000 0.5µm 000017

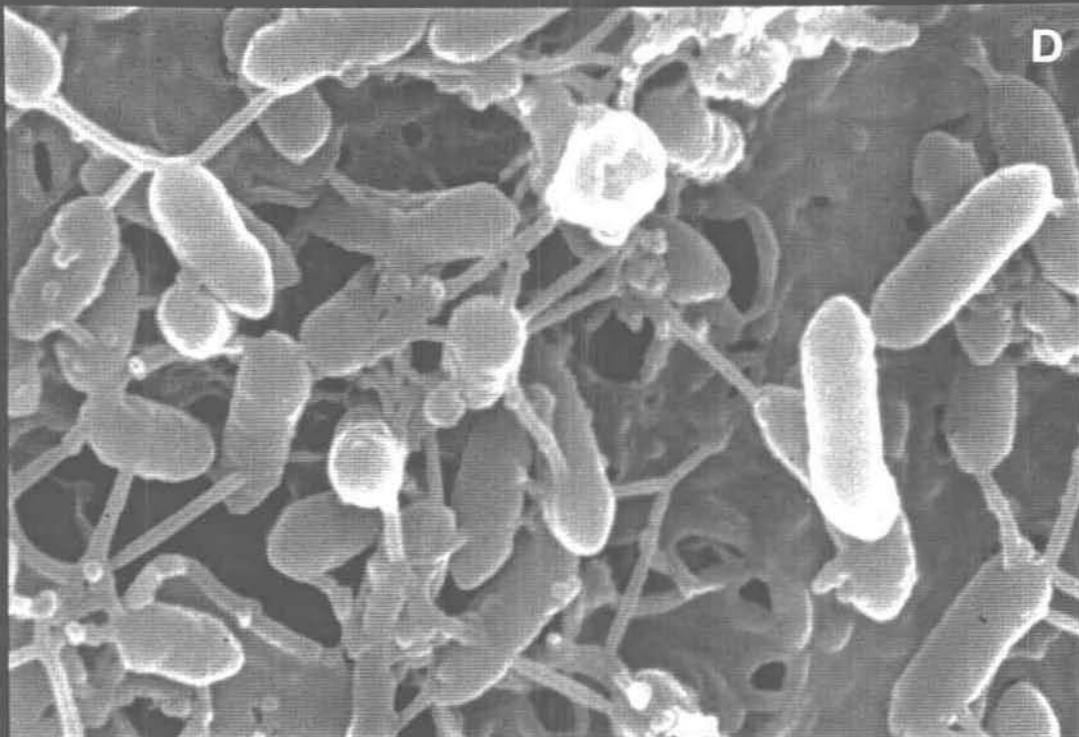
FIGURE 13. Colonisation du soufre élémentaire par *T. thiooxidans* après cinq jours d'incubation. (A) ATCC 55128 en milieu synthétique; (B) ATCC 19377 en milieu synthétique; (C et D) ATCC 55128 dans la boue de Valcartier autoclavée (boue S3).





20KV X10,000

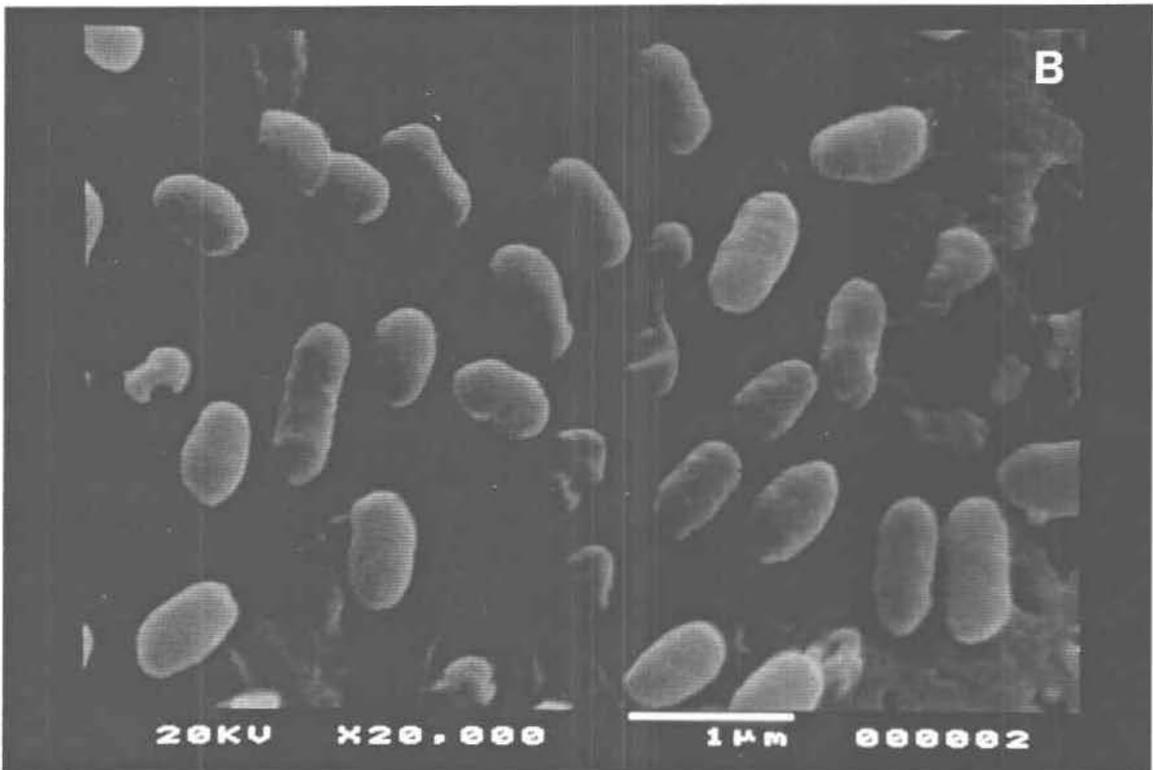
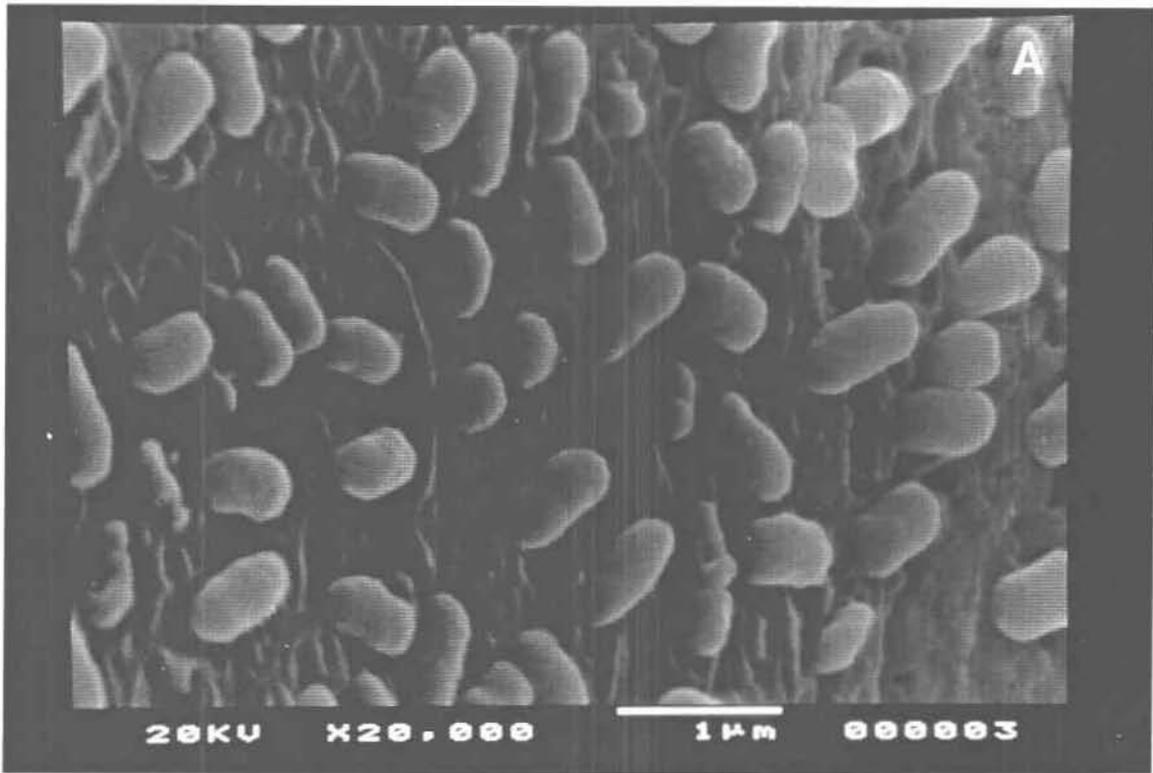
1µm 000014



20KV X20,000

1µm 000006

FIGURE 14. Colonisation du soufre élémentaire par *T. thioparus* ATCC 55127 après cinq jours d'incubation. (A) en milieu synthétique; (B) dans la boue digérée anaérobie de Valcartier autoclavée (boue S3).



observés sont supérieures dans les boues (figures 13C et 13D). Ceci pourrait être causé par une accumulation plus prononcée de matière organique par les cellules en croissance dans les boues, induisant une production plus importante de polymères extracellulaires. Enfin, les cellules de *T. thioparus* ATCC 55127 se fixent directement sur le soufre sans production notable de liens et ce, autant dans les boues qu'en milieu synthétique (figures 14A et 14B). Ce type de fixation est régulièrement observé chez les thiobacilles (Berry and Murr, 1978; Grishin et Tuovinen, 1989).

Après cinq jours d'incubation, la fraction de soufre oxydée en acide sulfurique déterminée par la concentration du sulfate produit est faible (< 15%); ceci est particulièrement évident pour *T. thioparus* en milieu synthétique (3%), et dans la boue (2.1%). La quantité de soufre oxydée dans la boue n'est que légèrement inférieure à celle oxydée dans le milieu synthétique pour *T. thioparus* ATCC 55127 et *T. thiooxidans* ATCC 55128. La quantité de soufre oxydée par la microflore indigène est semblable à celle obtenue avec les cultures pures de *T. thiooxidans* en croissance dans les boues ou en milieu synthétique. La présence d'une microflore hétérotrophe très dense et la composition riche en matière organique soluble et insolubles n'entravent pas la capacité de *T. thiooxidans* de coloniser et d'oxyder le soufre. La présence du réseau filamenteux pourrait contribuer favorablement à l'oxydation du soufre en favorisant le maintien de la biomasse à proximité de son substrat. Le rôle précis de ces polymères extracellulaires dans la colonisation du soufre en milieu naturel devrait être étudié, ainsi que la nature chimique de ces liens et les facteurs induisant leur production.

## **5.5 Cinétiques de croissance des populations pendant la lixiviation**

Plus tôt dans ce chapitre, il a été démontré que les deux groupes de thiobacilles (peu-acidophiles et acidophiles) sont impliqués dans la biolixiviation des métaux en présence de

soufre. Dans cette section, la coopération entre ces deux groupes a été examinée ainsi que les cinétiques de croissance de ces populations pendant la lixiviation des métaux. Les essais ont été effectués dans cinq boues d'épuration de différents types (une boue secondaire, deux boues digérées aérobies et deux boues digérées anaérobies) et avec des contenus variés en solides (7, 13, 14, 23, 41 g/L). Pendant la période de cinq jours de lixiviation microbienne, la microflore a produit entre 2.8 et 4.4 g/L de sulfate, ceci correspondant à une oxydation du soufre ajouté variant entre 19 et 29% (tableau 21). La production d'acide sulfurique cause une baisse du pH entre 1.5 et 2.2. Des mesures de la production d'intermédiaires soufrés (thiosulfate, trithionate et tétrathionate) lors de la biolixiviation ont indiqué que l'oxydation du soufre élémentaire en acide sulfurique s'effectue sans accumulation d'intermédiaires. L'acidification et l'aération des boues résultent en une hausse du POR entre 360 et 430 mV. Les rendements de solubilisation atteints après les cinq jours d'incubation sont présentés au tableau 22. Le cadmium, le cuivre, le manganèse, le nickel, et le zinc sont très bien solubilisés avec des moyennes respectives de 86, 84, 94, 84 et 92% alors que seulement 34% du chrome et 32% du plomb sont extraits

TABLEAU 21. Variation du pH, du POR et de la production de sulfate après cinq jours de lixiviation microbienne en présence de soufre

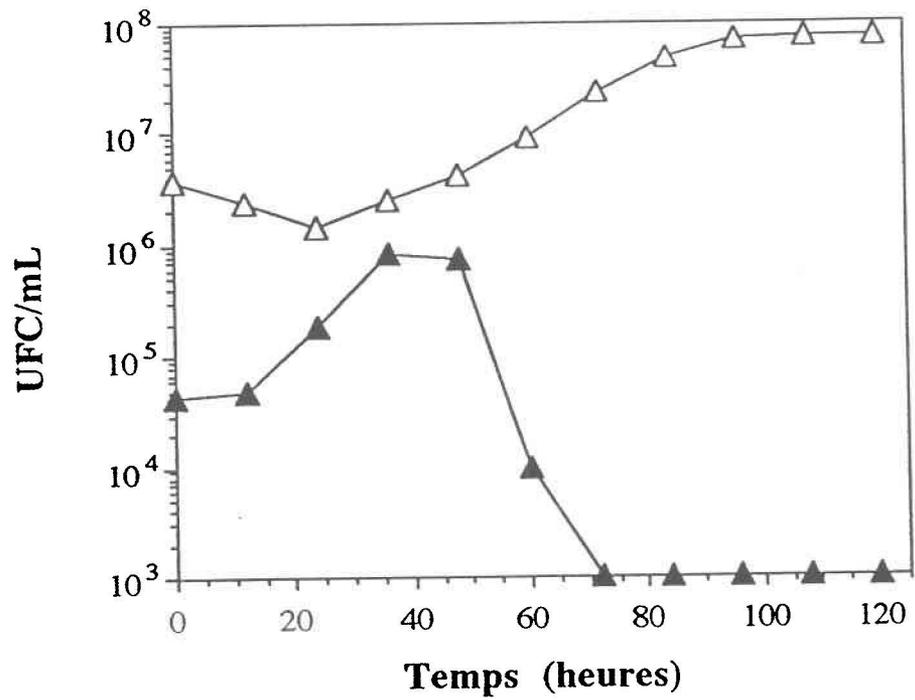
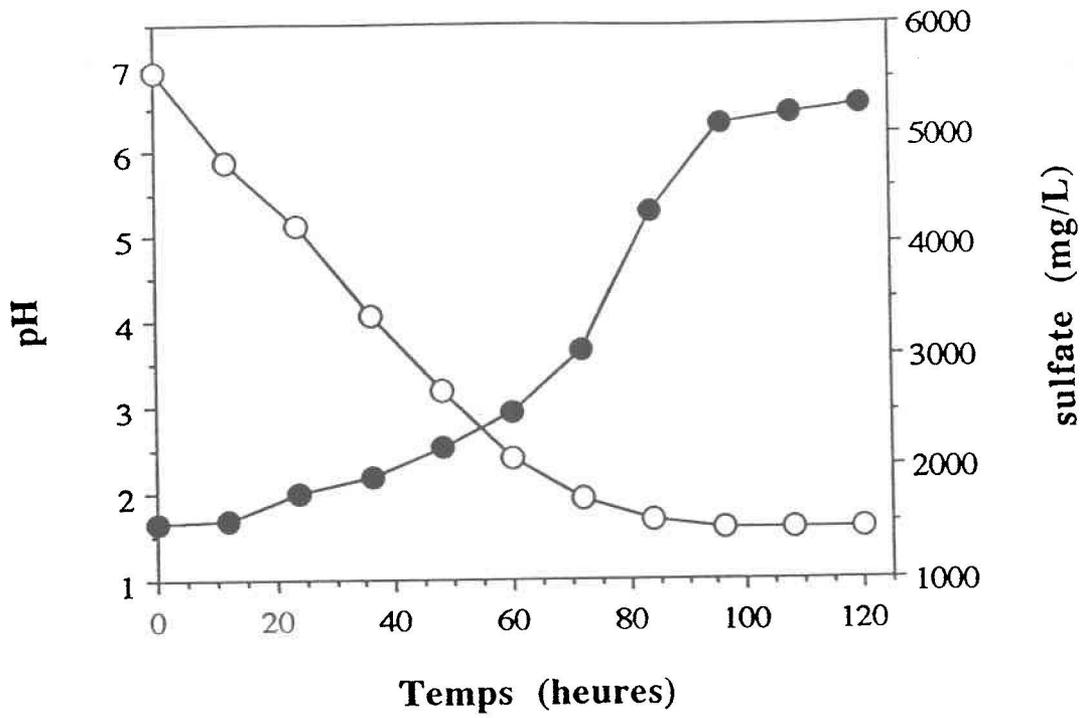
Boues	pH		POR (mV)		Sulfate (mg/L)		% de soufre oxydé
	initial	final	initial	final	initial	final	
A	6,04	2,05	138	428	509	3340	18,9
D2	6,95	1,58	155	374	1510	5250	24,9
L2	6,72	2,21	113	363	606	4080	23,2
N	6,92	1,55	37	410	781	5200	29,4
S3	6,60	2,10	167	417	874	3930	20,3

TABLEAU 22. Rendements de solubilisation des métaux dans les boues après cinq jours de biolixiviation avec 0.5% de soufre ajouté

Boues	% de solubilisation						
	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	83	19	92	99	87	10	88
D2	88	33	90	88	88	27	97
L2	84	41	69	95	80	39	92
N	90	41	89	93	87	54	88
S3	87	34	81	95	77	29	97

Un exemple de courbe de croissance des deux types de thiobacilles est présenté à la figure 15. Les thiobacilles peu-acidophiles présents initialement dans la boue prolifèrent et abaissent le pH initial de la boue aux environs de 4.0; par la suite les thiobacilles acidophiles provenant de l'inoculum commencent à se multiplier en entraînant une baisse importante du pH. La chute du pH à des valeurs inférieures à 3.0 cause une réduction du nombre de thiobacilles peu-acidophiles sous la limite de détection ( $10^3$  UFC/mL). Le même type de succession bactérienne a été constaté pour les quatre autres boues. Il faut noter qu'en tout temps lors de la période de lixiviation, les concentrations de thiobacilles acidophiles viables sont supérieures (> un cycle logarithmique) à celles des thiobacilles peu-acidophiles. De plus, la multiplication des thiobacilles acidophiles est responsable de la production de la majeure partie de l'acide sulfurique.

FIGURE 15. Production de sulfate, abaissement du pH et croissance des populations microbiennes oxydant le soufre dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2). Symboles: (○) pH; (●) sulfate; (△) thiobacilles acidophiles; (▲) thiobacilles peu-acidophiles.



Les thiobacilles peu-acidophiles ont une croissance plus rapide ( $t_d$ : 6.7 à 8.8 heures) que les thiobacilles acidophiles ( $t_d$ : 8.8 à 10.3 heures) pour les cinq boues testées (tableau 23). Le type de boue utilisée et le contenu en solides de celle-ci affectent peu la cinétique de croissance des populations lixiviantes puisque les taux maximums spécifiques de croissance sont comparables. De même, les cinétiques de production de sulfate dans les cinq boues sont semblables, avec des taux maximums spécifiques de production de sulfate variant au plus de 0.02 g  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}/$  heure, et des taux maximums spécifiques de production de sulfate étant estimés entre 1.4 et 2.3 g  $\text{SO}_4^{2-}/\text{g}$  cellules/ heure. L'évaluation de cette constante a été réalisée en utilisant le rapport poids/cellules suivant: 1 mg de cellules (poids sec) équivalent à  $1.2 \times 10^9$  cellules (Okereke et Stevens, 1991).

En tenant compte du temps de génération moyen de 9.5 heures pour les thiobacilles acidophiles, il faudrait utiliser un temps de résidence de 32 heures avec un bioréacteur en mode semi-continu et alimenté d'un inoculum de 10% amenant le pH initial de la boue à traiter aux environs de 4.0, les autres paramètres d'opération étant maintenus constants ( $\sigma_T$ , apport en oxygène, etc.). Évidemment, la solubilisation biologique des métaux étant influencée davantage par la quantité d'acide sulfurique produit que par la concentration de cellules lixiviantes dans le réacteur, le taux maximum spécifique de production de sulfate constitue un outil plus précis pour la mesure du temps de rétention hydraulique que le taux de division cellulaire. À cet égard, dans un système opéré dans les conditions mentionnées ci-dessus, un temps de rétention de 42 heures serait nécessaire pour obtenir une concentration finale de sulfate de 3 g/L (taux maximum de formation de sulfate: 64 mg  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}/$  heure). Ce temps de traitement des boues assume que l'activité biologique est le facteur limitant et que la solubilisation des métaux aux niveaux souhaités ne requiert pas une prolongation de la période de lixiviation. Les quantités d'acide requises pour acidifier les boues étant très variables (tableau 16) et les taux de production de sulfate étant relativement semblables (tableau 23), les temps de biolixiviation varieront donc appréciablement d'une boue à l'autre.

TABLEAU 23. Paramètres cinétiques de croissance dans les boues des microflores oxydant le soufre.

Boues	Peu-acidophiles		Acidophiles		$(dSO_4^{2-}/dt)^c$ (gSO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L/ hre)	$(V_{max})^d$ (gSO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /g cell./ hre)
	$\mu^a$ (hre <sup>-1</sup> )	$t_d^b$ (hre)	$\mu$ (hre <sup>-1</sup> )	$t_d$ (hre)		
A	0.079	8.8	0.067	10.4	0.055	1.70
D2	0.091	7.6	0.072	9.6	0.075	2.27
L2	0.091	7.6	0.078	8.9	0.060	1.39
N	0.104	6.7	0.079	8.8	0.061	2.28
S3	0.084	8.3	0.071	9.7	0.068	2.34

- a    taux maximum spécifique de croissance
- b    temps de génération
- c    taux maximum de formation de produit
- d    taux spécifique maximum de formation de produit

### 5.6    Caractérisation des isolats VA-4 et VA-7

Deux souches ayant été isolées de la boue digérée anaérobie de Valcartier (boue S) (Jain et Tyagi, 1992) ont été identifiées et caractérisées, puis déposées dans la collection ATCC. L'étude des caractéristiques physiologiques et métaboliques des souches VA-4 (*T. thiooxidans* ATCC 55128) et VA-7 (*T. thioparus* ATCC 55127) est donc présentée. La capacité acidifiante et lixiviante de ces souches dans la boue S a également été évaluée en comparaison avec d'autres souches ATCC.

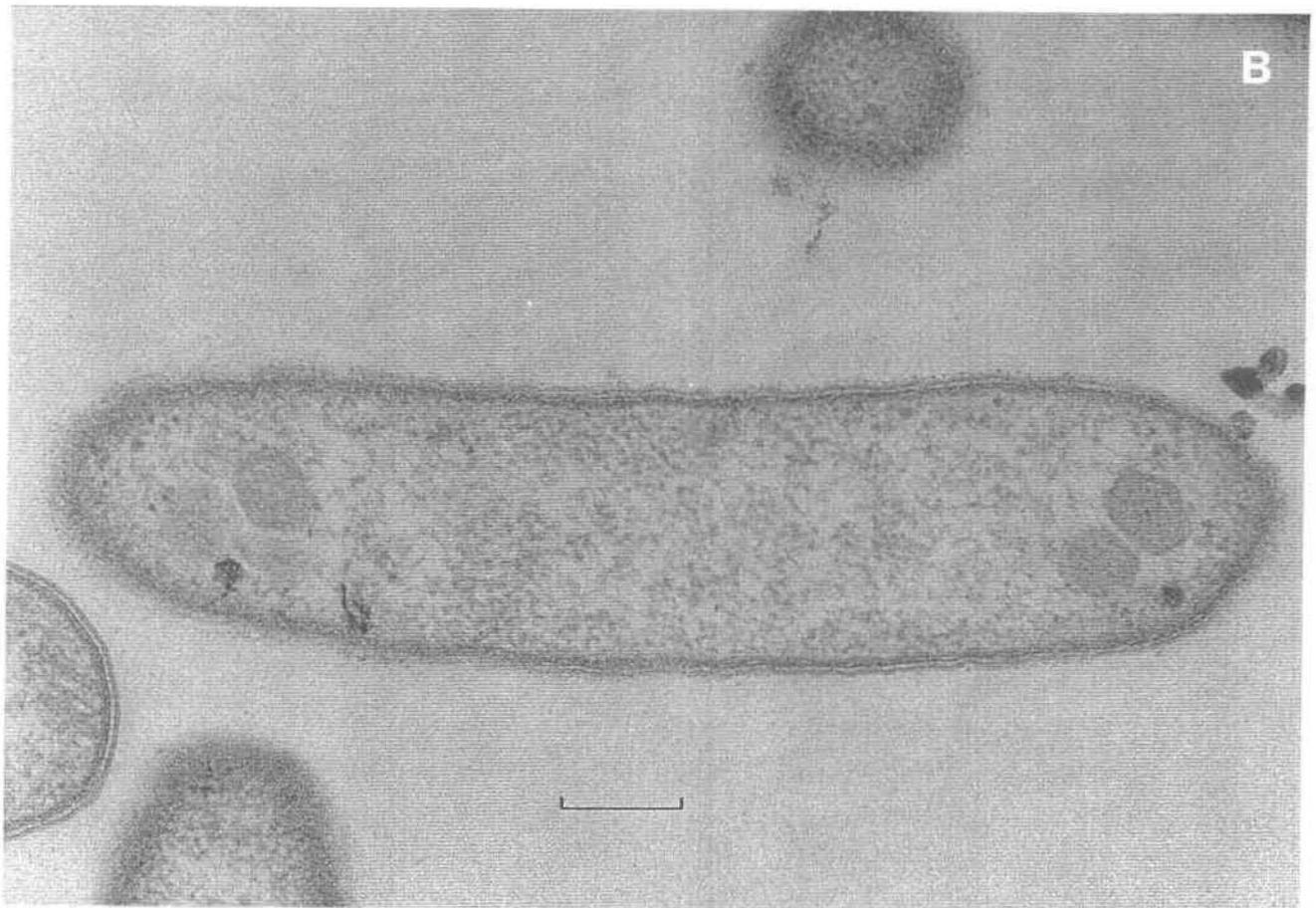
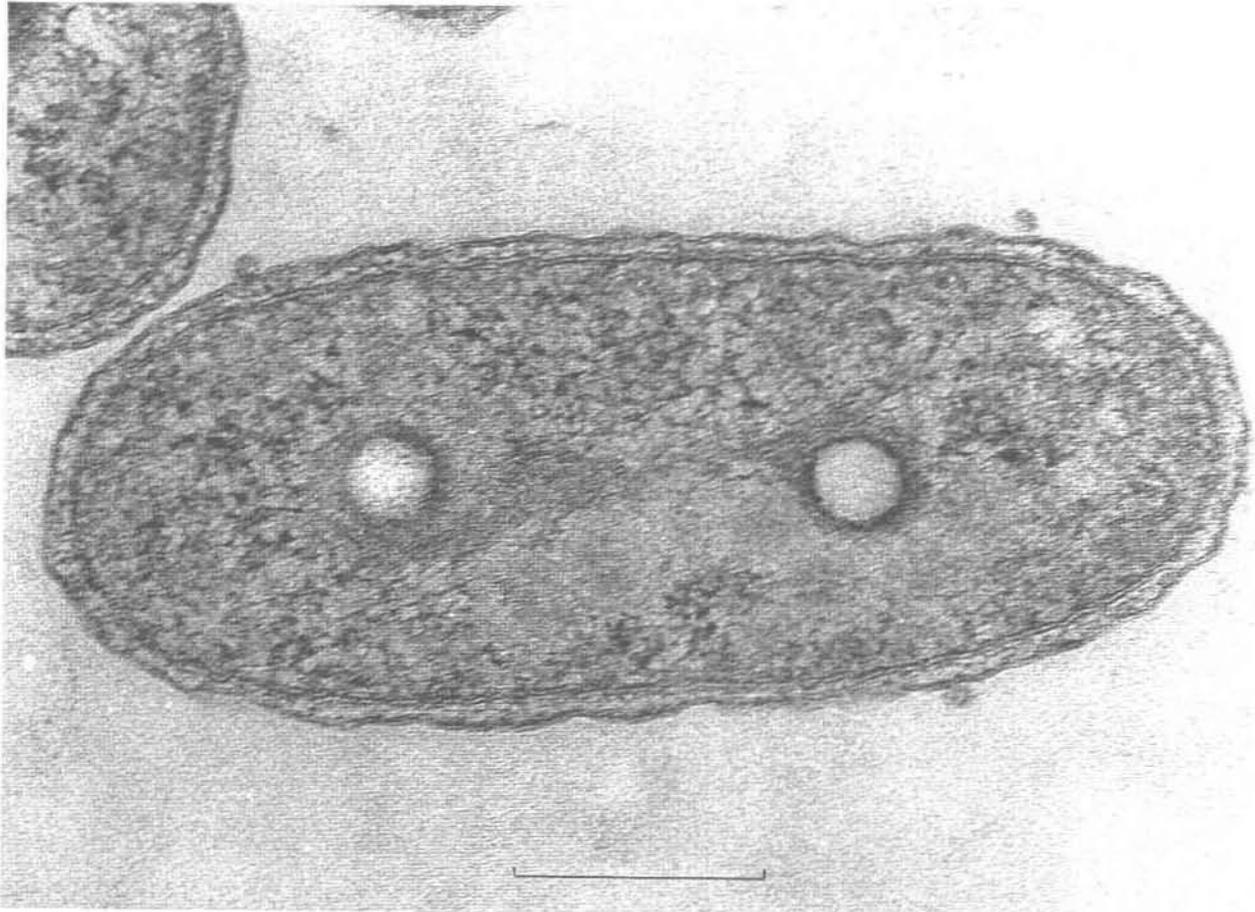
### 5.6.1 Physiologie et métabolisme

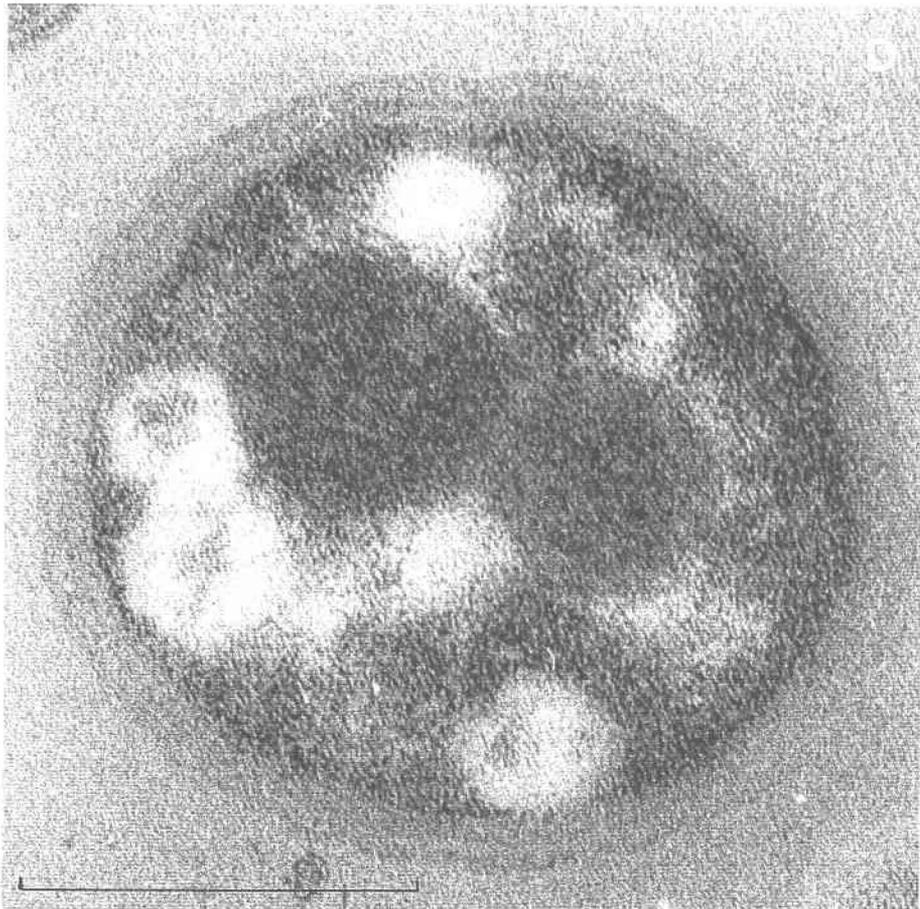
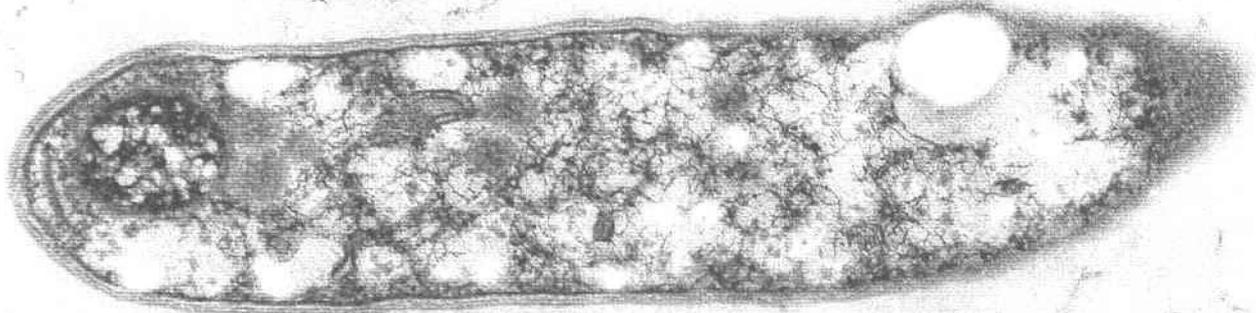
L'isolat VA-7 est un court bâtonnet mobile à Gram négatif ( $0.3-0.4 \mu\text{m} \times 0.8-1.2 \mu\text{m}$ ), alors que l'isolat VA-4 est un long bâtonnet mobile à Gram négatif ( $0.4-0.5 \mu\text{m} \times 1.2-2.0 \mu\text{m}$ ). Le cytoplasme des deux souches contient des inclusions cytoplasmiques semblables à des granules de volutine (polymétaphosphate) et plusieurs inclusions de formes polyhédriques (carboxysomes) (figures 16a à 16d). La croissance de l'isolat VA-7 s'effectue à un pH initial entre 5.0 et 9.0 avec un optimum entre pH 6.0 et 8.0. L'isolat VA-4 se multiplie à des valeurs initiales de pH entre 1.5 et 5.5, avec une croissance optimale entre 2.5 et 4.0. La croissance des deux souches a été observée dans la gamme de température variant de  $10^\circ\text{C}$  à  $37^\circ\text{C}$ , avec un optimum entre  $25^\circ\text{C}$  et  $30^\circ\text{C}$ . L'ion ammonium est la seule source d'azote assimilable par la souche VA-4, alors que la souche VA-7 peut utiliser le glutamate comme source alternative d'azote. Aucun des isolats ne peut croître en anaérobiose, ni en présence de 5% de NaCl. Les deux bactéries ne peuvent obtenir leur énergie de l'oxydation de composés organiques. La croissance autotrophe des deux souches est supportée par l'oxydation du thiosulfate, du soufre élémentaire et du tétrathionate, mais l'ion ferreux et le thiocyanate ne sont pas oxydés. Le pourcentage molaire de Guanine+Cytosine de l'ADN déterminé en spectrophotométrie est de 64% pour la souche VA-7, et 52% pour la souche VA-4. Les caractéristiques physiologiques et métaboliques de la souche VA-4 sont compatibles à la description taxonomique de *Thiobacillus thiooxidans*, alors que l'isolat VA-7 correspond à *Thiobacillus thioparus*.

### 5.6.2 Cinétique de croissance

L'oxydation du thiosulfate par l'isolat VA-7 se fait avec une production importante d'intermédiaires soufrés. Le trithionate constitue le principal polythionate accumulé dans le

FIGURE 16. Photomicrographies électroniques montrant des sections minces de (A) isolat VA-7, (B à D) isolat VA-4.

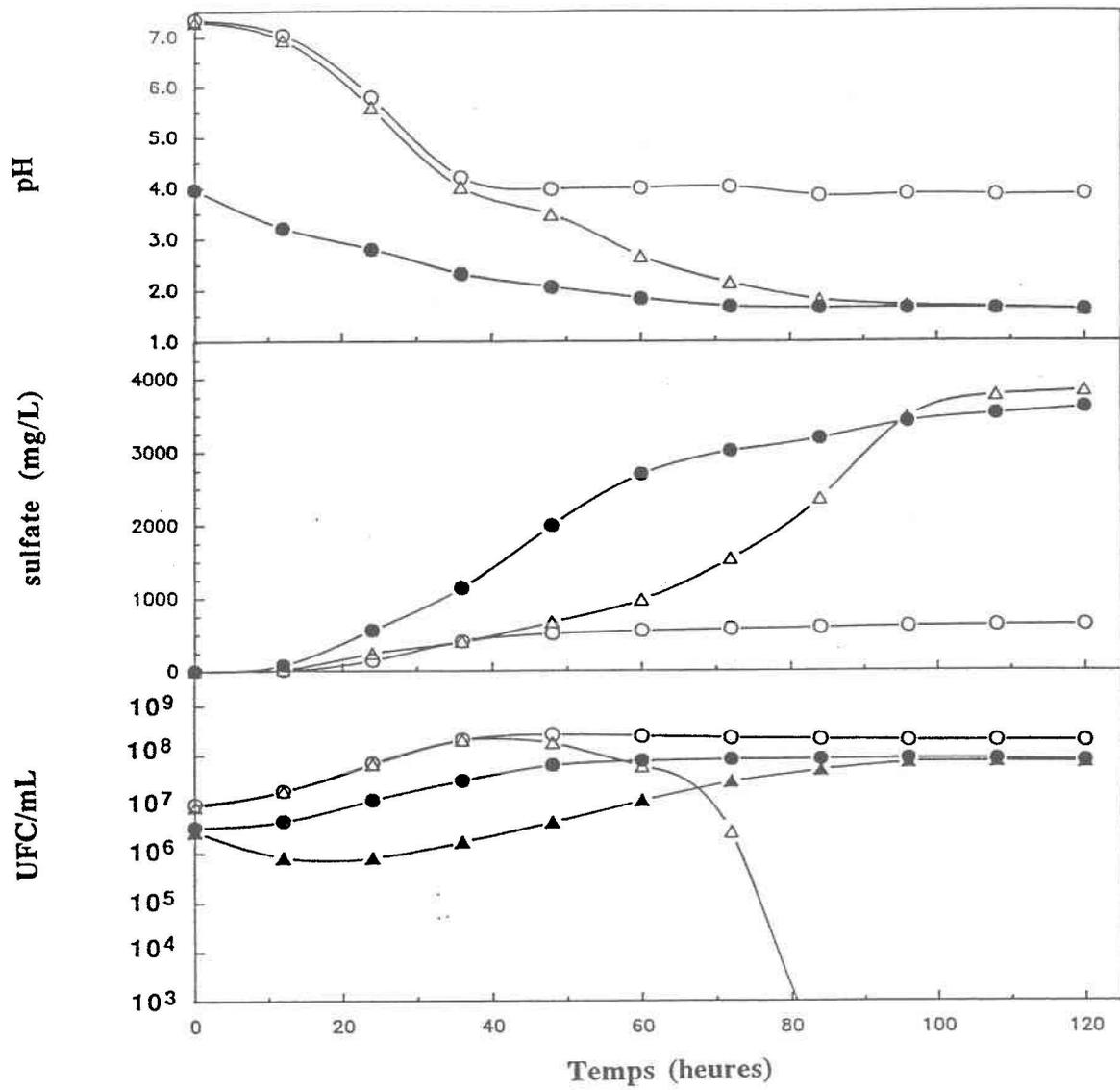




milieu et atteint une concentration optimale après trois jours d'incubation. Une fraction de ce trithionate est par la suite oxydée en sulfate, ce qui cause une chute du pH de 6.8 à 3.8. Après cinq jours de culture, 72% des atomes de soufre du thiosulfate se retrouvent sous forme de trithionate, et 25% sous forme de sulfate. La balance des atomes de soufre est probablement transformée en soufre élémentaire, dont la présence est observée à la surface du milieu pendant la croissance. Pour l'isolat VA-4, l'oxydation du thiosulfate résulte en une faible production d'intermédiaires ( $S_3O_6^{2-}$ ,  $S_4O_6^{2-}$ ), lesquels sont complètement réoxydés en sulfate. Après 4 jours de croissance, le pH du milieu est abaissé à 2.0 et approximativement 94% du thiosulfate est transformé en sulfate. L'inoculation de 0.1% des sous-cultures de chacun des isolats dans un milieu synthétique au thiosulfate, cause dans un premier temps une chute du pH à 4.0 en quatre jours avec une production importante de trithionate. Par la suite, la souche VA-4 oxyde le trithionate accumulé dans le milieu en sulfate, avec pour conséquence une chute du pH à 2.1 après neuf jours d'incubation. La concentration totale de cellules dans la culture mixte demeure stable à  $5 \times 10^8$  cellules/mL à partir du troisième jour d'incubation.

L'utilisation du soufre élémentaire en milieu synthétique par la souche VA-7 s'effectue sans accumulation de polythionate dans le milieu. Lors des cinq jours d'incubation, le pH du milieu est abaissé de 6.9 à 4.0 et 6.7% du soufre ajouté est oxydé en sulfate. Dans le cas de l'isolat VA-4, la croissance sur le soufre en milieu synthétique cause une baisse du pH de 4.0 à 1.8 en cinq jours (25% du soufre oxydé), et aucune accumulation de polythionate n'est observée. L'inoculation du milieu synthétique contenant du soufre par la culture mixte (0.1% de chaque isolat) entraîne une réduction du pH de 6.8 à 1.9 en dix jours. La concentration totale de cellules dans le milieu est stable à  $6 \times 10^8$  cellules à partir du quatrième jour. Les paramètres cinétiques de croissance des isolats en milieu synthétique sont présentés au tableau 24. La croissance des isolats VA-7 et VA-4 est plus rapide sur le thiosulfate ( $t_d$ : 4.3 et 5.0 heures, respectivement) que sur le soufre ( $t_d$ : 6.5 et 8.0 heures, respectivement).

FIGURE 17. Production de sulfate, abaissement du pH et croissance des isolats dans la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S). Symboles: (○) souche VA-7; (●) souche VA-4; (△, ▲) culture mixte (souche VA-7 et souche VA-4, respectivement).



La croissance des souches a également été suivie dans la boue de Valcartier digérée anaérobie (boue S2) et préalablement autoclavée. La figure 17 montre les courbes de croissance des deux espèces: en cultures pures et en cultures mixtes (5% d'inoculum de chaque souche). La culture mixte (1:1) des deux isolats se compare de façon similaire aux deux groupes de thiobacilles (peu-acidophiles et acidophiles) lors des essais de biolixiviation avec les microflores adaptées (section 5.5). La souche VA-7 prolifère en abaissant le pH aux environs de 4.0, et par la suite la souche VA-4 se multiplie et abaisse le pH à une valeur inférieure à 2.0. Cette acidification réduit le nombre de cellules viables de VA-7 sous la limite de détection ( $10^3$  UFC/mL). Les taux de croissance des souches dans les boues sont légèrement inférieurs à ceux estimés en milieu synthétique, avec des temps de génération moyen de 6.9 heures pour VA-7 et 9.1 heures pour VA-4, alors que ceux mesurés avec la culture mixte sont identiques à ceux obtenus en culture pure. Le taux maximum de production de sulfate en milieu synthétique est de 36% plus élevé que dans la boue pour la souche VA-7, et approximativement 16% pour la souche VA-4. Dans ce dernier cas, le taux maximum spécifique de production de sulfate est de 19% plus élevé dans la boue que dans le milieu synthétique, alors qu'il est presque deux fois moindre pour VA-7.

Les paramètres cinétiques de croissance dans la boue de la culture mixte des isolats constituent un bon modèle de ce qui est obtenu avec les microflores acclimatées (tableau 23). Ainsi, le temps de génération moyen des populations indigènes est de 7.8 heures pour les thiobacilles peu-acidophiles (6.9 heures pour VA-7) et de 9.5 heures pour les thiobacilles acidophiles (9.1 heures pour VA-4). De même, le taux maximum moyen de production de sulfate est de  $64 \text{ mg SO}_4^{2-} / \text{L} / \text{heure}$  avec les microflores indigènes et  $68 \text{ mg SO}_4^{2-} / \text{L} \times \text{heure}$  avec la culture mixte (VA-7 + VA-4). Finalement, un taux spécifique maximum moyen de production de sulfate de  $2.0 \text{ g SO}_4^{2-} / \text{g cellules} / \text{heure}$  a été trouvé dans les cinq boues, alors que cette valeur est de 2.1 pour la culture mixte.

TABLEAU 24. Paramètres cinétiques de croissance des isolats en milieu synthétique, et dans la boue autoclavée de Valcartier (boue S)

Souche	Milieu	Substrat (0,5%)	( $\mu$ ) <sup>a</sup> (hre <sup>-1</sup> )	(d SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> / d t) <sup>b</sup> (g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L/ hre)	(Vmax) <sup>c</sup> (g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /g cellules/ hre)
(VA-7)	synthétique	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.23	.d	-
	synthétique	S <sup>o</sup>	0.15	0.015	0.75
	boue	S <sup>o</sup>	0.15	0.011	0.40
(VA-4)	synthétique	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.20	-	-
	synthétique	S <sup>o</sup>	0.13	0.082	1.56
	boue	S <sup>o</sup>	0.11	0.071	1.85
culture mixte	synthétique	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-	-	-
	synthétique	S <sup>o</sup>	-	-	-
	boue	S <sup>o</sup>	0.15 (VA-7) 0.11 (VA-4)	0.068	2.13

- a   taux spécifique maximum de croissance  
b   taux maximum de formation de produit  
c   taux spécifique maximum de formation de produit  
d   non détecté

### 5.6.3 Solubilisation des métaux

Les rendements de solubilisation des métaux obtenus après cinq jours de croissance des souches dans la boue digérée anaérobie de Valcartier sont montrés au tableau 25. Les niveaux de solubilisation atteints avec la culture mixte dans la boue S non-autoclavée et la boue S2 autoclavée sont du même ordre que ce qui est observé avec les microflores acclimatées, et permettent d'abaisser les concentrations de cuivre et de plomb dans la phase solide des boues

sous les valeurs recommandées pour l'épandage agricole (Flynn *et al.*, 1987). Les niveaux de solubilisation requis étaient de 73% pour le cuivre dans la boue S, et 37 et 23% respectivement pour le cuivre et le plomb dans la boue S2 (tableau 10). Les teneurs de Cd, Cr, Mn, Ni et Zn dans la phase solide des boues étaient initialement sous les limites prescrites. Un pH final de 1.75 a été mesuré dans la boue non-autoclavée, alors que le pH final dans la boue autoclavée avec la culture mixte et la culture pure de VA-4 est de 1.62. La boue autoclavéeensemencée avec la souche VA-7 a été acidifiée à pH 3.88 après cinq jours. Les cinétiques de solubilisation des métaux révèlent que la solubilisation des métaux s'effectue presque entièrement dans les 60 premières heures alors que le pH atteint dans la boue non-autoclavée est de 1.8. Le manganèse est le premier métal à passer en solution avec environ 80% de solubilisation atteint après 24 heures. Le cadmium, le nickel et le zinc commencent à être solubilisés à pH 4.0 à 4.5. La solubilisation du cuivre débute après 24 heures d'incubation (pH 2.8); après 60 heures plus de 60% de ce métal est retrouvé dans le surnageant. Le plomb et le chrome ne sont solubilisés qu'à un pH inférieur à 2.5. Le cuivre et le zinc sont retrouvés en forte concentration dans le lixiviat avec 45 et 12 mg/L, respectivement. Le fer et l'aluminium qui sont présents en très hautes concentrations dans la boue S (14.5 et 21.7 g/kg de boue sèche) sont partiellement solubilisés (120 et 86 mg/L, respectivement). L'ordre de solubilisation des métaux mesurée lors de ces essais de biolixiviation ( $Mn > Zn = Cd = Ni > Cu > Pb = Cr$ ) correspond à ce qui a été trouvé par Wozniak et Huang (1982) dans une boue acidifiée à pH 2.0 par voie chimique ( $Zn > Cd > Ni > Cu > Pb > Cr$ ).

La capacité des isolats d'acidifier la boue de Valcartier digérée anaérobie (boue S) a été examinée dans la boue non-autoclavée et autoclavée (figure 18). Les contrôles stériles indiquent une fois de plus que l'oxydation du soufre par voie chimique est négligeable. Les courbes d'acidification des boues non-autoclavées et autoclavées sont identiques, ce qui

TABLEAU 25. Rendements de solubilisation des métaux dans les boues après cinq jours de lixiviation avec les souches VA-4 et VA-7.

Métal	% de solubilisation			
	boue non-autoclavée (09-89) culture mixte	boue autoclavée (06-90)		
		culture mixte	souche VA-4	souche VA-7
Cd	96 (0.15) <sup>a</sup>	83	81	40
Cr	54 (0.87)	16	17	1
Cu	87 (44.9)	85	88	19
Mn	91 (2.12)	94	89	69
Ni	78 (0.25)	79	86	42
Pb	46 (2.88)	28	30	1
Zn	82 (11.7)	96	97	63

<sup>a</sup> ( ) concentration du métal dans la phase liquide (mg/L)

démontre que la microflore indigène des boues n'interfère pas avec la croissance des thiobacilles, notamment en compétitionnant pour la quantité d'oxygène disponible. Toutefois, dans un système où l'apport en oxygène serait plus faible, une compétition entre la microflore hétérotrophe et les thiobacilles pour l'oxygène serait sans doute probable.

En ce qui concerne la disponibilité des éléments nutritifs, il est peu probable que la croissance de la microflore aérobie empêche celle des thiobacilles. En effet, comme il a été

FIGURE 18. Abaissement du pH de la boue digérée anaérobie de Valcartier (boue S) durant la croissance des souches VA-4 et VA-7 en présence de 0.5% de soufre. Symboles: boue autoclavée: (×) contrôle à pH élevé; (+) contrôle à pH bas; (○) isolat VA-7; (□) isolat VA-4; (△) culture mixte. boue non-autoclavée: (●) isolat VA-7; (■) isolat VA-4; (▲) culture mixte.

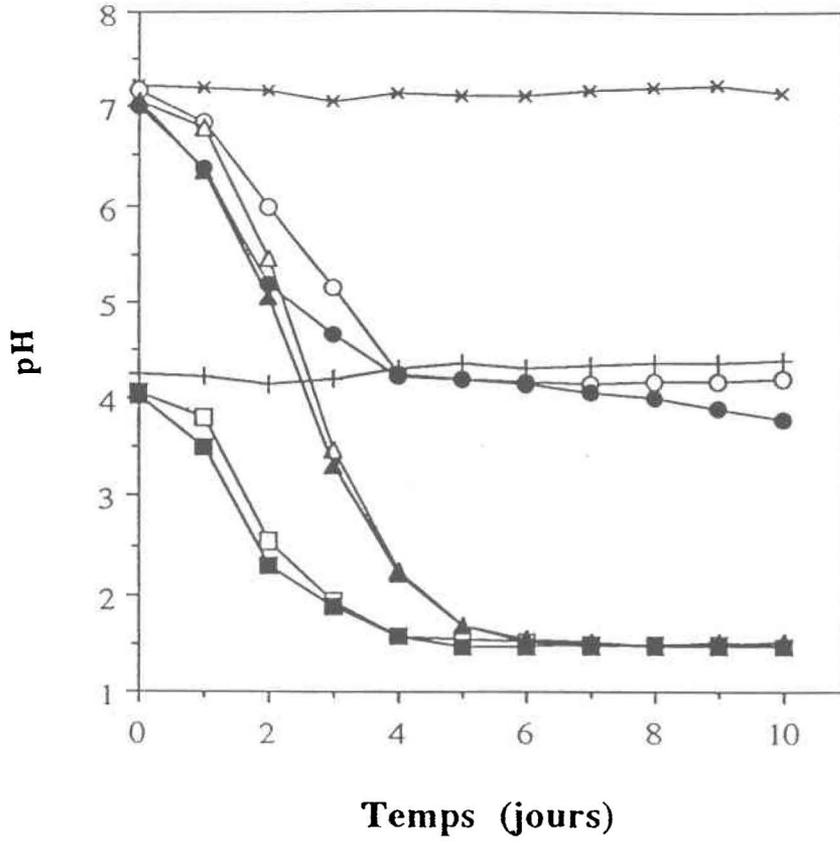
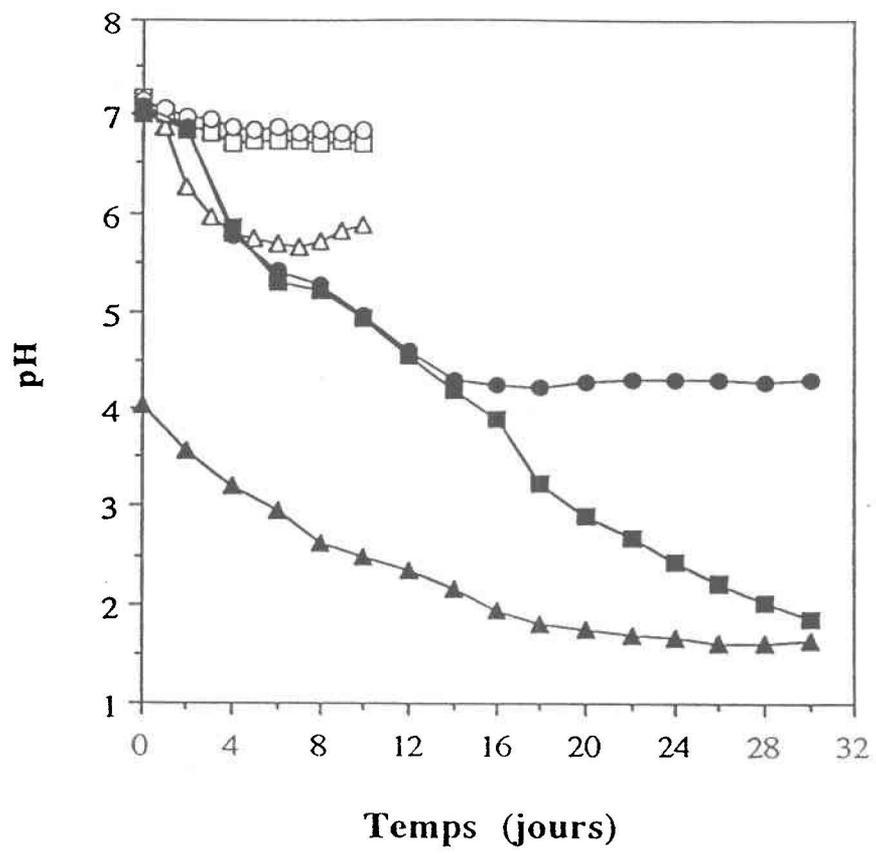


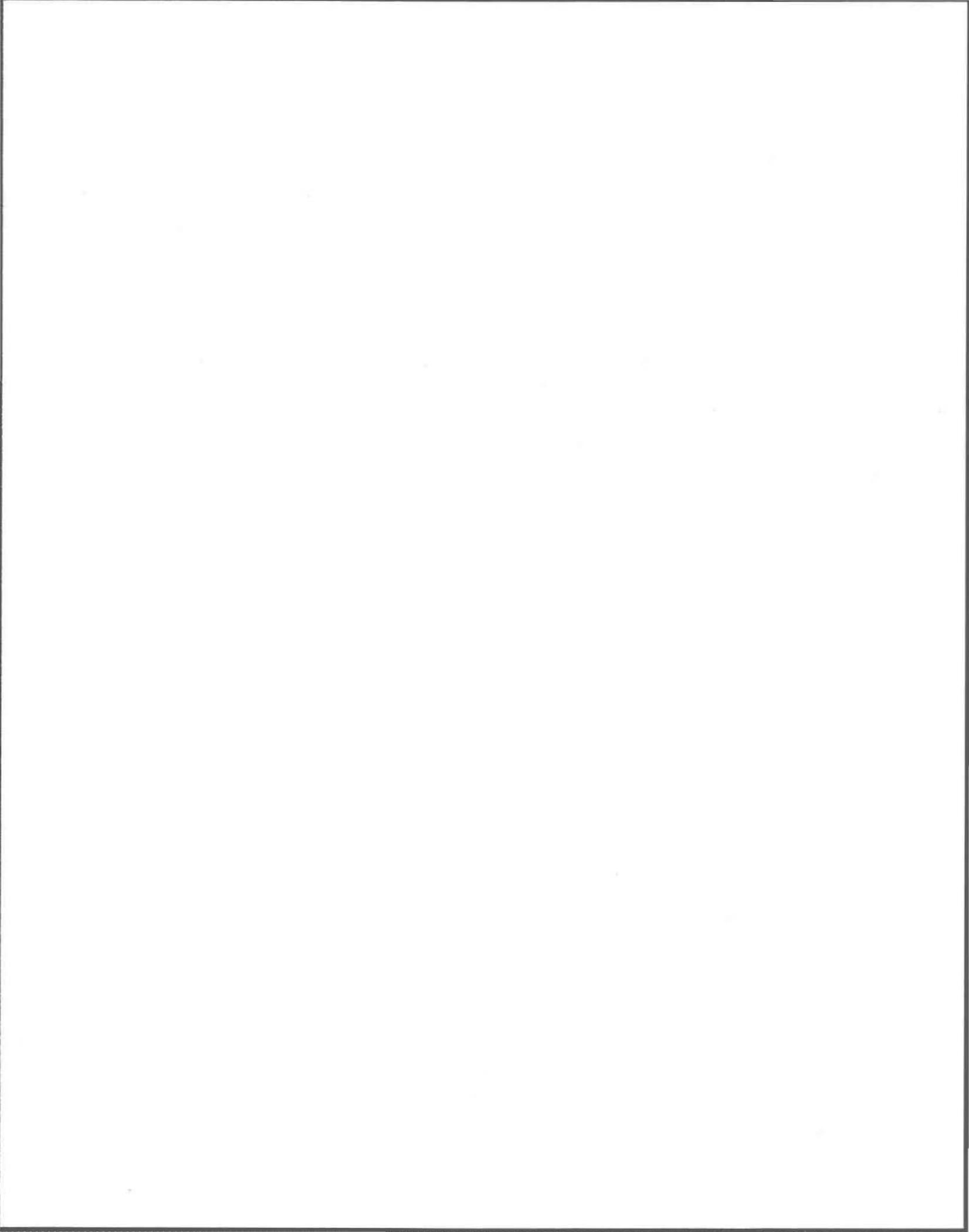
FIGURE 19. Abaissement du pH de la boue autoclavée digérée anaérobie de Valcartier (boue S) durant la croissance des thiobacilles en présence de 0.5% de soufre. Symboles: (□) *T. intermedius* ATCC 15466; (△) *T. neapolitanus* ATCC 23638; (○) *T. denitrificans* ATCC 23644; (●) *T. thioparus* ATCC 8158; (▲) *T. thiooxidans* ATCC 19377; (■) *T. thioparus* ATCC 8158 + *T. thiooxidans* ATCC 19377.



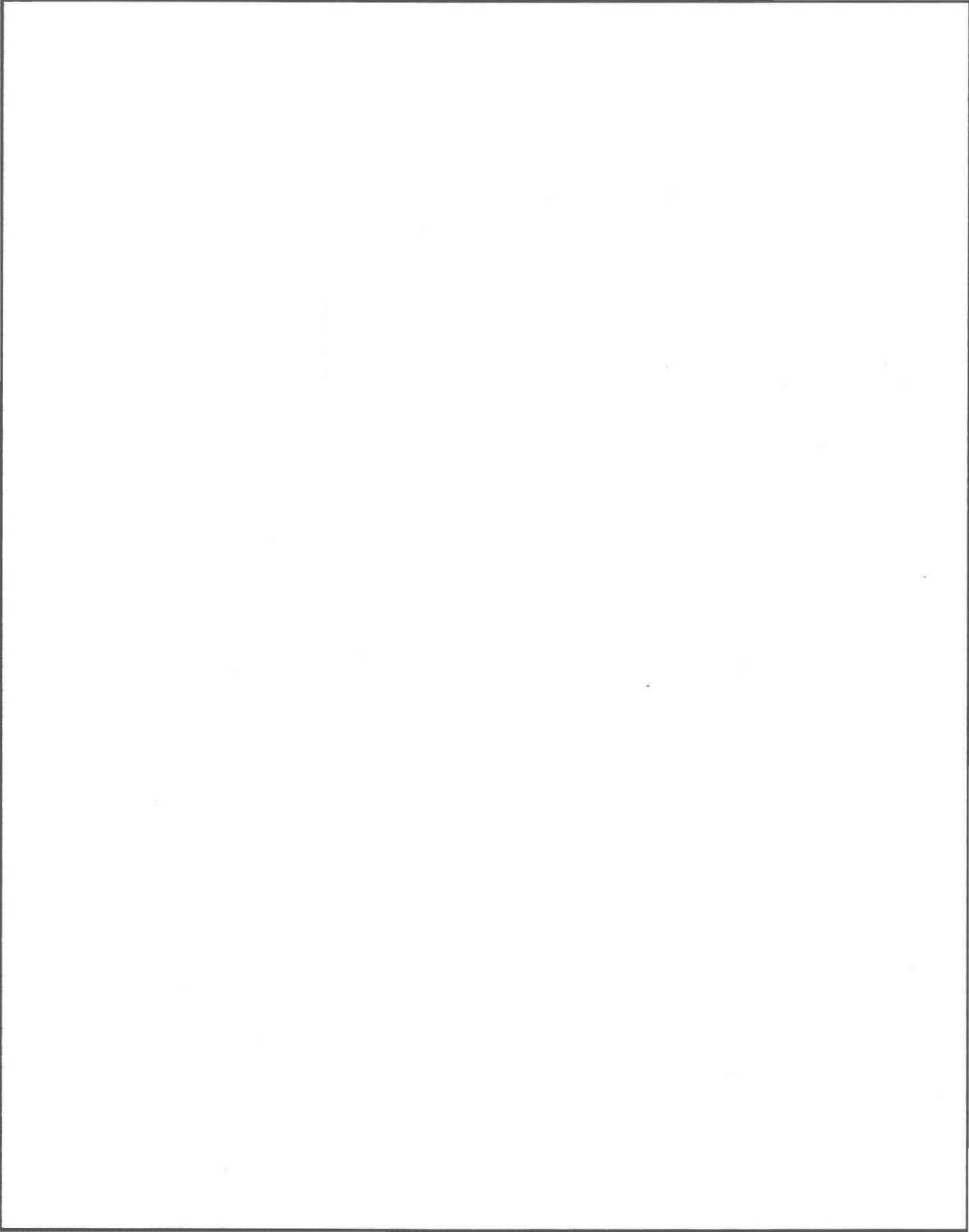
indiqué à la section 5.3.3 les boues d'épuration contiennent des teneurs en éléments nutritifs disponibles (azote, phosphore, magnésium, etc.) plusieurs fois supérieures aux exigences nutritionnelles normales des thiobacilles (Mercier, 1988). La croissance de quelques souches de la collection ATCC dans la boue autoclavée (S) a été suivie par l'abaissement du pH (figure 19). Ainsi, *T. intermedius* ATCC 15466 et *T. denitrificans* ATCC 23644 sont incapables de croître dans ce milieu, alors que *T. neapolitanus* ATCC 23638 a montré une activité acidifiante très faible. Ces essais de croissance ont été effectués à quatre reprises. La croissance de *T. thioparus* ATCC 8158 et de *T. thiooxidans* ATCC 19377 s'est avérée possible, mais celle-ci s'effectue très lentement. Un temps d'incubation de 12 jours est nécessaire pour la baisse de pH à 4.5 avec *T. thioparus* ATCC 8158, et de 16 jours pour l'acidification de la boue à pH 2.0 par *T. thiooxidans* ATCC 19377. La culture mixte (ATCC 19377 + ATCC 8158) abaisse le pH sous 2.0 en 28 jours. Contrairement aux résultats obtenus lors des essais de croissance effectués avec les isolats VA-4 et VA-7 dans les boues autoclavées D2 et S3 (section 5.3.3), la boue utilisée pour ces tests s'est avérée être peu propice au développement des souches ATCC non-acclimatée à ce milieu. Les souches VA-4 et VA-7 ayant été isolées de cette boue, celles-ci démontrent une très bonne adaptation à cet environnement. Ceci démontre encore une fois qu'il est possible d'effectuer l'extraction des métaux associés aux boues avec la microflore indigène sans avoir recours à l'utilisation de souches de collection.

Le présent chapitre a permis de mettre en évidence que la biolixiviation avec soufre s'effectue par la croissance successive de deux types de thiobacilles. Une étude en microscopie électronique à balayage sur des pastilles de soufre utilisées dans des essais de biolixiviation a montré une colonisation intensive du soufre élémentaire par une flore bactérienne constituée principalement de cellules morphologiquement semblables aux thiobacilles. La caractérisation de la microflore lixivante a indiqué que *T. thioparus* est l'espèce la plus importante dans l'acidification initiale des boues, alors que *T. thiooxidans* est responsable de l'acidification

finale des boues. Des essais de lixiviation effectués avec deux souches de ces espèces illustrent bien que la coopération entre ces bactéries constitue un bon modèle (cinétiques de croissance des populations et de production d'acide, et rendements de solubilisation des métaux) de la biolixiviation avec les microflores indigènes.



## CHAPITRE 6



## CHAPITRE 6

### EFFETS DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LES CINÉTIQUES DE CROISSANCE DES POPULATIONS LIXIVIANTES

Les résultats présentés auparavant ont permis de mettre en évidence que la lixiviation microbienne des métaux peut être exercée par la microflore indigène des boues. Les cinétiques de croissance de ces populations bactériennes ont aussi été étudiées dans quelques boues. Le prochain chapitre décrit l'étude de l'influence de quelques paramètres d'opérations sur la croissance des populations lixiviantes: la température d'incubation, le contenu en solides des boues, le pH initial, la forme du substrat, et la teneur en métaux dans les boues.

#### 6.1 Température

Les différentes études de lixiviation bactérienne réalisées à l'échelle laboratoire ont été effectuées à température ambiante ou contrôlée (20 °C à 30 °C). Or, le traitement des eaux usées par procédé de boue activée et par stabilisation/digestion aérobie des boues se fait habituellement à l'extérieur, dans des réacteurs dont la température n'est pas contrôlée. Ainsi, durant la saison hivernale la température des boues baisse fréquemment sous 10 °C (EPA, 1979, Martin et al., 1990). Il est déjà bien établi que l'oxydation biologique de soufre élémentaire, de l'ion ferreux et des sulfures métalliques est fortement influencée par la température de bioréaction (Ahonen et Tuovinen, 1989a, b, 1990, 1991); la biolixiviation des

métaux dans les boues sera donc elle aussi affectée significativement par ce paramètre. Le développement à l'échelle industrielle d'une biotechnologie d'extraction des métaux requiert dès lors une connaissance précise de l'influence de la température sur la cinétique du procédé. Dans cette étude, l'effet de la température d'incubation a été examiné pour les deux procédés biologiques de biolixiviation (soufre et sulfate ferreux).

Les effets de la température sur les variations du POR de la boue digérée aérobie de Black Lake (D2), du pH et de l'oxydation de l'ion ferreux, durant le procédé au sulfate ferreux, sont présentés à la figure 20. L'acidification et la hausse du POR sont accélérées avec une augmentation de la température de 7 °C à 42 °C. Toutefois, la hausse est surtout notée entre 7 °C et 28 °C. Pour toutes les températures testées, le pH est abaissé aux environs de 2.6 alors que le POR s'élève à 575 mV. De même, la concentration de fer soluble en fin de lixiviation se situe sous 100 mg/L pour toutes les températures.

La production d'acide sulfurique à partir de soufre élémentaire est également affectée par la température d'incubation (figure 21). Une hausse de la production d'acide est observée avec l'augmentation de la température d'incubation jusqu'à 35 °C. Cette variation du taux de production d'acide sulfurique affecte directement la cinétique d'acidification de la boue. L'augmentation de la température d'incubation de 7 °C à 28 °C réduit le temps requis d'incubation de 14 à 5 jours, pour l'acidification de la boue à pH 2.0. Les taux d'acidification de la boue à 28 °C et 35 °C sont identiques, alors que les boues incubées à 42 °C sont acidifiées rapidement à pH 4.0, mais ne subissent pas d'acidification plus importante du pH. L'ajout de soufre aux boues permet une acidification plus grande des boues (pH 2.0) que le procédé au sulfate ferreux, mais le potentiel d'oxydo-réduction ne s'élève qu'à des valeurs se situant entre 325 et 350 mV. Le pH des boues contrôles, sans addition de soufre et incubées à 7 °C et 42 °C, est stable et le POR augmente aux environs de 250 mV. La concentration finale de sulfate mesurée dans les boues incubées aux diverses températures est de l'ordre de 2500

mg/L. Cette concentration de sulfate correspond à une oxydation de 17% du soufre élémentaire ajouté à la boue.

L'effet de la température sur l'acidification des boues et la hausse du POR se reflète également sur la cinétique de solubilisation des métaux (figures 22 et 23). Pour tous les métaux testés, la hausse de la température d'incubation de 7 °C à 35 °C résulte en une solubilisation plus rapide des métaux; cependant, les rendements obtenus à la fin de la période de lixiviation sont comparables. Ainsi, les niveaux de solubilisation suivants sont obtenus avec le procédé avec ion ferreux: Cd (67-72%), Cu (71-78%), Mn (86-89%), Ni (65-68%), et Zn (87-89%). Le procédé avec le soufre permet les rendements suivants: Cd (63-76%); Cu (75-89%), Mn (77-93%), Ni (76-84%) et Zn (84-93%). Les courbes de solubilisation des métaux dans les boues contrôles ne sont pas présentées puisque les rendements y sont très faibles (< 20%). Les temps requis pour atteindre 60% de solubilisation des métaux aux différentes températures, avec les deux procédés, sont montrés au tableau 26. Le niveau de 60% de solubilisation a été sélectionné parce qu'il représente la limite de solubilisation obtenue pour certains métaux. Pour les deux procédés, la période de lixiviation est diminuée appréciablement avec l'augmentation jusqu'à 28 °C de la température d'incubation. Au-dessus de cette température, aucune amélioration significative n'est observée. Puisque les boues additionnées de soufre ne sont pas acidifiées fortement (pH = 4) à 42 °C, les rendements de solubilisation des métaux sont faibles.

FIGURE 20. Variation du pH, du POR et du fer soluble dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) pendant la biolixiviation avec sulfate ferreux aux diverses températures. Symboles: (○) 7°C; (△) 14°C; (▲) 21°C; (□) 28°C; (■) 35°C; (▽) 42°C; (●) contrôle à 7°C; (▼) contrôle à 42°C.

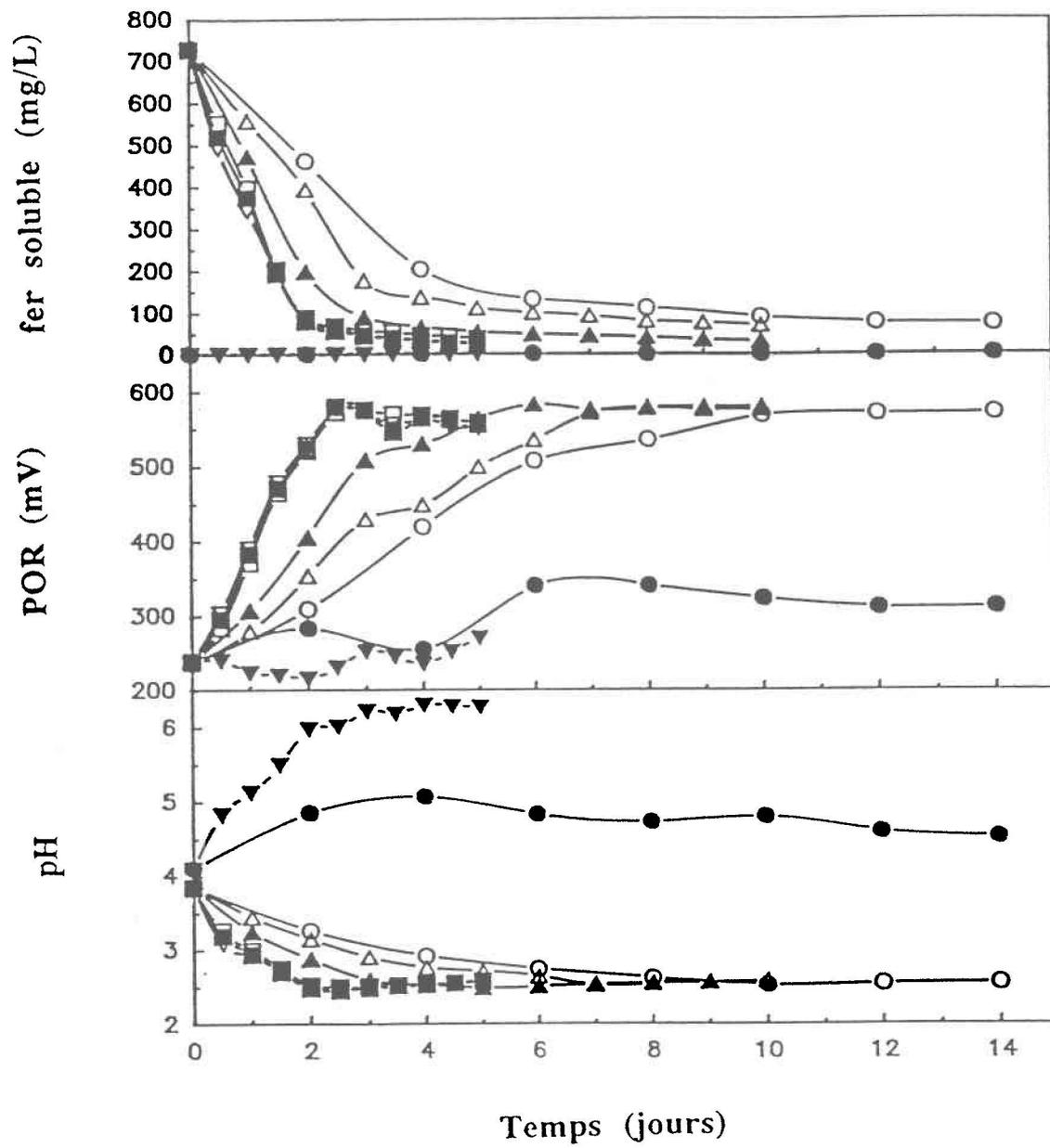
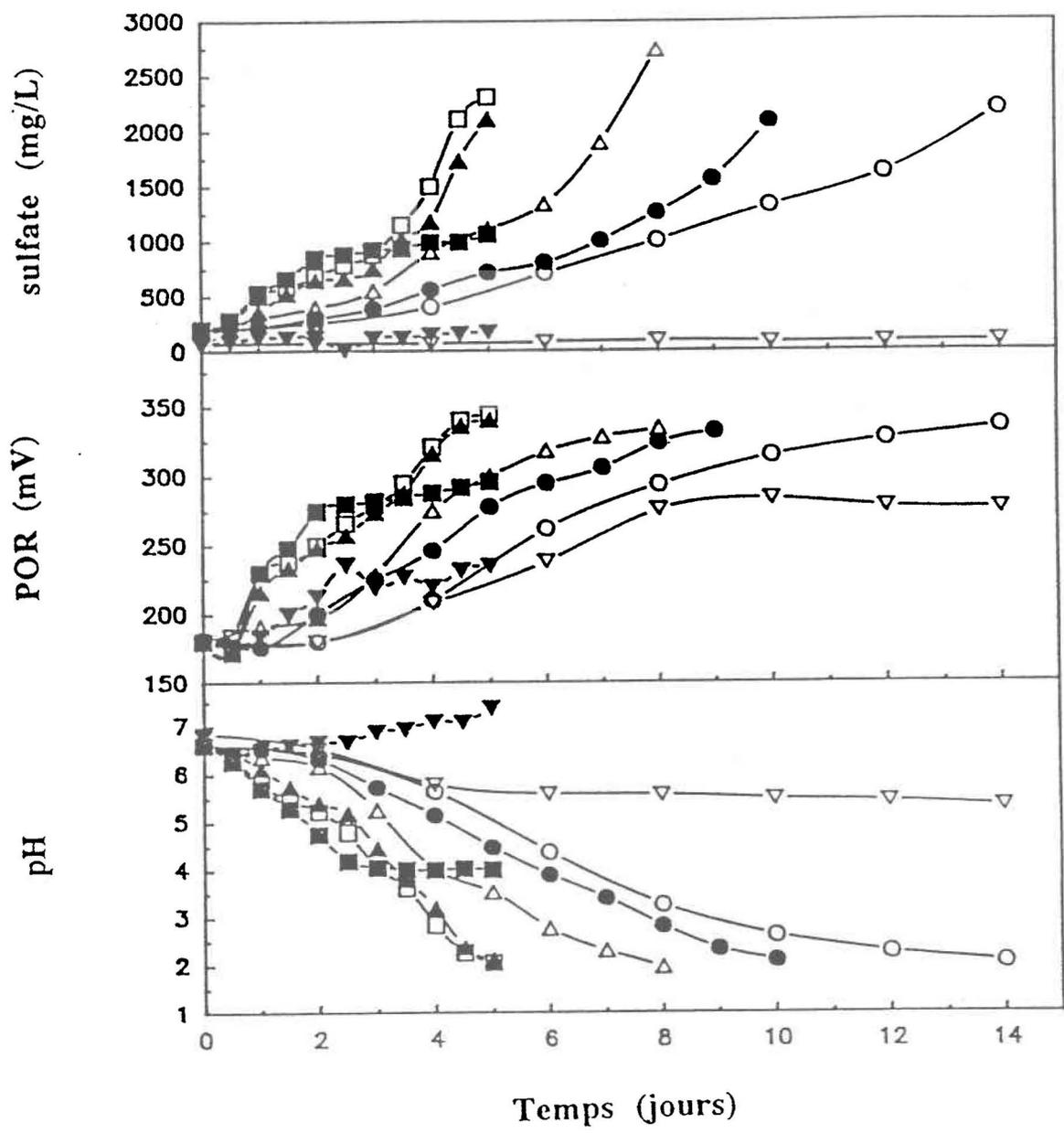


FIGURE 21. Variation du pH, du POR et production de sulfate dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) pendant la biolixiviation avec soufre aux diverses températures. Symboles: (○) 7°C; (●) 14°C; (△) 21°C; (▲) 28°C; (□) 35°C; (■) 42°C; (▽) contrôle à 7°C; (▼) contrôle à 42°C.



**FIGURE 22.** Solubilisation des métaux de la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) aux diverses températures pendant la biolixiviation avec sulfate ferreux. (A) Cadmium; (B) Cuivre; (C) Manganèse; (D) Nickel; (E) Zinc. Symboles: (○) 7°C; (●) 14°C; (△) 21°C; (▲) 28°C; (□) 35°C; (■) 42°C.

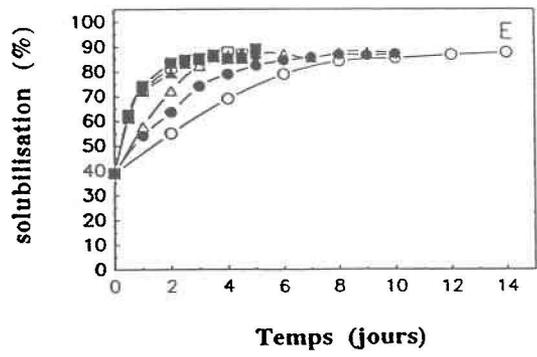
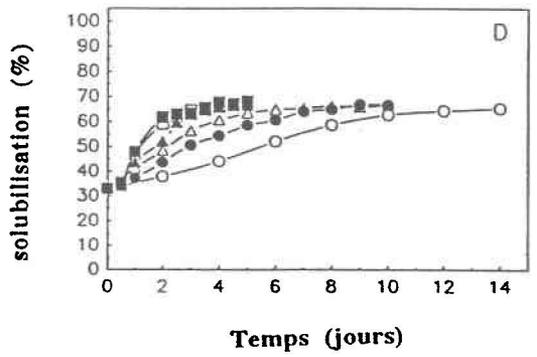
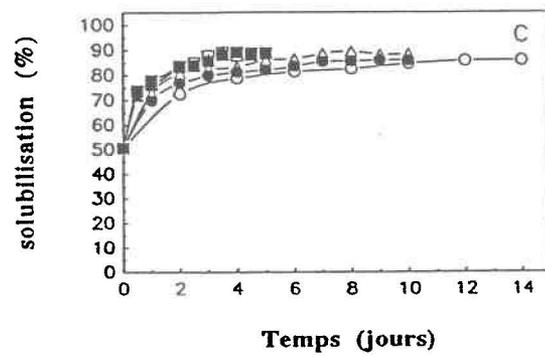
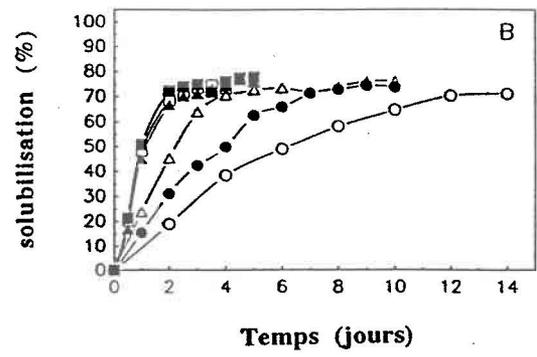
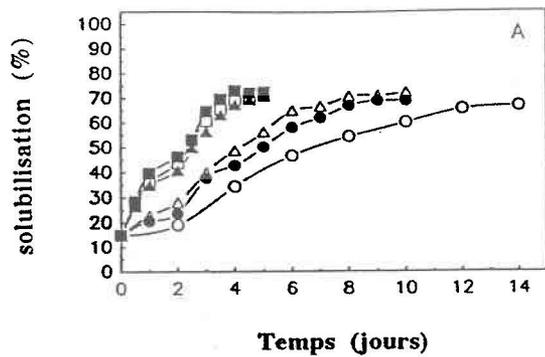


FIGURE 23. Solubilisation des métaux de la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) aux diverses températures pendant la biolixiviation avec soufre. (A) Cadmium; (B) Cuivre; (C) Manganèse; (D) Nickel; (E) Zinc. Symboles: (○) 7°C; (●) 14°C; (△) 21°C; (▲) 28°C; (□) 35°C.

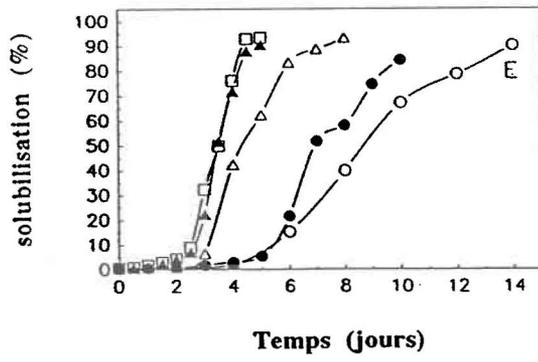
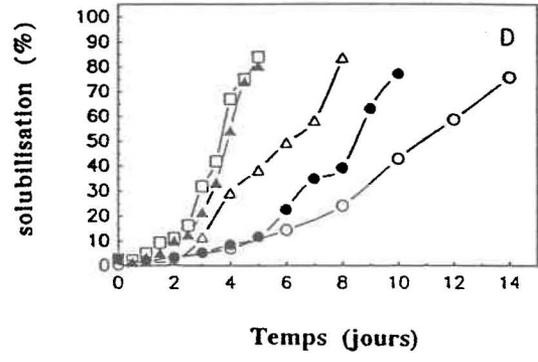
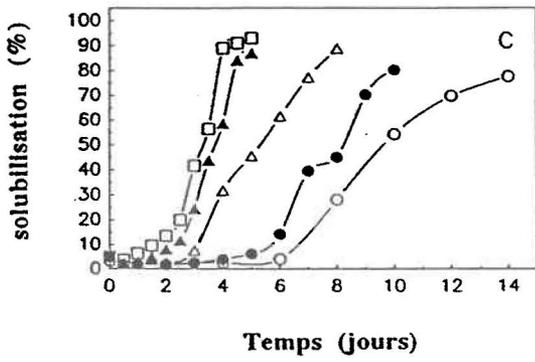
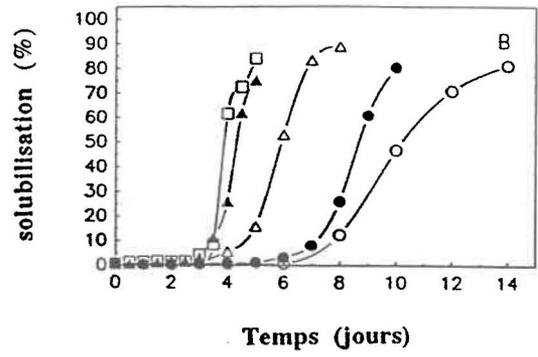
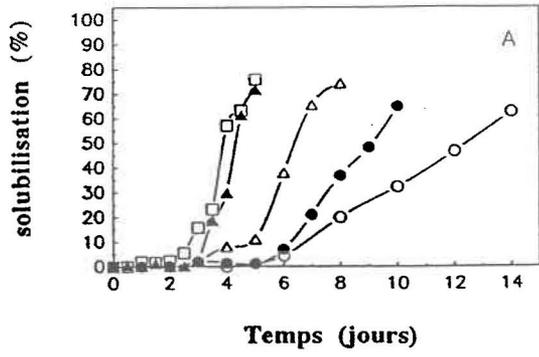


TABLEAU 26. Temps (heures) de biolixiviation requis pour atteindre 60% de solubilisation des métaux ( $t_{60\%}$ ) à différentes températures

Procédé	Métal	Température (°C)					
		7	14	21	28	35	42
avec ion ferreux	Cd	240	158	131	79	69	67
	Cu	206	114	67	40	37	35
	Mn	21	12	10	5	5	5
	Ni	210	139	95	62	51	45
	Zn	65	39	28	11	11	10
avec soufre élémentaire	Cd	327	232	162	106	100	-----a
	Cu	264	215	149	107	95	-----
	Mn	257	205	141	96	85	-----
	Ni	291	211	168	98	91	-----
	Zn	227	193	116	89	88	-----

a non solubilisé à ce niveau

Les courbes de croissance aux diverses températures des deux types de thiobacilles (peu-acidophiles et acidophiles) sont présentées à la figure 24. Les boues incubées à 42 °C montrent une prolifération rapide des thiobacilles peu-acidophiles avec une chute du pH à 4.0. Cependant, à cette température les thiobacilles acidophiles ne peuvent croître et le nombre de cellules viables chute sous la limite de détection. L'augmentation de la température d'incubation de 7 °C à 35 °C provoque la hausse des taux spécifiques maximums de croissance des deux groupes de thiobacilles (tableau 27). Il faut remarquer les bons coefficients de

détermination obtenus pour les taux spécifiques maximums de croissance ( $r^2 > 0.97$ ). Les courbes de croissance à 28 °C et 35 °C sont semblables pour les deux types de populations. Les temps de génération cellulaire ( $t_d$ ) pour les deux types de thiobacilles, estimés aux diverses températures, correspondent à ce qui est habituellement mesuré chez les thiobacilles (Ahonen et Tuovinen, 1989a, b; Kelly et Harrison, 1988). La capacité de la microflore oxydant le soufre et l'ion ferreux à croître à des températures aussi basses que 7 °C est une caractéristique importante inhérente aux deux procédés étudiés.

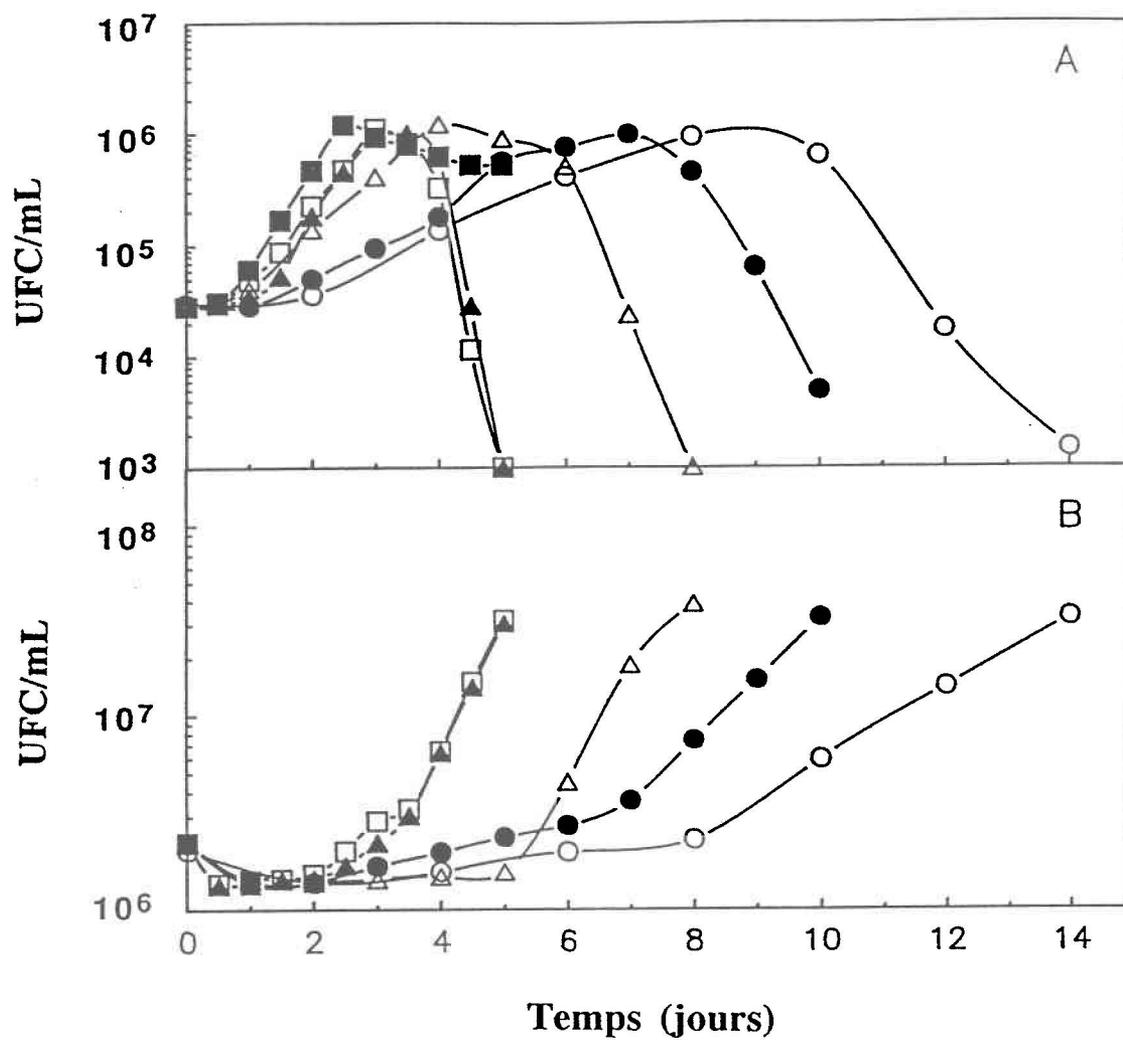
TABLEAU 27. Temps de génération ( $t_d$ ) et taux spécifiques maximums de croissance ( $\mu_{max}$ ) des thiobacilles dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) à différentes températures

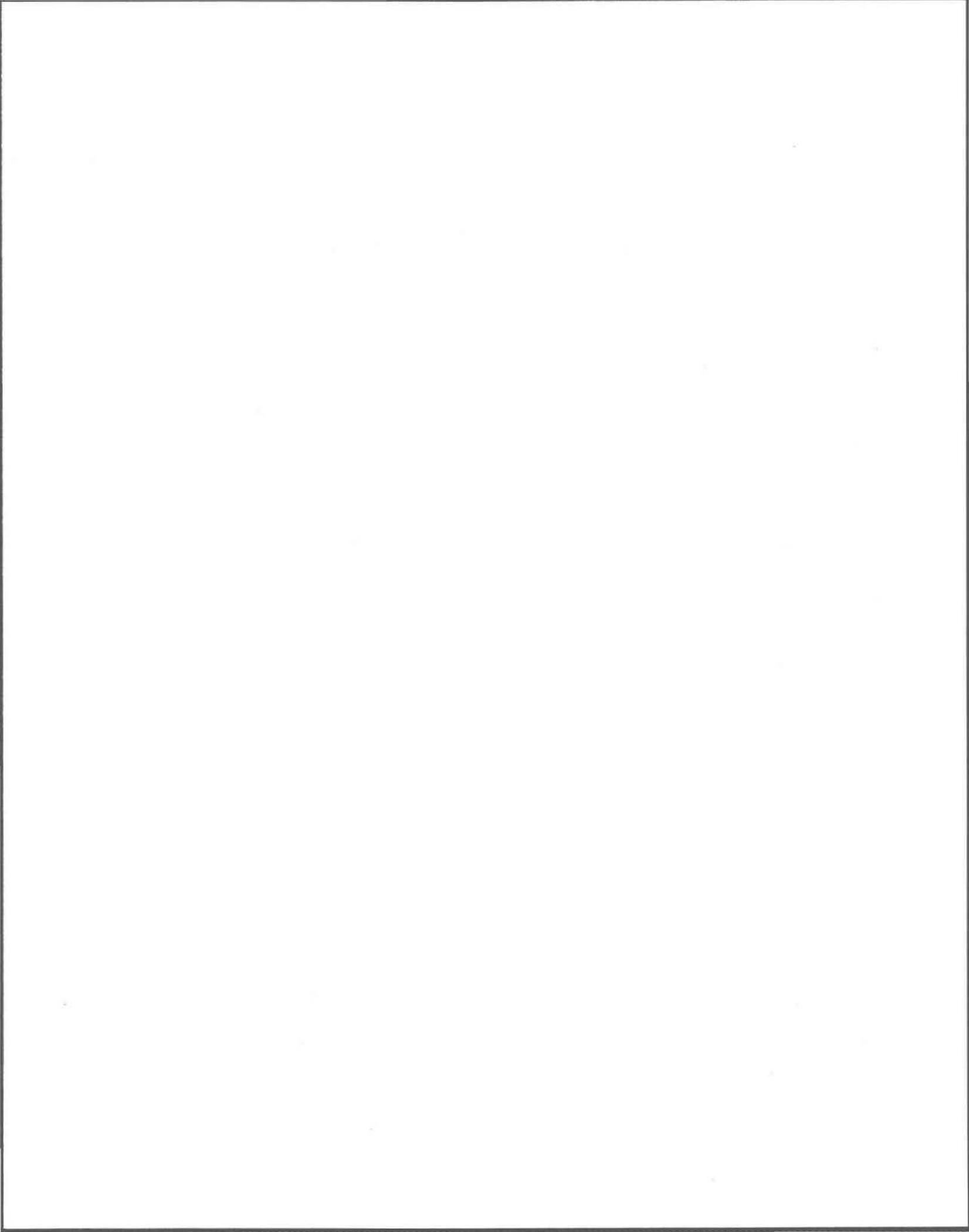
Température (°C)	Thiobacilles peu acidophiles			Thiobacilles acidophiles		
	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$r^2$	$t_d$ (h)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$r^2$	$t_d$ (h)
7	0.022	0.990	31.0 ± 2.2 <sup>a</sup>	0.018	0.999	37.7 ± 0.6
14	0.033	0.976	21.0 ± 1.8	0.030	1.000	22.8 ± 0.1
21	0.046	0.999	14.9 ± 0.3	0.044	0.987	15.7 ± 1.4
28	0.079	0.994	8.8 ± 0.2	0.064	1.000	10.9 ± 1.4
35	0.070	0.998	9.9 ± 0.2	0.063	1.000	11.1 ± 0.2
42	0.082	1.000	8.5 ± 0.1	----- <sup>b</sup>	-----	-----

a moyenne ± écart type

b pas de croissance

FIGURE 24. Croissance des microorganismes oxydant le soufre dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) durant la biolixiviation aux diverses températures. (A) Peu acidophiles; (B) Acidophiles. Symboles: (○) 7°C; (●) 14°C; (△) 21°C; (▲) 28°C; (□) 35°C; (■) 42°C.





Les constantes cinétiques de solubilisation des métaux ( $k$ ) sont obtenues par une régression linéaire par la méthode des moindres carrés du logarithme ( $\log_{10}$ ) de la fraction de métal solubilisé ( $1-R$ ) en fonction du temps d'incubation (tableau 28). Il faut remarquer les coefficients élevés de détermination ( $r^2$ ) obtenus lors du calcul des constantes. Les graphiques d'Arrhénius (figures 25 et 26) préparés à partir des valeurs de  $k$  montrent une relation linéaire pour l'intervalle de 7 °C à 28 °C. Une relation linéaire dans cette gamme de température est également obtenue dans l'expression d'Arrhénius en ce qui concerne la croissance ( $\mu_{\max}$ ) des thiobacilles (figure 27).

Les énergies d'activation et les coefficients de températures calculés à partir des graphiques d'Arrhénius sont présentés au tableau 29. Ces valeurs indiquent que la température d'incubation affecte de façon semblable la cinétique de croissance de ces bactéries. Les valeurs de  $Q_{10}$  (7 °C à 28 °C) de solubilisation des métaux mesurées pour le procédé au sulfate ferreux varient entre 1.6 et 2.2, alors que pour le procédé avec soufre celles-ci se situent entre 1.8 et 2.5. Il semble donc que les cinétiques des deux procédés soient contrôlées d'une manière analogue par la température d'incubation pour l'intervalle 7 °C à 28 °C. Cette conclusion est également appuyée par les valeurs d'énergies d'activation: procédé au sulfate ferreux (30 à 54 kJ/mole) et procédé au soufre (40 à 64 kJ/mole).

Les énergies d'activation calculées pour la solubilisation des métaux dans les boues sont semblables aux résultats de Ahonen et Tuovinen (1991) qui ont obtenu des valeurs de 40 à 45 kJ/mole pour la solubilisation biologique de la pyrrhotite ( $\text{FeS}$ ) et de la sphalérite ( $\text{ZnS}$ ). Cependant, des énergies plus élevées ont été nécessaires pour la solubilisation de la chalcopirite (77 kJ/mole) et de la pyrite (95 kJ/mole). Il faut toutefois remarquer que contrairement aux recherches de Ahonen et Tuovinen, seulement une fraction des métaux présents dans les boues se retrouve sous formes de sulfures, ceux-ci étant également trouvés sous formes d'oxydes, d'hydroxydes, de silicates, de sels insolubles ou encore liés à la matière

**FIGURE 25.** Courbes d'Arrhénius des taux de solubilisation des métaux pour le procédé de lixiviation microbienne avec sulfate ferreux dans la boue digérée aérobie de Black lake (D2). (A) Cadmium; (B) Cuivre; (C) Nickel et (D) Zinc.

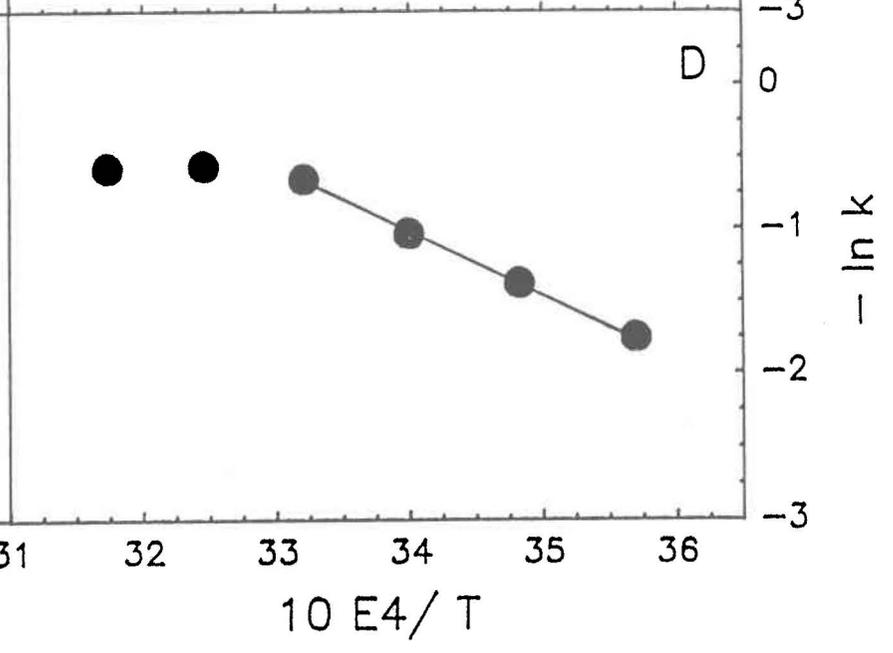
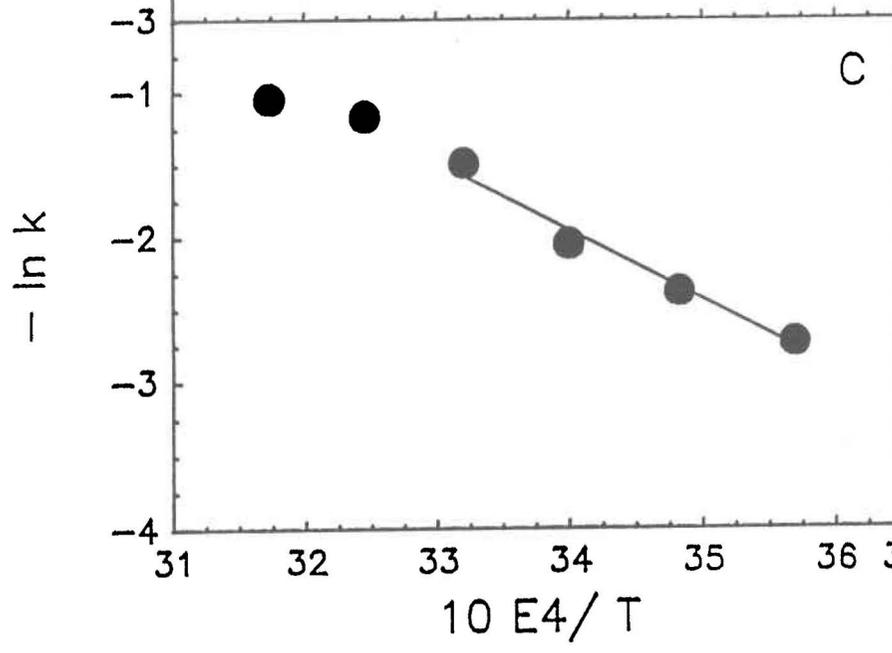
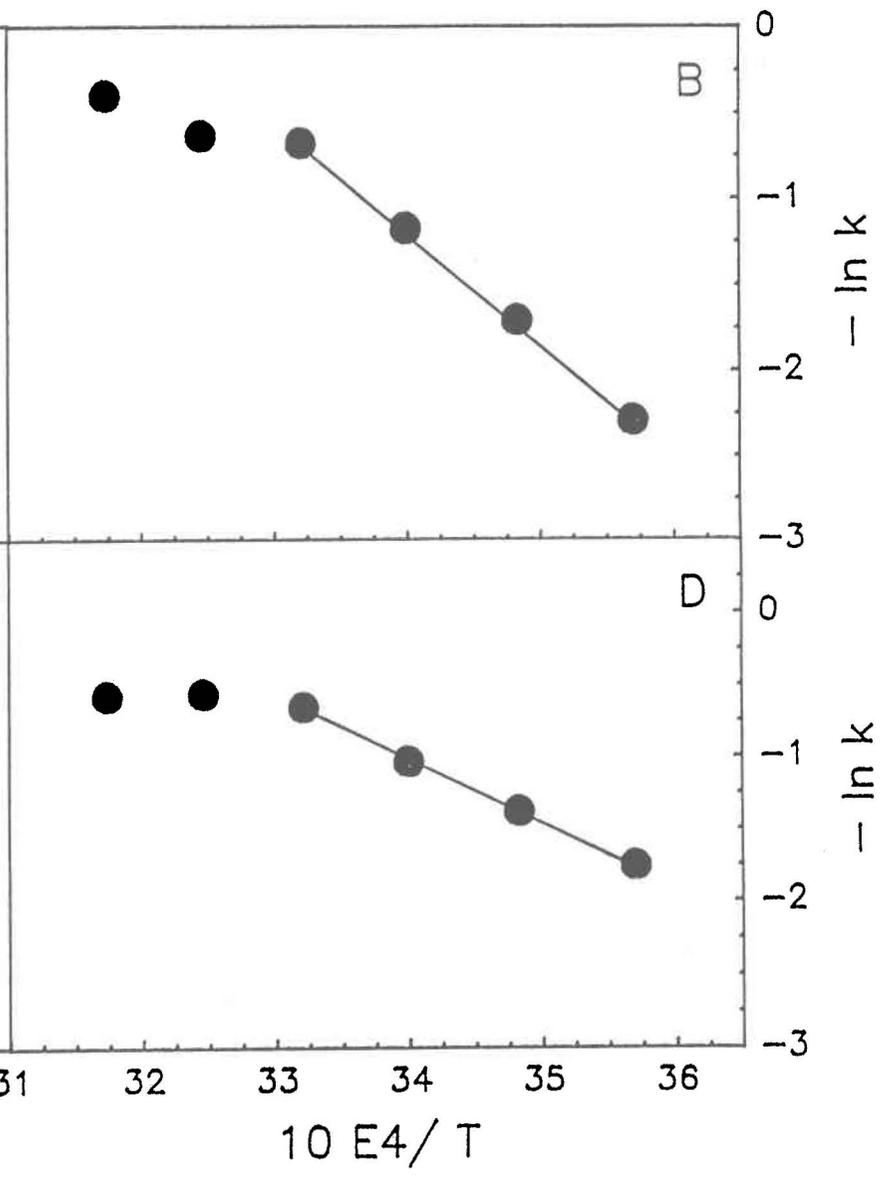
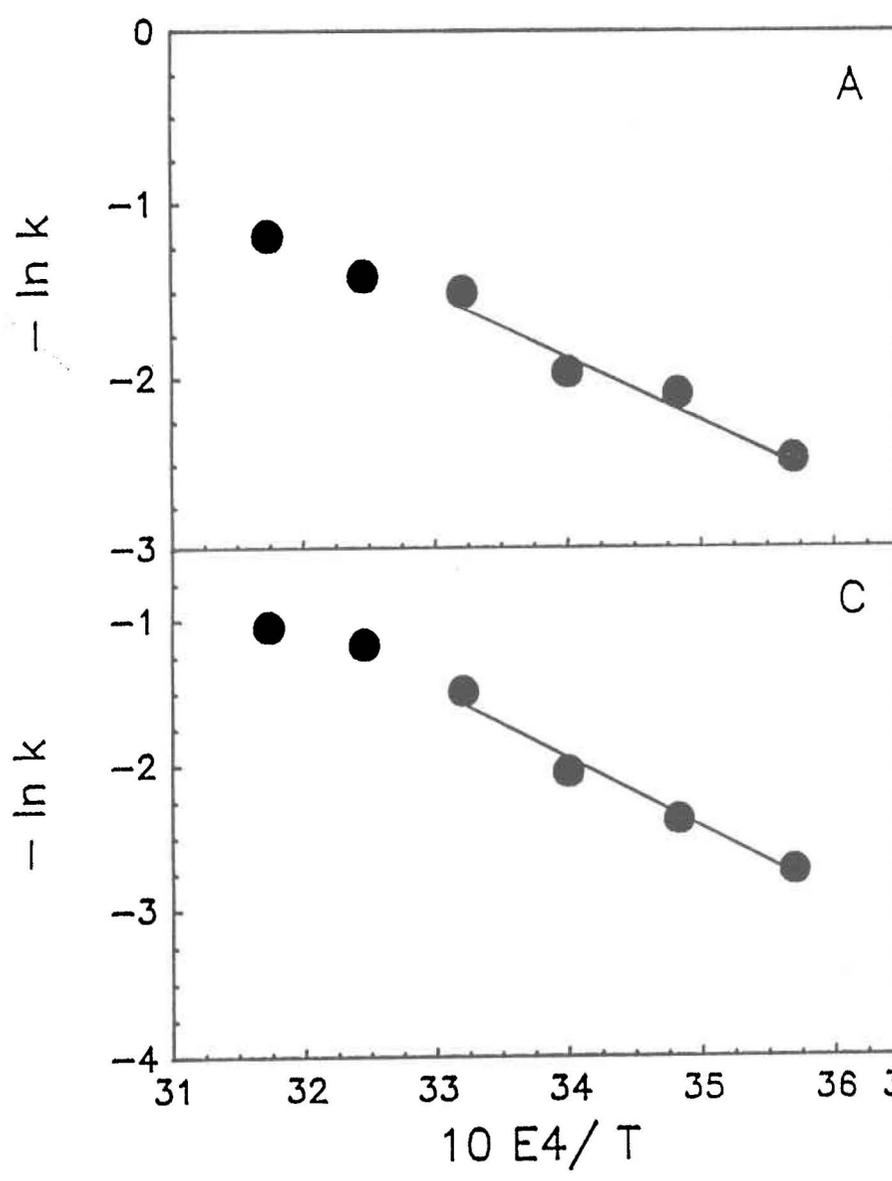


FIGURE 26. Courbes d'Arrhénius des taux de solubilisation des métaux pour le procédé de lixiviation microbienne avec soufre dans la boue digérée aérobie de Bláck Lake (D2). (A) Cadmium; (B) Cuivre; (C) Nickel et (D) Zinc.

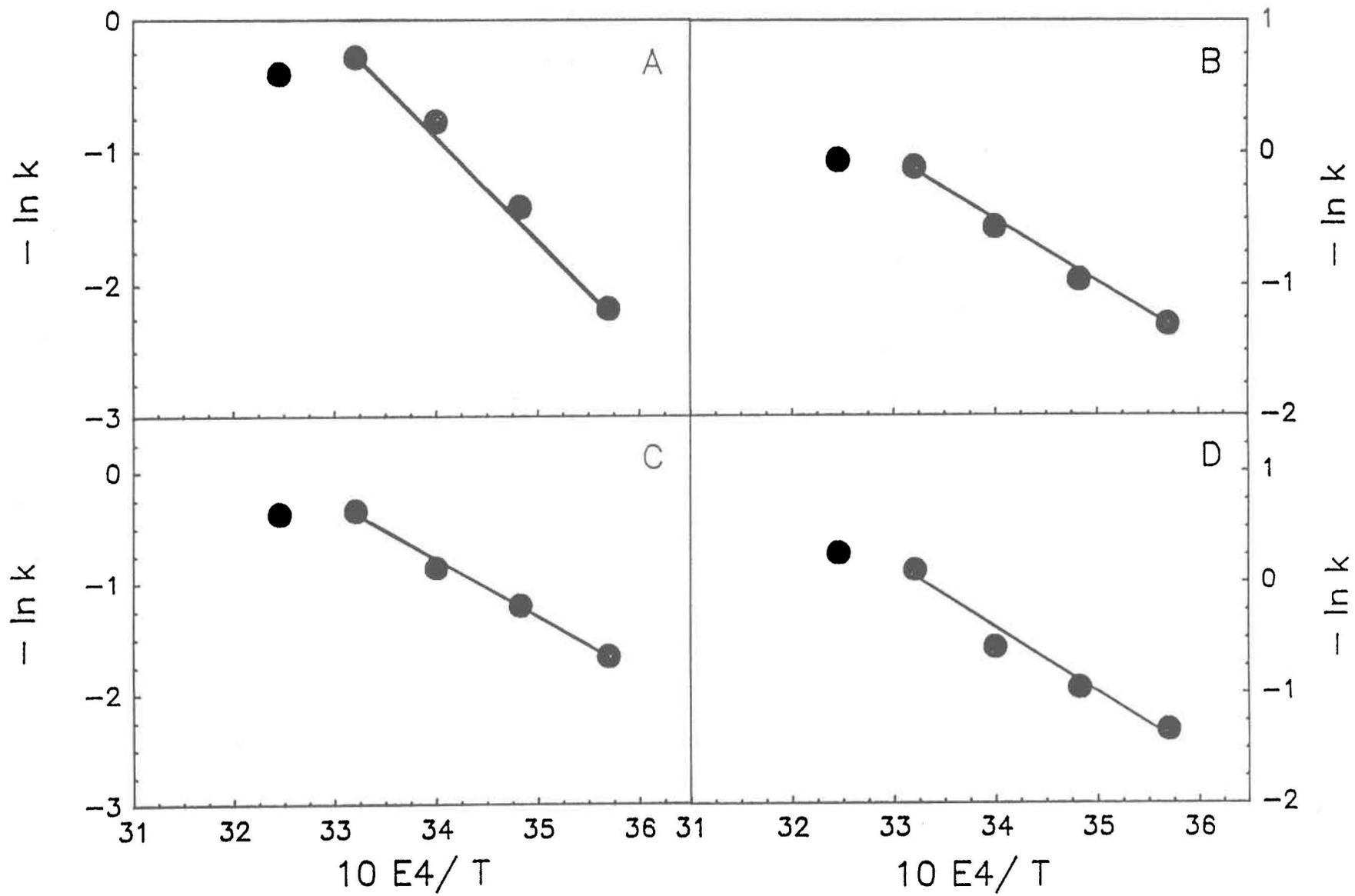


FIGURE 27. Courbes d'Arrhénius des taux spécifiques maximums de croissance dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) des microorganismes oxydant le soufre. (A) Peu-acidophiles; (B) Acidophiles.

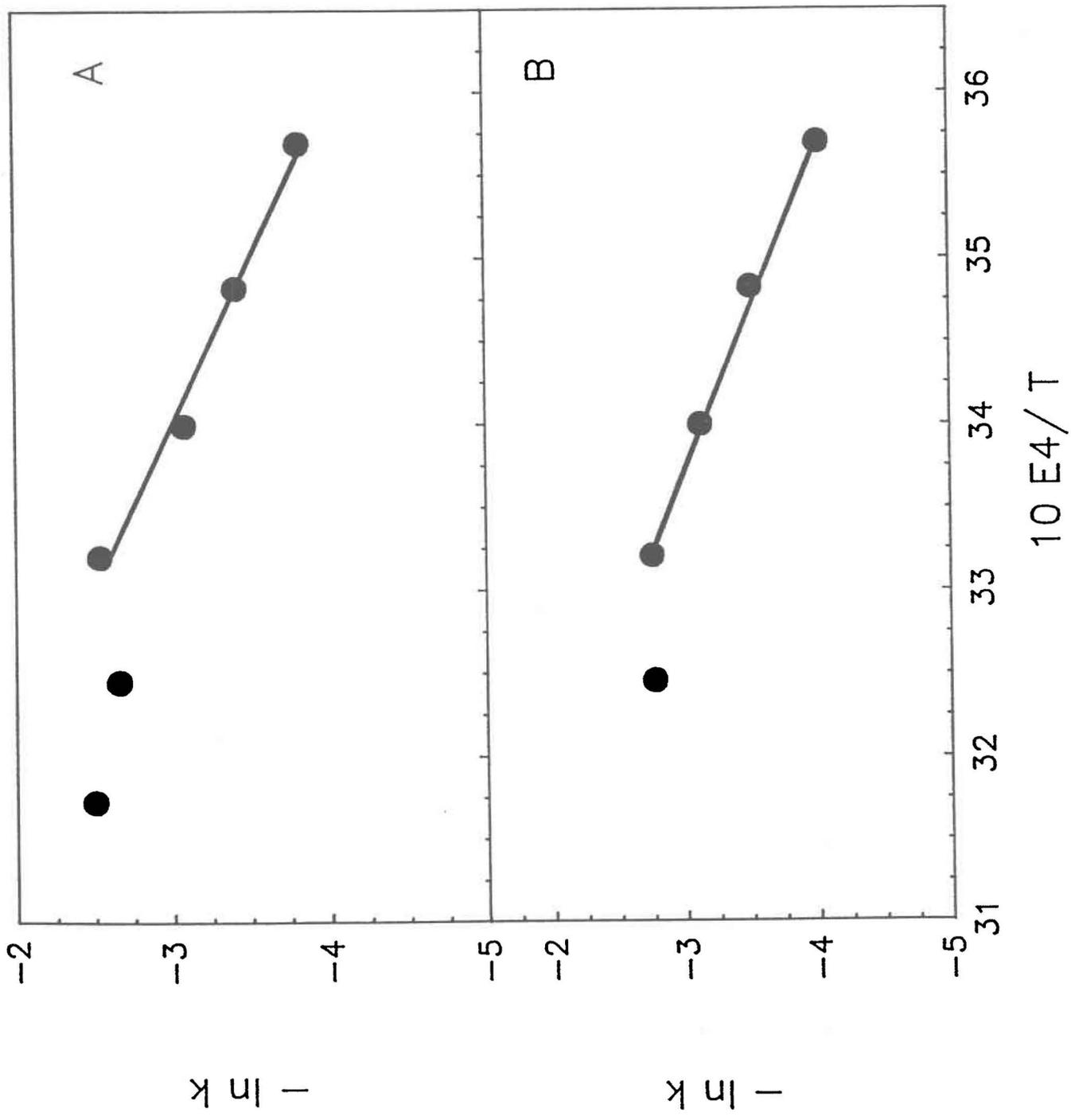


TABLEAU 28. Constantes cinétiques (jour<sup>-1</sup>) de solubilisation des métaux dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) aux différentes températures

Procédé	Température incub. (°C)	Taux k (jour <sup>-1</sup> )				Coefficient de détermination (r <sup>2</sup> )			
		Cd	Cu	Ni	Zn	Cd	Cu	Ni	Zn
avec ion ferreux	7	0.084	0.101	0.065	0.172	0.990	0.994	0.995	0.998
	14	0.124	0.181	0.093	0.251	0.990	0.994	0.991	0.992
	21	0.140	0.311	0.129	0.354	0.987	0.991	0.988	0.982
	28	0.223	0.506	0.225	0.516	0.984	0.980	0.979	0.937
	35	0.244	0.528	0.311	0.566	0.986	0.979	0.987	0.957
	42	0.306	0.668	0.352	0.558	0.975	0.989	0.992	0.961
avec soufre élémentaire	7	0.113	0.272	0.190	0.263	0.967	0.996	0.976	0.983
	14	0.243	0.381	0.300	0.383	0.973	0.957	0.908	0.977
	21	0.463	0.567	0.423	0.554	0.985	0.974	0.842	0.988
	28	0.756	0.891	0.710	1.113	0.955	0.960	0.971	0.980
	35	0.665	0.938	0.690	1.299	0.959	0.966	0.979	0.938
	42	----- <sup>a</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

<sup>a</sup> pas de solubilisation à cette température

TABLEAU 29. Énergies d'activation ( $E_a$ ) et coefficient de température ( $Q_{10}$ ) de la solubilisation des métaux et de la croissance bactérienne pour l'intervalle de température 7 à 28 °C

Procédé		$Q_{10}$	$E_a$ (kJ/mol)	Coefficient de détermination ( $r^2$ )
avec ion ferreux	Cd	1.59	30.4	0.957
	Cu	2.15	53.8	1.000
	Ni	1.81	40.5	0.979
	Zn	1.69	36.5	0.999
avec soufre élémentaire	Cd	2.47	63.6	0.994
	Cu	1.76	39.6	0.993
	Ni	1.87	43.0	0.993
	Zn	2.00	47.0	0.966
	thiobacilles peu-acidophiles	1.84	41.7	0.987
	thiobacilles acidophiles	1.83	42.0	0.997

organique (Gibbs et Angelidis, 1988; Lake *et al.*, 1984; Legret *et al.*, 1987).

Les valeurs de  $E_a$  et de  $Q_{10}$  comparables pour la croissance des thiobacilles et pour la solubilisation des métaux témoignent que l'extraction des métaux est contrôlée principalement par le taux de croissance des bactéries lixiviantes, plutôt que par des facteurs chimiques et

physiques. Les effets de la température sur la cinétique d'oxydation de l'ion ferreux n'ont pas été directement évalués dans cette étude. Toutefois, les énergies d'activation de solubilisation des métaux par ce procédé sont plutôt faibles. À cet égard, les valeurs de  $E_a$  pour l'oxydation de l'ion ferreux (58 et 40 kJ/mole) déterminées par Guay *et al.* (1975) et Lundgren (1975) semblent plus conformes à nos résultats que les valeurs (83 et 95 kJ/mole) estimées par Ahonen et Tuovinen (1989b) et Ferroni *et al.* (1986). Ahonen et Tuovinen (1990) ont évalué à 65 kJ/mole et à 2.1 les valeurs de  $E_a$  et de  $Q_{10}$  de l'oxydation du soufre élémentaire en milieu synthétique pour l'intervalle 4 °C à 37 °C. Les constantes cinétiques de croissance des thiobacilles (tableau 29) permettent de conclure que l'énergie d'activation et le coefficient  $Q_{10}$  pour l'oxydation du soufre élémentaire dans les boues sont inférieurs à ceux mesurés en milieu synthétique. L'acclimatation naturelle à de basses températures des microflores utilisées dans les deux procédés pourrait expliquer ce phénomène. En effet, les populations indigènes des boues subissent nécessairement l'influence des fluctuations importantes de la température du milieu, avant et pendant le traitement des eaux usées. La possibilité d'extraire les métaux des boues par voie biologique à des températures aussi basses que 7 °C serait un avantage important puisque aucun coût additionnel de chauffage d'un bioréacteur ne serait requis.

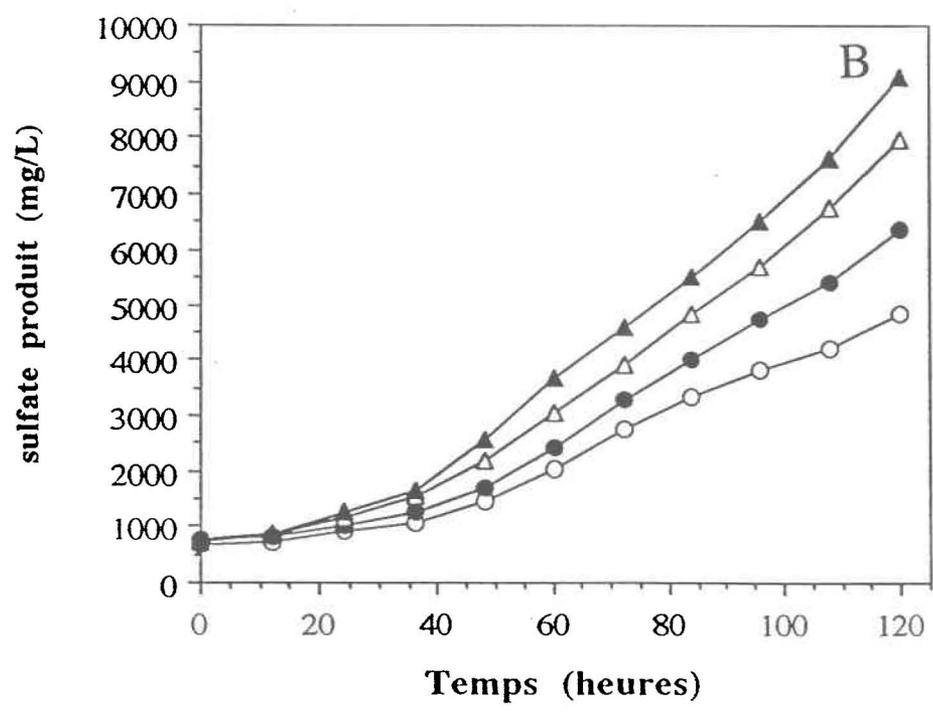
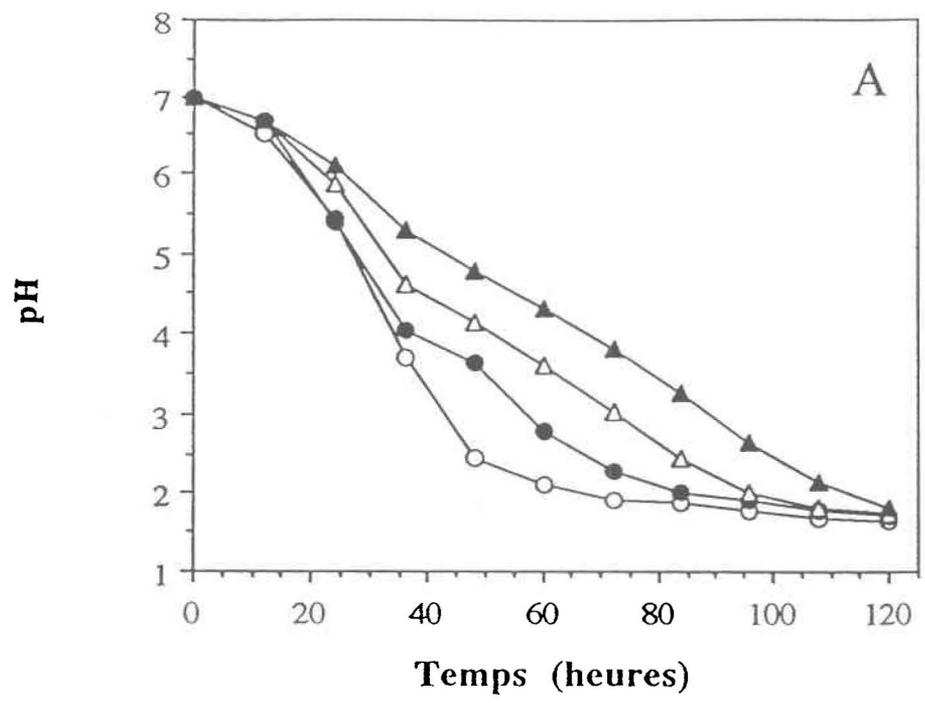
## **6.2 Contenu en solides des boues**

Les études précédentes témoignent que la biolixiviation avec ajout de soufre permet de très bons rendements de solubilisation des métaux dans les diverses boues testées. Cependant, la possibilité d'effectuer l'extraction des métaux toxiques à de hautes concentrations en solides permettrait d'envisager une réduction importante des coûts inhérents à cette étape de traitement. Des études déjà réalisées par Tyagi *et al.* (1988) et Wozniak et Huang (1982) ont montré que l'extraction des métaux par acidification chimique est fortement influencée par le pourcentage de solides de la boue. Cette section est donc consacrée à la vérification de l'influence de ce

paramètre sur la solubilisation des métaux et la croissance des microorganismes lixivians dans le procédé au soufre.

L'effet du contenu en solides a été vérifié dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) ajustée à quatre concentrations en solides (7, 22.8, 51.8, 71 g/L). Les courbes d'acidification de la boue, de production d'acide sulfurique (sulfate), et de croissance des populations lixiviantes sont montrées à la figure 28. L'abaissement du pH des boues est plus rapide pour les concentrations plus faibles de solides. Toutefois, le taux de production de sulfate augmente avec la hausse du contenu en solides. Cette observation démontre que l'oxydation du soufre par la microflore n'est pas inhibée par de fortes teneurs en solides riches en matières organiques. La hausse du taux de production de sulfate et du taux spécifique maximum de croissance des thiobacilles (tableau 30) pourrait s'expliquer par un apport supérieur en éléments nutritifs dans les boues concentrées. L'acidification plus lente des boues concentrées permet une croissance supérieure des thiobacilles peu-acidophiles. La hausse du contenu en solides de la boue permet l'obtention, lors de la lixiviation, de concentrations plus élevées de cellules viables de thiobacilles peu-acidophiles. Par contre, l'acidification des boues par les thiobacilles acidophiles entraîne une réduction sous la limite de détection des thiobacilles peu-acidophiles, et ce pour toutes les teneurs en solides. Les concentrations de thiobacilles acidophiles en fin de lixiviation sont également plus élevées dans les boues concentrées. Les taux spécifiques de croissance des deux groupes de populations augmentent avec l'accroissement du contenu en solides des boues; cependant les taux spécifiques maximum de production de sulfate sont relativement peu affectés (tableau 30).

FIGURE 28. Cinétiques de production de sulfate (B), d'abaissement du pH (A) et de croissance des microorganismes oxydant le soufre (C, D) dans la boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2) ajustée à différentes concentrations de solides. Symboles: (○) 7 g/L; (●) 22.8 g/L; (△) 51.8 g/L; (▲) 70.0 g/L.



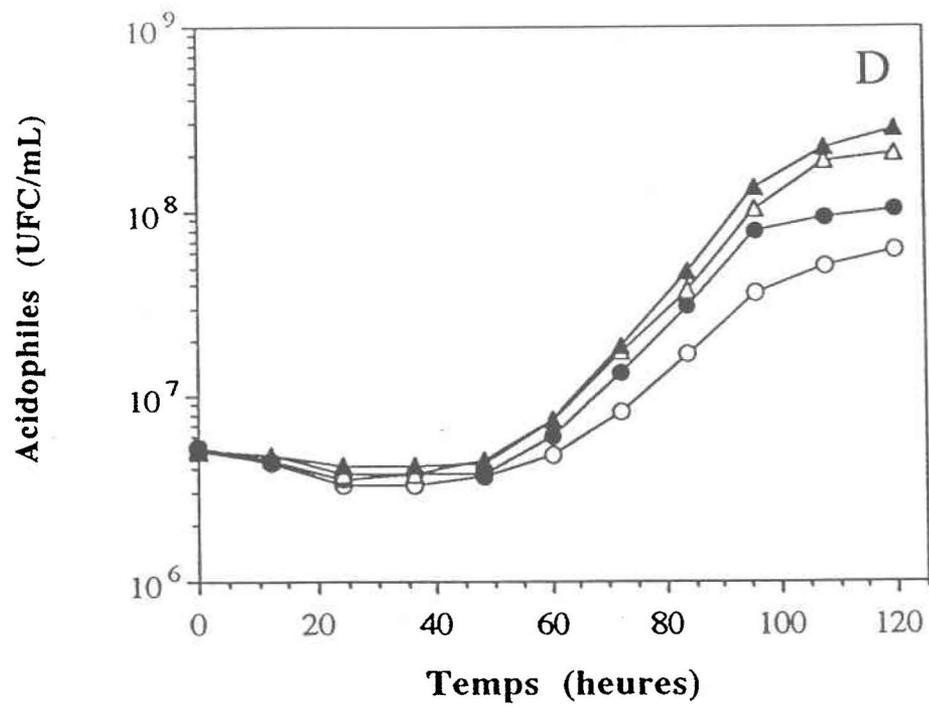
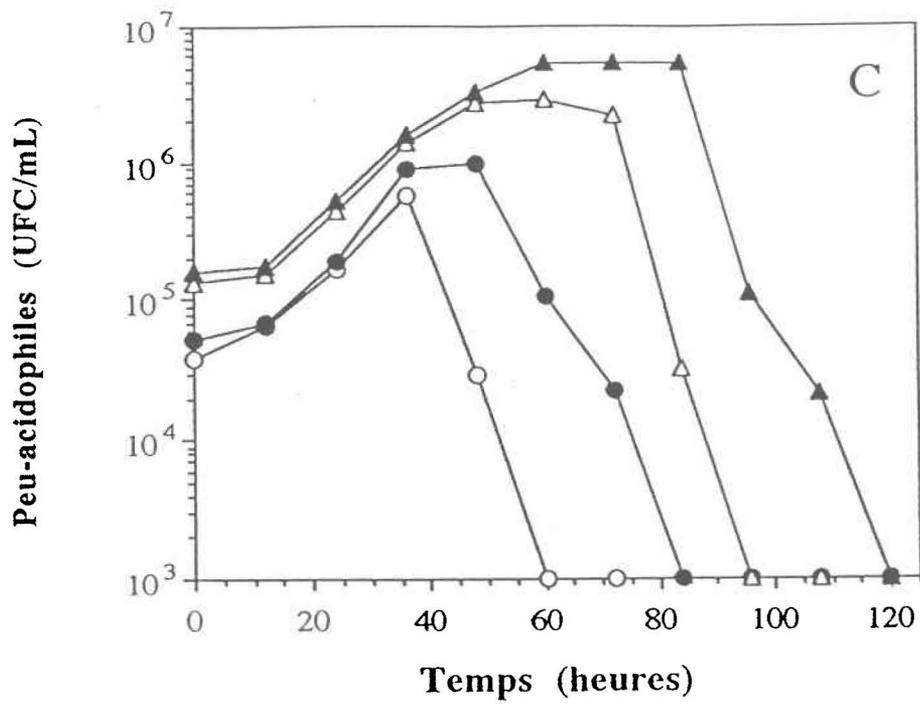


TABLEAU 30. Paramètres cinétiques de croissance de la microflore oxydant le soufre, dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) ajustée à différents pH et à différentes concentrations en solides

pH initial	Test Solides totaux (g/L)	$(\mu_{\max})^a$		$(dSO_4/dt)^b$ (g $SO_4^{2-}/L/h$ )	$(V_{\max})^c$ (g $SO_4^{2-}/g \text{ cell.}/h$ )
		peu acidophiles (h)	acidophiles (h)		
3.0	22.8	-----d	0.056	0.056	2.32
4.0	22.8	0.024	0.058	0.058	1.82
5.0	22.8	0.087	0.058	0.066	1.84
6.0	22.8	0.095	0.062	0.067	2.10
7.0	22.8	0.085	0.063	0.065	2.12
7.0	7.0	0.078	0.048	0.049	1.86
7.0	51.8	0.091	0.065	0.094	2.22
7.0	70.0	0.091	0.071	0.107	1.76

- a   taux spécifique maximum de croissance  
b   taux maximum de production de substrat  
c   taux spécifique maximum de production de substrat  
d   pas de croissance

Les rendements de solubilisation des métaux atteints après cinq jours de lixiviation dans les boues ajustées aux diverses concentrations en solides sont présentés au tableau 31. Pour tous les métaux, la hausse du contenu en solides cause une réduction du niveau de solubilisation. Les écarts de solubilisation sont de l'ordre de 15 à 20% pour la plupart des métaux: Cd (81-96%), Cu (81-95%), Mn (82-96%), Ni (71-93%) et Zn (85-98%).

L'influence du contenu en solides est particulièrement notable dans les cas du plomb (20-57%) et du chrome (31-67%). Ces résultats indiquent que la biolixiviation avec le soufre peut être réalisée avec des boues très concentrées (70 g/L), et que le contenu en solides des boues affecte peu ce système biologique de lixiviation, sauf pour la solubilisation du plomb et du chrome.

TABLEAU 31. Rendements de solubilisation des métaux après cinq jours de biolixiviation dans la boue digérée aérobie de Black Lake (D2) ajustée à différents pH et concentrations en solides

pH initial	Test Solides totaux (g/L)	% de solubilisation						
		Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
3.0	22.8	97	60	95	98	92	54	96
4.0	22.8	93	57	93	95	89	53	95
5.0	22.8	91	53	92	95	87	53	94
6.0	22.8	96	67	95	96	93	57	98
7.0	22.8	91	47	92	94	85	45	92
7.0	7.0	96	67	95	96	93	57	98
7.0	51.8	86	36	89	87	81	32	89
7.0	70.0	81	31	81	82	71	20	85

### 6.3 pH initial

Les divers essais de lixiviation microbienne présentés jusqu'à maintenant, ont été effectués avec des boues dont le pH se situait entre 6.0 et 8.0 au début de la lixiviation. Or,

plusieurs variantes peuvent être adoptées pour la mise au point d'un bioréacteur: système discontinu, semi-continu, et continu (Tyagi et Couillard, 1989). Le choix final de l'une ou l'autre de ces alternatives dépend entre autres de la capacité des microorganismes à croître efficacement dans les conditions expérimentales imposées. Ainsi, en mode semi-continu et continu, le pH de la boue dans le réacteur serait maintenu presque constant (pH entre deux et 4), alors qu'en mode cuvée (système discontinu) celui-ci oscillerait davantage, selon la quantité d'inoculum employée et la capacité tampon de la boue. Le procédé de biolixiviation avec le soufre faisant appel à la croissance successive de deux types de microorganismes, le pH initial de la boue à traiter aura donc un effet sur la croissance de ces derniers. Il est donc nécessaire de vérifier le comportement du système biologique de lixiviation à différents pH afin de pouvoir inférer sur les variantes technologiques envisageables.

Des essais de lixiviation ont donc été effectués avec une boue digérée aérobie (D2) préalablement ajustée à différents pH initiaux (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0). Les courbes de production de sulfate, d'acidification et de croissance des deux types de thiobacilles sont présentées à la figure 29. Après cinq jours d'incubation, le pH est identique pour toutes les boues. Cependant, le temps requis pour atteindre un pH de 2.0 est allongé avec la hausse du pH initial de la boue (50, 68, 73, 82, et 85 heures). Les taux maximum de production de sulfate sont semblables pour toutes les boues (tableau 30). Ces données indiquent que la biolixiviation des métaux avec le soufre peut être effectuée dans une gamme très large de pH initiaux, contrairement au procédé avec le sulfate ferreux qui nécessite un pH initial inférieur à 4.5 (Tyagi et Couillard, 1989; Wong et Henry, 1988). L'abaissement du pH initial de la boue cause une réduction importante de la croissance des thiobacilles peu-acidophiles. Ainsi, à un pH initial de 4.0 un très faible accroissement du nombre de cellules viables est observé, alors qu'au pH initial de 3.0 les thiobacilles peu-acidophiles sont rapidement éliminés et se retrouvent sous la limite de détection. Les taux maximum spécifiques de croissance des populations peu-acidophiles sont comparables pour les pH initiaux 5, 6, et 7, mais nettement

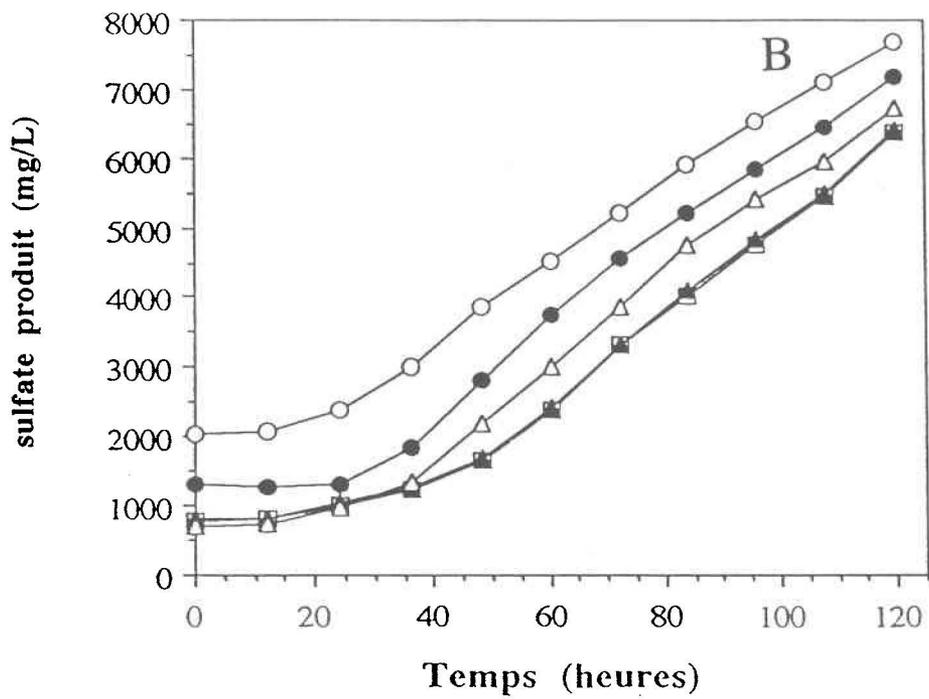
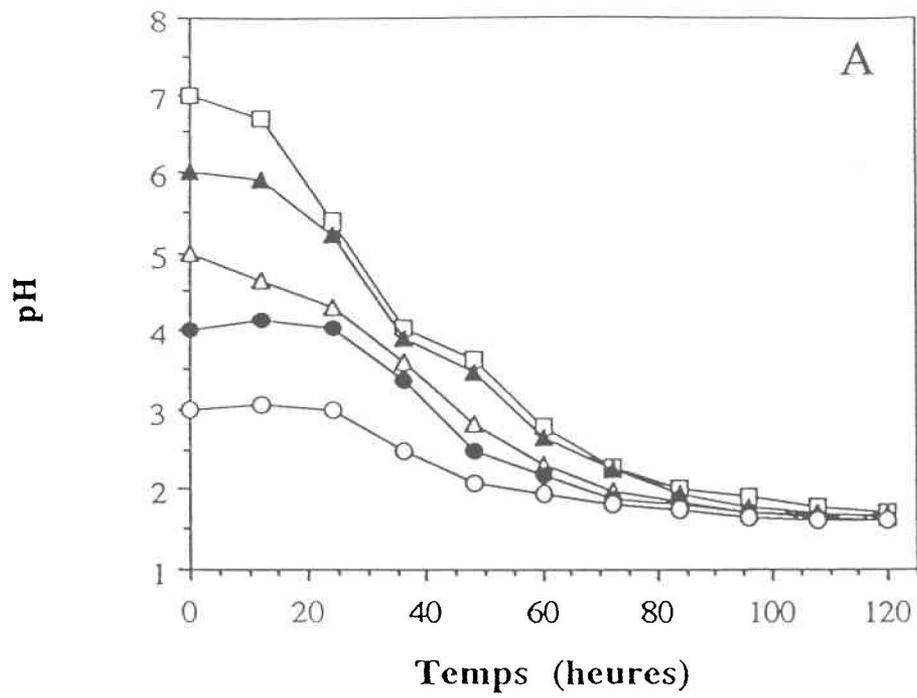
moindres à un pH initial de 4.0 (tableau 30). La hausse du pH initial ne fait que prolonger la phase de latence chez les thiobacilles acidophiles, les taux maximums spécifiques de croissance demeurant identiques. Aucune différence notable n'est apparue dans les taux spécifiques maximum de production de sulfate dans les boues ajustées aux différents pH initiaux.

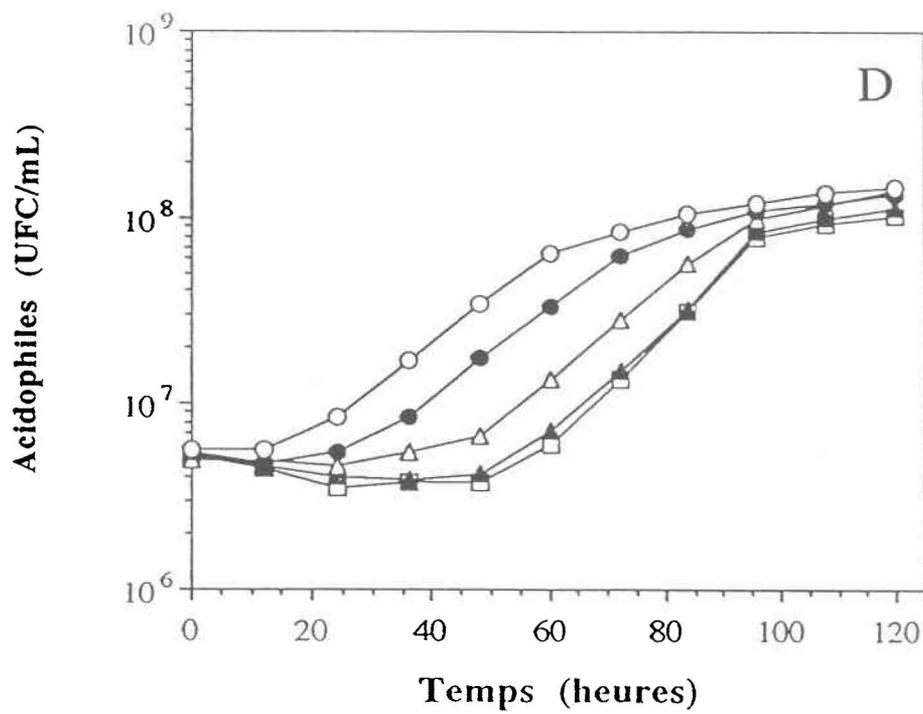
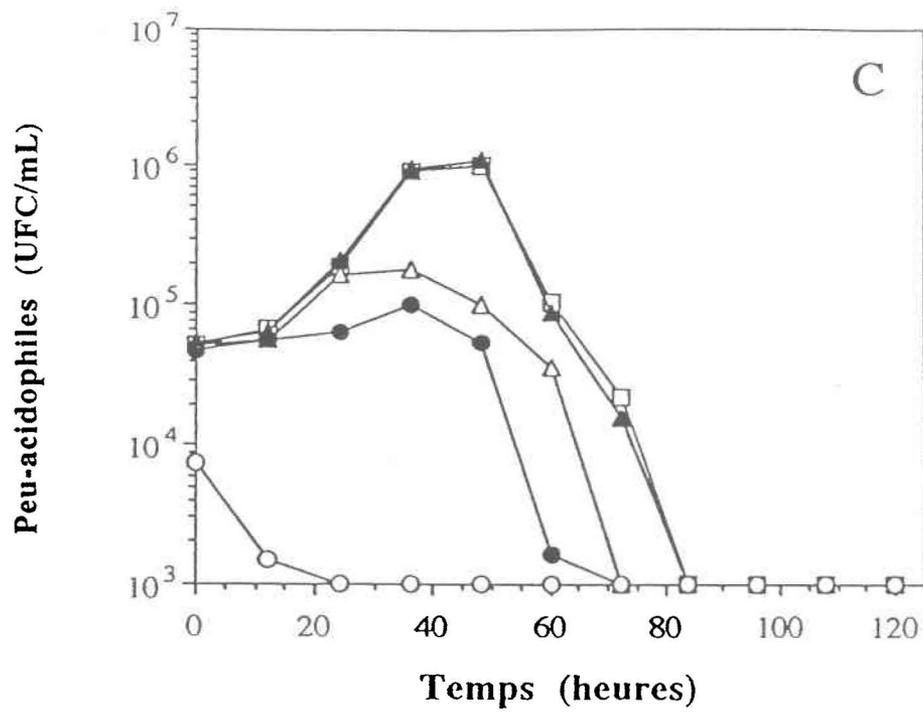
Les pourcentages de solubilisation des métaux toxiques obtenus après cinq jours de lixiviation sont indiqués au tableau 31. Les rendements finaux de solubilisation sont semblables pour toutes les boues utilisées dans ces essais. Même si le pH initial de la boue influence directement la croissance des thiobacilles (particulièrement les peu-acidophiles), ce paramètre ne représente pas une contrainte pour le fonctionnement adéquat du procédé avec le soufre. Ainsi, divers modes opératoires de bioréacteur (discontinu, semi-continu, continu) peuvent être envisagés si l'on ne tient compte que de la capacité d'acidification de la boue des microorganismes lixivians et des rendements de solubilisation des métaux.

#### **6.4 Substrat**

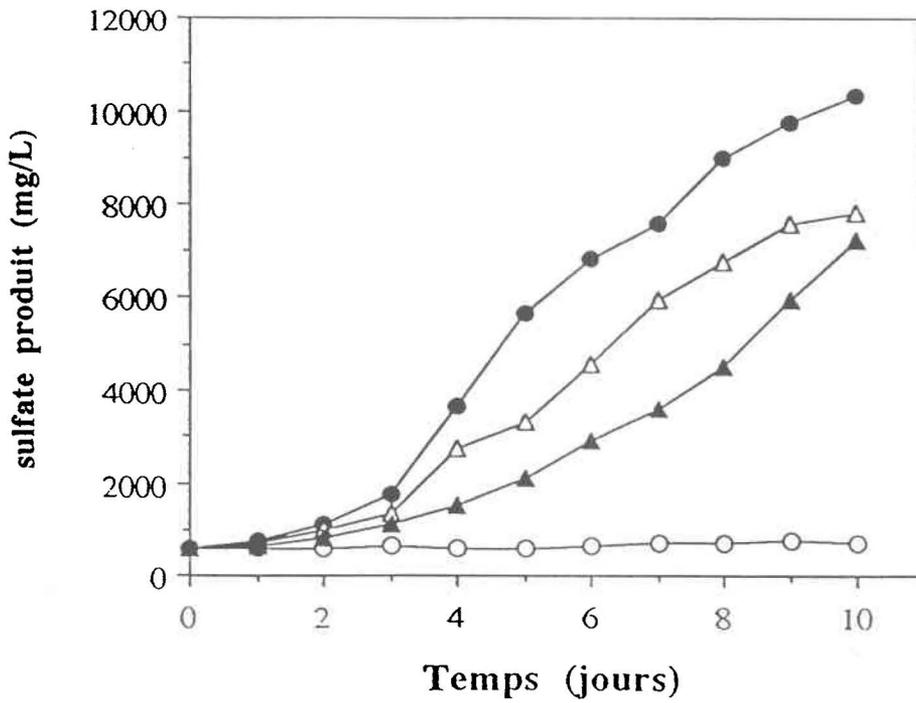
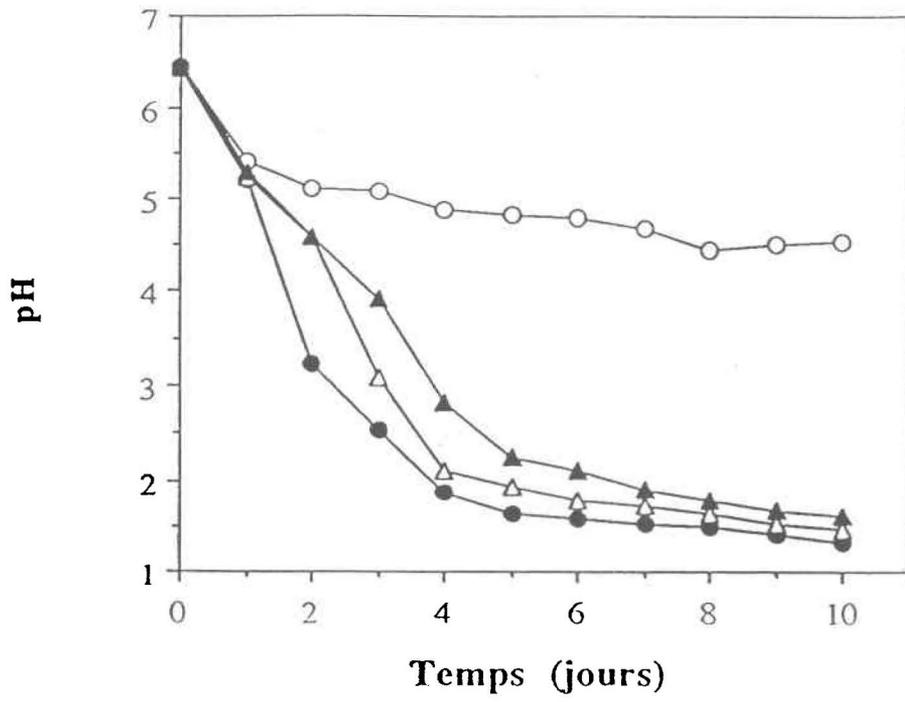
Les mesures de sulfate produit lors des essais de lixiviation indiquent que seulement une fraction du soufre ajouté est oxydée. La quantité de soufre ajoutée à la boue doit donc être optimisée afin d'éviter une perte importante de substrat dans les boues décontaminées. Cependant, les quantités de soufre nécessaires à l'acidification adéquate des boues sont très variables (tableau 15). Une façon habile de contourner le problème consisterait à utiliser le soufre sous une forme facilement récupérable après la lixiviation, et de réutiliser celui-ci pour d'autres étapes de solubilisation des métaux. Le soufre est un substrat non-toxique, inerte et facilement manipulable. Le soufre élémentaire est commercialisé au Canada à l'état solide en poudre, en feuilles, en granules, et en boulettes ainsi qu'à l'état liquide. Sur les 850 000 tonnes de soufre produites chaque année au Canada, plus de 50% est utilisé en Alberta dans la

FIGURE 29. Cinétiques de production de sulfate (B), d'abaissement du pH (A) et de croissance des microorganismes oxydant le soufre (C, D) dans la boue digérée aérobie de Black lake (boue D2) ajustée à divers pH initiaux. Symboles: (○) 3.0; (●) 4.0; (△) 5.0; (▲) 6.0; (□) 7.0.





**FIGURE 30** Variation du pH et production de sulfate lors de la lixiviation microbienne dans la boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2) avec 0.5% de différentes formes de soufre. Symboles: (○) contrôle sans soufre; (●) soufre en poudre; (△) soufre en bloc; (▲) soufre granulaire.



fabrication des fertilisants (Environnement Canada, 1984). L'objectif poursuivi dans cette section est de vérifier si la biolixiviation peut être réalisée avec différentes formes de soufre.

La figure 30 montre les courbes d'acidification de la boue digérée aérobie de Black Lake (boue D2) additionnée de 0.5% de trois formes différentes de soufre: en poudre, en sphères de dimension variant entre 2.36 et 4 mm préparées par précipitation dans l'eau (Laishley et al., 1986), et en bloc (pastille) préparé par précipitation à l'air du soufre fondu dans un moule (Bryant et al., 1984). Les trois formes de substrat permettent une acidification importante de la boue. Le soufre en poudre présentant une surface plus grande que les deux autres formes, celui-ci constitue le substrat le plus rapidement oxydé. L'acidification de la boue additionnée du bloc de soufre s'est montrée plus rapide que celle obtenue avec les granules sphériques de soufre. Cette observation peut s'expliquer par la surface plus poreuse du soufre en pastille en comparaison aux sphères de soufre, tel qu'observée en microscopie électronique à balayage. Des essais d'acidification de la boue ont été effectués en utilisant les granules de soufre récupérés après la période de dix jours d'incubation. Les résultats témoignent que le soufre peut être réutilisé pour plusieurs essais de lixiviation successifs sans perte d'efficacité (taux d'acidification de la boue). La mise au point d'un bioréacteur avec du soufre immobilisé semble donc possible et même souhaitable puisque celui-ci faciliterait grandement l'opération du procédé, tout en réduisant les risques de perturbations environnementales (acidification des terres agricoles par oxydation du soufre résiduel dans les boues décontaminées). De plus amples renseignements concernant le potentiel d'utilisation de ces formes de substrat pour la biolixiviation des métaux dans les boues sont disponibles dans quelques travaux réalisés à l'INRS-Eau.

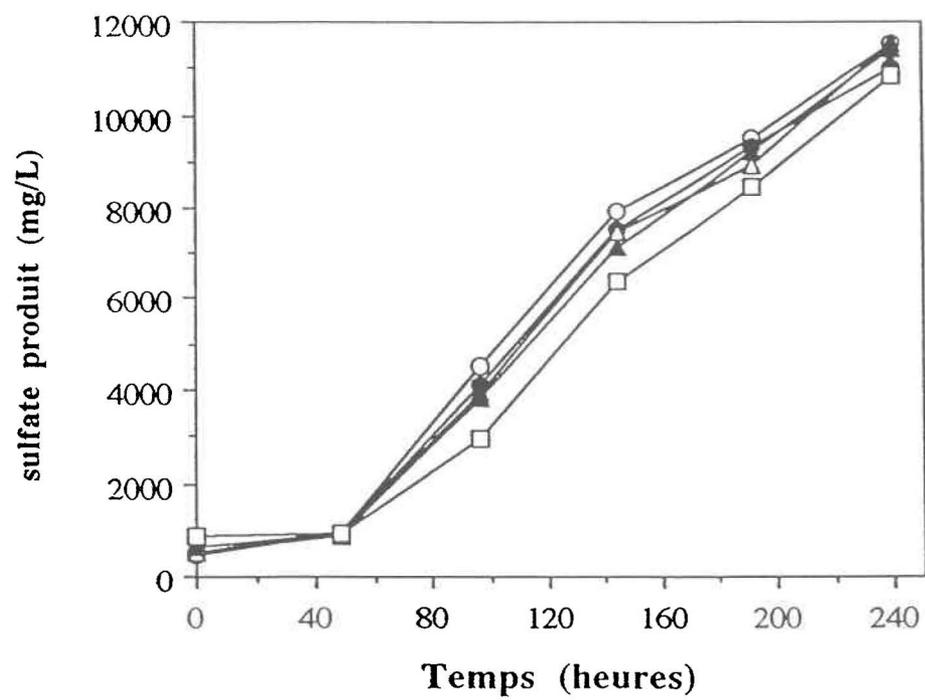
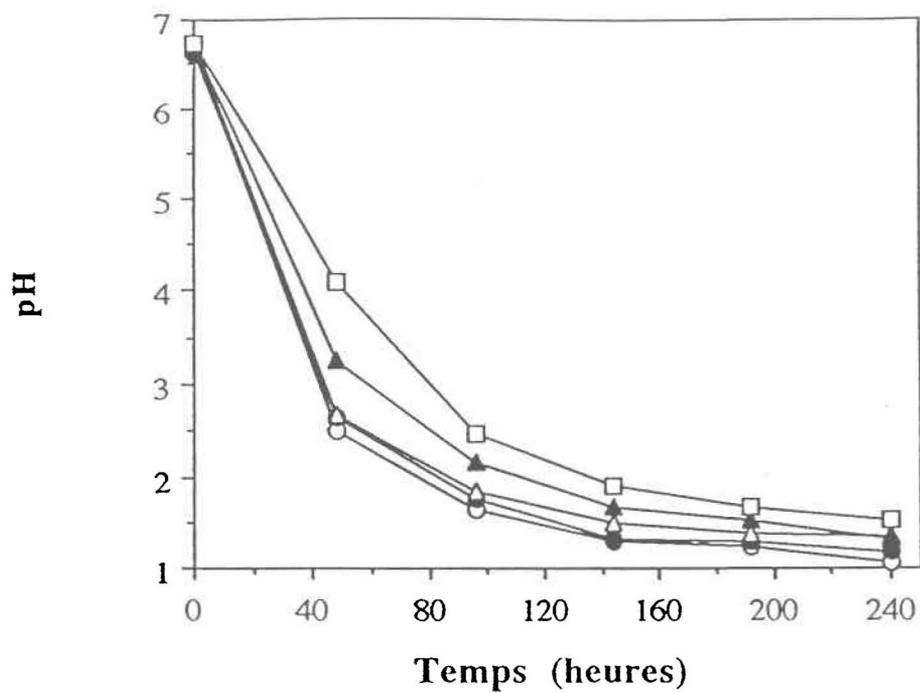
## 6.5 Concentration en métaux

L'extraction biologique des métaux toxiques présents dans les boues d'épuration municipales est, à l'heure actuelle, une technologie prometteuse. Cependant, les concentrations de métaux dans les boues, si elles sont inquiétantes d'un point de vue environnemental, demeurent trop faibles pour une récupération et un recyclage économique de ces métaux. Une façon de réduire les coûts assignés à la récupération des métaux consiste à concentrer le surnageant obtenu lors de l'étape de biolixiviation. Pour ce faire, le lixiviat obtenu est utilisé comme phase liquide en remplacement du surnageant de la boue à traiter. Cette étape est répétée quelques fois afin d'obtenir des concentrations de métaux solubilisés suffisantes pour permettre une récupération économique. Les biotechnologies étudiées pour l'enlèvement des métaux des boues municipales pourraient également être utilisées pour la décontamination des boues d'épuration industrielles fortement contaminées en métaux (Bosecker, 1986). Dans ces deux cas, la microflore lixivante doit être capable de croître en présence de concentrations élevées en métaux. La résistance des thiobacilles acidophiles (*T. ferrooxidans* et *T. thiooxidans*) à des concentrations élevées en ions métalliques est un fait bien reconnu (Brierley et LeRoux, 1978; Ehrlich et Brierley, 1990; Karavaiko et al., 1977; Lundgren et Silver, 1980). Toutefois, les boues d'épuration constituent des environnements forts différents de ceux rencontrés dans la biolixiviation de minerais ou de résidus miniers. Il est donc important de vérifier si les concentrations de métaux présents dans les boues affectent l'activité des microorganismes acidifiants.

Des essais de lixiviation microbienne avec le soufre ont été réalisés avec diverses concentrations de zinc et de cuivre ajoutés sous forme de sulfates. L'augmentation des concentrations de sulfate de cuivre diminue l'acidification des boues (figure 31). Cette baisse de la vitesse d'acidification de la boue est également observée avec l'ajout du sulfate de zinc (figure 32). Cependant, les taux de production de sulfate sont semblables pour les différentes

boues, indiquant ainsi que la croissance des microorganismes n'est pas inhibée par les ions cuivre et zinc. L'effet tampon des sulfates de cuivre et de zinc peut expliquer les différences observées dans les courbes d'acidification. Il faut noter que les ions de cuivre et de zinc précipitent complètement lors de l'ajout des sulfates dans les boues, et que la solubilisation débute lors de l'acidification des boues sous pH 4-5. Les rendements de solubilisation du cuivre atteints après dix jours de lixiviation sont excellents pour toutes les boues. Par exemple, un rendement de solubilisation de 80% du cuivre a été mesuré pour la boue contenant 537 mg/L de cuivre (500 ajoutés + 37 présents initialement dans la boue). Pour la boue contenant 512 mg/L de zinc (500 ajoutés + 12 présents initialement), un niveau de solubilisation du zinc de 78% a été calculé. Les rendements de solubilisation baissent légèrement avec l'augmentation de la quantité de métal ajouté. Ces résultats indiquent que les concentrations de métaux (Cu, Zn) n'affectent pas la croissance des microorganismes lixivians, et que la biolixiviation avec le soufre peut se faire sans restriction avec des boues fortement contaminées en métaux. L'étude de l'effet des paramètres traités dans ce chapitre sur la biolixiviation des métaux a permis de mettre à jour certaines limites d'opérations du système de lixiviation microbienne avec le soufre.

FIGURE 31. Effets de l'ajout de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) sur l'activité lixivante de la microflore oxydant le soufre dans la boue digérée aérobie de Black lake (boue D2).  
Symboles: (○) contrôle sans cuivre ajouté; (●) 50 mg/L Cu; (△) 100 mg/L Cu; (▲) 200 mg/L Cu; (□) 500 mg/L Cu.



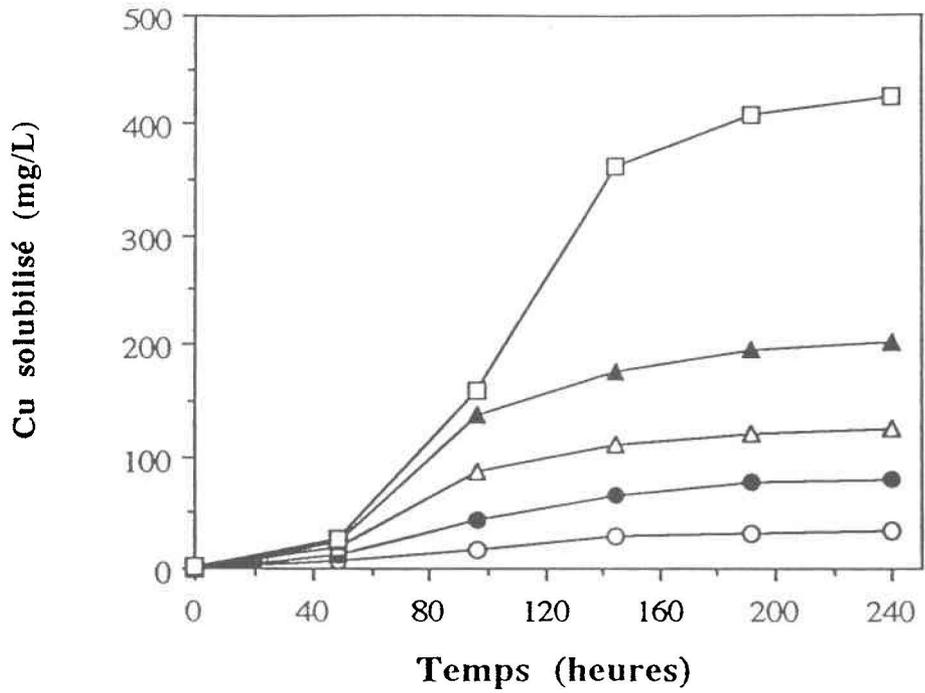
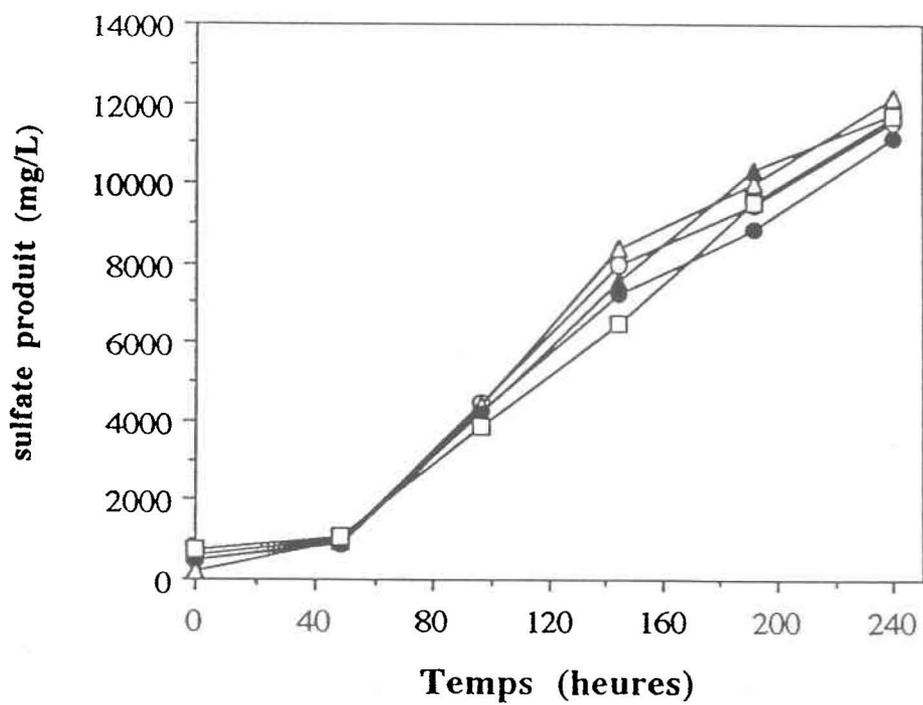
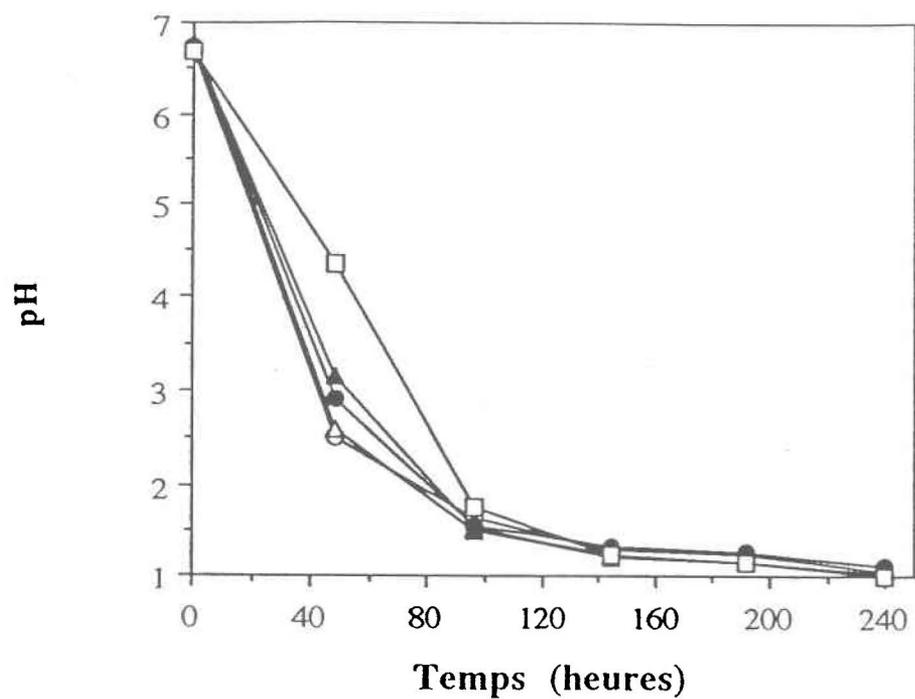
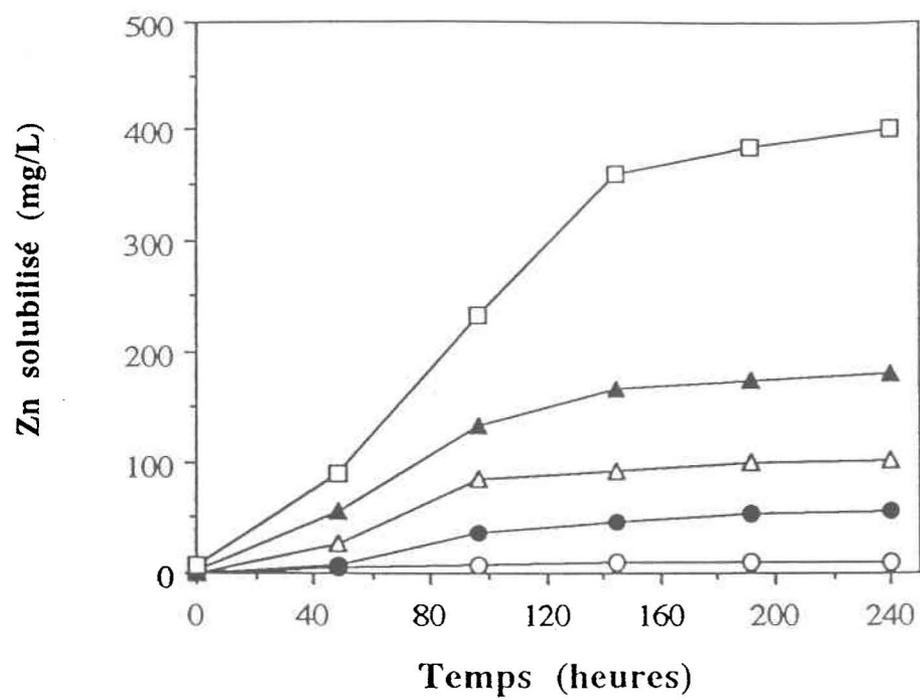
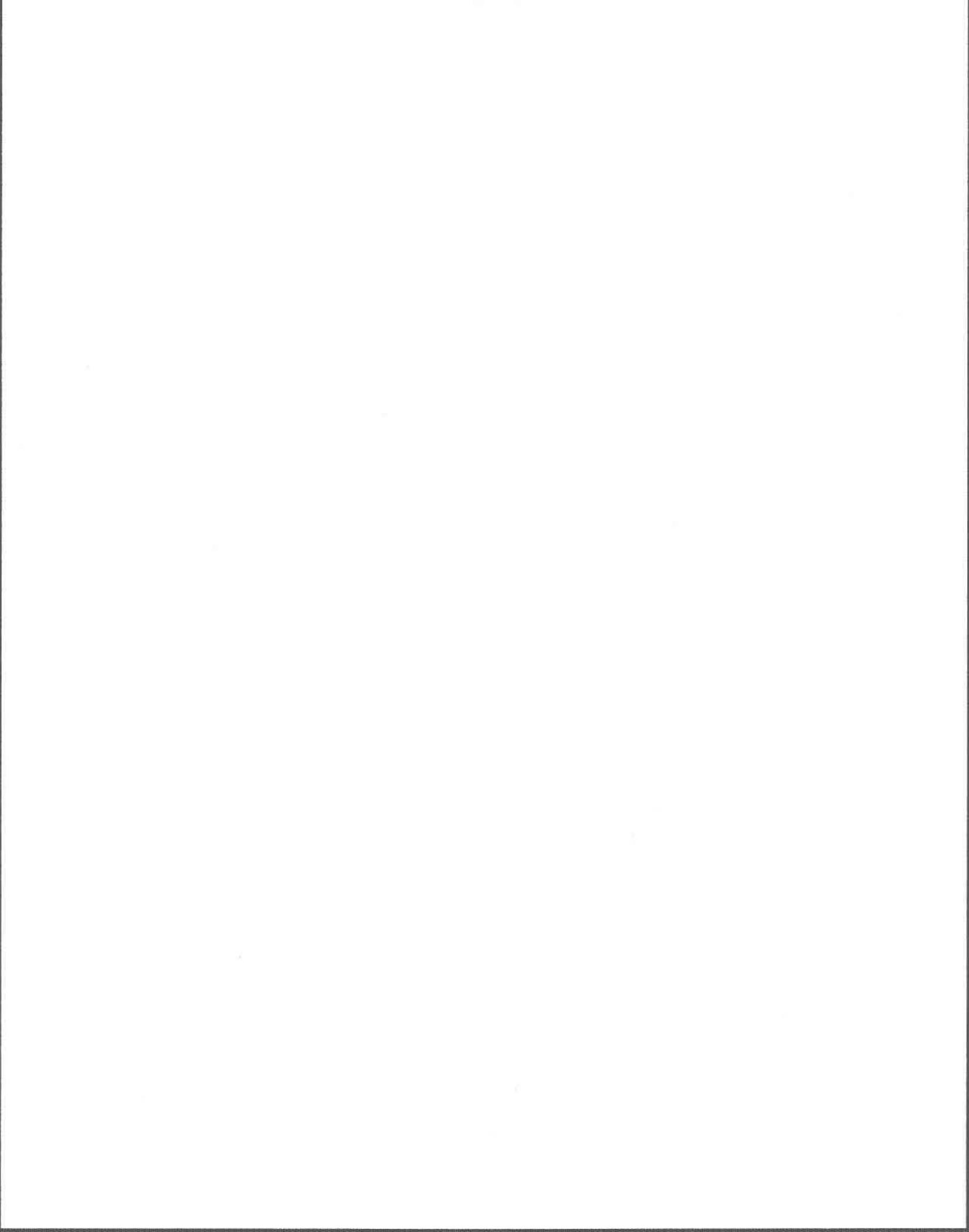


FIGURE 32. Effets de l'ajout de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) sur l'activité lixiviante de la microflore oxydant le soufre dans la boue digérée aérobie de Black lake (boue D2).  
Symboles: (○) contrôle sans zinc ajouté; (●) 50 mg/L Zn; (△) 100 mg/L Zn; (▲) 200 mg/L Zn; (□) 500 mg/L Zn.





## CHAPITRE 7



## CHAPITRE 7

### IMPACTS DU PROCÉDÉ AVEC LE SOUFRE SUR LES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES BOUES D'ÉPURATION

L'ajout d'un procédé d'extraction biologique des métaux en aval de la stabilisation conventionnelle des boues est fortement recommandable d'un point de vue écologique, mais hausserait nécessairement les coûts assignés aux traitements des eaux usées. La mise au point d'un procédé permettant conjointement l'enlèvement des métaux lourds et la stabilisation des boues est donc souhaitable, et pourrait permettre de réduire les temps de rétention et les coûts d'opération, en comparaison au procédé conventionnel de stabilisation. De plus, les boues ainsi traitées répondraient aux critères exigés pour l'épandage agricole et contribueraient donc à valoriser cette biomasse considérée le plus souvent comme un déchet. Ce chapitre traite donc du potentiel de stabilisation des boues du procédé de biolixiviation avec le soufre. La destruction des microorganismes pathogènes a été évaluée par le suivi des populations de bactéries indicatrices. La réduction de la charge organique des boues a été mesurée par la baisse des solides en suspension, et la solubilisation de la matière organique par les teneurs en carbone et phosphore total dans la phase liquide des boues.

## 7.1 Élimination des bactéries indicatrices

L'élimination des bactéries indicatrices (hétérotrophes totaux, coliformes totaux, coliformes fécaux, streptocoques fécaux) lors de la lixiviation a été suivie dans la boue secondaire de Black Lake (boue C) contenant 4.8 g/L de solides totaux avec 0.5% de soufre et sans ajout de soufre. Les populations indicatrices ont aussi été mesurées dans la boue secondaire ajustée à 17.4 g/L de solides. L'incubation à 28 °C avec agitation de la boue contrôle (sans soufre ajouté, figure 33) résulte en une légère hausse du pH et du POR avec peu de changements du compte d'hétérotrophes totaux viables. Les teneurs en hétérotrophes totaux et en coliformes totaux sont légèrement augmentées, alors que les coliformes fécaux et streptocoques fécaux sont faiblement abaissés (< un log). Les populations de thiobacilles peu-acidophiles sont haussées à  $2 \times 10^5$  UFC/100 mL après les quatre jours d'incubation. L'augmentation du pH de la boue cause une réduction des populations de thiobacilles acidophiles sous la limite de détection ( $10^3$  UFC/100 mL).

L'addition de 5% d'inoculum et de 0.5% de soufre en poudre à la boue secondaire (figure 34) entraîne une chute du pH de la boue à 2.0 après 48 heures d'incubation accompagnée par une hausse importante du POR. La concentration de microorganismes hétérotrophes totaux baisse légèrement (1 log) durant la période de lixiviation de quatre jours. Dans ce temps, la microflore initiale particulièrement diversifiée et constituée principalement de bactéries est remplacée totalement par des colonies de deux types (une moisissure et une levure). Cette substitution de la microflore indigène est peu surprenante, puisque la capacité de croître en milieu fortement acide a été démontrée pour plusieurs espèces de moisissures et de levures (Harrison, 1978; Rossi et Arst, 1990; Silverman et Munoz, 1971). La disparition sous la limite de détection des bactéries indicatrices se fait dans les deux premiers jours. La croissance des populations de thiobacilles s'effectue selon la succession décrite dans les chapitres précédents.

L'acidification de la boue concentrée (17.4 g/L de solides, figure 35) est plus lente que celle de la boue non-concentrée (figure 34); après 48 heures le pH se situe à 2.7. Cependant, après trois jours les pH des deux boues sont similaires. La disparition des streptocoques fécaux s'effectue dans les deux premiers jours (pH > 2.7), alors que l'élimination des coliformes requiert une réduction du pH sous 2.7. La réduction de la concentration de coliformes totaux a été mesurée dans une dizaine de boues d'épuration (tableau 32). Après cinq jours de biolixiviation (pH entre 1.4 et 2.2), une mortalité appréciable est observée (trois log ou sous la limite de détection).

La biolixiviation des métaux avec le soufre permet une élimination efficace des bactéries indicatrices et par extrapolation de la plupart des pathogènes bactériens. La destruction des bactéries indicatrices par ce procédé est nettement supérieure aux résultats obtenus par Henry et al. (1988, 1991). De plus, la réduction des bactéries indicatrices par le procédé avec *T. ferrooxidans* est fortement inhibée par des concentrations élevées (> 10 g/L) de matières en suspension (Henry et al., 1988, 1991). Le procédé avec le soufre permet une réduction des indicateurs bactériens à des niveaux compatibles avec l'utilisation agricole des boues, puisque les concentrations atteintes (< 10<sup>3</sup> UFC/100 mL) sont semblables ou inférieures aux teneurs normalement rencontrées dans les sols agricoles (Ibiebele et Inyang, 1986). La destruction des oeufs de parasites n'a pas été évaluée dans cette étude. Toutefois, si l'on se réfère à la résistance à l'acide des oeufs de parasites (*Ascaris*) (Schmidt et Roberts, 1989), la technologie étudiée n'est probablement pas efficace pour la destruction de ces organismes.

L'élimination des bactéries indicatrices peut être expliquée par la production importante d'acide. La sensibilité à l'acide de ces microorganismes est d'ailleurs bien connue (Roth et Keenan, 1971; Wortman et al., 1986). Les concentrations élevées de sulfate retrouvées dans les boues lors de la biolixiviation pourraient également contribuer à la réduction des bactéries indicatrices. En comparant les concentrations de bactéries indicatrices mesurées en fin de

FIGURE 33. Variations des populations microbiennes, du pH et du POR dans la boue contrôle sans soufre de Black Lake (boue C). Symboles: (○) pH; (●) POR; (△) hétérotrophes aérobies totaux; (▲) coliformes totaux; (□) coliformes fécaux; (■) streptocoques fécaux; (▽) thiobacilles acidophiles; (▼) thiobacilles peu-acidophiles.

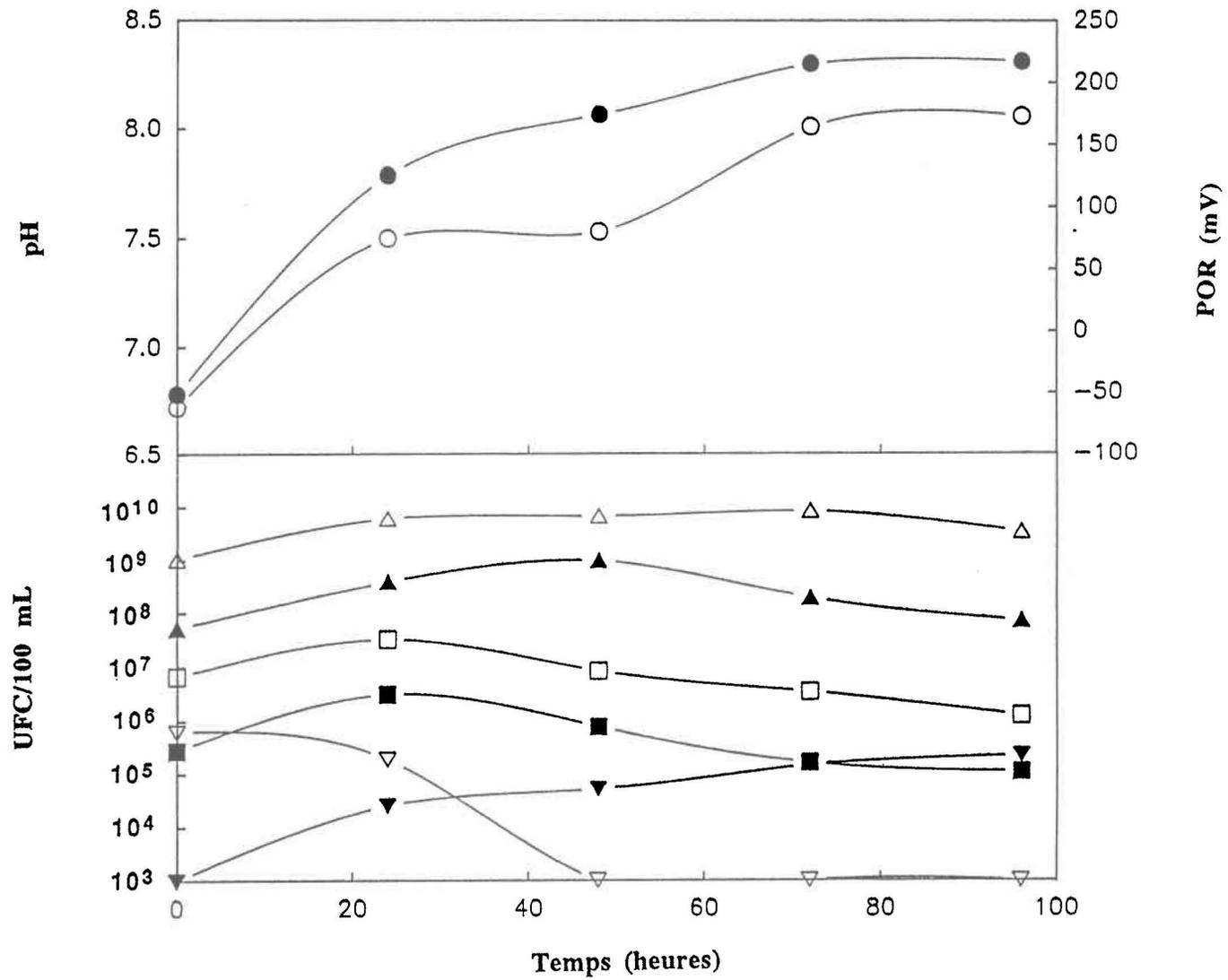


FIGURE 34. Variations des populations microbiennes, du pH et du POR dans la boue non-concentrée (4,8 g/L) de Black Lake (boue C, additionnée de 0.5% de soufre). Symboles: (○) pH; (●) POR; (△) hétérotrophes aérobies totaux; (▲) coliformes totaux; (□) coliformes fécaux; (■) streptocoques fécaux; (▽) thiobacilles acidophiles; (▼) thiobacilles peu-acidophiles.

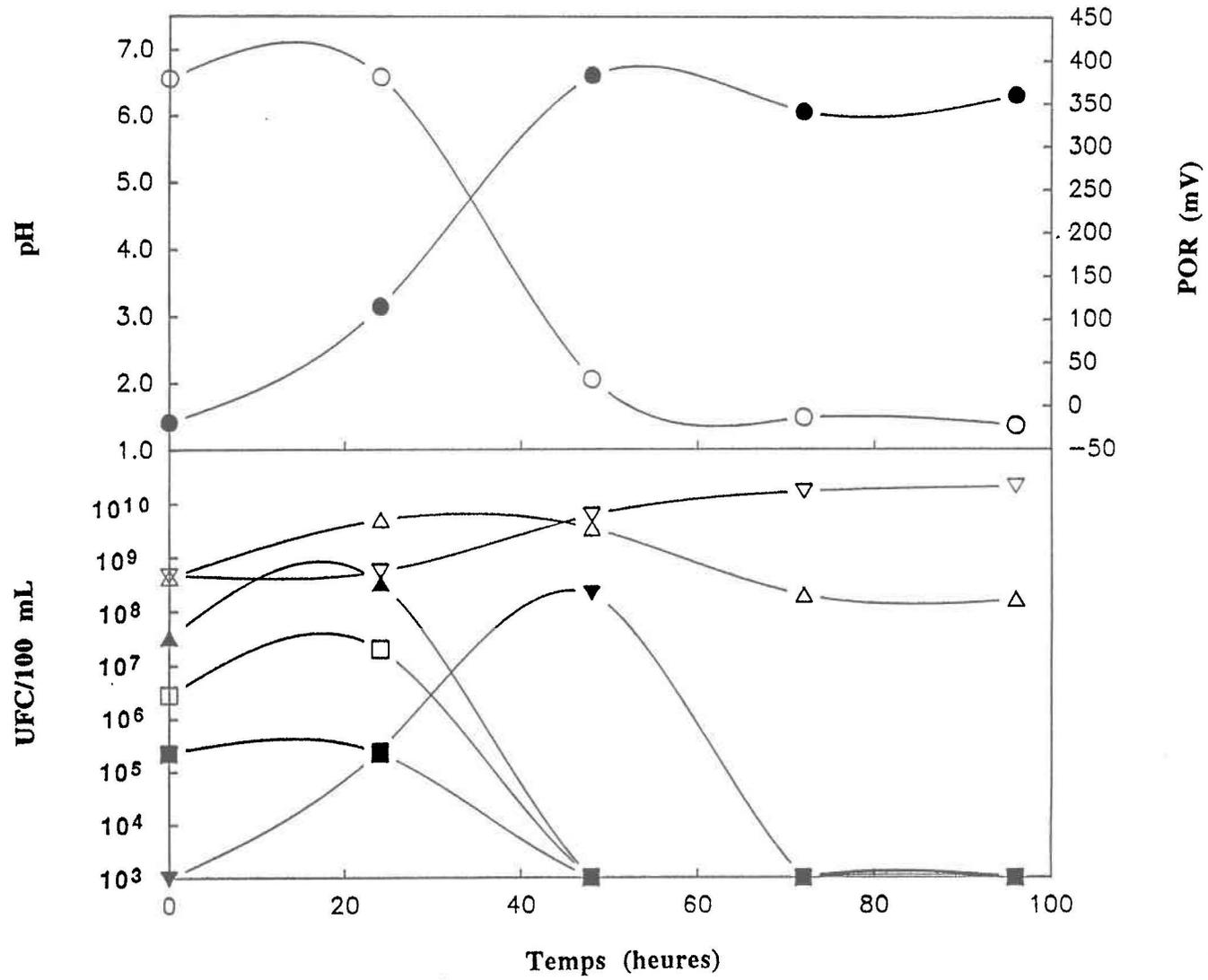


FIGURE 35. Variations des populations microbiennes, du pH et du POR dans la boue concentrée (17,4 g/L) de Black Lake (boue C, additionnée de 0.5% de soufre). Symboles: (○) pH; (●) POR; (△) hétérotrophes aérobies totaux; (▲) coliformes totaux; (□) coliformes fécaux; (■) streptocoques fécaux; (▽) thiobacilles acidophiles; (▼) thiobacilles peu-acidophiles.

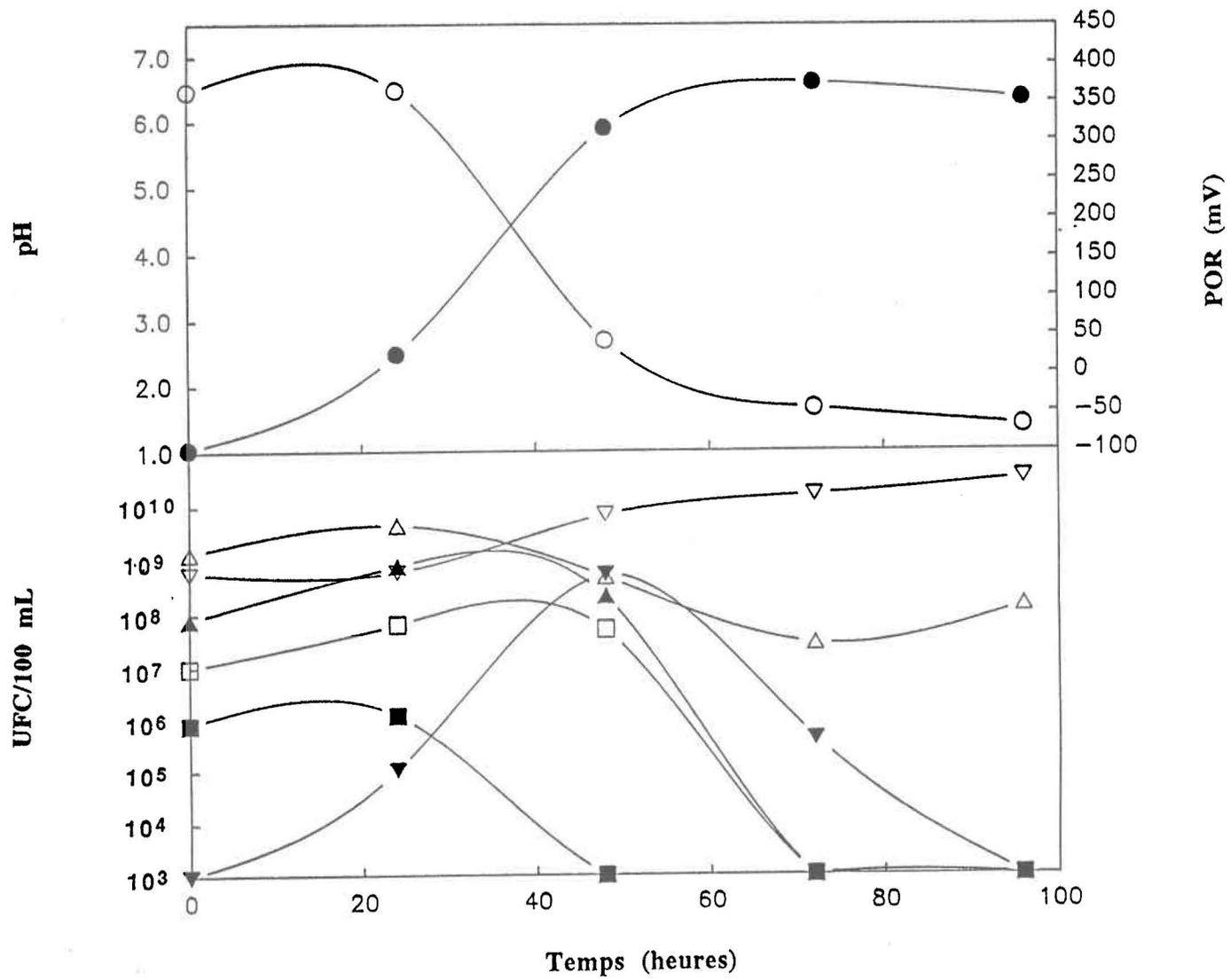


TABLEAU 32. Réductions des coliformes totaux dans les boues d'épuration après cinq jours de biolixiviation avec 0.5% de soufre

Boues		pH	POR (mV)	Sulfate (mg/L)	Coliformes totaux (UFC/ 100 ml)
A	initial	6.34	-152	243	$1.20 \times 10^6$
	final	1.85	370	3410	$< 1.00 \times 10^3$
B	initial	6.82	-116	201	$5.33 \times 10^4$
	final	2.10	400	2030	$< 1.00 \times 10^3$
C	initial	6.06	-80	138	$1.27 \times 10^6$
	final	1.70	384	2900	$< 1.00 \times 10^3$
D	initial	6.16	12	336	$7.30 \times 10^4$
	final	1.76	383	4330	$< 1.00 \times 10^3$
G	initial	6.33	-169	378	$3.23 \times 10^5$
	final	1.76	391	4240	$< 1.00 \times 10^3$
H	initial	6.55	-190	548	$1.40 \times 10^6$
	final	2.14	307	5340	$4.00 \times 10^3$
I	initial	6.52	-172	342	$1.56 \times 10^6$
	final	1.95	361	4760	$< 1.00 \times 10^3$
K	initial	6.23	-134	354	$7.20 \times 10^7$
	final	1.72	394	1580	$2.93 \times 10^4$
L	initial	6.48	-187	312	$2.96 \times 10^6$
	final	1.40	370	10400	$< 1.00 \times 10^3$
N	initial	6.14	17	291	$5.07 \times 10^7$
	final	2.20	362	2330	$5.73 \times 10^4$

lixiviation et les teneurs en coliformes totaux observées suite aux étapes conventionnelles de digestion aérobie et anaérobie des boues ( $10^7$ - $10^8$  bactéries/100 mL; EPA, 1979), il est évident que la biolixiviation avec le soufre constitue une étape de décontamination microbiologique efficace des boues d'épuration.

## 7.2 Modifications des solides des boues

Les modifications apportées aux solides des boues lors de la biolixiviation ont été examinées par la mesure des solides volatils (SV) et des matières en suspension volatiles (MESV). Pour ces essais, le soufre a été ajouté à la boue sous forme de pastille (bloc), afin de pouvoir enlever le soufre non-oxydé à la fin de la période de lixiviation. La production d'acide sulfurique (tableau 32) cause une augmentation importante des solides volatils (tableau 33). Toutefois, cette hausse est inférieure à la contribution en solides résultante de la production d'acide sulfurique. Cette différence s'explique par la réduction des MESV lors de l'incubation des boues. La réduction des matières en suspension volatiles peut être attribuée au métabolisme endogène de la biomasse, avant que l'acidification de la boue ne permette plus la croissance de la microflore indigène hétérotrophe. Cependant, la désagrégation de la matrice exopolymérique du floc biologique lors de la chute du pH, peut aussi être une cause de la réduction des MESV. Ce phénomène pourrait expliquer que la diminution des MESV n'est pas entièrement notée dans la variation des SV, parce que les polymères extracellulaires seraient transférés dans la fraction soluble lors de la filtration. Les exopolymères libérés par l'acidification ne seraient pas inclus dans les mesures du carbone soluble suite à leur précipitation dans le culot lors de la centrifugation à 20 000 x g (Brown et Lester, 1980; Pavoni et al., 1972).

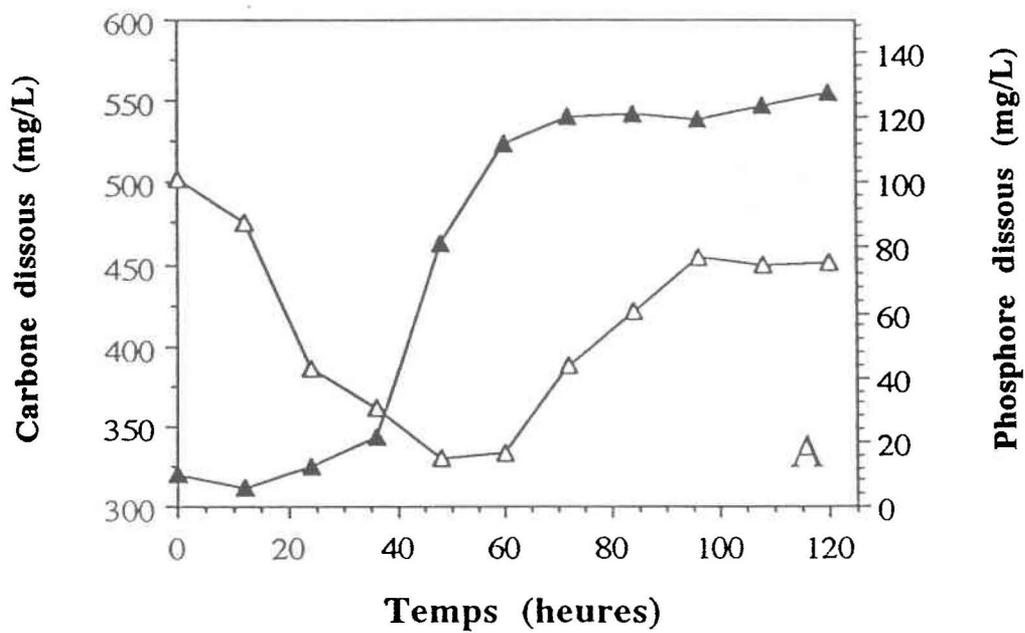
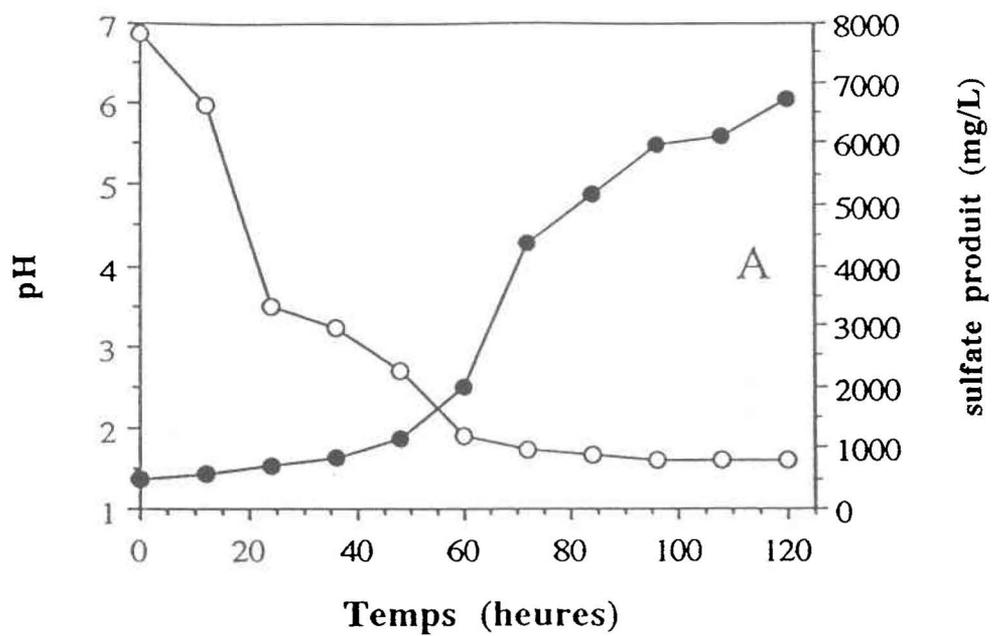
La figure 36 présente deux exemples de la variation du carbone et du phosphore total dans la phase dissous des boues lors de la lixiviation. Une baisse importante du carbone en solution est observée dans les premiers jours de biolixiviation. Cette baisse peut s'expliquer par l'assimilation du carbone dissous par la microflore hétérotrophe. Lorsque le pH descend sous 2.5, l'hydrolyse de la matière organique et la lyse cellulaire entraîne une hausse du carbone en solution. Les teneurs en phosphore dissous sont faibles durant les premiers jours d'incubation. Cependant, lorsque les boues sont acidifiées aux environs de pH 2.0 une solubilisation importante est observée. Ceci indique que la biolixiviation des métaux doit être arrêtée dans une gamme de pH se situant entre pH 2.0 et 2.5 afin d'éviter une perte appréciable du phosphore dans l'effluent. Il faut remarquer que le phosphore solubilisé pourra toutefois être précipité lors de l'étape de neutralisation du lixiviat.

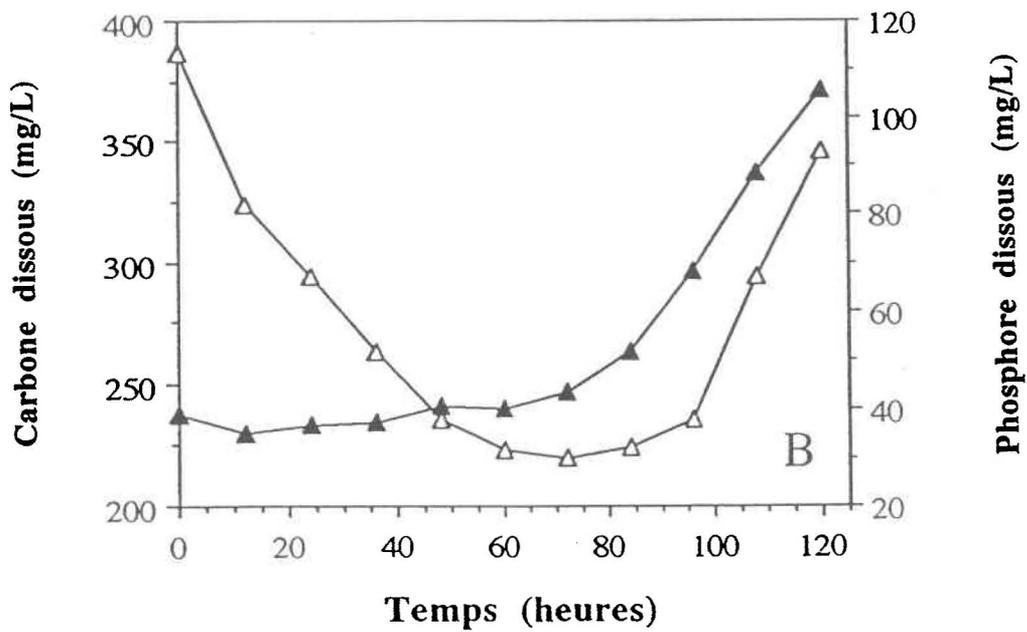
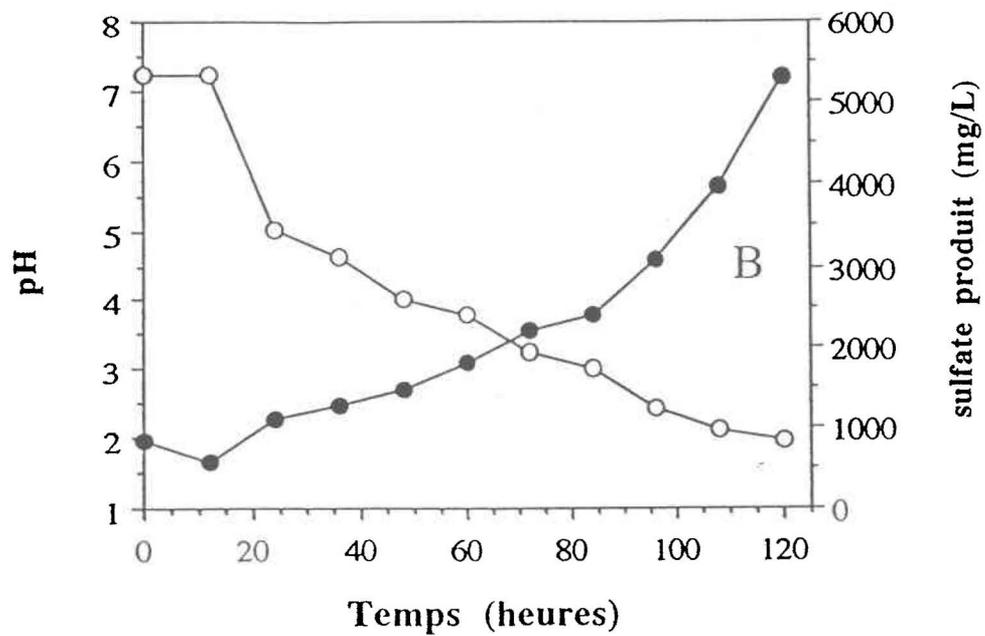
En plus de solubiliser efficacement les métaux, le procédé de biolixiviation avec du soufre permet une destruction efficace des bactéries indicatrices et une réduction significative des MESV. Ces caractéristiques suggèrent que cette technologie pourrait ultérieurement remplacer les procédés conventionnels de digestion des boues. Une étude plus complète de la possibilité de combiner l'étape de stabilisation des boues et de l'extraction des métaux a été réalisée à l'INRS-Eau. La biolixiviation avec le soufre des métaux toxiques des boues d'épuration municipales est présentement à l'étude en bioréacteurs de 10 à 30 litres dans les laboratoires de l'INRS-Eau. La figure 37 montre un schéma du procédé à l'échelle industrielle tel qu'envisagé à l'heure actuelle. Les études en cours, réalisées par Monsieur B. Boulanger et Monsieur B.R. Ravishankar, pourraient toutefois suggérer des modifications importantes à ce procédé pour le traitement des boues, plusieurs variantes technologiques étant explorées.

TABLEAU 33. Variations des solides dans les boues après cinq jours de biolixiviation avec 0.5% de soufre

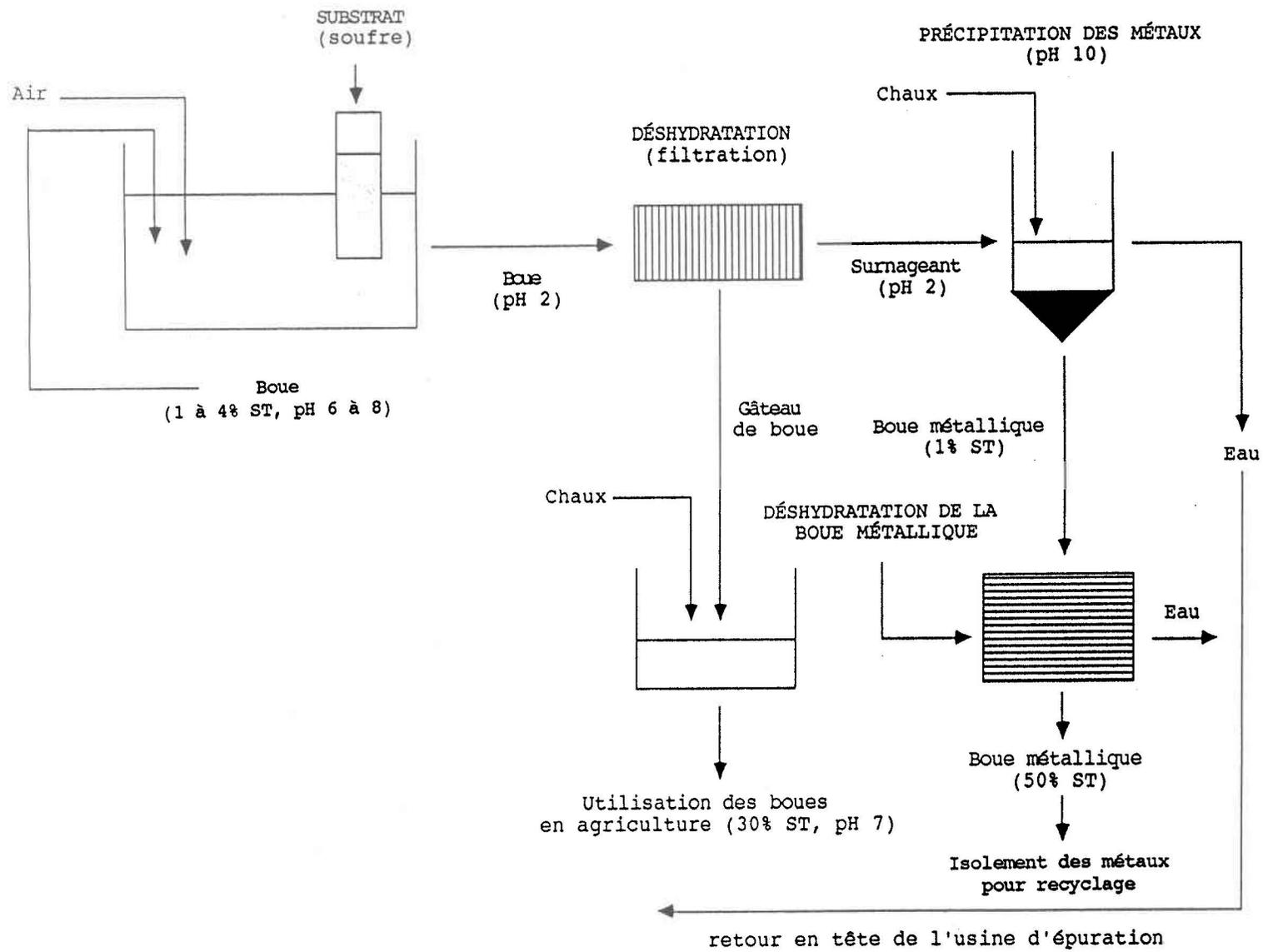
Boues		Solides volatiles (mg/L)	Solides volatiles en suspension (mg/L)
A	initial	8570	8330
	final	11700	5680
	% de réduction	- 36.4	31.8
B	initial	2160	1550
	final	4960	413
	% de réduction	- 129.7	73.3
C	initial	3210	2850
	final	5870	1010
	% de réduction	- 83.2	64.4
D	initial	12500	12100
	final	14300	9410
	% de réduction	- 14.5	22.1
G	initial	9230	8890
	final	13100	6390
	% de réduction	- 41.9	28.1
H	initial	19400	19200
	final	24000	18900
	% de réduction	- 24.1	1.4
I	initial	8780	8350
	final	13200	4950
	% de réduction	- 50.3	40.8
K	initial	1040	993
	final	1880	250
	% de réduction	- 80.2	74.8
L	initial	22300	22200
	final	29700	17700
	% de réduction	- 33.6	20.4
N	initial	4460	4070
	final	6250	3370
	% de réduction	- 40.0	17.2

FIGURE 36. Modifications des concentrations de carbone et de phosphore dans la fraction soluble de la boue lors de la lixiviation microbienne avec soufre. (A) boue secondaire de St-Georges (boue N); (B) boue digérée anaérobie de Valcartier (boue S3). Symboles: (○) pH; (●) sulfate; (△) carbone; (▲) phosphore.

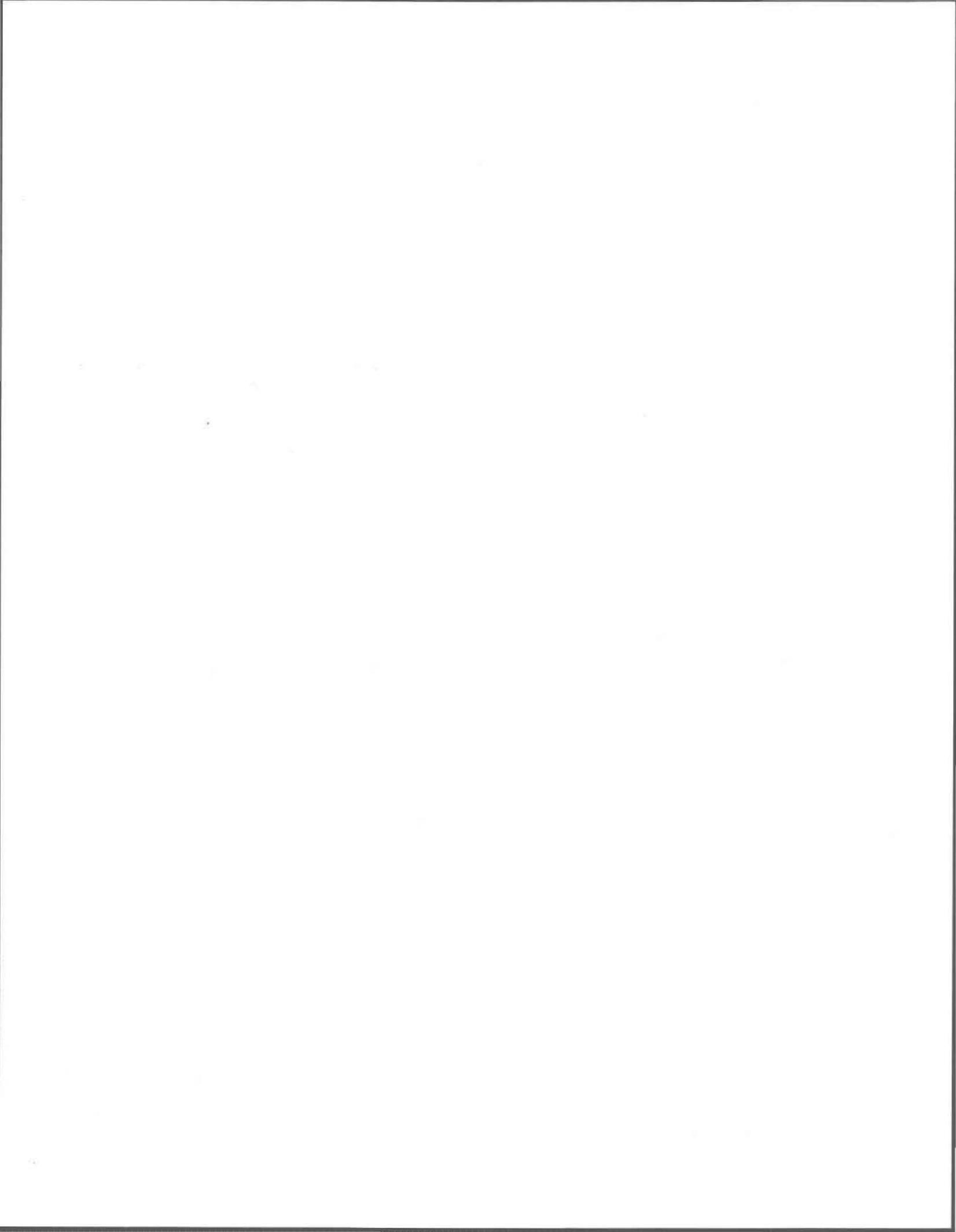




**FIGURE 37. Schéma proposé pour le procédé d'extraction des métaux toxiques des boues d'épuration par biolixiviation avec le soufre.**



## **CHAPITRE 8**



## CHAPITRE 8

### CONCLUSIONS

Les différentes études réalisées sur la biolixiviation des métaux dans les boues d'épuration ont été principalement orientées sur la mise au point et l'optimisation de bioréacteurs. La présente recherche a plutôt été axée sur la compréhension du fonctionnement biologique du système de biolixiviation. Les travaux de recherche présentés dans les chapitres précédents ont donc permis de mettre à jour certaines notions microbiologiques essentielles au développement d'une biotechnologie d'enlèvement des métaux toxiques associés aux boues d'épuration municipales. Ainsi, en plus de contribuer à l'enrichissement des connaissances particulièrement peu élaborées, sur l'extraction biologique des métaux des boues, cette étude a permis de définir les limites d'opérations de ces systèmes, tout en faisant ressortir certaines variantes technologiques jusqu'alors inexplorées.

#### **8.1 Développement des connaissances**

Des études sur l'enrichissement et l'acclimatation sur le soufre élémentaire ou l'ion ferreux de la microflore indigène de 23 boues d'épuration, ont permis de vérifier l'ubiquité des microorganismes oxydant ces deux substrats. Après quelques transferts, la croissance de ces microorganismes entraîne une acidification rapide (production d'acide sulfurique par oxydation

du soufre élémentaire) des boues, ou une hausse importante du potentiel d'oxydo-réduction de ces milieux (production d'ions ferriques par oxydation de l'ion ferreux). La microflore de tous les types de boues d'épuration peut être acclimatée rapidement à l'oxydation des deux substrats. La croissance des microorganismes indigènes oxydant le soufre et l'ion ferreux permet une solubilisation des métaux toxiques à des niveaux compatibles avec une utilisation agricole des boues d'épuration. L'extraction des métaux des boues peut donc être effectuée sans avoir recours à l'acclimatation et au maintien en laboratoire de souches spécialisées. De plus, les résultats obtenus permettent d'affirmer que la solubilisation de métaux mesurée lors des différents essais de biolixiviation avec des souches de *T. ferrooxidans* de la collection ATCC (Couillard et Chartier, 1991; Couillard et Mercier, 1990, 1991a, b; Couillard et al., 1991; Mercier, 1988; Tran, 1989; Tyagi, 1992; Tyagi et Couillard, 1987, 1989; Tyagi et Tran, 1991; Tyagi et al., 1988, 1989, 1990, 1991a, b; Wong et Henry, 1983, 1984, 1988), pourrait résulter de la croissance de la microflore indigène oxydant l'ion ferreux. L'observation des cultures des microflore oxydant l'ion ferreux provenant des 23 boues d'épuration suggère que la biolixiviation avec le sulfate ferreux se fait uniquement par la croissance de souches de *T. ferrooxidans*.

D'autre part, cette étude a démontré que la lixiviation microbienne avec le soufre se fait par la croissance successive de deux groupes de thiobacilles (peu-acidophiles et acidophiles). L'acidification initiale des boues s'effectue lors de la croissance des populations indigènes de thiobacilles peu-acidophiles qui abaissent le pH aux environs de 4.0. À ce moment, les thiobacilles acidophiles provenant de l'ajout d'un inoculum se développent en provoquant une réduction importante du pH de la boue. Lorsque le pH est abaissé à des valeurs inférieures à 3.0, les populations peu-acidophiles viables sont éliminées ( $< 10^3$  UFC/mL). Cette succession bactérienne a été observée dans les divers types de boues d'épuration (secondaire, digérée aérobie, digérée anaérobie), dans des boues incubées à différentes températures (7 °C à 35 °C), et avec des concentrations variables en solides totaux (7 à 70 g/L).

La caractérisation partielle des microflores acclimatées à l'oxydation du soufre a montré que le groupe de thiobacilles acidophiles serait constitué uniquement de *Thiobacillus thiooxidans*. D'autres part, *Thiobacillus thioparus* est l'espèce la plus importante pour l'acidification initiale des boues d'épuration, mais plusieurs autres espèces ont également un rôle mineur dans la production initiale d'acide sulfurique. Des tests de solubilisation des métaux effectués avec une culture mixte de deux souches préalablement isolées et caractérisées (*Thiobacillus thioparus* ATCC 55127 et *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 55128) ont permis de constater que la croissance successive de ces deux bactéries constitue un très bon modèle de la biolixiviation opérée avec les microflores indigènes des boues. Une étude en microscopie électronique à balayage a d'ailleurs indiqué que la colonisation du soufre dans les boues est accomplie presque exclusivement par une flore bactérienne morphologiquement semblable à des thiobacilles. Cette examen microscopique a également montré que les thiobacilles peu-acidophiles se fixent au soufre par contact direct de la membrane cellulaire sur le substrat, alors que les thiobacilles acidophiles peuvent en plus produire des polymères extracellulaires (possiblement du glycocalice) favorisant l'attachement au soufre et à d'autres cellules.

L'étude des cinétiques de croissance et de production de sulfate par des populations lixiviantes témoigne que le type de boues d'épuration n'affecte pas le développement des thiobacilles. Ainsi, les temps de génération des thiobacilles peu-acidophiles mesurés dans 5 boues (deux secondaires, deux digérées aérobie et une digérée anaérobie) se situent entre 6.7 et 8.8 heures, alors que pour les thiobacilles acidophiles ceux-ci varient entre 8.8 et 10.3 heures. Les taux de production de sulfate dans ces boues sont comparables. Les constantes cinétiques pour la croissance de la culture mixte (*T. thioparus* ATCC 55127 et *T. thiooxidans* ATCC 55128) correspondent bien à celles évaluées avec les microflores indigènes. Le temps de génération de *T. thioparus* en croissance dans la boue autoclavée est de 6.9 heures, alors que le temps de division cellulaire moyen pour les thiobacilles

peu-acidophiles des cinq boues est de 7.8 heures. De même, *T. thiooxidans* croît avec un temps de génération de 9.1 heures, alors qu'une période moyenne de 9.5 heures est requise pour la division cellulaire des populations de thiobacilles acidophiles dans les boues. Un taux maximum moyen de production de sulfate de 64 mg  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$  / heure est mesuré pour les microflores indigènes des boues et 68 mg  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$  / heure pour la culture mixte. Finalement, le taux maximum spécifique moyen de production de sulfate avec les microflores indigènes est semblable (2.0 g  $\text{SO}_4^{2-}/\text{g}$  cellules / heure) à celui de la culture mixte. Il est également apparu que l'oxydation du soufre élémentaire dans les boues se fait sans accumulation d'intermédiaires soufrés (thiosulfate, trithionate, tétrathionate) dans le milieu.

L'augmentation du contenu en solides de la boue ne cause pas d'inhibition de la croissance des thiobacilles. Au contraire, les taux spécifiques de croissance des deux types de thiobacilles sont haussés, de même que les taux spécifiques maximum de production de sulfate. Les tests de lixiviation réalisés avec des boues ajustées initialement à divers pH révèlent que si ce paramètre affecte grandement la croissance des thiobacilles peu-acidophiles, le temps de génération des thiobacilles acidophiles demeure stable ainsi que le taux spécifique maximum de production de sulfate. Les deux procédés de biolixiviation (soufre et sulfate ferreux) se sont montrés fortement influencés par la température d'incubation avec les coefficients de température  $Q_{10}^{(7-28)}$  suivants pour la solubilisation des métaux: ion ferreux (Cd: 1.59, Cu: 2.15, Ni: 1.81 et Zn: 1.69) et soufre (Cd: 2.47, Cu: 1.76, Ni: 1.87, Zn: 2.00). Les énergies d'activation de la solubilisation de ces métaux calculées pour la même gamme de température varient entre 30 et 54 kJ/mole pour le procédé avec l'ion ferreux et entre 40 et 64 kJ/mole pour la lixiviation avec soufre. Les énergies d'activation estimées pour la croissance des deux groupes de thiobacilles (acidophiles et peu-acidophiles) sont semblables à 42 kJ/mole, de même que les coefficients de température ( $Q_{10}^{7-28}$ ) à 1.8.

## 8.2 Limites et possibilités de la technologie

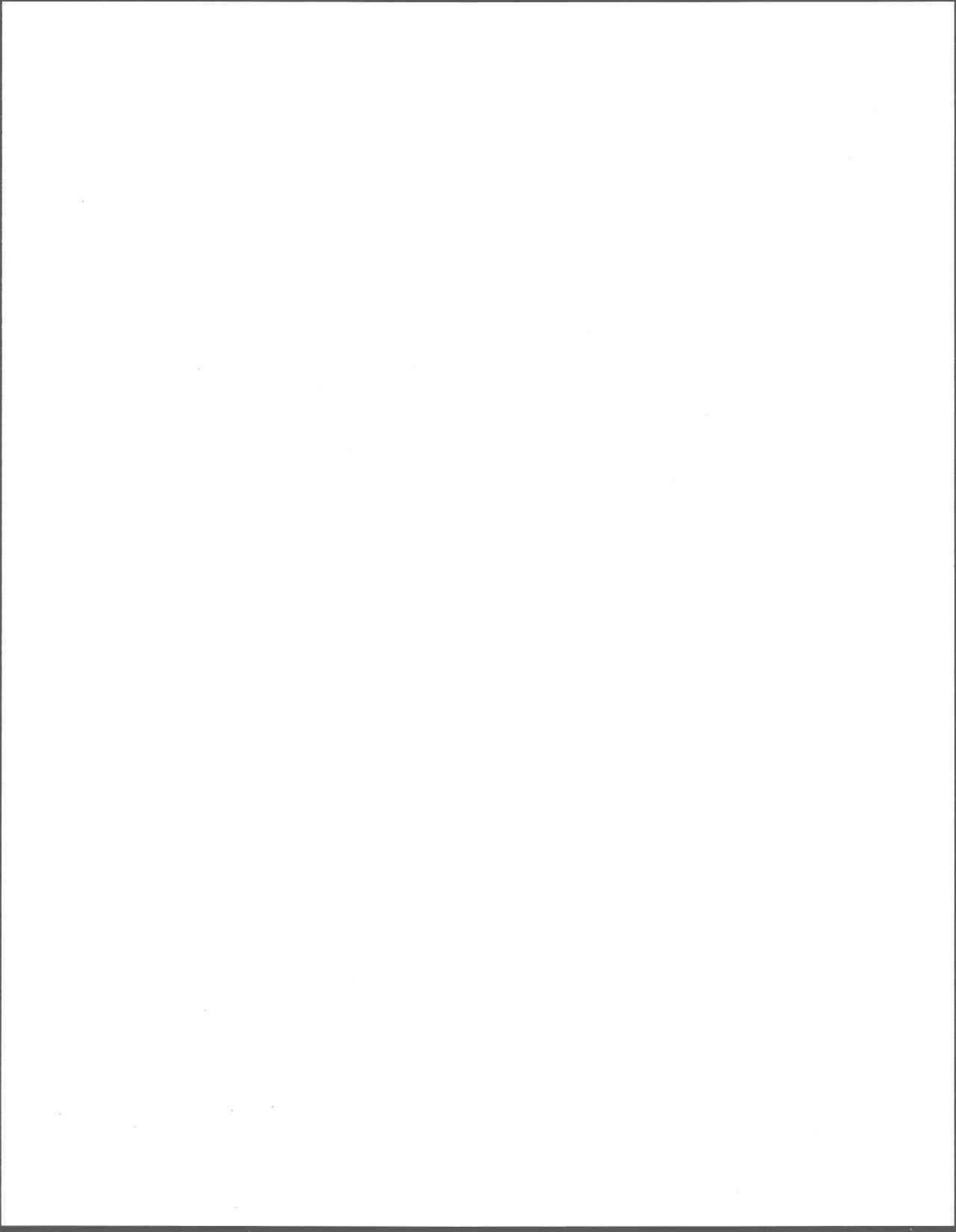
Les travaux exposés dans ce document permettent de faire ressortir certains avantages et inconvénients de la biolixiviation des métaux des boues d'épuration. Les moyennes de solubilisation des métaux obtenues dans les 23 boues d'épuration par le procédé biologique au soufre (5 jours, 28 °C) sont les suivantes: Cd ( $82 \pm 13\%$ ), Cr ( $31 \pm 19\%$ ), Cu ( $75 \pm 21\%$ ), Mn ( $92 \pm 7\%$ ), Ni ( $79 \pm 16\%$ ), Pb ( $27 \pm 21\%$ ) et Zn ( $85 \pm 10\%$ ). Avec le procédé au sulfate ferreux (10 jours, 21 °C) les niveaux de solubilisation atteints sont: Cd ( $74 \pm 13\%$ ), Cr ( $7 \pm 8\%$ ), Cu ( $60 \pm 22\%$ ), Mn ( $89 \pm 8\%$ ), Ni ( $63 \pm 19\%$ ), Pb ( $9 \pm 8\%$ ) et Zn ( $82 \pm 12\%$ ). L'analyse statistique de ces résultats a démontré que les deux procédés sont aussi efficaces l'un que l'autre pour la solubilisation du cadmium, du manganèse et du zinc. Le procédé au soufre s'est avéré meilleur pour l'extraction du cuivre ( $p < 0.05$ ), du nickel ( $p < 0.05$ ), du plomb ( $p < 0.01$ ) et du chrome ( $p < 0.001$ ) que le procédé au sulfate ferreux. Le niveau de contamination des boues peut donc constituer un facteur important dans le choix de l'une ou l'autre des technologies.

Les deux procédés se sont révélés efficaces pour le traitement des divers types de boues générées lors du traitement des eaux usées municipales. De même, les deux traitements sont influencés de façon comparable par la température d'incubation. L'extraction biologique des métaux par ces deux technologies peut être accomplie à des températures aussi basses que 7 °C, ne nécessitant pas ainsi de chauffage du bioréacteur durant la saison hivernale. Les deux traitements peuvent également être effectués avec des boues contenant de hautes concentrations en solides soit 50 g/L pour le procédé avec sulfate ferreux (Tyagi, 1992) et 70 g/L pour le procédé au soufre. Les deux substrats employés (soufre élémentaire et sulfate ferreux) sont peu dispendieux. Cependant, le rejet dans les boues de soufre non-oxydé lors de la lixiviation étant peu souhaitable d'un point de vue écologique, l'utilisation d'une forme de soufre immobilisé ou facilement récupérable permettrait d'éviter ces inconvénients tout en simplifiant l'opération du bioréacteur.

Les métaux solubilisés dans les boues par les deux procédés peuvent être séparés des solides par les méthodes conventionnelles de séparation solide-liquide. La séparation peut être réalisée sur des filtres à plateau ou sous vide, la décantation des boues étant une méthode de séparation inefficace pour les boues issues des deux procédés (Couillard et Mercier, 1990, 1991b). Les métaux traces en solution peuvent être précipités à pH 10 par addition de chaux. La solution (pH 10) obtenue après précipitation des métaux peut être utilisée pour la neutralisation de la fraction solide des boues. La possibilité de récupérer sélectivement les métaux solubilisés pour les recycler dans l'industrie métallurgique est également explorée à l'INRS-Eau. La neutralisation de la boue traitée avec le sulfate ferreux et la précipitation des métaux avec de la chaux (0.12 g Ca(OH)<sub>2</sub>/ g de boue sèche) coûte \$ 8 U.S./ tonne de boue sèche. L'acidification des boues étant plus importante avec le procédé au soufre, le coût de l'ajout de chaux (0.14 g Ca(OH)<sub>2</sub>/ g de boue sèche) serait augmenté à \$ 9.2 U.S./tonne de boue sèche. Aucun ajout d'acide n'étant requis pour le procédé au soufre une économie de \$ 8.5 U.S./tonne de boue sèche est possible en comparaison au procédé avec sulfate ferreux (Tyagi *et al.*, 1988). Les mesures de certains éléments nutritifs dans l'effluent (carbone, azote, phosphore, potassium), effectuées lors de la lixiviation avec soufre, montrent que le pH final doit être contrôlé (2.0 à 2.5) afin d'éviter une forte perte de la valeur fertilisante des boues (N, P, K) et une solubilisation excessive de la matière organique.

De plus, les résultats présentés dans cette étude ont montré que le procédé au soufre permet une destruction efficace des bactéries indicatrices, et peut contribuer à la réduction des matières en suspension volatiles. Ainsi, cette biotechnologie pourrait ultérieurement se substituer au procédé conventionnel de stabilisation aérobie des boues, ou encore être effectuée simultanément dans un même réacteur avec l'étape de digestion aérobie des boues. Ces variantes technologiques permettraient une réduction appréciable des coûts de construction des installations tout en simplifiant le processus de traitement des eaux usées. Les coûts assignés à la stabilisation aérobie étant particulièrement onéreux (\$ 60 U.S./tonne de boue sèche; EPA,

1979), le remplacement de la stabilisation aérobie traditionnelle des boues par une simple étape de biolixiviation avec du soufre constituerait une innovation importante dans le domaine du traitement des eaux usées municipales. Les travaux effectués avec le procédé au sulfate ferreux ont par ailleurs démontré que cette technologie ne peut être combinée à la stabilisation aérobie des boues, étant donné le bas pH requis pour le début de la biolixiviation (Couillard *et al.*, 1991). Si les deux procédés biologiques d'extraction des métaux étudiés dans cette recherche présentent certaines limites, ceux-ci semblent toutefois être une voie prometteuse pour l'enlèvement des métaux toxiques des boues municipales.



## **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- Adair F.W. et K. Gundersen** (1969) Chemoautotrophic sulfur bacteria in the marine environment. I. Isolation, cultivation, and distribution. Can. J. Microbiol. **15**, 345-353.
- Adamu C.A., P.F. Bell et C. Mulchi** (1989) Residual metal concentrations in soils and leaf accumulations in tobacco a decade following farmland application of municipal sludge. Envir. Pollut. **56**, 113-126.
- Ahonen L. et O.H. Tuovinen** (1989a) Effect of temperature on the microbiological leaching of sulfide ore material in percolators containing chalcopyrite, pentlandite, sphalerite and pyrrhotite as main minerals. Biotechnol. Lett. **11**, 331-336.
- Ahonen L. et O.H. Tuovinen** (1989b) Microbiological oxidation of ferrous iron at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 312-316.
- Ahonen L. et O.H. Tuovinen** (1990) Kinetics of sulfur oxidation at suboptimal temperatures. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 560-562.
- Ahonen L. et O.H. Tuovinen** (1991) Temperature effects on bacterial leaching of sulfide minerals in shake flask experiments. Appl. Environ. Microbiol. **57**, 138-145.
- Alleman J.E., E.H. Bryan, T.A. Stumm, W.W. Marlow et R.C. Hocevar** (1990) Sludge-amended brick production: applicability for metal-laden residues. Sludge Management Conference, Compte rendu, Loyola Marymount University, Los Angeles, U.S.A.
- Andrews G.F. et J. Maczuga** (1982) Bacterial coal desulfurization. Biotechnol. Bioeng. Symp. **12**, 337-348.
- Angelidis M. et R.J. Gibbs** (1989) Chemistry of metals in anaerobically treated sludges. Wat. Res. **23**, 29-33.
- APHA, AWWA et WPCF** (1989) Standards Methods for Examination of Water and Wastewaters. 17<sup>ième</sup> Édition. American Public Health Association, Washington, D.C, U.S.A.
- Baldensperger J., L.J. Guarraja et W.J. Humphreys** (1974) Scanning electron microscopy of thiobacilli grown on colloidal sulfur. Arch. Microbiol. **99**, 323-329.
- Barton L.L. et J.M. Shively** (1968) Thiosulfate utilization by *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 8085. J. Bacteriol. **95**, 720.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Beijerinck M.W. (1904) Phénomènes de réduction produits par les microbes. Arch. Sci. Exactes Nat. **9**, 131-157.
- Berry V.K. et L.E. Murr (1978) Direct observations of bacteria and quantitative studies of their catalytic role in the leaching of low-grade, copper-bearing waste. Dans Metallurgical applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena. L.E. Murr, A.E. Torma et J.A. Brierley (Éditeurs), Academic Press, New York, U.S.A, pp. 103-136.
- Berthelin J. (1987) Des bactéries pour extraire des métaux. La Recherche. **188**, 720-725.
- Beyer M., H.G. Ebner, H. Assenmacher et J. Frigge (1987) Elemental sulphur in microbiologically desulphurized coals. FUEL, **66**, 551-555.
- Bloomfield C. et G. Pruden (1975) The effects of aerobic and anaerobic incubation on the extractabilities of heavy metals in digested sewage sludge. Envir. Pollut. **8**, 217-232.
- Bonnefont J.L., Y.P. Martin et B. Guiennet (1990) Étude expérimentale de la décroissance des bactéries fécales en milieu marin: quantification, facteurs impliqués. Wat. Res. **24**, 267-273.
- Bosecker K. (1986) Bacterial metal recovery and detoxification of industrial waste. Biotechnol. Bioeng. Symp. **16**, 105-120.
- Bowden A.V. (1987) Survey of European sludge treatment and disposal practices. Water Research Centre Rep., 1656-M.
- Bowen P.T., J.E. Hendrick, T.A. Woodward, L.S. Mitchell et M. Lahlou (1989) Sludge treatment, utilization, and disposal. J. Wat. Pollut. Control Fed. **61**, 821-829.
- Brannan D.K. et D.E. Caldwell (1980) *Thermotrix thiopara*: growth and metabolism of a newly isolated thermophile capable of oxidizing sulfur and sulfur compounds. Appl. Environ. Microbiol. **40**, 211-216.
- Brierley C.L. et N.W. LeRoux (1978) Bacterial leaching. CRC Crit. Rev. Microbiol. **6**, 207-262.
- Brown M.J. et J.N. Lester (1979) Metal removal in activated sludge: The role of bacterial extracellular polymers. Wat. Res. **13**, 817-837.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Brown M.J. et J.N. Lester** (1980) Comparaison of bacterial extracellular polymer extraction methods. Appl. Environ. Microbiol. **40**, 179-185.
- Bruce A.M. et R.D. Davis** (1989) Sewage sludge disposal: current and future options. Wat. Sci. Technol. **21**, 1113-1128.
- Brune D.C.** (1989) Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. Biochim. Biophysica Acta, **975**, 189-221.
- Bryant R.D., J.W. Costerton et E.J. Laishley** (1984) The role of *Thiobacillus albertis* glycocalyx in the adhesion of cells to elemental sulfur. Can. J. Microbiol. **30**, 81-90.
- Bryant R.D., K.M. McGroarty, J.W. Costerton et E.J. Laishley** (1983) Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). Can. J. Microbiol. **29**, 1159-1170.
- Caldwell D.E., S.J. Caldwell et J.P. Laycock** (1976) *Thermothrix thioparus* gen. et sp. nov. a facultatively anaerobic chemolithotroph living at neutral pH and high temperature. Can. J. Microbiol. **22**, 1509-1517.
- Calmano W., W. Ahlf et U. Förstner** (1985) Heavy metal removal from contaminated sludges with dissolved sulfur dioxide in combination with bacterial leaching. Dans Heavy Metals in the Environment. International Conference. Vol. 2, J.P. Vernet (Éditeur), CEP Consultants Ltd., Comptes rendus, Athènes, Grèce, pp. 952-955.
- Coker E.G. et P.J. Matthews** (1983) Metals in sewage sludge and their potential effects in agriculture. Wat. Sci. Technol. **15**, 209-225.
- Colmer A.R. et M.E. Hinkle** (1947) The role of microorganisms in Acid Mine Drainage: A preliminary report. Science, **106**, 253-256.
- Cornwell D.A., G.P. Westermoff et G.C. Cline** (1980) Batch feasibility testing of heavy metals removal from wastewater sludge with liquid-ion exchange. Proc. Mid. Atlantic Waste Conf, Comptes rendus, 13-15 juillet, Bucknell Univ., Lewisburg, PA, U.S.A., pp. 111-119.
- Costerton J.W. et R.T. Irvin** (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. **35**, 299-324.
- Costerton J.W., G.G. Geesey et K.J. Cheng** (1978) How bacteria stick. Sci. Am. **238**, 86-95.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Couillard D.** (1988) Étude de quelques indices de croissance du *Larix laricina* fertilisé par des boues anaérobies. Envir. Technol. Lett. **9**, 191-206.
- Couillard D. et M. Chartier** (1991) Removal of metals from aerobic sludges by biological solubilization in batch reactors. J. Biotechnol. **20**, 163-180.
- Couillard D. et Y. Grenier** (1987) Alternative à la gestion des boues résiduaires municipales: recyclage en sylviculture. Sci. Tech. Eau **20**, 215-220.
- Couillard D. et G. Mercier** (1990) Bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge-bioreactors comparison. Envir. Pollut. **66**, 237-253.
- Couillard D. et G. Mercier** (1991a) Optimum residence time (in CSTR and airlift reactor) for bacterial leaching of metals from anaerobic sewage sludge. Wat. Res. **25**, 211-218.
- Couillard D. et G. Mercier** (1991b) Procédé de solubilisation biologique des métaux dans les boues anaérobies d'épuration: filtrabilité, neutralisation et teneurs en N et P des boues traitées. Can. J. Chem. Eng. **69**, 779-787.
- Couillard D., M. Chartier et G. Mercier** (1991) Bacterial leaching of heavy metals from aerobic sludge. Bioresource Technol. **36**, 293-302.
- Couillard D., M. Crowley et J.L. Sasseville** (1986) Technological public choice in practice: the case of wastewater treatment facilities. J. Environ. Manag. **22**, 133-146.
- Crowley M., J.L. Sasseville et D. Couillard** (1986) L'importance accordée à l'évaluation technologique dans l'assainissement des eaux usées municipales au Québec. Rev. Int. Sci. Eau **2**, 49-57.
- Davis R.D., et C.H. Carlton-Smith** (1980) Crops as indicators of the significance of contamination of soil by heavy metals. Technical Report 140, Water Research Centre.
- Davis R.D.** (1987) Use of sewage sludge on land in the United Kingdom. Wat. Sci. Technol. **19**, 1-8.
- Davis R.D. et C.H. Carlton-Smith** (1984) An investigation into the phytotoxicity of zinc, copper and nickel using sewage sludge of controlled metal content. Envir. Pollut. **B8**, 163-185.
- Davis J.A., et J. Jacknow** (1975) Heavy metals in wastewater in three urban areas. J. Wat. Pollut. Control Fed. **47**, 2292-2297.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Debus** (1989) Identifying the biohydrometallurgical processes with the greatest probability of commercial adoption. *Dans Biohydrometallurgy. International Conference*. J. Salley, R.G.L. McCready et P.L. Wichlacz (Éditeurs), CANMET SP89-10, Comte rendu, 13 au 18 août, Jackson Hole, Wyoming, U.S.A., pp. 487-498.
- Doyle P.J., J.N. Lester et R. Perry** (1978) Survey of litterature and experience on the disposal of sewage sludge on land. Final Report to the U.K. Department of the Environment, septembre.
- Dempsey M.J.** (1981) Colonization of antifouling paints by marine bacteria. *Botanica Marina*, **24**, 185-191.
- Dudley D.J., M.N. Guentzel, M.J. Ibarra, B.E. Moore et B.P. Sagik** (1980) Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 118-126.
- Eashwar M., S. Maruthamuthu et K. Balakrishnan** (1990) Occurence of thiobacilli in Tuticorin harbour waters. *Indian J. Marine Sci.* **19**, 107-109.
- Ehrlich H.L. et C.L. Brierley** (1990) *Microbial Mineral Recovery*. H.L. Ehrlich et C.L. Brierley (Éditeurs), McGraw-Hill Publishing Company, New York, U.S.A., 479 pages.
- Elliot H.A.** (1986) Land application of municipal sewage sludge. *J. Soil Wat. Conserv.* **41**, 5-10.
- Environnement Canada** (1984) Le soufre. Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa, Ontario, 58 pages.
- Environnement Canada** (1985) L'épandage des eaux usées traitées et des boues d'épuration d'origine urbaine. Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa, Ontario, Rapport SPE 6-EP-84-1, 190 pages.
- EPA** (1979) Sludge treatment and disposal. Process design manual. Center for Environmental Research Information, Cincinnati, U.S.A., EPA-625/1-79-011.
- EPA** (1982) The 40 city study. *Dans Fate of priority pollutants in publicly owned treatment works*. Vol. 1, Industrial Technology Division, Washington, D.C., U.S.A., EPA 440/1-82-303.
- EPA** (1981) Composting processes to stabilize and disinfect municipal sewage sludge. Office of Water Program Operations, U.S. Environmental Protection Agency, EPA-430/9-81-011.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- EPA (1983) Land application of municipal sludge. Process design manual. Center for Environmental Research Information, Cincinnati, U.S.A., EPA-625/1-83-016, 466 pages.
- EPA (1984) Environmental regulations and technology. Use and disposal of municipal wastewater sludge. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-625/10-84-003, 76 pages.
- EPA (1990) National sewage sludge survey; availability of information and data, and anticipated impacts on proposed regulations, proposed rule. U.S. Fed. Register, **55**, 47209-47283.
- Fernandez A.L. et E.A. Vilda (1988) Ecology of some species of *Thiobacillus* and sulfate-reducing bacteria in the middle course of the river Guadalquivir (Spain). Int. Revue ges. Hydrobiol. **73**, 309-318.
- Ferroni G.D., L.G. Leduc et M. Todd (1986) Isolation and temperature characterization of psychotrophic strains of *Thiobacillus ferrooxidans* from the environment of a uranium mine. J. Gen. Appl. Microbiol. **32**, 169-175.
- Flynn F., J.M. Jalbert, R. Robert, A. St-Yves, A. Terreault et G. Trudel (1984) Recueil des documents sur la gestion des boues provenant de l'épuration des eaux usées. Ministère de l'Environnement, Gouvernement du Québec.
- Flynn F., J. M. Jalbert, J. Robert, A. St-Yves, A. Terreault et G. Trudel (1987) Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Guide de bonnes pratiques. Ministère de l'Environnement du Québec, 60 pages.
- Förstner U. et G.T.W. Wittmann (1979) Toxic Metals. Dans Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne, pp. 3-68.
- Friedrich C.G. et G. Mitrenga (1981) Oxidation of thiosulfate by *Paracoccus denitrificans* and other hydrogen bacteria. FEMS Microbial Lett. **10**, 209-212.
- Gauthier M.J. et V.A. Breittmayer (1990) La pollution bactérienne de la mer. La Recherche, **223**, 910-912.
- Gibbs R.J. et M. Angelidis (1988) Metal chemistry differences between digested and undigested sludges. J. Wat. Pollut. Control Fed. **60**, 113-118.
- Gore P.S., O. Raveendran et R.V. Unnithan (1986) Studies on thiobacilli spp. isolated from sandy beaches of Kerala. Fishery Technol. **23**, 183-188.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Gouvernement du Québec** (1984) Rapport sur la qualité des boues des stations d'épuration et autres boues. Ministère de l'Environnement du Québec, 74 pages.
- Grishin S.I. et O.H. Tuovinen** (1989) Scanning electron microscopic examination of *Thiobacillus ferrooxidans* on different support matrix materials in packed bed and fluidized bed bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. **31**, 505-511.
- Groudev S.N. et V.I. Groudeva** (1986) Biological leaching of aluminium from clays. Biotechnol. Bioeng. Symp. **16**, 91-99.
- Guay R. et M. Silver** (1975) *Thiobacillus acidophilus* sp. nov.; isolation and some physiological characteristics. Can. J. Microbiol. **21**, 281-288.
- Guay R., M. Silver et A.E. Torma** (1976) Base composition of DNA isolated from *Thiobacillus ferrooxidans* grown on different substrates. Rev. Can. Biol. **35**, 61-67.
- Guay R., A.E. Torma et M. Silver** (1975) Oxydation de l'ion ferreux et mise en solution de l'uranium d'un minerai par *Thiobacillus ferrooxidans*. Ann. Microbiol. (Inst Pasteur), **126 B**, 209-219.
- Harper S.R., C.C. Ross et G.E. Valentine** (1988) Agricultural wastes. J. Wat. Pollut. Control Fed. **60**, 876-884.
- Harrison A.P. Jr.** (1978) Microbiol sucession and mineral leaching in an artificial coal spoil. Appl. Environ. Microbiol. **36**, 861-869.
- Harrison A.P. Jr.** (1983) Genomic and physiological comparaisons between heterotrophic thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp nov., and *Thiobacillus acidophilus* nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. **33**, 211-217.
- Hattori H.** (1988) Microbial activities in soil amended with sewage sludges. Soil Sci. Plant Nutr. **34**, 221-232.
- Hayes T.D., W.J. Jewell et R.M. Kabrick** (1980) Heavy metals removal from sludges using combined biological/chemical treatment. 34th Ind. Waste Conf., Compte rendu, Purdue Univ., West Lafayette, Indiana, U.S.A, pp. 529-543.
- Henry G., D. Prasad et W. Lohaza** (1988) Survival of indicator bacteria during leaching. A.S.C.E. Nat. Conf. Env. Eng., Compte rendu, 13-15 juillet, Vancouver, Canada, pp. 369-376.
- Henry G., D. Prasad et W. Lohaza** (1991) Fate of indicator organisms in sludge during bacterial leaching of metals. Can. J. Civ. Eng. **18**, 237-243.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Hoffmann M.R., B.C. Faust, F.A. Panda, H.H. Koo et H.M. Tsuchiya (1981) Kinetics of the removal of iron pyrite from coal by microbial catalysis. Appl. Environ. Microbiol. **42**, 259-271.
- Huber H. et K.O. Stetter (1989) *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal field. Arch. Microbiol. **151**, 479-485.
- Huber H. et K.O. Stetter (1990) *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 315-322.
- Huber T.F., N.W.F. Kossen, P. Bos et J.G. Kuenen (1984) Design and scale up of a reactor for microbial desulphurization of coal: A regime analysis. Dans Innovations in Biotechnology. E.H. Houwink et R.R. van der Meer (Éditeurs), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Pays-Bas, pp. 179-189.
- Hutchins S.R., M.S. Davidson, J.A. Brierley et C.L. Brierley (1986) Microorganisms in reclamations of metals. Ann. Rev. Microbiol. **40**, 311-336.
- Hutchinson M., K.I. Johnstone et D. White (1965) The taxonomy of certain thiobacilli. J. Gen. Microbiol. **41**, 357-366.
- Hutchinson M., K.I. Johnstone et D. White (1966) Taxonomy of the acidophilic thiobacilli. J. Gen. Microbiol. **44**, 373-381.
- Hutchinson M., K.I. Johnstone et D. White (1967) Taxonomy of anaerobic thiobacilli. J. Gen. Microbiol. **47**, 17-23.
- Hutchinson, M., K.I. Johnstone et D. White (1969) Taxonomy of the genus *Thiobacillus*: The outcome of numerical taxonomy applied to the group as a whole. J. Gen. Microbiol. **57**, 397-410.
- Ibiebele D.D. et A.D. Inyang (1986) Environmental movement of indicator bacteria from soil amended with undigested sewage sludge. Envir. Pollut. (Series A) **40**, 53-62.
- Islander R.L., J.S. Devanny, F. Mansfeld, A. Postyn et H. Shih (1991) Microbial ecology of crown corrosion in sewers. J. Environ. Eng. **117**, 751-770.
- Jackson J.F., D.J.W. Moriarty et D.J.D. Nicholas (1968) Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of thiobacilli and some nitrifying bacteria. J. Gen. Microbiol. **53**, 53-60.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Jacobs A. et M. Silver (1990) From ocean disposal to landfill cover. Wat. Eng. Manag. mars, 28-31.
- Jain D.K. et R.D. Tyagi (1992) Heavy metals leaching from anaerobic sewage sludges by sulphur-oxidizing bacteria. Enzym. Microbiol. Technol. (sous presse).
- Jenkins R.L., B.J. Scheybeler, M.L. Smith, R. Baird, M.P. Lo et R.T. Huang (1981) Metals removal and recovery from municipal sludge. J. Wat. Pollut. Control Fed. 53, 25-32.
- Jokela E.J., W.H. Smith et S.R. Colbert (1990) Growth and elemental content of slash pine 16 years after treatment with garbage composted with sewage sludge. J. Environ. Qual. 19, 146-150.
- Kadota H. et Y. Ishida (1972) Production of volatile sulphur compounds by microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 26, 127-138.
- Kanagawa T. et D.P. Kelly (1986) Breakdown of dimethyl sulphide by mixed cultures and by *Thiobacillus thioparus*. FEMS Microbiol. Lett. 34, 13-19.
- Kanagawa T. et E. Mikami (1989) Removal of methanediol, dimethyl sulfide, dimethyl disulfide, and hydrogen sulfide from contaminated air by *Thiobacillus thioparus* TK-m. Appl. Environ. Microbiol. 55, 555-558.
- Karavaiko G.I., S.I. Kuznetsov et A.I. Golonizik (1977) The bacterial leaching of metals from ores. G.I. Karavaiko, S.I. Kuznetsov et A.I. Golonizik (Éditeurs), Technicopy Limited, Stonehouse, Angleterre, 205 pages.
- Kargi F. et T.D. Cervoni (1983) An airlift-recycle fermenter for microbial desulfurization of coal. Biotechnol. Lett. 5, 33-38.
- Katayama-Fujimura Y., N. Tsuzaki et H. Kuraishi (1982) Ubiquinone, fatty acid and DNA base composition determination as a guide to the taxonomy of the genus *Thiobacillus*. J. Gen. Microbiol. 128, 1599-1611.
- Kelly D.P. (1969) Regulation of chemoautotrophic metabolism. I. Toxicity of phenylalanine to thiobacilli. Arch. Microbiol. 69, 330-342.
- Kelly D.P., L.A. Chambers et P.A. Trudinger (1969) Cyanolysis and spectrophotometric estimation of trithionate in mixture with thiosulfate and tetrathionate. Anal. Chem. 41, 898-901.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Kelly D.P. et A.P. Harrison (1988) Genus *Thiobacillus*. Dans Bergey's manual of determinative bacteriology. J. G. Holt, J.T. Staley, M.P. Bryant et N. Pfennig (Éditeurs), Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, U.S.A, pp. 1842-1858.
- Khalid Z.M. et K.A. Malik (1987) Isolation and characterization of some acidophilic thiobacilli from sewage waters. Pakistan. J. Sci. Ind. Res. **30**, 905-908.
- Klein L.A., M. Lang, N. Nash et S.L. Kirschner (1974) Sources of metals in New York city wastewater. J. Wat. Pollut. Control Fed. **12**, 2653-2662.
- Kreye W.C., P.H. King et C.W. Randall (1973) Biological treatment of high thiosulfate industrial wastewater. 37th Conference on Industrial Waste, Comptes rendus, Purdue University, Lafayette, Indiana, U.S.A, pp. 537-547.
- Kuenen J.G. et O.H. Tuovinen (1981) The genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira*. Dans The Prokaryotes. M.P. Starr (Éditeur), Springer-Verlag, Berlin, Allemagne, pp. 1022-1036.
- Laishley E.J., R.D. Bryant, B.W. Kobryn et J.B. Hyne (1986) Microcrystalline structure and surface area of elemental sulphur as factors influencing its oxidation by *Thiobacillus albertis*. Can. J. Microbiol. **32**, 237-242.
- Laishley E.J., K. Rae, A.M. Dillman et R.D. Bryant (1988) Characterization of a new less acidophilic *Thiobacillus* isolate (*Thiobacillus capsulatus*). Can. J. Microbiol. **34**, 960-966.
- Lake D.L., P.W.W. Kirk et J.N. Lester (1984) Fractionation, characterization, and speciation of heavy metals in sewage sludge and sludge-amended soils: A review. J. Environ. Qual. **13**, 175-183.
- Lane D.J., D.A. Stahl, G.J. Olsân, D.J. Heller et N.R. Pace (1985) Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5s rRNA sequences. J. Bacteriol. **163**, 75-81.
- Lee A., J.H. Watkinson, G. Orbell, J. Bagyaraj et D.R. Lauren (1987) Factors influencing dissolution of phosphate rock and oxidation of elemental sulphur in some New Zealand soils. New Zealand J. Agric. Res. **30**, 373-385.
- Legret M., L. Divet et P. Marchandise (1987) Mobilité et extraction des métaux lourds associés aux boues de stations d'épuration. Wat. Res. **21**, 541-547.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Lester J.N., R.M Sterrit et P.W.W. Kirk (1983) Significance and behaviour of metals in waste water treatment processes. I. Sewage treatment and effluent discharge. Sci. Total Envir. **30**, 1-44.
- Levine M.B., A.T. Hall, G.W. Barrett et D.H. Taylor (1989) Heavy metal concentrations during ten years of sludge treatment to an old-field community. J. Environ. Qual. **18**, 411-418.
- Lo K.S.L. et Y.H. Chen (1990) Extracting heavy metals from municipal and industrial sludges. Sci. Total Envir. **90**, 99-116.
- Logan T.J. et R.E. Feltz (1985) Effect of aeration, cadmium concentration and solids content on acid extraction of cadmium from a municipal wastewater sludge. J. Wat. Pollut. Control Fed. **57**, 406-412.
- London J. (1963) *Thiobacillus intermedius* nov. sp., a novel type of facultative autotroph. Arch. Microbiol. **46**, 328-337.
- London J. et S.C. Rittenberg (1967) *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic *Thiobacillus*. Arch. Microbiol. **59**, 218-225.
- Lu M.C., A. Matin et S. Rittenberg (1971) Inhibition of growth of obligately chemolithotrophic thiobacilli by amino acids. Arch. Microbiol. **79**, 354-366.
- Lundgren D.G. (1975) Microbiological problems in strip mine areas: relationship to the metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. Ohio J. Sci. **75**, 280-287.
- Lundgren D.G. et M. Silver (1980) Ore leaching by bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **34**, 263-283.
- Mahmoud S.A.Z., M.M. Zaki et A.E. El-Hafez (1977) A survey of sulfur oxidizing and sulfate reducing bacteria in different Egyptian soils. Egypt J. Microbiol. **12**, 15-22.
- Manning H.L. (1975) New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidophilic bacteria from acid mine drainage. Appl. Microbiol. **30**, 1010-1016.
- Markosyan G.E. (1972) A new acidophilic iron bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. Biol. Zh. Arm. **25**, 26-31.
- Markosyan G.E. (1973) A new mixotrophic sulfur bacterium developing in acid media, *Thiobacillus organoparus* sp. n. Doklady Akademii nauk SSSR, **211**, 1205-1208.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Marmur J.** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. **3**, 208-218.
- Martin J.H.Jr., H.E. Bostian et G. Stern** (1990) Reductions of enteric microorganisms during aerobic sludge digestion. Wat. Res. **24**, 1377-1385.
- Matin A.** (1978) Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **32**, 433-468.
- McNulty K.J., A.T. Malarkey, R.L. Goldsmith et M.A. Fremont** (1977) Development of a new process for sludge conditioning. National Conference on Composting of Municipal Residue and Sludge, Compte rendu, 23-25 août, Rockville, MD, U.S.A.
- Mercier G.** (1988) L'extraction biologique des métaux lourds des boues anaérobies d'épuration. Mémoire de maîtrise ès Sciences de l'eau, INRS-Eau, Université du Québec.
- Meyer W.C. et T.F. Yen** (1976) Enhanced dissolution of oil shale by bioleaching with thiobacilli. Appl. Environ. Microbiol. **32**, 610-616.
- Milde K., W. Sand, W. Wolff et E. Bock** (1983) Thiobacilli of the corroded concrete walls of the Hamburg sewer system. J. Gen. Microbiol. **129**, 1327-1333.
- Mininni G. et M. Santori** (1987) Problems and perspectives of sludge utilization in agriculture. Ecosystem Envir. **18**, 291-311.
- Mizoguchi T., T. Sato et T. Okabe** (1976) New sulfur-oxidizing bacteria capable of growing heterotrophically, *Thiobacillus rubellus* nov. sp. and *Thiobacillus delicatus* nov. sp. J. Ferment. Technol. **54**, 181-191.
- Nakamura D., T. Noike et J. Matsumoto** (1986) Effect of Operation Conditions on Biological Fe<sup>2+</sup> Oxidation with Rotating Biological Contactors. Wat. Res. **20**, 73-77.
- Okereke A. et S.E. Stevens** (1991) Kinetics of iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. **57**, 1052-1056.
- Olem H. et R.F. Unz** (1977) Acid Mine Drainage Treatment with Rotating Biological Contactors. Biotechnol. Bioeng. **19**, 1475-1491.
- Oliver B.G. et J.H. Carey** (1976) Acid solubilisation of sewage sludge and ash constituents for possible recovery. Wat. Res. **10**, 1077-1081.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Olver J.W., W.C. Kreye et P.H. King (1975) Heavy metal release by chlorine oxidation of sludge. J. Wat. Pollut. Control Fed. **47**, 2490-2497.
- Paerl H.W. (1980) Attachment of microorganisms to living and detrital surfaces in freshwater systems. *Dans Adsorption of Microorganisms to Surfaces*. G. Bitton, K.C. Marshall et K.C. Wiley (Éditeurs), New York, U.S.A., pp. 375-402.
- Pahren H.R. (1987) Microorganisms in municipal solid waste and public health implications. CRC Crit. Rev. Environ. Control, **17**, 187-228.
- Parker C.D. et J. Prisk (1953) The oxidation of inorganic compounds of sulphur bacteria. J. Gen. Microbiol. **8**, 344-364.
- Pavoni J.L., M.W. Tenney et W.F. Echelberger (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation. J. Wat. Pollut. Control Fed. **71**, 583-604.
- Pesic B., D.J. Oliver et P. Wichlacz (1989) An electrochemical method of measuring the oxidation rate of ferrous to ferric iron with oxygen in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioeng. **33**, 428-439.
- Reynolds, D.M., E.J. Laishley et J.W. Costerton (1981) Physiological and ultrastructural characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. kabobis*). Can. J. Microbiol. **59**, 151-161.
- Rittenberg S.C. (1969) The roles of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. Adv. Microbial Physiol. **3**, 159-196.
- Rossi A. et H.N.Jr. Arst (1990) Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at moderate pH. FEMS Microbiol. Lett. **66**, 51-54.
- Roth L.A. et D. Keenan (1971) Acid injury of *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. **17**, 1005-1008.
- Sand W. (1987) Importance of hydrogen sulfide, thiosulfate, and methylmercaptan for growth of thiobacilli during simulation of concrete corrosion. Appl. Environ. Microbiol. **53**, 1645-1648.
- Schaeffer W. I., P. E. Holbert et W. W. Umbreit (1963) Attachment of *Thiobacillus thiooxidans* to sulfur crystals. J. Bacteriol. **85**, 137-140.
- Scheltinga H.M.J. (1987) Sludge in agriculture: the European approach. Wat. Sci. Technol. **19**, 9-18.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Schmidt G.D. et L.S. Roberts (1989)** Order Ascaridata: large intestinal roundworms. *Dans Foundations of parasitology*. 4<sup>ième</sup> édition, G.D. Schmidt et L.S. Roberts (Éditeurs), Times Mirror/ Mosby College Publishing, St-Louis, MI, U.S.A, chap. 27.
- Schönborn W. et H. Hartmann (1978)** Bacterial leaching of metals from sewage sludge. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **5**, 305-313.
- Scott D.S. et H. Horlings (1975)** Removal of phosphates and metals from sewage sludges. *Envir. Sci. Technol.* **9**, 849-855.
- Silverman M.P. et D.G. Lundgren (1959)** Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yield. *J. Bacteriol.* **77**, 642-647.
- Silverman M.P. et E.F. Munoz (1971)** Fungal leaching of titanium from rock. *Appl. Microbiol.* **22**, 923-924.
- Sommers L.E. et D.W. Nelson (1981)** Monitoring the response of soils and crops to sludge applications. *Dans Sludge and its ultimate disposal*. J.A. Bouchart, W.J. Jone et G.E. Sprague (Éditeurs), Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan, U.S.A., 286 pages.
- Starkey R.L. (1934)** Cultivation of organisms concerned in the oxidation of thiosulphate. *J. Bacteriol.* **28**, 365-386.
- Stephenson T. et J.N. Lester (1987a)** Heavy metal removal during the activated sludge process. I. Extent of soluble and insoluble metal removal mechanisms. *Sci. Total Envir.* **63**, 199-214.
- Stephenson T. et J.N. Lester (1987b)** Heavy metal removal during the activated sludge process. II. Insoluble metal removal mechanisms. *Sci. Total Envir.* **63**, 215-230.
- Sterrit R.M. et J.N. Lester (1984)** Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes. III. Speciations in waste waters and related complex matrices. *Sci. Total Envir.* **34**, 117-141.
- St-Yves A. et R. Beaulieu (1988)** Caractérisation des boues de 34 stations d'épuration des eaux usées municipales. Ministère de l'environnement du Québec, Dir. Gén. Assainissement Eaux, Direction de l'assainissement agricole, 11 pages.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Strayer R.F. et E.C. Davis** (1983) Reduced sulfur in ashes and slags from the gasification of coals: Availability for chemical and microbial oxidation. Appl. Environ. Microbiol. **45**, 743-747.
- Sublette K.L.** (1987) Aerobic oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*. Biotechnol. Bioeng. **29**, 690-695.
- Sublette K.L. et N.D. Sylvester** (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of natural gas. Biotechnol. Bioeng. **29**, 249-257.
- Sutherland I.W.** (1972) Bacterial exopolysaccharides. Adv. Microbiol. Physiol. **8**, 143-213.
- Suzuki I.** (1974) Mechanisms of inorganic oxidation and energy coupling. Ann. Rev. Microbiol. **28**, 85-101.
- Takakuwa S., T. Fujimori et H. Iwasaki** (1979) Some properties of cell-sulfur adhesion in *Thiobacillus thiooxidans*. J. Gen. Appl. Microbiol. **25**, 21-29.
- Tay J.H.** (1987) Ultimate disposal of sludge. Dans Heavy Metals in the Environment. International Conference. Vol. 1, S.E. Lindberg et T.C. Hutchinson (Éditeurs), CEP Consultants Ltd., Comptes rendus, New Orleans, U.S.A., pp. 91-95.
- Temple K.L. et A.R. Colmer** (1951) The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. **62**, 605-611.
- Timoney J.F., J. Port, J. Giles et J. Spanier** (1978) Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York bight. Appl. Environ. Microbiol. **36**, 465-472.
- Tjell J.C.** (1986) Trace metal regulations for sludge utilization in agriculture; A critical review. Dans Processing and use of organic sludge and liquid agricultural wastes. P. L'Hermite (Éditeur), Commission of the European Communities, D. Reidel Publishing Co., Comptes rendus, 8-11 Octobre, Rome, Italie, pp. 348-361.
- Tran F.T.** (1989) Air-lift contactor (A.B.C.) coupled with P.B.S.S. (polyurethane biomass support system) for heavy metals biolixiviation of anaerobic sludge by *Thiobacillus ferrooxidans*. Dans Heavy Metals in the Environments. International Conference. Vol. 2, J.P. Vernet (Éditeur), CEP Consultants Ltd., Comptes rendus, Albany, U.S.A., pp. 80-83.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Tuovinen O.H., S.I. Niemela et H.G. Gyllenberg (1971)** Effect of mineral nutrients and organic substances on the development of *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioeng. **13**, 517-527.
- Tuttle J.H. et P.R. Dugan (1976)** Inhibition of growth, iron, and sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* by simple organic compounds. Can. J. Microbiol. **22**, 719-730.
- Tuttle J.H., P.E. Holmes et H.W. Jannasch (1974)** Growth rate stimulation of marine pseudomonads by thiosulfate. Arch. Microbiol. **99**, 1-14.
- Tuttle J.H. et H.W. Jannasch (1972)** Occurrence and types of *Thiobacillus* -like bacteria in the sea. Limnol. Oceanogr. **17**, 532-543.
- Tyagi R.D. (1992)** Microbial leaching of heavy metals from municipal sludge: Effects of sludge solids concentration. Proc. Biochem. (sous presse).
- Tyagi R.D. et D. Couillard (1987)** Bacterial leaching of metals from digested sewage sludge. Proc. Biochem. **22**, 114-117.
- Tyagi R.D. et D. Couillard (1989)** Bacterial leaching of metals from sludge. Dans Encyclopedia of Environmental Control Technology. Wastewater Treatment Technology. Vol. 3, P.N. Cheremisinoff (Éditeur), Gulf Publishing Co., Houston, Texas, U.S.A., pp. 557-591.
- Tyagi R.D., F.T. Tran (1991)** Microbial leaching of metals from digested sewage sludge in continuous system. Envir. Technol. **12**, 303-312.
- Tyagi R.D., D. Couillard et Y. Grenier (1991a)** Effects of medium composition on the bacterial leaching of metals from digested sludge. Envir. Pollut. **71**, 57-67.
- Tyagi R.D., D. Couillard et F. Tran (1988)** Heavy metals removal from anaerobically digested sludge by chemical and microbiological methods. Envir. Pollut. **50**, 295-316.
- Tyagi R.D., D. Couillard et F. T. Tran (1990)** Studies on microbial leaching of heavy metals from municipal sludge. Wat. Sci. Technol. **22**, 229-238.
- Tyagi R.D., D. Couillard et F. T. Tran (1991b)** Comparative study of bacterial leaching of metals from sewage sludge in continuous stirred tank and air-lift reactors. Proc. Biochem. **26**, 47-54.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Tyagi R.D., F. Tran et D. Couillard** (1989) Improved bacterial lixiviation of heavy metals from municipal sludge (reactor studies). *Dans Heavy Metals in the Environment. International Conference*. Vol. 2, J.P. Vernet (Éditeur), CEP Consultants Ltd., Compte rendu, Albany, U.S.A, pp. 56-59.
- Ulitzur S.** (1972) Rapid determination of DNA base composition by ultra-violet spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta*, **272**, 1-11.
- Vesilind P.A.** (1980) Treatment and disposal of wastewater sludges. P.A. Vesilind (Éditeur), Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan, U.S.A, 323 pages.
- Vogler K. G. et J. W. Umbreit** (1941) The necessity for direct contact in sulphur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *Soil Science*, **51**, 331-337.
- Wainwright M.** (1978) Microbial sulphur oxidation in soil. *Sci. Prog. Oxf.* **65**, 459-475.
- Wainwright M.** (1984) Sulfur oxidation in soils. *Adv. Agronomy*, **37**, 349-396.
- Waksman S.A. et J. Joffe** (1922) Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thio-oxidans*: A new sulphur-oxidizing organism isolated from soil. *J. Bacteriol.* **7**, 239-256.
- Wardell J.N.** (1988) Methods for the study of bacterial attachment. *Dans Methods in Aquatic Bacteriology* B. Austin (Éditeur), John Wiley & Sons, Chichester, U.S.A, pp. 389-415.
- Wardell J. N., C. M. Brown, D. C. Ellwood, et A. E. Williams** (1984) Bacterial growth on inert surfaces. *Dans Continuous Culture 8: Biotechnology, Medicine and the Environment*. A.C.R. Dean, D.C. Ellwood et C.G.T. Evans (Éditeurs), Ellis Horwood, Chichester, U.S.A, pp. 159-168.
- Webber M.D.** (1986) Épandage des boues d'épuration sur les terres agricoles- une évaluation. Direction générale de la recherche, Agriculture Canada, 42 pages.
- Webber M.D.** (1988) Contrôle de la concentration de métaux lourds dans les sols après épandage de boues d'égout municipales: l'approche canadienne. *Sci. Tech. Eau*, **21**, 45-51.
- Weiss R.L.** (1973) Attachment of bacteria to sulphur in extreme environments. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 501-507.

## BIBLIOGRAPHIE (suite)

- Williams R.A.D. et D.S. Hoare (1972)** Physiology of a new facultatively autotrophic thermophilic *Thiobacillus*. J. Gen. Microbiol. **70**, 555-566.
- Wong L. et J.G. Henry (1983)** Bacterial leaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. Wat. Pollut. Res. J. Can. **18**, 151-162.
- Wong L. et J.G. Henry (1984)** Decontaminating biological sludge for agricultural use. Wat. Sci. Technol. **17**, 575-586.
- Wong L. et J.G. Henry (1988)** Bacterial leaching of heavy metals from anaerobically digested sludge. *Dans* Biotreatment Systems. Vol. 2, D.L. Wise (Éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A, pp. 125-169.
- Wood A.P. et D.P. Kelly (1985)** Physiological characteristics of a new thermophilic obligately chemolithotrophic *Thiobacillus* species, *Thiobacillus tepidarius*. Int. J. Syst. Bacteriol. **35**, 434-437.
- Wood A.P. et D.P. Kelly (1988)** Isolation and physiological characterisation of *Thiobacillus aquaesulis* sp. nov., a novel facultatively autotrophic moderate thermophile. Arch. Microbiol. **149**, 339-343.
- Wood A.P. et D.P. Kelly (1989)** Isolation and physiological characterisation of *Thiobacillus thyasiris* sp. nov., a novel marine facultative autotroph and the putative symbiont of *Thyasira flexuosa*. Arch. Microbiol. **152**, 160-166.
- Wortman A.T., H. Voelz, R.C. Lantz et G.K. Bissonnette (1986)** Effect of acid mine water on *Escherichia coli*: structural damage. Curr. Microbiol. **14**, 1-5.
- Wozniak D.J. et J.Y.C. Huang (1982)** Variables affecting metal removal from sludge. J. Wat. Pollut. Control Fed. **54**, 1574-1580.
- Yagi S., S. Kitai et T. Kimura (1971)** Oxidation of elemental sulfur to thiosulfate by *Streptomyces*. Appl. Microbiol. **22**, 157-159.

