

Université du Québec  
INRS-Eau

**UTILISATION DES BOUES D'ÉPURATION COMME MILIEU DE  
CULTURE POUR LA PRODUCTION D'INOCULANTS À BASE  
DE RHIZOBIUM**

Par  
Ben Rebah Faouzi  
Maîtrise en Environnement

Thèse présentée  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiae doctorat (Ph.D.)  
en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

|  |   |
|--|---|
| Président du jury et examinateur interne           | Mme Darakhshan Ahmad , professeur<br>INRS-Santé                               |
| Examinateur externe                                | M. Shiv O. Prasher, professeur<br>Université McGill                           |
| Examinateur externe                                | M. Antoun Hani, professeur<br>Université Laval                                |
| Examinateur interne et<br>Codirecteur de recherche | Mme Prévost Danielle, professeur<br>Agriculture et Agro-alimentaire<br>Canada |
| Directeur de recherche                             | M. Rajeshwar D. Tyagi, professeur<br>INRS-Eau                                 |

Thèse soutenue le 16 octobre 2001

©Droits réservés de Ben Rebah Faouzi, 2001

## **REMERCIEMENTS**

Je désire exprimer ma sincère gratitude à mon directeur Dr R. D. Tyagi pour m'avoir bien guidé dans mon travail et pour ses conseils constructifs. En tant qu'expert dans le traitement des eaux usées et la valorisation des boues municipales et industrielles, ses intérêts particuliers dans les issues environnementales sont à l'origine de ce projet, auquel il a apporté une grande contribution.

J'aimerais remercier ma codirectrice Dr D. Prévost, pour sa disponibilité et l'encouragement qu'elle m'a apportée. Sans son expertise en microbiologie du sol pour me guider, sa coopération enthousiaste et ses innombrables heures passées sur ce projet, la thèse aurait pu être totalement différente. Travailler sous sa codirection est autant un plaisir qu'un travail.

Je suis grandement redevable au professeur J. R. Valero qui m'a encouragé et m'a supporté durant mon travail.

J'aimerais aussi remercier le personnel de la bibliothèque et les techniciens de l'INRS-Eau ainsi que ceux du centre de recherche d'Agriculture et Agro-alimentaire Canada, mais particulièrement Carole, Gabriel, Pauline et Sébastien pour leur contribution aux analyses.

Mes sincères remerciements vont aussi à plusieurs de mes collègues et amis, mais particulièrement à Youssef et Simon pour leur soutien et leur aide et leur encouragement durant la réalisation de mon travail.

Finalement, je remercie également mes parents, mes frères, mes sœurs pour leur appui et leur encouragement.

Faouzi Ben Rebah

## RÉSUMÉ

L'utilisation des boues d'épuration pour la production d'un inoculum commercial de rhizobium à été démontré en tenant compte de leur composition en éléments nutritifs capable de supporter la croissance des rhizobia. La première étape du projet consistait à caractériser des boues de différentes origines et à tester la croissance de deux groupes de rhizobia (à croissance rapide : *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* et à croissance lente: *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii*). Les essais de croissance en erlenmeyer ont montré la possibilité d'utiliser les boues comme milieu de culture pour les rhizobia et que généralement le nombre de cellules de rhizobia dépasse  $1 \times 10^9$  ufc/ml après 72h de croissance. Ajoutons à cela que la variabilité de la composition des boues affecte le temps de génération, le rendement en cellules et l'indice de nodulation sur les légumineuses hôtes. Par ailleurs, une concentration élevée en solide totaux tend à donner un temps de génération élevé. En outre, les boues primaires peuvent inhiber la croissance des cellules et l'utilisation d'un prétraitement acide, alcalin et oxydatif augmentent la biodégradabilité des boues primaires et en conséquence le compte cellulaire (cas de *S. meliloti*).

L'effet de la concentration des solides en suspension et d'un prétraitement acide (pH 2.0 à pH 6.0 obtenu avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et alcalin (50 à 200 meq/L NaOH) des boues primaire (boue de Black Lake primaire) et secondaire (boue de Black Lake secondaire) a été étudié sur la croissance de *S. meliloti*. Dans les boues primaires ainsi que dans les boues secondaires, quelques traitements acides et alcalins ont causé une augmentation des comptes cellulaires et une réduction du temps de génération de *S. meliloti* et ceci est en fonction de la concentration en solides en suspension. Par exemple, dans les boues primaires non-traitées, le nombre le plus élevé de cellules ( $11.10 \times 10^9$  ufc/mL) a été obtenu avec 1.3% de solides en suspension. Cependant, un dénombrement maximum de  $13.00 \times 10^9$  ufc/mL a été atteint avec un traitement acide à pH 2.0 sous une concentration de 0.325% de solides en suspension, alors que le traitement alcalin avec 100 meq/L NaOH à 0.65% de solides a augmenté le rendement des cellules à  $21.00 \times 10^9$  cfu/mL. Les résultats de cette partie expérimentale ont montré aussi que *S. meliloti* produit dans les boues traitées a maintenu sa capacité à noduler la luzerne.

L'effet de l'addition de sources de nutriments (extrait de levure et glycérol) à la boue secondaire de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ) sur la souche *S. meliloti* a été étudié. Les résultats ont montré que le nombre de cellules ainsi que le temps de génération ont été affectés par l'addition de ces sources de nutriments et que le nombre maximal de cellules de  $8.85 \times 10^9$  ufc/ml a été observé au bout de 32 heures d'incubation après addition de 4 g/l d'extrait de levure. De même l'addition du glycérol, aux échantillons de boue contenant 4 g/l d'extrait de levure a amélioré encore la croissance rhizobiale et la valeur la plus élevée de  $16.5 \times 10^9$  ufc/ml a été obtenue avec 7.5 g/l de glycérol.

L'effet du contrôle du pH sur la souche *S. meliloti* dans les boues de CUQ a été étudié en fermenteur de 15 litres équipé d'un contrôleur de pH. Dans cette expérience en fermenteur, il a été observé que le pH n'était pas un facteur limitant et l'augmentation du pH à 8.85 dans le fermenteur non contrôlé semble n'avoir aucun effet sur la croissance de la souche en question.

Il a été aussi prouvé que la boue offre une meilleure protection pour la survie du rhizobia (*S. meliloti* cultivée dans la boue de CUQ) durant la congélation-décongélation à -20°C que le milieu standard (milieu à l'extrait de levure et au mannitol : YMB). Les résultats ont montré également la possibilité d'utiliser la boue comme support (Cas de la boue de Jonquière) par ce qu'elle supporte, comme la tourbe, la survie de *S. meliloti* et que le nombre de cellules demeure acceptable comparativement au standard quelque soit l'origine de l'inoculant (préparé dans les boues ou dans YMB) et la température de conservation (4 ou 25°C).

Finalement, l'efficacité des inoculants (cas de *S. meliloti*) à base de boue (inoculant solide ou liquide) a été étudiée et comparée à celle des inoculants à base du milieu de culture standard (YMB) pour le cas de la luzerne cultivée dans des pots contenant deux types de sol (Kamouraska : sol argileux et Saint-André : sol sableux) fertilisés (fertilisant commercial) et amendés à des doses de 60 et 120 KgN/ha (avec des boues secondaires de la CUQ). Les résultats des rendements de la luzerne en matière sèche et en azote ont montré que les inoculants à base de boue ont le même potentiel que ceux à base d'YMB et tous les inoculants (inoculant solide ou liquide) ont la même tendance. Ajoutons à cela, l'application des boues comme amendement a augmenté le nombre du rhizobia dans les sols et a amélioré significativement le poids sec et le

contenu en azote de la luzerne. Cette amélioration augmente avec l'augmentation de la dose des boues et avec la coupe. Cependant, l'application du fertilisant azoté a donné des faibles rendements de la plante. Les résultats ont montré aussi que le processus de nodulation a été toujours maintenu dans les sols amendés et fertilisés et que les macroéléments et les métaux lourds apportés par les boues sont à un niveau acceptable et ne sont pas considérés comme des facteurs négatifs dans cette étude. Cependant, les meilleurs rendements obtenus avec le sol de Kamouraska par apport à celui de Saint-André semble être en relation avec leurs caractéristiques.

## TABLE DES MATIÈRES

|  |          |
|--|----------|
| <b>Chapitre 1 : SYNTHÈSE.....</b>  | <b>1</b> |
| 1. INTRODUCTION.....   | 1        |
| 2. REVUE DE LITTÉRATURE.....   | 2        |
| 2.1. Généralité sur les rhizobia.....  | 2        |
| 2.1.1. Taxonomie des rhizobia.....   | 2        |
| 2.1.2. Le processus de nodulation.....   | 4        |
| 2.2. La culture des rhizobia.....  | 6        |
| 2.2.1. Les exigences nutritives du rhizobium.....  | 6        |
| 2.2.2. Production d'inoculum à l'échelle industrielle.....   | 7        |
| 2.2.3. Les conditions de production de rhizobium.....  | 8        |
| 2.3. Utilisation des rhizobia en agriculture.....  | 9        |
| 2.4. Généralité sur les boues des stations d'épuration.....  | 10       |
| 2.4.1. Stabilisation et prétraitement des boues.....   | 13       |
| 2.4.2. Élimination des boues.....  | 14       |
| 2.4.3. Les métaux lourds dans les boues d'épuration.....   | 16       |
| 2.5. Effet de métaux sur les populations de rhizobium.....   | 17       |
| 3. PROBLÉMATIQUES.....   | 20       |
| 3.1. Problématique de disposition des boues.....   | 20       |
| 3.1.1. Problématique de la production d'inoculants commerciaux.....  | 20       |
| 4. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....  | 21       |
| 4.1. Hypothèses.....   | 21       |
| 4.2. Objectifs de la recherche.....  | 21       |
| 5. MÉTHODOLOGIE.....   | 22       |
| 6. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....  | 24       |
| 6.1. Caractérisation des boues des stations d'épuration.....   | 24       |
| 6.2. Utilisation des boues comme milieu de culture pour les rhizobia.....  | 25       |
| 6.3. Effet des solides en suspension et d'un prétraitement des boues sur la croissance du <i>S. meliloti</i> ..... | 27       |
| 6.3.1. Effet des solides en suspension.....  | 28       |
| 6.3.2. Effet d'un prétraitement acide.....   | 29       |
| 6.3.3. Effet d'un prétraitement alcalin.....   | 29       |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.3.4. Évaluation du potentiel de nodulation.....   | 30        |
| 6.4. Influence de l'addition de sources de nutriments sur la croissance du <i>S. meliloti</i> .....   | 30        |
| 6.5. Influence du contrôle du pH.....   | 32        |
| 6.6. Effet des conditions de conservation sur la survie de <i>S. meliloti</i> .....   | 32        |
| 6.7. Effet de l'inoculation par <i>S. meliloti</i> cultivé dans les boues ainsi que de l'amendement des sols par les boues sur la nodulation, le rendement en matière sèche et la teneur en azote de la luzerne ..... | 34        |
| 7. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....  | 36        |
| 7.1. Conclusions.....   | 36        |
| 7.2. Recommandations.....   | 38        |
| RÉFÉRENCES.....   | 40        |
| <b>Chapitre 2 : WASTEWATER SLUDGE AS A NEW MEDIUM FOR RHIZOBIA GROWTH.....</b>  | <b>54</b> |
| RÉSUMÉ.....   | 54        |
| ABSTRACT.....   | 55        |
| 1. INTRODUCTION.....  | 56        |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....  | 56        |
| 2.1. Sludge sampling.....   | 56        |
| 2.2. Sludge pre-treatment.....  | 57        |
| 2.3. Micro-organisms.....   | 57        |
| 2.4. Inoculum preparation.....  | 57        |
| 2.5. Growth experiments.....  | 58        |
| 2.6. Verification of the nodulation potential.....  | 58        |
| 2.7. Sludge analysis.....   | 58        |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION.....  | 59        |
| 3.1. Sludge composition.....  | 59        |
| 3.2. Influence of sludge origin on growth of rhizobia.....  | 60        |
| 3.3. Variation of pH during growth of rhizobia.....   | 62        |
| 3.4. Influence of sludge-grown rhizobia on the nodulation.....  | 63        |
| 3.5. Influence of pre-treatments on the production of <i>S. meliloti</i> .....  | 63        |
| 4. CONCLUSIONS.....   | 65        |
| REFERENCES.....   | 66        |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Chapitre 3: ACID AND ALKALINE TREATMENTS FOR ENHANCING THE GROWTH OF RHIZOBIA IN SLUDGE.....</b>   | 81  |
| RÉSUMÉ.....   | 81  |
| ABSTRACT.....   | 82  |
| 1. INTRODUCTION.....  | 83  |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....  | 84  |
| 2.1. Sludge sampling and characterisation.....  | 84  |
| 2.2. Alkaline pre-treatment.....  | 85  |
| 2.3. Acid pre-treatment.....  | 85  |
| 2.4. Rhizobial strain and inoculum preparation.....   | 85  |
| 2.5. Growth experiments.....  | 85  |
| 2.6. Evaluation of the nodulation.....  | 86  |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION.....  | 86  |
| 3.1. Characterisation of waste water sludge.....  | 86  |
| 3.2. Effect of total suspended soild concentration and acid hydrolysis on <i>S. meliloti</i> growth.....  | 87  |
| 3.3. Effect of total suspended solid and alkaline dose on <i>S. meliloti</i> growth.....  | 89  |
| 3.4. Evaluation of the nodulation potential.....  | 91  |
| 4. CONCLUSIONS.....   | 91  |
| REFERENCES.....   | 92  |
| <b>Chapitre 4 : PRODUCTION OF <i>S. MELILOTI</i> USING WASTEWATER SLUDGE AS A RAW MATERIAL: EFFECT OF NUTRIENT ADDITION AND pH CONTROL.....</b> | 102 |
| RÉSUMÉ.....   | 102 |
| ABSTRACT.....   | 103 |
| 1. INTRODUCTION.....  | 104 |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....  | 104 |
| 2.1. Rhizobial strain.....  | 104 |
| 2.2. Sludge sampling.....   | 105 |
| 2.3. Shake flask experiments.....   | 105 |
| 2.4. Fermentor experiments.....   | 105 |

|  |     |
|--|-----|
| 3. RESULTS.....  | 106 |
| 3.1. Effect of yeast extract on rhizobial growth.....              | 106 |
| 3.2. Effect of yeast extract and glycerol on rhizobial growth..... | 106 |
| 3.3. The effect of pH control on rhizobial growth.....             | 107 |
| 4. DISCUSSION.....   | 107 |
| 5. CONCLUSIONS.....  | 110 |
| REFERENCES.....  | 110 |

**Chapitre 5: WASTEWATER SLUDGE AS A SUBSTRATE AND CARRIER FOR RHIZOBIA : THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON SURVIVAL OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI*.....**120

|   |     |
|---|-----|
| RÉSUMÉ.....   | 120 |
| ABSTRACT.....   | 121 |
| 1. INTRODUCTION.....  | 122 |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....                                      | 123 |
| 2.1 Rhizobial growth.....   | 123 |
| 2.2. Freezing and thawing of <i>S. meliloti</i> cultures.....     | 124 |
| 2.3. Preparation of carrier based inoculants.....                 | 124 |
| 3. RESULTS.....   | 124 |
| 3.1. Characterisation of waste water sludges and peat.....        | 124 |
| 3.2. Effect of freezing on rhizobial survival.....                | 125 |
| 3.3. Survival of YMB grown-rhizobia in carriers.....              | 125 |
| 3.4. Survival of secondary sludge-grown rhizobia in carriers..... | 126 |
| 4. DISCUSSION.....  | 127 |
| 5. CONCLUSIONS.....   | 130 |
| REFERENCES.....   | 130 |

**Chapitre 6: NODULATION AND YIELD OF ALFAFA GROWN IN SLUDGE AMENDED SOILS AND INOCULATED WITH RHIZOBIA PRODUCED IN SLUDGE.....**140

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| RÉSUMÉ.....                       | 140 |
| ABSTRACT.....                     | 141 |
| 1. INTRODUCTION.....              | 142 |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....      | 142 |
| 2.1. Soil and sludge origins..... | 143 |
| 2.2. Chemical analysis.....       | 143 |

|   |            |
|---|------------|
| 2.3 Estimation of population size of the indigenous rhizobia.....                               | 143        |
| 2.4. Procedures and experimental design.....  | 143        |
| 2.5. Plant growth and nodulation assessment.....  | 144        |
| 3. RESULTS.....   | 145        |
| 3.1. Sludge and soil chemical characteristics.....  | 145        |
| 3.2. Assessment of nodulation of alfalfa and the population size<br>of <i>S. meliloti</i> ..... | 146        |
| 3.3. Shoot dry weight and nitrogen content.....   | 146        |
| 3.4. Macronutrients and heavy metals uptake by alfalfa plants.....                              | 149        |
| 4. DISCUSSION.....  | 150        |
| 5. CONCLUSIONS.....   | 155        |
| REFERENCES.....   | 155        |
| <b>ANNEXES.....</b>   | <b>169</b> |

## LISTE DES FIGURES

### **Chapitre 2 : WASTEWATER SLUDGE AS A NEW MEDIUM FOR RHIZOBIA GROWTH**

Figure 1. Growth of fast-growing rhizobia on different sludges and on YMB media; means of two replicates..... 78

Figure 2. Growth of slow-growing rhizobia on different sludges and on YMB media; means of two replicates..... 79

Figure 3. Growth of *S. meliloti* on different pre-tread sludges and on YMB media; means of two replicates..... 80

### **Chapitre 4 : GROWTH OF *S. MELILOTI* IN WASTEWATER SLUDGE : THE EFFECT OF NUTRIENT ADDITION AND THE pH CONTROL**

Figure 1. Growth of *S. meliloti* in secondary sludge supplemented with different concentrations of yeast extract (Y.E)..... 116

Figure 2. Growth of *S. meliloti* in secondary sludge supplemented with 4g/l of yeast extract (Y.E) and different concentrations of glycerol (Gly)..... 117

Figure 3. Growth of *S. meliloti* and pH variation using secondary sludge in fermentor experiment..... 118

Figure 4. Initial and final concentrations of the soluble COD, N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> of the sludge supporting *S. meliloti* growth in controlled and uncontrolled fermentors..... 119

### **Chapitre 5: WASTEWATER SLUDGE AS A SUBSTRATE AND CARRIER FOR RHIZOBIA : THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON SURVIVAL OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI***

Figure 1. Survival of YMB-grown rhizobia in sludge, peat and mixture sludge-peat based carriers at 4°C (A) and 25°C (B). The 7 day values corresponding to the end of the pre-incubation at 30°C. Vertical bars indicate LSD (0.05)..... 137

Figure 2. Survival of secondary sludge-grown rhizobia in sludge, peat and mixture sludge-peat based carriers at 4°C (A) and 25°C (B). The 7 day values corresponding to the end of the pre-incubation at 30°C. Vertical bars indicate LSD (0.05)..... 138

Figure 3. Survival percentages of *S. meloliti* in different carriers after 130 days of storage. Calculation based on the maximum cell numbers obtained during storage.....139

## LISTES DES TABLEAUX

### **Chapitre 1 : SYNTHÈSE**

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1. Milieux utilisés dans la culture de rhizobium (Tiré de Burton, 1979).....                                | 8  |
| Tableau 2. Teneurs limites obligatoires et recommandées en métaux lourds dans les boues destinées à l'épandage..... | 17 |
| Tableau 3. Boues des usines d'épuration testées comme milieu de culture pour les souches de rhizobium.....          | 23 |

### **Chapitre 2 : WASTEWATER SLUDGE AS A NEW MEDIUM FOR RHIZOBIA GROWTH**

|   |    |
|---|----|
| Table 1. Determination of the nodulation index.....                                       | 71 |
| Table 2. Physical and chemical characteristics of original sludges.....                   | 72 |
| Table 3. Metals content of sludges and recommended levels for agricultural practices..... | 73 |
| Table 4. Growth results of fast-growing strains using different sludges.....              | 74 |
| Table 5. Growth result of slow-growing rhizobium strains using different sludges.....     | 75 |
| Table 6. Nodulation capacity of rhizobia strains produced in different sludges.....       | 76 |
| Table 7. Growth results of <i>S. meliloti</i> after sludge pre-treatments.....            | 77 |

### **Chapitre 3: ACID AND ALKALINE TREATMENTS FOR ENHANCING THE GROWTH OF RHIZOBIA IN SLUDGE**

|   |     |
|---|-----|
| Table 1. Determination of the nodulation index.....   | 96  |
| Table 2. The characteristics of the original sludges.....   | 97  |
| Table 3. Effect of TSS concentration and acid hydrolysis on <i>S. meliloti</i> grown in primary sludge..... | 98  |
| Table 4. Effect of TSS and acid hydrolysis treatment on <i>S. meliloti</i> grown in secondary sludge.....   | 99  |
| Table 5. Effect of TSS and alkaline dose on <i>S. meliloti</i> grown in primary sludge.....                 | 100 |
| Table 6. Effect of TSS and alkaline dose on <i>S. meliloti</i> grown in secondary sludge.....               | 101 |

### **Chapitre 4 : GROWTH OF *S. MELILOTI* IN WASTEWATER SLUDGE : THE EFFECT OF NUTRIENT ADDITION AND THE pH CONTROL**

|   |     |
|---|-----|
| Table 1. Characteristics of sludge used in the experiments..... | 113 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| Table 2. Effect of yeast extract on rhizobial growth.....  | 114 |
| Table 3. Effect of glycerol on rhizobial growth.....   | 115 |
| <b>Chapitre 5: WASTEWATER SLUDGE AS A SUBSTRATE AND CARRIER FOR RHIZOBIA : THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON SURVIVAL OF <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i></b> |     |
| Table 1. The characteristics of the original sludges and peat.....   | 135 |
| Table 2. pH and moisture at the end of storage.....  | 136 |
| <b>Chapitre 6: NODULATION AND YIELD OF ALFAFA GROWN IN SLUDGE AMENDED SOILS AND INOCULATED WITH RHIZOBIA PRODUCED IN SLUDGE</b>                              |     |
| Table 1 Determination of the nodulation index.....   | 161 |
| Table 2. Soils characteristics.....  | 162 |
| Table 3. Total composition of sludge, quantity added to soil and recommended levels of heavy metals for agricultural practices.....                          | 163 |
| Table 4. Nodulation index of alfalfa and rhizobial number in soils at the end of the experiment.....   | 164 |
| Table 5. Shoot dry weight and nitrogen content for alfalfa cultivated in Kamouraska soil.....  | 165 |
| Table 6. Shoot dry weight and nitrogen content for alfalfa cultivated in Saint André soil.....   | 166 |
| Table 7. P, mineral salts and heavy metal concentrations (mg/kg) in alfalfa shoots cultivated in Kamouraska soil.....  | 167 |
| Table 8. P, mineral salts and heavy metal concentrations (mg/kg) in alfalfa shoots cultivated in Saint André soil.....                                       | 168 |

**PARTIE I**

**Chapitre 1 : SYNTHÈSE**

## Chapitre 1

### SYNTHÈSE

#### 1. INTRODUCTION

Afin de répondre aux demandes mondiales toujours grandissantes pour la production de protéines végétales, il faut pouvoir mettre à la disposition des végétaux les quantités d'azote indispensables. Généralement, l'agriculture utilise surtout des engrains azotés de synthèse nitriques et ammoniacaux. Cependant, la technologie propre à ces industries est très coûteuse, ce qui constitue un problème d'accèsabilité surtout pour les pays en voie de développement. De plus, dans les pays plus développés, l'utilisation grandissante cause un problème environnemental. Les nitrates polluent les eaux souterraines et constituent un danger pour la santé humaine.

Ce problème peut être réduit en se basant sur le fait que certaines espèces végétales forment leurs protéines à partir de l'azote gazeux inerte. Il s'agit d'un phénomène biologique essentiel. Ce sont les légumineuses principalement qui peuvent, grâce à une symbiose avec des bactéries du sol (les rhizobia), fixer dans l'atmosphère des millions de tonnes d'azote.

En symbiose, au champ, les rhizobia peuvent fixer de 40 à 350 kg/ha d'azote par saison de croissance (Quispel, 1974). Cet avantage naturel se traduit chez l'agriculteur par une diminution de la consommation des engrains azotés et ainsi une réduction des coûts de production d'une importance appréciable dans le contexte économique actuel.

La nécessité d'inoculer avec des rhizobia certaines cultures de légumineuses dans le monde et en particulier dans les pays en voie de développement pose de façon cruciale le problème de l'approvisionnement en inoculum de qualité et à moindre coût. En effet, le prix et la disponibilité de la source de carbone influencent la production de l'inoculum de rhizobium (Bissonnette et al., 1986). Dans cette perspective, une grande variété de milieux a été testée pour la production à grande échelle de l'inoculum (Burton, 1979; Bergersen, 1961). Le milieu YMB (yeast extract mannitol) est généralement utilisé pour la production du rhizobium à l'échelle de laboratoire.

L'utilisation de ce milieu de culture en milieu industriel est limitée surtout par le coût élevé.

Des recherches ont été déclenchées, afin de mettre au point des milieux de cultures économiques et capables de soutenir la croissance des rhizobia. Ainsi, plusieurs chercheurs ont tenté de tester des déchets industriels, comme les sous-produits de l'industrie des boissons alcooliques (Burton, 1979), les débris des enveloppes de pois protéolysés (Gulati et al., 1979), l'extrait de germes de malt (Bioardi et Ertola., 1985), les sous-produits de l'industrie de levure (Meade et al., 1985) et les résidus de fabrication du fromage comme le lactosérum (Bissonnette et al, 1986). Ces sous-produits testés constituent un milieu riche en sources de carbone et d'azote et en facteurs de croissances indispensables pour la croissance des rhizobia.

La valorisation des déchets constitue une solution bénéfique pour assurer un environnement de qualité. Entre autres, des programmes d'intervention ont été créés dans le but de résoudre les problèmes de pollution tels que ceux des eaux usées qui nécessitent l'application de certains procédés d'assainissement (Crowley et al., 1986). Ces procédés d'assainissement génèrent des boues d'épuration. La richesse de ces boues en substances nutritives (carbone, azote, phosphore, sels minéraux...etc.) les rend des produits valorisables en agriculture. La présente étude vise donc à la valorisation des boues d'épuration municipales et industrielles en les utilisant comme milieu de culture pour la production d'inoculums commerciaux de rhizobium.

## 2. REVUE DE LITTÉRATURE

### 2.1. Généralité sur les rhizobia

#### 2.1.1. Taxonomie des rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries du sol gram-négatives, aérobies en forme de bâtonnets et non sporulantes pas qui appartiennent à la famille des Rhizobiaceae (Jordan, 1982). Selon la classification actuelle, cette famille comprend le genre *Rhizobium* (*R. galegae*, *R. leguminosarum*, *R. elti*), *Sinorhizobium* (*S. meliloti*, *S. fredii*, *S. teranga*, *S. sahelii*), *Mesorhizobium* (*M. loti*, *M. ciceri*, *M. huakuii*), *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. elkanii*) et *Azorhizobium* (*Az. Caullnодans*) (Young et Haukka, 1996). Des nouvelles espèces s'ajoutent toujours, et un nouveau genre, *Allorhizobium* (*Al.*

*undicicola*) vient d'être rapporté (Amarger, 2001)

Les différents rhizobia se distinguent par leurs vitesses de croissance, par la nutrition carbonée et par la différence enzymatique. Ainsi, on trouve ceux à croissance rapide (*Rhizobium* et *Sinorhizobium*) et ceux à croissance lente (*Bradyrhizobium*). Dans ce qui suit, on parlera uniquement de ces deux sous-groupes (ceux à croissance rapide et ceux à croissance lente).

La comparaison entre ces deux sous-groupes montre que les espèces du genre *Bradyrhizobium* possèdent un flagelle polaire ou subpolaire, tandis que celles de l'autre groupe comportent deux à six flagelles périthriches. Les espèces du genre *Rhizobium* contiennent de grands plasmides très stables (pSym), variables en nombre et en taille (200 à 1 500 kilopaires de base). Les souches de *Bradyrhizobium* ne possèdent pas de grands plasmides (Martinez et al., 1990).

Les rhizobia qui se caractérisent par une croissance rapide (temps de génération inférieur à 6 heures), comprend *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *M. loti* et *R. galegae*. Les souches poussant dans un bouillon à base de glucose et d'extrait de levure (YGB), ont un temps de génération de 3,4 à 8,3 heures (Martinez de Drechsler et Arias, 1972). Les souches les plus représentatives ont un temps de génération de 5,5 heures (Martinez de Drechsler et Arias 1972) ou moins (Kennedy et Greenwood, 1982). Elles forment des colonies de 2 à 4 mm de diamètre après 3 à 5 jours d'incubation sur gélose à base de mannitol et d'extrait de levure (YMA) (Jordan, 1982). Le genre *Bradyrhizobium*, à croissance plus lente (temps de génération supérieur à 6 heures), comprend une grande variété de souches formant des nodosités sur diverses légumineuses tropicales, la plupart appartenant à l'espèce *B. japonicum*, qui regroupe toutes les souches capables de noduler le soja. Les *Bradyrhizobium* poussant sur milieu YGB ont un temps de génération de 14,3 à 33,3 heures (Martinez de Drechsler et Arias, 1972). Les souches les plus représentatives ont un temps de génération de 8,5 heures ou plus (Kennedy et Greenwood, 1982). Lorsqu'ils poussent sur milieu YMA, ils forment des colonies qui ne dépassent pas 1 mm de diamètre après 5 à 7 jours d'incubation (Jordan, 1982).

Les rhizobia à croissance rapide utilisent une grande diversité de substrats carbonés, parmi les hexoses, les pentoses, les di et les trisaccharides et les acides organiques (Allen et Allen, 1950). Les *Bradyrhizobium*, par contre, n'utilisent pas une si grande

diversité de substrats carbonés, mais peuvent utiliser une variété de substrats aromatiques (Pake et Ornston, 1984). Ils n'utilisent pas les disaccharides ni les acides organiques. Ces différences dans la nutrition carbonée sont reliées à leur capacité de transport des substrats et à la présence d'enzymes pouvant les métaboliser.

L'enzyme clé de la voie des pentoses phosphate le NADP-6-phosphogluconate dehydrogénase n'a été observée que chez les espèces à croissance rapide. La présence de cette enzyme leur permet d'utiliser la voie des pentoses phosphate ce qui les différencie des *Bradyrhizobium* qui ne peuvent pas utiliser cette voie pour la dégradation des hexoses (Hernandez et Focht, 1984; Martinez de Drets et Arias, 1972).

D'autres différences enzymatiques se trouvent au niveau de la dégradation des disaccharides. Ainsi les rhizobia possèdent l'enzyme invertase qui leur permet de briser le saccharose. Cette enzyme est absente chez les *Bradyrhizobium* qui ne peuvent donc pas croître sur ce substrat (Martinez de Drets et al., 1974). Au niveau de la dégradation des pentoses, les *Bradyrhizobium* possèdent l'enzyme 2-keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase qui intervient dans une voie produisant du pyruvate et de l'acétaldéhyde à partir du L-arabinose. Cette enzyme est absente chez ceux à croissance rapide (Pedrosa et Zancan, 1974).

### 2.1.2. Le processus de nodulation

La symbiose rhizobium - légumineuses joue un rôle important en agriculture à cause de sa capacité de fixer l'azote atmosphérique en n'utilisant que l'énergie fournie par la photosynthèse.

C'est au niveau des nodosités situées sur les racines de la plante hôte que les bactéroïdes (forme bactérienne du nodule) peuvent réduire l'azote atmosphérique grâce au complexe enzymatique de la nitrogénase.

L'établissement de la symbiose débute par la colonisation de la surface racinaire par les rhizobia et se termine par le fonctionnement efficace de la nitrogénase dans les nodosités. Les études sur l'adsorption racinaire ont démontré que cette étape est déterminante dans l'établissement de la symbiose et ont permis de distinguer deux phases. La première est la phase de faible adhésion, réversible, par contre la deuxième

est la phase de forte adhésion, caractérisée par la présence de microfibrilles (Dazzo et al. 1976; Dazzo, 1980).

Selon Vincent (1980) la symbiose rhizobium – légumineuse se fait en trois stades:

**1/** stade de pré-infection qui comporte les étapes de colonisation racinaire, d'adsorption racinaire, de déformation des poils absorbants et de déformation prononcée des poils absorbants;

**2/** stade d'infection et formation nodulaire qui renferme les étapes de l'infection, de l'initiation des nodules et le développement des bactéroïdes;

**3/** stade de fonctionnement lors duquel il se produit la fixation de l'azote, établissement des fonctions biochimiques et physiologiques complémentaires et persistance de l'ensemble des fonctions;

Avant toutes ces étapes, il doit y avoir une communication très précise entre les deux partenaires. Dans un premier temps, la plante sécrète dans ses exsudats racinaires des composés chimiques, appelés flavonoïdes, qui attirent par chimiotactisme les rhizobia et activent l'expression des gènes de nodulation (*nod*) (Fisher et Long, 1992; Denarié et al, 1992). Une fois activés, ces gènes déterminent la production par les rhizobia de molécules signales, les facteurs Nod, qui jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance et l'infection de la plante hôte. Ces facteurs sont aussi responsables de la formation du nodule (Lerouge et al, 1990). Les associations entre rhizobium et légumineuses sont très spécifiques. En effet, si le facteur Nod produit par un rhizobium quelconque n'est pas spécifique à la plante hôte, il n'y a tout simplement pas d'infection. Par exemple, la majorité des espèces de rhizobium comme *S. meliloti*, *R. leguminosarum* (bv. *viciae*, bv. *trifolii*, et bv. *Phaseoli*) et *R. fredii* peuvent noduler seulement un nombre limité d'hôtes (Vincent, 1977). Cependant, quelques exceptions, incluant le *Rhizobium tropical sp.* NGR234 et son dérivé MPIK3 030 établissent des symbioses avec une grande variété de légumineuses et avec les non - légumineuses *Parasponia* (Trinick, 1980). Tant qu'à lui le *Bradyrhizobium* possède un nombre d'hôtes moins restreints. Cette reconnaissance spécifique envers un hôte approprié est contrôlée par les gènes de nodulation (gènes *nod*) qui sont classés en deux catégories : les gènes régulateurs et les gènes de structure.

## 2.2. La culture des rhizobia

### 2.2.1. Les exigences nutritives du rhizobium

Comme déjà indiqué, les rhizobia utilisent des sources de carbone variables selon l'espèce bactérienne. La capacité du rhizobium à consommer un hydrate de carbone dépend de la méthode de culture, du volume d'inoculum et d'autres facteurs liés à la biologie de la bactérie.

L'extrait de levure est utilisé universellement comme source d'azote. Un niveau de 1g/L satisfait les exigences en acides aminés et assure une croissance optimale du rhizobium (Skinner et al., 1977). Certains espèces à croissance rapide peuvent utiliser le nitrate, l'ammonium ou un acide aminé comme seule source d'azote (Quispel, 1974). Généralement, une bonne croissance s'obtient lorsqu'on ajoute des acides aminés de faible poids moléculaire. Un équilibre en acides aminés semble être important lors de la croissance du rhizobium (Burton, 1979).

Les espèces du genre rhizobium diffèrent beaucoup quand à leur exigence en vitamines. En effet, les *R. leguminosarum*, (bv. trifolii et bv. phaseoli) requièrent un ou une combinaison de trois vitamines (biotine, thiamine et l'acide pantothénique) (Graham, 1963). Certaines espèces (*S. meliloti*, *B. japonicum*...etc.) ne requièrent que la biotine. Généralement, les exigences en vitamines sont habituellement apportées par l'addition de l'extrait de levure au milieu de culture.

Les rhizobia ont des exigences en sels minéraux. L'extrait de levure contient les concentrations suffisantes en sel (potassium, calcium, magnésium..etc.) (Burton, 1979). Le potassium joue un rôle dans la combinaison de protéines à l'ARN pour former des ribonucléo-protéines. Il agit comme un régulateur enzymatique dans la synthèse des polypeptides bactériens (Mandeistan et McQuillen, 1973). Bergersen (1961) a montré l'influence du calcium sur la croissance de cette bactérie. Il observe une phase latente plus longue, une phase exponentielle plus courte, une croissance totale réduite et une production de cellules bactériennes anormales, avec une faible concentration de calcium (0,1 ppm), comparativement à une plus forte concentration (10-14 ppm) dans le milieu de culture du rhizobium. Les cellules déficientes en calcium sont gonflées et contiennent de nombreuses vacuoles suggérant une perte de la rigidité de la paroi cellulaire, ce qui entraîne une réduction de la viabilité (Vincent,

1962). Le calcium pourrait aussi lever l'inhibition provoquée par la glycine ou d'autres acides aminés de l'extrait de levure (Sherwood, 1972). En ce qui concerne le magnésium, il s'agit d'un élément essentiel pour la croissance, car il joue un rôle de régulateur enzymatique. Une déficience en cet élément produit une division anormale des cellules qui deviennent plus allongées (Norris, 1959).

Certains oligo-éléments tels le cobalt, le zinc, le manganèse et le fer sont requis en trace pour la croissance de rhizobium. Le cobalt est requis pour la synthèse et le fonctionnement de la vitamine B<sub>12</sub> et prévient la toxicité due au Ni ou au Cu (Wilson et Reisenauer, 1970a; Lowe et Evans, 1962). D'autre part, le zinc à faible concentration stimule la croissance (Wilson et Reisenauer, 1970b). Le fer joue un rôle important dans le transport des électrons. Il fait partie de la ferrédoxine (Fe-S-protéine) et à une fonction dominante dans la synthèse et le fonctionnement des cytochromes. De plus, il agit comme cofacteur (coenzyme métallique) dans plusieurs réactions enzymatiques. Le fer doit être sous forme soluble pour être assimiler par le rhizobium (Quispel, 1974).

### **2.2.2. Production d'inoculum à l'échelle industrielle**

Pour la production à grande échelle de l'inoculum, une grande variété de milieux ont été utilisés. Le milieu YMB (Vincent, 1970) est généralement utilisé pour la production du rhizobium à l'échelle de laboratoire. Le tableau 1 représente la composition du milieu de culture utilisé dans la production industrielle durant la période allant de 1925 au 1976.

Le sucre est le plus utilisé comme source de carbone, alors que le mannitol et le glycérin sont souvent utilisés pour le cas des espèces à croissance lente. Le glycérin représente le milieu le plus satisfaisant pour les rhizobia. En présence de ce substrat, les rhizobia ont un temps de génération plus court qu'en présence de mannitol, de glucose, de galactose ou de sucre (Arias et Martinez-Drets, 1976).

Dans la même perspective, plusieurs chercheurs ont tenté de tester des déchets industriels, comme les sous-produits de l'industrie des boissons alcooliques (Burton, 1979), les débris des enveloppes de pois protéolysés (Gulati, 1979), les sous produits de l'industrie de levures (Meade et al., 1985) et les résidus de fabrication du fromage

(le lactosérum) (Bissonnette et al., 1986). Les recherches ont conduit à des résultats satisfaisants. Ainsi, avec le lactosérum, les chercheurs ont obtenu un nombre

**Tableau 1.** Milieux utilisés dans la culture de rhizobium à l'échelle industrielle (Tiré de Burton, 1979)

| Composition (mg/l)                                  | Wright<br>(1925) | Bond<br>(1940) | Van<br>Schreven<br>(1967) | Burton<br>(1967) | Date<br>(1976) |
|---|------------------|----------------|---------------------------|------------------|----------------|
| Sucrose   | -                | 10             | 15                        | 10               | -              |
| Mannitol  | 10               | -              | -                         | 2                | 10             |
| K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                      | -                | -              | -                         | 0.10             | -              |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 0.50             | 9.50           | 0.50                      | -                | 0.50           |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | -                | -              | -                         | 0.37             | -              |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                 | 0.20             | 0.20           | 0.20                      | 0.18             | 0.80           |
| NaCl  | 0.10             | 0.10           | -                         | 0.06             | 0.20           |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>    | -                | -              | -                         | 0.10             | -              |
| CaSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O                 | -                | -              | -                         | 0.04             | -              |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O | -                | -              | -                         | -                | -              |
| CaCO <sub>3</sub>                                   | 3.00             | 1.00           | 2.00                      | 0.25             | -              |
| Gluconate de Ca                                     | -                | 1.50           | -                         | -                | -              |
| FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                 | -                | -              | -                         | -                | 0.10           |
| Eau de levure (ml)                                  | 100              | 50             | 100                       | -                | 0.10           |
| Levure auto lysé                                    | -                | -              | -                         | 1.00             | -              |
| Eau (ml)  | 900              | 950            | 900                       | 1000             | 900            |

de  $5 \times 10^9$  ufc/ml de cellules de *S. meliloti*, après 48 heures de culture. Ce nombre augmente à  $1 \times 10^{10}$  ufc/ml lors d'un ajout d'extrait de levure (1 g/L) et de phosphate (0,5 g/L). Ceci le rend un milieu promoteur pour la production à grande échelle.

### 2.2.3. Les conditions de production de rhizobium

Lors de la production de rhizobium, les principales exigences pour la croissance se concentrent au niveau de l'oxygénation, de la température et du niveau de l'inoculation.

Puisque le rhizobiun est une bactérie aérobie obligatoire, un accroissement de l'aération se traduit par une augmentation de son taux de croissance (Quispel, 1974). Le taux d'oxygénation dans des erlenmeyers agités est suffisant pour les besoins des cultures de rhizobium (Ertola et al., 1969). Sous un faible taux d'oxygénation (29 ml O<sub>2</sub>/L h), le taux de croissance est ralenti. À des niveaux d'oxygénation plus élevés

(jusqu'à 40 fois le taux nécessaire), les taux de croissance sont comparables (Ertola et al., 1969).

La température d'incubation du rhizobium n'est pas un facteur limitant déterminant. Cependant, maintenir la culture à une température optimale permet de réduire notablement le temps de culture, donc les risques de contamination. Une température de 25 à 30 °C convient à presque toutes les souches de rhizobium.

Le processus d'inoculation joue un rôle important lors de la culture. Une inoculation massive du milieu de culture permet de réduire le temps de latence et atteindre plus rapidement la concentration maximale de cellules viables. Date et Roughley (1977) proposent une inoculation de 0.1 à 1%. D'autres chercheurs utilisent un volume d'inoculum de 1 à 3% et ceci en fonction de la nature du milieu de culture (Biossonnette et al., 1986).

### **2.3. Utilisation des rhizobia en agriculture**

Il est maintenant bien connu que les légumineuses ont la faculté de former des nodosités racinaires en symbiose avec les bactéries rhizobium. L'exploitation des rhizobia est généralement reconnue comme une priorité pour la recherche en biotechnologie du fait de son importance fondamentale pour la croissance des légumineuses et la production alimentaire. Les agriculteurs ne peuvent guère tirer parti des rhizobia présents naturellement dans le sol lorsque celui-ci contient des souches à faible pouvoir fixateur d'azote ou des populations limitées de souches à pouvoir fixateur d'azote élevé. C'est pourquoi il est courant aujourd'hui d'inoculer les légumineuses, c'est-à-dire d'ajouter délibérément des souches de rhizobium efficaces, de manière à accroître les populations efficaces et ainsi, augmenter les rendements des légumineuses.

Traditionnellement, on appliquait les rhizobia aux cultures par des méthodes de transfert de sol, par exemple en apportant dans un champ de la terre prélevée dans un champ contenant des rhizobia, ou en collectant la terre entourant les racines et les nodosités de légumineuses et en l'appliquant directement sur les semences d'autres légumineuses (OCDE, 1995). Par la suite, on a compris qu'une inoculation microbienne n'était efficace que si elle était compatible avec la culture. En d'autres termes, la souche doit être spécifique à la légumineuse et être présente sous forme de

produit formulé comportant des agents assurant le maintien de la viabilité. Ceci facilite la manipulation du produit pour l'inoculation. On a tout d'abord utilisé comme support inerte de la gélose et du sable, puis on a eu recours à la tourbe, qui est devenue un standard dans ce secteur. De même, d'autres types de support (vermiculite, lignite, cellulose et certains déchets industriels) ont été testés (Walter, 1992; Kandasamy and Prasad, 1971; Pugashetti et al., 1971; Muniruzzaman, 1992; Ajay et al., 1996).

Les inoculants à usage agricole qui sont essentiellement fournis par des sociétés spécialisées existent depuis 1896, année où fut breveté aux Etats-Unis le premier inoculum commercial. Certains pays (Australie, Nouvelle-Zélande, Canada, France...etc.) ont établi des normes visant à garantir que les inoculums vendus dans le commerce auront une efficacité optimale au moment de leur application en champ (OCDE, 1995). Généralement, la qualité des inoculants pour les légumineuses est basée essentiellement sur la présence d'un nombre adéquat de rhizobia viables et efficient dans le produit pour entraîner une nodulation efficace. La norme canadienne exige que l'inoculant doive apporter de  $10^3$  (cas de petite graine) à  $10^5$  (cas de grosses graines) cellules/graine (Smith, 1992).

Il existe deux principales méthodes d'inoculation des légumineuses avec des rhizobia. L'inoculum peut être mélangé directement à la semence après adjonction d'un adhésif et d'une faible quantité d'eau, ou en ajoutant de grandes quantités d'eau pour former une bouillie. Le traitement par voie sèche est la méthode la plus répandue en raison de sa simplicité, mais malheureusement, c'est également la moins satisfaisante en termes d'adhésion du produit à la semence. On utilise également des semences pré-inoculées pour introduire certaines espèces de rhizobia dans des cultures (OCDE, 1995).

Lorsqu'ils se présentent sous forme liquide ou de granules, les inoculums peuvent être appliqués directement dans le sol. Il est parfois souhaitable d'avoir recours à cette méthode lorsque les produits agrochimiques, comme les antifongiques, appliqués sur les semences risquent d'être nocifs pour les rhizobia, lorsque le sol est chaud et sec (ce qui est défavorable aux bactéries), ou lorsque les populations de rhizobium présentes dans le sol sont importantes et fixent peu l'azote et qu'il est donc nécessaire d'apporter de grandes quantités d'inoculum pour coloniser massivement la zone d'enracinement des plantes pendant l'installation du peuplement. Une autre méthode, qui met en œuvre une application mixte, s'est également révélée efficace. Une fois les semis

effectués, on utilise les systèmes d'irrigation pour pulvériser une bouillie contenant l'inoculum sur les semences pré-inoculées (Ciafardini et Lambardo, 1990).

Le Canada et le Québec accordent une importance pour la culture des légumineuses, vu leurs valeur économique. Le soja, par exemple, offre un potentiel de rendement de 2 500 à 4 000 kg/ha, avec une teneur en protéines de 38 à 45 %, et en huile de 18 à 21 % (CPVQ, 1995). Cette culture s'est développée de façon spectaculaire dans la dernière décennie. L'importance de cette culture au Canada et au Québec vient du fait que plusieurs pays sont acheteurs de différents types de soja destinés à l'alimentation humaine. Ainsi, le Québec est en compétition avec l'Ontario dans l'exportation de ces légumineuses. Sa première exportation de soja (exportation de 500 TM vers le Japon) date de 1988, alors que l'Ontario et l'Etats-Unis sont sur le marché depuis les années 70. Les besoins de soja en azote varient de 223 à 262 kg N/ha pour un rendement de 3 500 kg/ha de soya (CPVQ, 1996). Les prélèvements en azote du soja sont donc élevés. Ces besoins en azote sont toutefois comblés dans une large proportion par la fixation symbiotique.

De même, la symbiose rhizobium-luzerne a un intérêt agronomique et économique considérable dans les systèmes de production agricole au Québec. Sous de bonnes conditions d'exploitation, la luzerne fixe plus de 200 kg d'azote annuellement sur chaque hectare (CPVQ, 1995). De tels taux de fixation sont annuellement suffisants pour satisfaire aux besoins de la luzerne. De plus, les légumineuses peuvent alimenter les non-légumineuses en leur fournissant une partie de l'azote qu'elles fixent. Les symbioses avec les légumineuses à grain revêtent une importance agronomique et un intérêt grandissant au Québec passant de 1 000 ha en 1980 à plus 45 000 ha en 1993. Dans la même perspective, dans les régions tempérées, des recherches visent adapter les rhizobia de cette symbiose pour les régions plus froides (CPVQ, 1995).

Donc, en agriculture durable, les légumineuses jouent un rôle clé en termes de bilan azoté du système d'exploitation agricole. Ainsi, afin de croître l'exploitation des légumineuses, il est nécessaire de pousser les recherche pour l'isolement de souches de rhizobium plus efficaces et découvrir des milieux de culture adéquats pour la production d'un inoculum de bonne qualité et bon marché.

## **2.4. Généralité sur les boues des stations d'épuration**

Les eaux usées municipales et industrielles renferment une grande variété de polluants d'origine organique, inorganique et biologique qui vont se trouver en suspension, sous forme de colloïdes ou dissous. Les polluants organiques sont des protéines, des hydrates de carbone, des acides gras, des huiles et des matières synthétiques (agents tensioactifs, phénols ou pesticides). Les polluants d'origine inorganique renferment les chlorures, les sels minéraux (de calcium, de magnésium et de potassium), le phosphore, l'azote, le soufre, des ions métalliques (le cuivre, le cadmium, le plomb, le chrome, le manganèse, le nickel, le fer, le mercure et le zinc). Les polluants d'origine biologique sont les micro-organismes tels que les bactéries, les protozoaires, les virus et les parasites. L'enlèvement de ces polluants est réalisé à l'aide de procédés physiques, chimiques et biologiques.

Les procédés de traitement physique (la sédimentation, la flottation, la flocculation et la filtration), chimiques (la précipitation, la transmission de gaz, l'adsorption et la désinfection) et biologiques peuvent être regroupés dans des chaînes de traitement dans le but d'obtenir une eau de qualité acceptable pour le rejet dans l'environnement. Généralement, les types de processus à employer dans une chaîne de traitement dépendent de la qualité de l'eau usée à traiter et du taux d'élimination des polluants envisagé (Metcalf et Eddy, 1972). Ces procédés de traitement génèrent des boues d'épuration. Ces dernières sont considérées comme déchets recyclables.

Les boues d'épuration sont d'origine primaire, secondaire ou sont digérées. Ceci dépend de l'étape du traitement d'où elles proviennent le long d'une chaîne de traitement. Ces boues sont des suspensions complexes formées d'eau (entre 95% et 98%), de matière organique et inorganique de différentes tailles ainsi que d'une population microbienne très variée. Il s'agit d'un mélange de polluants enlevés aux eaux, de produits du métabolisme de la population microbienne et ceux dus au processus du traitement. Le volume et les caractéristiques des boues varient selon l'origine (municipale ou industrielle) et le type de traitement donné à l'eau usée.

Les boues primaires sont obtenues principalement du décanteur primaire et les solides qu'elles contiennent sont d'origine minérale et organique. Le pourcentage de matières sèches n'excède généralement pas 5% (Roques, 1979). Les boues secondaires qui proviennent du bassin d'aération et du clarificateur secondaire sont formées de flocs bactériens constitués d'un mélange de micro-organismes vivants ou morts, de

particules organiques, de colloïdes organiques et de débris de cellules lysées. Les matières volatiles en suspension (MVES) représentent 70 à 80 % de contenu de ces boues en matière en suspension (Roques, 1979).

La quantité de boue produite varie selon le type de traitement, le volume à traiter et l'origine de l'eau (municipale ou industrielle). Selon les chiffres estimés, chaque personne peut produire par jour entre 50 et 100 grammes de boue sèche (Vergès, 1984; Environnement Canada, 1985; Webber, 1984; Sabey et Hart, 1975). En 1978, le gouvernement de Québec a lancé un programme d'assainissement des eaux usées qui vise 900 municipalités correspondant à 5.2 millions de personnes (Couillard et al., 1986; Giroux, 1986). Sur cette base, entre 100 000 et 200 000 tonnes de boues sont produites par année dans la province (Grenier et Couillard, 1989). Selon Webber (1988), dans sept provinces canadiennes, toutes les eaux usées conduites par des égouts municipaux sont déjà traitées avant leur disposition finale. La construction d'usines d'épuration dans les autres provinces restantes va entraîner une augmentation de la quantité de boue. On estime que la production de boue pourrait atteindre un million de tonnes de matière sèche par année à la fin du siècle (Tyagi et al., 1993). Aux Etats Unis la production annuelle a atteint 5.4 millions de tonnes de boues sèches (USEPA, 1993) et avec les programmes d'assainissement prévus pour l'année 2010 qui touchera 87% de la population, ceci fera augmenter considérablement la quantité de boues produites (Burton Environmental Engineering et al, 1993). En Europe, pour certains pays qui forment la communauté européenne (CEE) une augmentation de 33% de la quantité de boues a été notée de 1984 à 1994 (Olivier, 1994) et elle va augmenter au cours des années.

#### **2.4.1. Stabilisation et prétraitement des boues**

Avant de réaliser le conditionnement nécessaire pour leur élimination finale, les boues primaires et secondaires doivent être stabilisées afin de réduire leur contenu en matière organique, en pathogènes et leurs odeurs désagréables, ce qui conduit aux boues digérées. Leur stabilisation est réalisée en utilisant des moyens chimiques, thermiques ou biologiques (digestion aérobie ou anaérobie) (Metcalf et Eddy, 1972; Qasim, 1982).

Dans un système digestion aérobie, seulement 30 à 40% de la matière organique sont digestibles (Gossett et Belser, 1982). Parkin et Owen (1986) rapportent que la dégradation de 30 à 50% de la demande chimique en oxygène (DCO) ou des solides volatiles (VS) exige une durée de 30 jours.

En outre, l'efficacité d'un procédé de digestion des boues peut être améliorée par l'utilisation d'un prétraitement. Les procédés de prétraitement peuvent être thermiques, chimiques ou mécanique ou enzymatiques. Le prétraitement mécanique consiste en une désintégration des particules solides par ultrason (Eastman et Ferguson, 1981). Selon Everett (1973), une énergie ultrasonique, maintenue une heure à une fréquence de 20KHz et à 375 W, favorise la destruction des cellules bactériennes.

Le traitement chimique acide ( $HCl$ ,  $H_2SO_4$ ) ou alcalin ( $CaCO_3$ ,  $NaOH$ ) favorise l'hydrolyse et la décomposition des lipides, des hydrocarbures et des protéines en substrats de faibles tailles comme les acides aminés, les polysaccharides et les acides aliphatiques (Mukherjee et Levine, 1992; Woodard et Wukasch, 1994). La dégradation oxydative de certains composés (cellulose, hemicellulose et d'autres polysaccharides) par le peroxyde d'hydrogène en présence de certains métaux de transition, constitue un procédé chimique qui augmente de manière significative le processus enzymatique de saccharification (Tagaki, 1987). La même chose a été observée pour l'utilisation de l'ozone (Yasui et Shibata, 1994).

Des résultats d'hydrolyse des boues efficaces ont été obtenus par des prétraitements thermiques (Stuckey et McCarty, 1984; Li et NoiKe, 1992). Ce traitement thermique consiste en un autoclavage des boues à haute température et durant un temps bien déterminé.

Les prétraitements enzymatiques ou microbiens s'appliquent pour certains substrats spécifiques (cellulose, lignine...etc.). L'application de l'ensemble de ces procédés est limitée par les conditions techniques et économiques.

#### **2.4.2. Élimination des boues**

Le traitement des boues (épaisseur, conditionnement et déshydratation) et leur élimination peuvent représenter environ 50% du coût d'opération d'une usine de traitement (Lester et al., 1983; Pahren, 1980; Vesilind, 1980). Ceci nécessite la

recherche de solutions économiques pour résoudre le problème d'élimination finale des boues. Les principaux procédés employés actuellement sont le rejet en mer, l'incinération, l'enfouissement et le recyclage.

Le rejet en mer cause des problèmes environnementaux (contamination des sédiments et des espèces marines). Ceci a entraîné l'intervention des gouvernements afin de réduire cette pratique (Bruce et Davis, 1989). Ce mode d'élimination est de moins en moins employé, voir même interdit dans certains pays (Couillard et Mercier, 1994; Lester et al., 1983; Bradley et al., 1992).

L'incinération peut offrir certains avantages par rapport aux autres moyens d'élimination, comme la réduction à environ 20% du volume que constituent les solides des boues. Elle élimine aussi quelques problèmes environnementaux potentiels comme la présence de micro-organismes pathogènes et des substances organiques toxiques. Cependant, il s'agit d'un procédé coûteux par le fait qu'il consomme une grande quantité d'énergie, en plus des problèmes de contamination de l'air par l'émission de substances toxiques (mercure et cadmium) à la suite de la combustion et l'enfouissement des cendres générées (Tyagi et Couillard, 1990).

L'enfouissement sanitaire dans des endroits contrôlés constitue une des techniques amplement utilisées. Aux Etats-Unis, 20% des boues sont ainsi disposées tandis qu'en Europe le pourcentage augmente à 40% (USEPA, 1990). Par ailleurs, les coûts liés à l'enfouissement et la difficulté d'identifier les sites adéquats, le rend, au cours du temps, de plus en plus difficile à envisager (Mercier, 1988).

La valeur des boues d'épuration comme fertilisants et agents d'amendement des sols est mondialement reconnue en raison de leur contenu en éléments nutritifs importants comme l'azote, le phosphore (MENVIQ et MAPAQ, 1991) et la matière organique. En effet, elles peuvent contenir de 3 à 5 % d'azote, de 1 à 4 % de phosphore sur une base de matière sèche (Wong et Henry, 1984) et 30 % de carbone organique sur une base sèche (Couillard et Grenier, 1989). La valorisation des boues en agriculture et en foresterie permettent de tirer profit de leur valeur comme fertilisants (Mostaghimi et al., 1992; MENVIQ et MAPAQ., 1991; Couillard et Grenier, 1987). L'épandage et la disposition en surface constituent les pratiques les plus employées. Aux Etats-Unis. 40% de la production annuelle de boues sont gérées de cette façon (USEPA, 1993). En

Europe, plus de 40% de la production annuelle de boues sont valorisées en agriculture (Blais et al., 1993; Olivier, 1994).

Le recyclage est une pratique plus économique et plus écologique que les autres modes de disposition finale (Baldwin et al., 1983; Sabey et Hart, 1975). Dans le cadre du développement durable, le Gouvernement du Québec (Gouvernement du Québec, 1983), celui du Canada (Environnement Canada, 1985) et l'agence américaine de protection de l'environnement (USEPA, 1979) favorisent le recyclage comme pratique de disposition finale des boues. Ainsi, d'autres options pour recycler les boues ont été envisagées (préparation de peinture, de papier, conversion en carburants...etc.) (Bowen et al., 1989; Harper et al, 1988).

Toutes ces techniques présentent des créneaux intéressants, mais ne permettent pas de résoudre définitivement le problème que représente l'important volume de boues produites lors du traitement des eaux municipales, dont les métaux lourds qui y sont associés constituent un danger potentiel, quelle que soit l'option retenue (Alleman et al., 1990; USEPA, 1984).

#### **2.4.3. Les métaux lourds dans les boues d'épuration**

La présence de métaux lourds dans les boues d'épuration municipales provient de sources industrielles et domestiques, ainsi que du ruissellement urbain (McGrath et al., 1994; Davis, 1987; Tjell, 1986; Wozniak et Huang, 1982). Ces métaux constituent donc un obstacle important pour la disposition finale de ces boues dans l'environnement, et leur enlèvement devient essentiel pour la gestion adéquate de ces dernières.

Lors du procédé d'épuration des eaux usées, environ 90% des métaux lourds se retrouvent généralement dans les boues primaires et secondaires (Stephenson et Lester, 1987a, 1987b) et une partie importante est éliminée lors de la décantation primaire (Sterrit et Lester, 1984). En plus, pendant le traitement secondaire par boues activées, des complexes entre les métaux et les polymères extracellulaires sont formés. Ces complexes sont responsables de la structure du floc bactérien (Brown et Lester, 1979). Pour éviter ces teneurs élevées en métaux lourds dans les boues, certains pays préfèrent pratiquer un contrôle à la source des rejets industriels (USEPA, 1990; UK Department of the Environment, 1993; McGrath et al., 1994). Le tableau 2 présente

les normes prescrites par le Gouvernement du Québec (Flynn et al., 1987) et par la Communauté Économique Européenne (CEE) (Davis, 1987), concernant les concentrations en métaux lourds dans les boues destinées à l'épandage agricole. Les valeurs recommandées par la CEE sont largement supérieures à celles du Gouvernement du Québec, surtout à cause des sols plus contaminés en Europe.

**Tableau 2.** Teneurs limites obligatoires et recommandées en métaux lourds dans les boues destinées à l'épandage

|               |                     | Concentration (mg/kg de boue sèche) |      |     |      |      |
|---------------|---------------------|-------------------------------------|------|-----|------|------|
|               |                     | Cd                                  | Cu   | Ni  | Pb   | Zn   |
| <b>Québec</b> | <b>Obligatoires</b> | 15                                  | 1000 | 180 | 500  | 2500 |
|               | <b>Recommandées</b> | 10                                  | 600  | 100 | 300  | 1750 |
| <b>CEE</b>    | <b>Obligatoires</b> | 40                                  | 1500 | 400 | 1000 | 3000 |
|               | <b>Recommandées</b> | 20                                  | 1000 | 300 | 750  | 2500 |

L'étude réalisée par St-Yves et Beaulieu (1988) montre que plus de 52% des boues produites au Québec dépassent les normes obligatoires (concentrations limites à ne pas dépasser) pour l'épandage agricole, alors que 85% dépassent les teneurs recommandées . Par ailleurs, selon Wong et Henry (1984), plus de 50% des boues produites en Ontario ne respectent pas les normes ontariennes, alors que pour Wonzniak et Huang (1982), 50% à 60% des boues produites aux États Unis dépassent les normes de l'USEPA.

## 2.5. Effet de métaux sur les populations de rhizobium

Certaines données de la littérature, rapportent que la présence de métaux lourds semble avoir un effet sur la fixation de l'azote atmosphérique, sur la biomasse et la taille ainsi que la diversité génétique des populations de rhizobium.

Dans cette perspective, Giller et al. (1989) ainsi que Angle et al. (1993) ont constaté que les isolats de rhizobium (*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*) obtenus à partir de nodosité de trèfle blanc (*Trifolium resens L*) cultivé sur un sol contaminé par le Cu, le Zn et surtout le Cd, étaient inefficaces par comparaison avec des souches efficientes issues d'un sol non contaminé.

Rother et al. (1983), selon des essais faits sur des sols contaminés par le Cd, le Zn et le Pb, ont rapporté uniquement une perte mineure de l'activité nitrogénase, de la taille de plantes et de la nodulation. En effet, la capacité fixatrice d'azote est maintenue. De même, un retard de nodulation a été démontré par Martensson et Witter (1990). En revanche, d'autres études, ont démontré la présence de souches de rhizobium efficientes dans des sols hypercontaminés par les métaux lourds (Giller et al., 1989).

Dans leur étude, Reddy et al (1983) ont constaté un abaissement de la population des *Bradyrhizobium* dans un sol récemment contaminé par des boues d'épuration. Ce déclin de la viabilité des bactéries a été attribué à la toxicité des métaux lourds. Dans ce même contexte, Madariaga et Angle (1992) expliquent cette mortalité par la présence de concentrations toxiques de sels solubles dans les boues.

La diminution de la taille des populations de rhizobium en rapport avec l'augmentation des teneurs en métaux dans le sol et le temps d'exposition est actuellement bien étudiée (McGrath et al., 1995; Chander et Brookes, 1991). Selon les tests ecotoxicologiques au laboratoire et au champ le nombre des bactéries serait réduit par la présence des métaux (Chaudri et al., 1993; Giller et al., 1989). Ceci se traduit par la disparition rapide et à court terme des cellules les plus sensibles (Frostegard et al., 1996). À long terme, une compensation de ces pertes en biomasse est possible à la suite d'un développement d'une tolérance et des changements dans la structure des communautés.

Les travaux de McGrath el al. (1988) ainsi que Martensson (1992) désignent le zinc comme le principal responsable de la diminution de la taille des populations de rhizobium du sol. Cependant, il est possible que la présence d'autres métaux dans le sol amplifie l'effet毒ique du zinc. La toxicité des métaux serait de plus aggravée par la réduction du pH des sols (Ibekwe et al., 1995). Cependant, selon McBride (1995), la matière organique contenue dans les boues résiduaires protégerait les micro-organismes de la toxicité des métaux. Il ajoute que ces métaux ne sont libérés dans la solution du sol, sous forme d'ions actifs et toxiques, qu'après minéralisation, à long terme, de la matière organique. C'est pourquoi les métaux n'induiraient pas de diminution de la biomasse selon Kelly et Tate (1998) et ne seraient pas toxiques pour le rhizobium selon Ibekwe et al. (1995).

En outre, la sensibilité des populations de rhizobium semble donc dépendante des concentrations de métaux dans le sol, de la nature du sol et du contaminant. Ces bactéries pouvant disparaître lorsque le seuil de toxicité est dépassé. Ceci a été observé au laboratoire, à des concentrations supérieures à 385 mg/kg de sol et à 7 mg/Kg de sol respectivement pour le Zn et le Cd et pour un temps d'exposition de 8 mois (Chaudri et al., 1993). Durant les mêmes expériences Chaudri et al. (1993) ont constaté que le Ni ne présente pas d'effet sur les rhizobia à des concentrations de 54 mg/Kg de sol. Alors que le Cu entraîne uniquement l'abaissement du nombre des cellules à des concentrations supérieures à 128 mgCu/kg de sol.

Selon Dahlin et al. (1997) ainsi que Frostegard et al. (1996), l'effet des métaux sur la structure des communautés de rhizobium serait graduel avec l'augmentation des concentrations des métaux, plutôt que liés à un seuil de toxicité observé à long terme.

À long terme, la contamination des sols par les métaux affecterait la diversité génétique des populations de rhizobium. Selon Giller et al. (1989) ainsi que Chaudri et al. (1992a), un seul génotype métal-tolérant ayant perdu la capacité de fixer l'azote aurait été sélectionné par la présence des métaux. L'absence de diversité génétique serait illustrée par des profils plasmidiques tous similaires, comparée à l'hétérogénéité des génotypes des isolats obtenus sur un sol non pollué (Chaudri et al., 1992a et 1992b). Ce résultat a été confirmé par l'analyse des profils RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Hirsch et al., 1993).

Diaz-Ravina et al. (1994) ont constaté que la tolérance de certaines espèces pourrait être obtenue ou augmentée par mutation. De même, la capacité de survivre des souches métal-tolérantes préexistantes les rendrait dominantes (modification des proportions relatives des espèces de rhizobiurn) (Hirsch et al., 1993).

Par ailleurs, les approches moléculaires de caractérisation génotypique des isolats (PCR-RFLP de régions d'ADN ribosomique) et l'analyse des contenus plasmidiques (profils plasmidiques) ont permis de visualiser un changement de la structure des communautés et des populations de rhizobium, ainsi que de la diversité, suite à la contamination du sol par le cuivre (Laguerre, 1998).

Il faut mentionner, que le génome bactérien extrachromosomique plasmidique des rhizobia porte l'essentiel de l'information nécessaire pour la symbiose. Un

mégaplasmide *pSym* chez le rhizobiurn contient ainsi les gènes *nodABC*, les gènes *nodIJ* qui y participent, le gènes *nif* codant la nitrogénase et les gènes *fix* de fixation symbiotique de l'azote. Un changement ou une perte de cet ADN conduit donc à la perte de la capacité à noduler et, par conséquent, la capacité de fixer l'azote atmosphérique. Cependant, pour le cas de l'espèce *Sinorhizobium meliloti* les gènes nécessaires pour l'établissement d'une symbiose complète sont situés sur plus d'un plasmide (mégaplasmides *nod-nif* et *exo-thi*). Ainsi, une mutation dans l'un des gènes de spécificité d'hôte (*hsn*) pourrait modifier le spectre d'hôte d'une souche de rhizobium. L'altération des gènes *nodIJ* pourrait éventuellement expliquer, aussi, le retard de nodulation observé par Martensson et Witter (1990) et Ibekwe et al (1996).

### **3. PROBLÉMATIQUES**

#### **3.1. Problématique de disposition des boues**

Le défi pour les usines de traitement des eaux usées est de trouver des moyens pour réduire les coûts de la disposition des rejets. Le traitement et la gestion des boues constituent une part importante de ce défi. L'augmentation de la production des boues a fourni une raison importante pour intensifier les recherches sur leur disposition finale. Généralement, les boues provenant du traitement des eaux usées industrielles et municipales peuvent être utilisées pour l'amendement des sols. Elles contiennent certains éléments nutritifs utiles à la croissance des plantes dont l'azote, le carbone, le phosphore, le potassium et le magnésium. Les quantités varient d'une boue à l'autre selon l'origine et le procédé de traitement. Il est toutefois possible d'exploiter la richesse des boues en source d'énergie peu coûteuse utilisables par les micro-organismes, pour la production d'inoculants commerciaux de rhizobium.

#### **3.2. Problématique de la production d'inoculants commerciaux**

La production d'inoculants commerciaux sur milieu synthétique est limitée surtout à cause du coût élevé (Bissonnette et al., 1986). La recherche pour trouver un milieu de culture moins cher capable de soutenir la croissance du rhizobium a été faite par plusieurs chercheurs. L'emploi des déchets industriels comme milieu de culture se heurte à certaines limitations comme par exemple leur disponibilité, leur prétraitement et leur carence en certains éléments de croissance. Ainsi, pour la majorité des déchets testés (les débris des enveloppes de pois protéolysés, les sous-produits de l'industrie

de levure et l'extrait de germes de malt), le milieu YMB est partiellement remplacé (Bioardi et Ertola, 1985).

En outre, dans les travaux de Bioardi et Ertola (1985) l'extrait de germes de malt a été mélangé avec d'autres éléments nutritifs (peptone,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $KNO_3$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NaCl$ ,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , extrait de levure, biotine, etc...). De même, l'utilisation des enveloppes de pois a nécessité des étapes de prétraitement et l'ajout de certains éléments de croissance (Gulati et al., 1979).

En se basant sur ces deux problématiques (la problématique des boues et celle de la production d'inoculants commerciaux) et sur le fait que les frais de disposition des boues sont peu couteux (250 à 400\$/t de boue), on peut mentionner que les boues d'épuration peuvent être considérées comme des déchets potentiellement utilisables et recyclables, et dont leur utilisation pour la production d'inoculants commerciaux de rhizobium n'a pas été encore testée. Ceci fera l'objet de la présente recherche dont les hypothèses et les objectifs seront présentés dans la section suivante.

#### **4. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE**

##### **4.1. Hypothèses**

Pour faire preuve qu'un procédé de production d'inoculum commercial de rhizobium par utilisation des boues des stations d'épuration comme milieu de culture est applicable, il faut vérifier les hypothèses suivantes:

- 1/** Les rhizobia sont capables d'utiliser différentes sources de carbone et d'azote, à savoir les sources apportées par les boues d'épuration tout en conservant leur potentiel symbiotique;
- 2/** Les boues d'épuration constituent un déchet disponible et qui contient les éléments nutritifs nécessaires pour supporter la croissance du rhizobium.

##### **4.2. Objectifs de la recherche**

Le présent projet de recherche vise principalement à évaluer la faisabilité de la production d'un inoculum commercial de rhizobium en utilisant les boues des stations d'épuration comme milieu de culture. Ceci entre dans le cadre de la valorisation des

boues d'épuration et la recherche de solutions plus efficaces pour surmonter le problème de manque d'azote dans les sols lors de la culture des légumineuses et par conséquent, éviter les coûts élevés des engrains azotés (même si leur utilisation est faible pour les légumineuses) et des milieux synthétiques. L'objectif global de ce projet inclut une série d'objectifs spécifiques regroupés comme suit dans la démarche de travail:

- 1/ Connaître les caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration de différentes origines qui seront testées comme milieu de culture pour des souches de rhizobium;
- 2/ Démontrer que les boues sont capables de supporter la croissance de rhizobium, par réalisation de différents essais avec différents types de boues d'usines d'épuration et des souches de rhizobium à croissance lente et rapide;
- 3/ Évaluer l'influence d'un prétraitement sur la production de rhizobium, en utilisant comme prétraitement l'hydrolyse acide avec  $H_2SO_4$ , l'hydrolyse alcaline avec NaOH et le traitement oxydatif avec  $H_2O_2$ ;
- 4/ Évaluer au laboratoire la nodulation des souches cultivées dans les boues;
- 5/ Étudier l'effet des solides en suspension sur la croissance du rhizobium;
- 6/ Étudier l'effet de l'addition de certains sources de nutriments sur la culture des rhizobia (source de carbone, source d'azote et de vitamines)
- 7/ Produire le rhizobium en fermenteur;
- 8/ Étudier la survie de rhizobium et l'effet d'utilisation d'un support (tourbe et boues déshydratées);
- 9/ Étudier l'efficacité des inoculants à base de boue sur des plantes cultivées en pots.

## 5. MÉTHODOLOGIE

Afin de déterminer la capacité du rhizobium de croître dans les boues des stations d'épurations, des essais ont été effectués sur différents types de boues, provenant de différentes stations d'épuration (Tableau 3). Ces boues ont été choisies pour leurs

caractéristiques différentes. Ces boues étaient prélevées, stérilisées et conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation. L'information concernant les techniques de caractérisation des échantillons des boues est présentée dans l'annexe A.

Le but de ces essais est d'étudier la capacité des boues de supporter la croissance du rhizobium et du bradyrhizobium. Les échantillons des boues sont ajustés à pH 7, stérilisés puis inoculés par des souches de rhizobia. Les techniques d'inoculation et de

**Tableau 3.** Boues des usines d'épuration testées comme milieu de culture pour les souches de rhizobium

| Boue                               | Origine    |
|------------------------------------|------------|
| Valcartier primaire (VALP)         | Municipal  |
| Valcartier secondaire (VALS)       | Municipal  |
| Black Lake primaire (BLKP)         | Municipal  |
| Black Lake secondaire (BLKS)       | Municipal  |
| Communauté Urbaine de Québec (CUQ) | Municipal  |
| Pâtes et papiers secondaire (PPS)  | Industriel |

culture en Erlenmeyer sont indiquées dans les chapitres suivants et en annexe A. Dans cette partie du travail quatre souches de rhizobium ont été testées : deux souches de rhizobium à croissance rapide (*Sinorhizobium meliloti* (A<sub>2</sub>) qui nodule la luzerne et *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (ATCC10004) qui nodule le pois) et deux souches *Bradyrhizobium* à croissance lente (*Bradyrhizobium japonicum* (532C) et *Bradyrhizobium elkanii* (USDA76) qui nodulent le soya).

Vu que les boues contiennent des composés organiques complexes, il semblait important d'évaluer si un prétraitement pouvait améliorer les performances des boues pour soutenir la croissance du rhizobium. L'objectif du prétraitement est d'augmenter la disponibilité de substrat assimilable par les bactéries. En plus de l'autoclavage des boues, les traitements choisis sont les suivants: l'hydrolyse acide avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; l'hydrolyse alcaline avec NaOH et l'oxydation avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, l'effet des prétraitements sur la croissance de la souche *S. meliloti* (A<sub>2</sub>) a été évalué. Les protocoles des prétraitements sont présentés dans le chapitre 2 (section 2). Pour évaluer l'influence des solides en suspension et du pH d'hydrolyse (pH 2, 4 et 6) sur la croissance du *S. meliloti*, des boues secondaire et primaire de la station de Black Lake, avec différentes concentrations en solides en suspension, ont été utilisées. Selon le

même principe les deux types boues ont été traités par différentes doses de NaOH (50, 100, 150 et 200 meq/L de boue). Les protocoles de traitements acide et alcalin ainsi que les concentrations des solides en suspension utilisées sont donnés dans le chapitre 3 (section 2). Finalement, à la fin de chaque essai nous avons utilisé des échantillons de rhizobia pour vérifier la nodulation. Les préparations pour l'évaluation de l'indice nodulaire sont décrites dans l'annexe A. Dans l'ensemble des essais, la boue utilisée a été comparée au milieu YMB.

Des essais de croissance de la souche *S. meliloti* dans une boue secondaire additionnée de différentes concentrations d'extrait de levure ainsi que du glycérol ont été réalisés dans le but de voir la possibilité d'augmenter les performances de la fermentation et maximiser les rendements en cellules. De même l'effet d'un contrôle de pH sur la croissance a été l'objet de quelques essais en fermenteur. Le chapitre 4 (section 2) renferme les procédures appliquées.

Les boues déshydratées ont été, aussi, testées comme support pour les inoculants. L'effet de la nature de l'inoculant (inoculant préparé dans les boues ou dans le milieu standard) et la nature du support (boue déshydratée, tourbe et mélange boue-tourbe) ainsi que l'effet de la température (4 et 25 °C) et la durée de conservation sur la survie de la souche *S. meliloti* ont été étudiés. Les boues utilisées ainsi que les techniques employées sont présentées dans le chapitre 5 (section 2).

Finalement, l'efficacité symbiotique de l'inoculant produit dans les boues a été évaluée et comparée à celle d'un inoculant produit dans le milieu standard (YMB). Dans cette partie expérimentale la luzerne cultivée dans deux types de sol a été inoculée par deux types d'inoculant (*S. meliloti* cultivé dans les boues ou dans le milieu YMB). Nous avons étudié aussi l'effet de l'amendement des sols par des boues ainsi que par un fertilisant azoté sur l'inoculation et par conséquent sur la nodulation, la fixation d'azote et les rendements des plantes. La section 2 du chapitre 6 indique les sols et les boues utilisés ainsi que les procédures expérimentales.

## 6. RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 6.1. Caractérisation des boues des stations d'épuration

Cette première partie des travaux expérimentaux avait pour objectif de déterminer les caractéristiques physiques et chimiques des différentes boues et examiner les différents éléments qui peuvent constituer des facteurs favorisant la croissance des rhizobia. Les résultats de la caractérisation des boues (Tableaux 2 et 3, chapitre 2) montrent que les caractéristiques physiques et chimiques sont variables selon l'origine des boues. La concentration en solides totaux est généralement élevée dans les boues primaires (VALP : 35750 mg/L, BLKP : 34250 mg/L et CUQ : 23100 mg/L) alors que la concentration en carbone organique total est élevée dans les boues VALP (435 g/kg de matière sèche), CUQ(400 g/kg de matière sèche) et PPS (410 g/kg de matière sèche). La boue secondaire de Valcartier présente les concentrations les plus élevées en carbone et azote avec respectivement 387 et 55 g/kg de matière sèche. De même les concentrations en phosphore et sels minéraux (Ca, Mg et Na) sont variables d'une boue à l'autre. La richesse de ces boues en substances nutritives (carbone, azote, phosphore et sel minéraux) les rend valorisables comme substrat pouvant soutenir la croissance des souches de rhizobium. En outre, les rhizobia ont des exigences en calcium et magnésium. Ainsi, le Ca agit sur la croissance et favorise l'enlèvement de certaines inhibitions provoquées par certains acides aminés. Par contre, le Mg est un élément essentiel pour la croissance, car il joue un rôle de régulateur enzymatique (Vincent, 1962; Sherwood, 1972; Norris, 1959). Certains métaux, tels le zinc, le manganèse et le fer sont requis pour la croissance. Ainsi, le Zn stimule la croissance de rhizobium (Willson et Reisenauer, 1970b) et le Fe joue un rôle important dans le transport des électrons et agit comme cofacteur (Quispel, 1974). Cependant, certains éléments peuvent être toxiques pour les rhizobia, à savoir le Ni et le Cu (Wilson et Reisenauer, 1970a; Lowe et Evans, 1962).

Les rapports Ca/Mg et C/N (Tableau 2, chapitre 2) sont très variables d'une boue à l'autre (Ca/Mg varie entre 1.06 et 3.5, C/N varie entre 7 et 18.2). Ces rapports ont un impact sur la croissance du rhizobium. En effet, le rapport Ca/Mg semble avoir plus d'impact sur la croissance de la bactérie que la quantité de Ca et Mg considérée séparément (Vincent, 1962). Les espèces de rhizobium répondent différemment à une variation de ce rapport. Par exemple, le *R. trifolii* ne semble pas affecté par un rapport variant de 10 à 1/30, tandis que le *S. meliloti* semble croître mieux au rapport Ca/Mg le plus faible (Steinborn et Roughley, 1975). Il est donc clair, que la composition des boues peut influencer la croissance, la survie des souches de rhizobium et,

probablement, le processus de nodulation. Ainsi, la section suivante 6.2 expose les résultats de la croissance des rhizobia dans différentes boues municipales et industrielles.

## 6.2. Utilisation des boues comme milieu de culture pour les rhizobia

Pour évaluer la capacité de rhizobium à croître dans les boues d'épuration, deux souches à croissance rapide (*S. meliloti* et *R. leguminosarum* bv *viciae*) et deux souches à croissance lente (*B. japonicum* et *B. elkanii*) ont été cultivées dans six boues de différentes origines (VALP, VALS, BLKP, BLKS, CUQ et PPS).

L'ensemble des résultats (Figures 1 et 2, chapitre 2; Tableaux 4 et 5, chapitre 2) montre que les souches à croissance rapide et à croissance lente, réagissent différemment d'une boue à l'autre et que les boues secondaires supportent mieux la croissance. Généralement, le nombre maximal de cellules en fin de fermentation excède  $1 \times 10^9$  ufc/ml et le temps de génération est supérieur à celui obtenu par utilisation du milieu standard (YMB). La composition des boues affecte le temps de génération et le rendement en cellules. Certaines boues inhibent la croissance des rhizobia. Par exemple, la croissance de la souche *R. leguminosarum* bv *viciae* est inhibée en présence des boues primaires de Valcartier (VALP) et de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ). De même, à l'exception de la boue primaire de Black Lake (BLKP), les boues de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ) et du Valcartier (VALP) sont toxiques pour les deux souches de *Bradyrhizobium*.

Par ailleurs, la nature et la composition des boues et, par conséquent, la disponibilité d'éléments nécessaires pour la croissance influence la croissance des bactéries. Ajoutons à cela, la tolérance propre à chaque souche vis-à-vis de certains composés toxiques, à savoir les métaux lourds, peut expliquer ce comportement.

Il est généralement reconnu qu'à un rapport C/N élevé les bactéries utilisent l'azote disponible et ensuite cessent de croître et donc d'utiliser le carbone du milieu. La variabilité du rapport C/N d'une boue à une autre pourrait influencer la croissance. Le rapport Ca/Mg a aussi un effet sur la croissance. Selon Vincent (1962), même si les souches de rhizobium répondent différemment au rapport Ca/Mg, le meilleur taux de croissance a été atteint avec un rapport de 1/1. Dans notre cas, ce rapport est très variable selon l'origine des boues, ce qui explique la variabilité des résultats.

Le fait que les boues secondaires supportent mieux la croissance du rhizobium que les boues primaires, s'explique probablement par un meilleur transfert d'oxygène et une plus grande disponibilité des éléments de croissance. Ainsi, dans le cas des boues secondaires le transfert d'oxygène est plus favorisé, ajoutons à cela que la grande partie de matière nutritive se trouve sous une forme simple, accessible et assimilable par les bactéries.

Durant la croissance des rhizobia à croissance rapide, nous observons des variations du pH. Le pH initial avant inoculation a été ajusté à 7. Les valeurs du pH des boues ont augmenté pendant la fermentation pour arriver à une valeur finale entre 8.3 et 9.1 (Tableaux 4 et 5, chapitre 2). Cependant, dans le cas du YMB, on assiste à une acidification du milieu. Ces élévations de pH final des boues peuvent être expliquées par la dégradation des protéines, la libération d'ammonium et certains composés qui augmentent le pH, comme, par exemple, la libération du Ca de sa forme complexe. Cette explication est évoquée par Bissonnette et al. (1986) lors d'utilisation du lactosérum comme milieu de culture. Contrairement aux souches à croissance rapide, les souches à croissance lente alcalinisent leurs milieux de croissance. Cependant, la variabilité de la composition des boues peut influencer le pH final.

L'étude de la nodulation montre la variabilité de l'indice nodulaire d'un milieu à l'autre et d'une souche à l'autre (Tableau 6, chapitre 2). Ceci s'explique probablement par: (1) la variabilité de la concentration en rhizobium appliquée lors de l'inoculation suite à l'effet de la congélation sur la survie; (2) l'effet de la composition des boues (métaux lourds et autres) sur le processus de nodulation, sur l'interaction plante - bactérie et/ou sur la physiologie de la souche.

Vu que les boues contiennent des composés organiques complexes et vu que certaines souches éprouvent des difficultés à croître dans les boues, il semblait important d'évaluer si un pré traitement ainsi que l'addition de sources de nutriments pouvaient améliorer la performance des boues pour soutenir la croissance du rhizobium. Les sections suivantes (6.3 et 6.4) décrivent l'effet des prétraitements et de l'addition de sources de nutriments sur la croissance de *S. meliloti*.

### **6.3. Effet des solides en suspension et d'un prétraitement des boues sur la croissance du *S. meliloti***

L'effet des solides en suspension sur la croissance de *S. meliloti* a été évalué par réalisation de différentes expériences en faisant varier la concentration des solides en suspension. Des échantillons de boues de Black Lake ( primaire et secondaire) ont été hydrolysés avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH : 6, 4 et 2) et avec NaOH (50, 100, 150 et 200 meqNaOH/L) afin de déterminer le niveau d'hydrolyse nécessaire pour atteindre la plus haute concentration en cellules.

### 6.3.1. Effet des solides en suspension

Dans le cas de la boue primaire de Black Lake, les fermentations ont été réalisées en utilisant cinq concentrations en solides en suspension (3.2%, 2.6%, 1.3%, 0.65% et 0.325% obtenu par dilution de l'échantillon original). D'après les résultats de fermentation (Tableau 3, chapitre 3), les solides en suspension affectent la croissance de *S. meliloti*. Le nombre le plus élevé de cellules ( $11.1 \times 10^9$  ufc/ml) a été obtenu avec 1.3% en solides en suspension. Le temps de génération chute avec la diminution de la concentration des solides en suspension. Ce temps passe de 9.32h (cas de 3.2% des solides en suspension) à 4.15h (cas de 0.325% des solides en suspension). Ceci s'explique par les trois points suivants: (1) possibilité de présence de composés qui inhibent la croissance de *S. meliloti*, comme les métaux (Wilson et Reisenauer, 1970a; Lowe et Evans, 1962), ainsi la dilution de la boue entraîne une réduction de l'effet inhibiteur ; (2) L'effet de la réduction de la concentrations de Ca et Mg qui influencent la croissance des rhizobia (Vincent, 1962; Steinborn et Roughely, 1975); (3) l'abaissement de la concentration des solides en suspension favorise un bon transfert d'oxygène et par conséquent une croissance meilleure de la bactérie.

L'utilisation d'une boue secondaire (BLKS) montre aussi que les solides en suspension (trois concentrations 0.2%, 0.3% et 0.4% obtenu par concentration de l'échantillon original) influencent la croissance de *S. meliloti*. Les résultats (Tableau 4, chapitre 3) montrent qu'il n'y a pas eu d'amélioration de la croissance avec l'augmentation de la concentration des solides en suspension. Cependant, le nombre de cellules le plus élevé est obtenu avec une concentration en solide de 0.4% ( $0.99 \times 10^9$  ufc/ml). Si on examine les performances de la fermentation en passant d'une concentration de 0.2% à 0.4%, on assiste à une chute de ces performances. Ceci s'explique par le fait que la concentration de la boue secondaire apporte en plus de la matière assimilable des substances inhibitrices (métaux lourds et autres). L'effet de ces

dernières l'emporte sur celui de la matière assimilable. De même les concentrations en Ca et Mg doublent en passant de 0.2 à 0.4% des solides en suspension et cette augmentation semble être non optimale pour la croissance.

### 6.3.2. Effet d'un prétraitement acide

D'après les résultats de cette partie expérimentale, l'hydrolyse de la boue primaire à différents niveaux de pH a affecté la quantité de matière organique disponible pour *S. meliloti* (Tableau 3, chapitre 3). L'amélioration la plus significative (augmentation du nombre de cellules et réduction du temps de génération) a été obtenue pour des concentrations en solides en suspension de 0.65% ( $9 \times 10^9$  ufc/ml) et 0.325% ( $13 \times 10^9$  ufc/ml). Ceci s'explique par le fait que l'action de l'acide dépend de la concentration des solides en suspension. Ainsi, l'effet de l'acide est partiel à des concentrations en solides élevées. À pH 6 et à pH 4, le degré d'hydrolyse est faible. En conséquence, ce qui peut être tiré de ces expériences qu'une concentration faible en solides en suspension est souhaitable pour un traitement à pH 2.

Comme pour le cas de la boue primaire, quelques traitements acides ont causé l'augmentation des comptes cellulaires et la diminution du temps de génération (Tableau 4, chapitre 3). La valeur la plus élevée est obtenue avec 0.4% en solides en suspension à pH 2 ( $(9.8 \times 10^9$  ufc/ml). Les résultats indiquent aussi que la concentration de la boue apporte plus de nutriments assimilables et plus de matière organique. Ainsi, le passage de 0.2 à 0.4% des solides semble être bénéfique pour le traitement acide. Cependant, la concentration des boues apporte aussi plus d'inhibiteurs (métaux lourds et autres) expliquant ainsi les valeurs constantes du temps de génération.

### 6.3.3. Effet d'un prétraitement alcalin

Les résultats de l'hydrolyse alcalin de la boue primaire (Tableau 5, chapitre 3) permettent de conclure, aussi, que plus la concentration des solides en suspension est faible plus l'action de NaOH est efficace. Ceci améliore la croissance maximale de la bactérie et réduit le temps de doublement à des valeurs de l'ordre de 3h. Pour l'ensemble des concentrations en solides en suspension les traitements alcalins avec 50 et 100 meq NaOH/L augmentent significativement les performances des fermentations. Les meilleures performances sont obtenues par un traitement de 100

meq NaOH/L à 0.65% des solides en suspension (rendement en cellules:  $21 \times 10^9$  ufc/ml, temps de génération de 2.92h). L'utilisation de 150 et 200 meq NaOH/L ne montre pas une amélioration du nombre de cellules. Par exemple, le passage de 100 à 150 meq NaOH/L pour 3.2% des solides entraîne une chute du nombre de cellules. Ceci s'explique probablement par un surplus de NaOH et par l'effet de la dilution suite à l'ajustement de pH qui entraînent un abaissement de la concentration des éléments nutritifs.

Les suivis de la croissance de *S. meliloti* dans la boue secondaire de Black Lake (BLKS) sous les différents traitements alcalins montrent aussi une augmentation significative du nombre de cellules, mais moins importante par rapport à la boue primaire (Tableau 6, chapitre 3). La valeur la plus élevée ( $2.52 \times 10^9$  ufc/ml) est obtenue avec une dose de 50 meq NaOH/L et une concentration en solides en suspension de 0.2%. Cependant, des doses en NaOH supérieures à 50 meq/L ne changent pas les performances de la fermentation. Ceci s'explique probablement par: (1) les doses en NaOH supérieures à 50 meq/L sont non souhaitables pour les concentrations des solides en suspension testées; (2) la concentration de la boue secondaire apporte plus d'inhibiteurs (métaux lourds et autres).

#### **6.3.4. Évaluation du potentiel de nodulation**

Pour le test de nodulation, quel que soit le type de traitement (acide ou alcalin) appliqué aux boues (primaire ou secondaire), la souche conserve la capacité de nodulation avec des indices nodulaires variables, mais similaires à ceux obtenus avec *S. meliloti* cultivée dans YMB. Par exemple, pour le cas de la boue primaire, l'indice nodulaire est compris entre 5.6 et 11.2 pour le traitement acide et entre 6.4 et 12 pour le traitement alcalin. Vu que l'indice de nodulation est une mesure qualitative, il semble difficile d'établir une corrélation entre l'indice de nodulation et la concentration en cellules appliquée. En outre, le nombre de cellules appliquée, dans nos expériences, est nettement supérieur au nombre minimal requis dans les inoculants commerciaux ( $10^3$  cellules/graine) selon le programme d'inoculation canadien (CFIA, 1997).

#### **6.4. Influence de l'addition de sources de nutriments sur la croissance du *S. meliloti***

Dans la production des inoculants, il est désirable de produire des concentrations élevées en cellules tout en réduisant le temps de fermentation. La productivité des boues pourrait être améliorée par addition d'autres sources de carbone et d'azote facilement assimilables par les rhizobia. La boue secondaire de la CUQ a été choisie comme milieu de culture pour la souche à croissance rapide *S. meliloti* afin d'évaluer l'influence de l'addition des nutriments. Dans ces expériences, l'extrait de levure (quatre concentrations différentes: 0.5, 1, 2 et 4 g/L) a été employé comme source d'azote et de vitamine alors que le glycérol (quatre concentrations différentes: 2.5, 5, 7.5 et 10 g/L) a été choisi comme source additionnelle de carbone.

L'addition de l'extrait de levure à la boue secondaire de la CUQ montre une réduction du temps de génération et une augmentation du rendement en cellules même à des concentrations faibles de 0.5g/L (Figure 1, chapitre 4; Tableau 2, chapitre 4). Le nombre maximal de cellules le plus élevé ( $8.8 \times 10^9$  ufc/ml) est obtenu pour une concentration en extrait de levure de 4 g/L, mais cette valeur est statistiquement similaire à celui obtenu à une concentration de 2 g/L. Pour l'ensemble des échantillons additionnés de 0.5, 1 et 2 g/L d'extrait de levure, la phase de déclin commence à 32-36 heures de croissance. Cependant, dans le cas de l'échantillon additionné de 4 g/L, le nombre de cellules reste presque stable jusqu'à la fin de la fermentation. Il est clair donc que l'addition de l'extrait de levure comme source d'azote et de vitamine a eu un effet positif sur la croissance de *S. meliloti*. Par ailleurs, des études ont montré que les rhizobia utilisent l'extrait de levure comme source de carbone et source d'azote (Meade et al., 1985). Une étude similaire faite par Bissonette et al. (1986) a montré aussi l'effet bénéfique de l'addition de l'extrait de levure sur la croissance de *S. meliloti* cultivée dans le lactosérum (résidus de fabrication du fromage).

L'addition de glycérol en plus d'extrait de levure (4 g/L) à la boue secondaire de la CUQ favorise aussi l'augmentation des rendements en cellules (Figure 2, chapitre 4; Tableau 3, chapitre 4). Une augmentation significative a été observée après addition 5, 7.5 et 10 g/L de glycérol. L'addition de 5 g/L augmente le nombre de cellule par un facteur de 1.6. Le nombre de cellules maximal le plus élevé ( $16.5 \times 10^9$  ufc/ml) est obtenu à une concentration de 7.5 g/L. Cependant, le temps de génération reste presque constant. Le glycérol a donc joué un rôle important dans la croissance de *S. meliloti*. Dans le même perspective, Arias et al. (1976) ont montré que quelques

souches de rhizobium ont un temps de génération plus court en présence de glycérol qu'en présence de glucose, mannitol, galactose ou sucrose. Ajoutons à cela, le glycérol est considéré comme une excellente et économique source de carbone pour certaines souches (Lopreto et al., 1972).

### **6.5. Influence du contrôle du pH**

Pour étudier l'effet du contrôle du pH sur la croissance de la souche *S. meliloti* dans la boue secondaire de la CUQ, deux fermentations ont été conduites dans deux réacteurs de 15 litres. Dans le premier, on n'applique pas un contrôle de pH alors que dans le deuxième le pH est maintenu constant à 7 durant la fermentation. La figure 3 (chapitre 4) montre que le pH augmente progressivement pour atteindre en fin de fermentation une valeur de 8.58. L'élévation du pH de la boue s'explique probablement par la dégradation des protéines, la libération d'ammonium et de certains composés qui augmentent l'alcalinité, comme, par exemple, la libération du Ca de sa forme complexe. Le même effet a été observé dans les travaux de Bissonnette et al. (1986) et Meade et al. (1985). Cependant, le fait de maintenir un pH 7 durant la fermentation n'influence pas la croissance de la souche en question et donne un nombre maximal de cellules de l'ordre de  $2.96 \times 10^9$  ufc/ml similaire à celui obtenu sans contrôle de pH ( $2.8 \times 10^9$  ufc/ml). Les expériences réalisées par Bissonnette et al. (1986) lors d'utilisation du lactosérum comme milieu de culture ont donné les mêmes conclusions sur l'effet du pH. L'analyse de la composition de la fraction soluble de la boue (DCO, N-NH<sub>4</sub> et en PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) avant et après fermentation montre une différence entre les deux types de fermentation (contrôlé et non contrôlé) dans la consommation du N-NH<sub>4</sub> et du PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Figure 4, chapitre 4). Les pourcentages d'élimination les plus élevés sont obtenus sans contrôle de pH. Ceci s'explique probablement par l'effet du pH qui influence le devenir de l'ammonium et du phosphore dans le fermenteur. Par exemple, un pH alcalin peut favoriser le stripage de l'azote ammoniacal et la précipitation du phosphore.

### **6.6. Effet des conditions de conservation sur la survie de *S. meliloti***

L'effet du milieu de croissance (croissance dans la boue ou dans le milieu standard), de l'utilisation d'un support (boue déshydratée, tourbe ou mélange boue-tourbe) et de la température de conservation (-20, 4 et 25°C) sur la survie de la souche *S. meliloti*

ont fait l'objet d'une partie expérimentale. La boue secondaire de la CUQ a été choisie comme milieu de culture alors que la boue déshydratée de Jonquière a été choisie comme support. La conservation des inoculants liquides à -20°C montre que la boue secondaire de la CUQ protège mieux la souche *S. meliloti* contre les effets néfastes de la congélation-décongélation et donne un pourcentage de survie (18%) supérieur à celui obtenu avec le milieu YMB (1%). Ceci s'explique probablement par la présence des solides en suspension dans la boue qui protègent les cellules durant la décongélation. Cependant, le milieu de croissance standard est non favorable pour la congélation comme déjà indiqué par Bissonette et al. (1988) et que les cellules semblent être physiologiquement différentes.

Dans le but de faciliter l'inoculation des légumineuses et maintenir une concentration en cellules suffisante, plusieurs types de supports ont été testés. Notre étude montre que les boues déshydratées sont utilisables comme support pour les rhizobia. Pour le cas des cellules cultivées dans YMB (figure 1, chapitre 5) la survie de *S. meliloti* dans la tourbe est similaire à celle dans la boue durant la conservation à 4 et à 25°C. Cependant, pour le cas des cellules cultivées dans la boue secondaire, la survie est meilleure dans la boue déshydratée que dans la tourbe (figure 2, chapitre 5). À l'exception du cas des cellules cultivées dans la boue secondaire et stockées dans la tourbe, le nombre de cellules viables est maintenu, généralement, supérieur à 10<sup>8</sup> cellules/g pour une période de conservation (à 4 et à 25°C) de 80 jours. Il est clair donc que la boue déshydratée supporte bien la survie du rhizobia et ne nécessite pas d'être mélangée avec de la tourbe. Ceci s'explique probablement par la composition de la boue en carbone, en azote en phosphore et en sels minéraux avec des concentrations élevées (Tableau 1, chapitre 5) favorable pour *S. meliloti*.

Les résultats montrent que la nature du milieu de culture (boue ou YMB) affecte la croissance des cellules durant la préincubation des inoculants solides à 30°C. Ainsi, l'utilisation de la boue secondaire comme milieu de culture favorise bien l'augmentation du nombre de rhizobia dans un support à base de boue déshydratée comparativement à la tourbe qui donne une augmentation non significative (après préincubation à 30°C). Cependant, l'utilisation du milieu YMB favorise mieux la croissance dans la tourbe que dans un support à base de boue déshydratée. Ceci indique que *S. meliloti* cultivé dans la boue secondaire est déjà préadapté ce qui donne

un plus grand potentiel de multiplication dans les boues déshydratées que dans la tourbe. Il est préférable donc d'inoculer un support à base de boue par des cellules précultivées dans la boue. En outre, la différence de comportement des cellules cultivées dans la boue secondaire et dans le milieu standard semble être en relation avec la physiologie de la bactérie (Bisonnette et Lalande, 1988) et en rapport avec le milieu de culture et le support utilisé.

Selon les figures 1 et 2 (chapitre 5), la survie de *S. meliloti* est la même à 4 et à 25°C spécialement pour le cas des cellules cultivées dans la boue secondaire et mélangées avec la tourbe ou avec la boue déshydratée. Ceci semble être aussi en relation avec la physiologie de la bactérie (Sparrow et Ham, 1983) vis-à-vis de la température de stockage et du type du support utilisé.

Durant la conservation à 25°C, on observe une élévation du pH (Tableaux 2 et 3, chapitre 5). Ceci semble être le résultat de la dégradation des protéines et la libération de certains composés comme le Ca, ce qui augmente l'alcalinité du milieu. Le fait d'avoir un pH de l'ordre de 7 ou supérieur à 7 est en faveur de l'hypothèse d'absence d'interaction entre les rhizobia et les métaux lourds contenus dans les boues.

#### **6.7. Effet de l'inoculation par *S. meliloti* cultivé dans les boues ainsi que de l'amendement des sols par les boues sur la nodulation, le rendement en matière sèche et la teneur en azote de la luzerne**

L'objectif principal de cette partie expérimentale est d'étudier l'efficacité des inoculants à base de boue sur la luzerne cultivée dans deux types de sol (sol argileux de Kamouraska et sol sableux de Saint-André). La luzerne a été inoculée par deux types d'inoculant (*S. meliloti* cultivée dans la boue secondaire de la CUQ ou dans le milieu YMB). Nous avons étudié aussi l'effet de l'amendement des sols par des boues (60 et 120 kgN/ha) et par un fertilisant (60 kgN/ha) sur l'inoculation et par conséquent sur la nodulation, la fixation d'azote et les rendements des plantes.

L'évaluation de l'indice de nodulation et du nombre du rhizobia dans les sols à la fin des expériences (Tableau 4, chapitre 6) montre que la nodulation est efficace et n'est pas affectée par la nature de l'inoculant (inoculant à base de boue ou à base d'YMB). Ainsi, l'inoculation des sols par un équivalent de  $10^8$  cellules/graine augmente l'indice de nodulation et favorise le maintien d'un nombre suffisant de cellules dans le sol. Ce

nombre est de l'ordre de  $10^7$  et  $10^6$  cellules/g de sol respectivement pour le sol Kamouraska et Saint-André. Cette différence s'explique probablement par les propriétés physiques du sol qui peuvent influencer la diffusion, l'adsorption et ,en conséquence, la concentration des rhizobia dans la zone racinaire.

L'amendement des sols avec des boues secondaires présente un effet bénéfique sur les rhizobia indigènes (le nombre de rhizobia passe de  $10^3$  à  $10^4$  cellules/g de sol). L'augmentation de leurs nombre (Tableau 4, chapitre 6) après amendement par les boues (60 kgN/ha) confirme les observations de Kinkle et al. (1987) et Heckman et al. (1987a, 1987b).

Comparativement aux boues, l'utilisation du fertilisant azoté entraîne une réduction de l'indice de nodulation spécifiquement pour le sol de Saint-André. Ceci semble être le résultat de la différence en valeur nutritive entre les boues et le fertilisant (les boues sont plus nutritives) ainsi que la différence des propriétés physiques entre les deux sols. Par ailleurs, le sol Saint-André favorise une lixiviation rapide durant l'irrigation, vu qu'il s'agit d'un sol sableux.

Le point le plus important dans nos travaux est que l'inoculant à base de rhizobium cultivé dans la boue (inoculant solide ou liquide) est équivalent à un inoculant à base de rhizobium cultivé dans YMB (inoculant solide ou liquide) en terme de nodulation. En outre l'équivalence entre les deux types d'inoculant est confirmée aussi par l'évaluation du poids sec et de la quantité d'azote accumulée par la luzerne (Tableaux 5 et 6, chapitre 6). Cependant, la comparaison des plantes inoculées à celles non inoculées montre que l'inoculation n'augmente pas les rendements en poids sec et en azote de manière significative. Ceci s'explique probablement par la présence des rhizobia indigènes à une concentration acceptable (de l'ordre de  $10^3$  cellules/g de sol) permettant un niveau élevé de nodulation.

L'inoculation des sols amendés montre que les boues favorisent le maintien de la survie des rhizobia à un niveau élevé pour établir la nodulation. Ceci confirme les résultats obtenus par Ferreira et Castro (1995) ainsi que ceux de Giller et al. (1989). Par ailleurs, l'augmentation des rendements des plantes (poids sec et teneur en azote) à la suites des amendements est en rapport avec la composition des boues en matière organique et en nutriments. Cet effet bénéfique des boues augmente avec

l'augmentation du taux d'application. Par exemple, pour la première coupe et avec le sol Kamouraska les rendements en matière sèche et en azote passent de 3.16 à 4.08 g/pot et de 89 à 123 mg/pot respectivement (en passant de 60 et 120 kgN/ha). Cependant, malgré la présence de l'azote dans le fertilisant ainsi que dans les boues en concentration acceptable, la nodulation persiste et n'est pas inhibée. Ceci s'explique par le fait que la concentration d'azote apportée par le fertilisant et les boues n'est pas inhibitrice et insatisfaisante pour répondre au besoin de la luzerne comme déjà indiqué par Ferreira et Castro (1995). Dans le cas des boues, ce phénomène s'explique aussi par leur maturité (Chardas et al., 1991) qui contrôle la disponibilité de l'azote pour les plantes ainsi que par la perte de l'azote par évaporation, vu que les boues ont été appliquées à l'état liquide.

Les caractéristiques des sols (Tableau 2, chapitre 6) et leur capacité de rétention d'eau affecte la croissance des plantes et l'efficacité de la fertilisation et l'amendement. Par ailleurs, le processus de lixiviation semble être de plus grande importance dans le cas du sol Saint-André (sol sableux) que dans le sol Kamourska (sol argileux) ce qui pourrait expliquer les rendements supérieurs obtenus par la luzerne cultivée dans le sol Kamourska (Tableaux 5 et 6, chapitre 6).

Les concentrations des macro-éléments et des métaux lourds dans les plantes sont à un niveau acceptable (Tableaux 7 et 8, chapitre 6) comme déjà rapporté par Martin et Matocha (1973) et Chaney et al. (1978). Par ailleurs, ces éléments ne sont pas considérés comme des facteurs négatifs dans la présente étude.

## 7. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

### 7.1. Conclusions

C'est pour la première fois qu'on arrive à démontrer que le rhizobium pousse dans les boues et conserve son pouvoir symbiotique. Cela ouvre la porte devant le développement d'une nouvelle technologie de production des inoculants à base de rhizobium (biofertilisants) par utilisation des boues des stations d'épuration municipales et industrielles comme milieu de culture et comme support pour les rhizobia. Ceci représente une nouvelle option de recyclage et de disposition des boues qui peut contribuer à réduire les coûts de production des inoculants liée à l'utilisation du milieu standard et au prétraitement des déchets utilisables dans cet objectif.

Les résultats des travaux de recherche présentés dans ce document ont donc permis de mettre en évidence que les boues d'épuration des eaux usées municipales et industrielles constituent un substrat qui peut être exploité pour la croissance des rhizobia.

La caractérisation des différentes boues a montré qu'elles contiennent des éléments pouvant soutenir la croissance du rhizobium, à savoir le carbone, l'azote, le phosphore et les sels minéraux. L'utilisation des boues comme telle affecte la croissance des rhizobia. La variabilité des résultats d'une boue à l'autre et d'une souche à l'autre s'explique par la composition des boues et la forme sous laquelle se présentent les éléments nécessaires pour la croissance ainsi que par la physiologie des différentes souches testées.

Généralement, un prétraitement des boues a tendance à améliorer la croissance du rhizobium. Cependant, l'efficacité d'un prétraitement varie en fonction de l'origine des boues et du type du procédé d'hydrolyse appliqué. Les expériences réalisées avec des boues primaires et secondaires (BLKP et BLKS) ont montré que la croissance de *S. meliloti* est affectée par la concentration des boues en solides en suspension ainsi que par l'application d'un prétraitement acide ou alcalin. À partir des résultats obtenus se dégagent les conclusions suivantes :

- La concentration des solides en suspension affecte le rendement en cellules ainsi que le temps de génération;
- La réduction de la concentration en solides en suspension par dilution des boues primaires favorise l'augmentation du rendement en cellules et améliore l'efficacité des prétraitements acide et alcalin;
- L'augmentation de la concentration en solides en suspension des boues secondaires n'améliore pas les performances de la fermentation et ne semble pas pertinente, vu qu'il y a d'autres facteurs qui conditionnent la croissance des rhizobia à savoir la composition en sels minéraux (Mg et Ca) et en métaux lourds;

Après culture dans les boues, les souches de rhizobium conservent la capacité de noduler les plantes hôtes. De même un prétraitement des boues n'affecte pas la

nodulation et donne généralement un indice nodulaire comparable à celui obtenu par la croissance du rhizobia dans le milieu standard.

L'addition de sources de nutriments dans la boue secondaire de la CUQ a eu un effet positif sur la croissance de la souche *S. meliloti*. Par ailleurs, l'effet de l'addition de l'extrait de levure et du glycérol se révèle principalement dans le nombre maximal de cellules obtenu durant la croissance qui a augmenté significativement.

Le contrôle du pH près de la neutralité pendant la croissance dans un fermeneur équipé par un contrôleur de pH n'a pas eu d'effet sur les performances de la bactérie testée. Il semble alors inutile de contrôler le pH ce qui éviterait les coûts d'ajustement.

Les résultats de l'étude de l'efficacité des inoculants sur la luzerne cultivée dans deux types de sol amendés et non amendés (sol argileux de Kamouraska et sol sableux de Saint-André) ont bien montré que l'inoculant (inoculant solide ou liquide) à base de rhizobium cultivé dans la boue est équivalent à un inoculant à base de rhizobium cultivée dans YMB. De cette expérience se dégagent d'autres conclusions :

- L'inoculation des sols par un équivalent de  $10^8$  cellules/graine augmente l'indice de nodulation et favorise le maintien d'un nombre suffisant de cellules dans le sol;
- L'amendement des sols par les boues présente un effet bénéfique sur les rhizobia indigènes et favorise le maintien de la survie des rhizobia introduites à un niveau élevé pour établir la nodulation;
- L'effet bénéfique des boues augmente avec l'augmentation du taux d'application;
- Les caractéristiques des sols influencent la concentration en rhizobium introduite dans le sol, la croissance des plantes et l'efficacité de la fertilisation et de l'amendement;
- Les boues présentent une valeur nutritive plus importante que le fertilisant azoté;
- La présence de sels minéraux et des métaux lourds dans les boues ne présente pas un facteur négatif pour les taux de boues appliqués.

## 7.2. Recommandations

Suite à la présente étude, certaines recommandations peuvent être émises quand aux avenues des recherches subséquentes:

- 1/ Vu que la majorité des expériences de croissance ont été réalisées à l'échelle d'rlenmyer, il serait recommandable de reproduire les expériences en fermenteur. Ceci permettrait d'évaluer les possibilités réelles de l'emploi des boues à l'échelle industrielle;
- 2/ Afin de déterminer les facteurs limitants qui conditionnent la croissance des rhizobia dans les boues, il semble important de réaliser une caractérisation plus approfondie, en analysant toutes les formes d'azote, de carbone et de phosphore solubles et non solubles dans les échantillons avant et après fermentation ainsi que d'autres paramètres comme la composition en protéines;
- 3/ Vu que les souches à croissance lente éprouvent quelques difficultés à croître dans les boues comparativement aux souches à croissance rapide, il serait nécessaire de faire des essais avec des souches à croissance lente dans des boues traitées ou additionnées de sources de nutriments.;
- 4/ Puisque l'utilisation de la boue déshydratée comme support est une option très intéressante pour produire des inoculants solides et vu que les boues renferment des métaux lourds, il serait recommandable de voir l'effet de la conservation à long terme sur la viabilité et la stabilité génétique des rhizobia;
- 5/ Dans le but de confirmer la nodulation des plantes par la souche introduite lors de l'inoculation des sols contenant des souches indigènes, une étude de la diversité génétique des souches isolées des nodules serait intéressante;
- 6/ Les résultats de l'efficacité symbiotique des inoculants à base de boue ont été obtenus en pot, il serait alors recommandable de réaliser des essais sur le terrain;
- 7/ Il serait opportun aussi de tester d'autres souches de rhizobia à croissance rapide ou à croissance lente.

## RÉFÉRENCES

- Amarger N. 2001. Rhizobia in the field. Advanced in Agronomy. Volume 73, p109-168. Edit par D. L. Sparks. Newark, Delaware.
- American Public Health Association (APHA) 1992. Standard methods for examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Angle S. J. Chaudri A. M., McGrath S. P., Chaney R. L. et Giller K. E. 1993. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* 25 (5): 575-580.
- Ajay k., Rawlat, A.K., Verman, L.N., Khare, A.K. and Kaushal, A. 1996. Oxalic acid industrial waste as a carrier for Rhizobium inoculants and its effect on soybean. *J. of the Indian Society of soil Science.* 44: 249-252.
- Alleman J. E. Bryan E. H., Stumm T. A., Marlow W. W. et Hocevar R. C. 1990. Sludge-amended brick production : applicability for metal-laden residues. *Wat. Sci. Tecghnol.* 22 : 309-317.
- Allen E. K. et Allen O. N. 1950. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.* 14 : 273-330.
- Arias A. et Martinez-Drets G. 1976. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. *Can. J. Microbiol.* 22:150-153.
- Baldwin A., T. A. Brown, P. H. T. Beckett et Elliot G. E. P. 1983. The forms of combination of Cu and Zn in digested sewage sludge. *Water Ressources.* 17:1935-1944.
- Bergersen F. I. 1961. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Australian J. of Biological Sciences.* 14: 349-360.
- Bissonnette N., Lanande R. et Bordeleau L. M. .1986. Large-scale production of Rhizobium meliloti on whey. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:838-841.
- Bissonnette N. et Lanande R. 1988. High survivality of cheese whey-grown *Rhizobium*

- meliloti* cells upon exposure to physical stress. Appl. Environ. Microbiol. 54:183-187.
- Blais J. F., Tyagi R. D. et Auclair J. C. 1993. Bioleaching of metals from sewage sludge: microorganisms and growth kinetics. Wat. Res. 27(1):101-110.
- Bioardi J. L. et Ertola R. J. 1985. Rhizobium biomass production in batch and continuous culture with a malt-sprouts medium. MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1:163-172.
- Bowen P. T., Hendrick J. E., Woodward T. A, Mitchell L. S. et Lahlou M. 1989. Sludge treatment, utilization and disposal. J. Wat. Pollut. Control Fed. 61: 821-829.
- Bradley J. W., Kyosal S., Matthews P., Sato K. et Webber M. 1992. Worlwide sludge management practices. Dans: C. Lue-Hing, D. R. Zenz et T. Kuchenrither (éds), Municipal sewage sludge management processing, utilization and disposal. Lancaster, Pennsylvanie, U.S.A., Technomic Publishing, p.537-657.
- Brown M.J. et Lester J. N. 1979 Metal removal in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymers. Wat. Res. 13: 817-837.
- Bruce A. M. et Davis R. D. 1989. Sewage sludge disposal : current and future options. Wat. Sci. Technol. 21 : 1113-1128.
- Burton J. C. 1979. *Rhizobium* species, p. 29-58. In H. J. Peppler (ed.), Microbial Technology. Academic Press, Inc.
- Burton Environmental Engineering, RCG Hagler, Bailly, Metcalf et Eddy. 1993. Water and wastewater industries: characteristics and DSM opportunities. Electric power Research Institute, Palo Alto, Californie, U. S. A.
- Canadian Food Inspection Agency (CFIA). 1997. Canadian legume inoculant and pre-inoculated seed product testing report. Nepean, Ont.
- Chaney R. L., Hunderman R. L., Palmer W. T., Small. R. J., White M.C. et Decker A. M. 1978. Plant accumulation of heavy metals and phytotoxics resulting from utilisation of sewage sludge and sludge compost on cropland. P. 86-97. In Proc. National Conference on composting of Municipal Residues and Sludges.

Information Transfer, Rockville, MD.

- Chander K. et Brookes P. C. 1991. Effects of heavy metals from past applications on microbial biomasse and organic matter accumulation in a sandy loam U. K. soil. *Soil Biol. Biochem.* 23: 927-932.
- Chardas G., Karayianni-Christou M., Kollias A., Nikolaou T. et Papadopoulos N. 1991. The use of sewage sludge from the center of biological cleaning, in Metamorphosis Attiki, for the improvement of soil fertility and the protection of the environment. In Treatment and Use of Sewage and Liquid Agricultural Wastes (P. L'Hermite, Ed). pp. 388-392. Elsevier Applied Science. London.
- Chaudri A. M., McGrath S. P. et Giller K. E. 1992a. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past applications of sewage sludge. *Soil Biol. and Biochem.* 24 (2): 83-88.
- Chaudri A. M., McGrath S. P. et Giller K. E. 1992b. Survival of the indigenous population of *Rhizobium* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. *Soil Biol. Biochem.* 24 (7): 625-632.
- Chaudri A. M., McGrath S. P. et Giller K. E. 1993. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previuosly treated with metal-contaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* 25(3): 301-3093.
- Ciafardini G. et Lombardo G. .M. 1991. Nodulation, dinitrogen fixation and yield improvement in second-crop soybean cover-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *J. of Agronomy*, vol.83, pp.622-625.
- Couillard D., Crowley M. et Sasseville J. L. 1986. Technological public choice in practice: the case of wastewater treatment facilities. *Journal of Environmental Management*. 22: 133-146.
- Couillard D. et Grenier Y. 1987. Alternative à la gestion des boues résiduaires municipales: recyclage en sylviculture. *Sciences et Techniques de l'Eau* 3(20): 215-220.
- Couillard D. et Grenier Y. 1989. Forest management: trees response to wastewater

- sludge fertilization. *Journal of Environmental Management.* 28: 235-243.
- Couillard D. et Mercier G. 1994. An economic evaluation of biological removal of heavy metals from wastewater sludge. *Wat. Environ. Res.* 66(1): 32-39.
- CPVQ. 1995. Colloque sur les symbioses végétales en agricultures durable : biotechnologie à notre porté. Québec. 101p.
- CPVQ. 1996. Colloque sur le soya le : soya en expansion. Québec. Cahier des conférences 114p.
- Crowley M., Sasseville J. L. et Couillard D. 1986. L'importance accordée à l'évaluation technologique dans l'assainissement des eaux usées municipales au Quebec. *Revue internationale des Sciences de l'Eau.* 2(2): 49-57.
- Dahlin S., Witter E., Martensson A. M., Turner A. et Baath E. 1997. Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal Contamination. *Soil Biol. Biochem.* 29 (9): 1405-1415.
- Date R. A., et Roughley R. J. 1977. Preparation of legume seed inoculants: A treatise on dinitrogen fixation, section 4 R. W. F. Hardy et Gibson (éd), 245-275.
- Dazzo F.B. 1980. Microbial adhesion to plant surfaces. Pages 311-328 dans R.C.W. Berkeley, 3.M. Lynch, 3. Melling, P. R. Rutter et B. Vincent (éd.). *Microbial adhesion to surfaces.* Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- Dazzo F.B., Napoli C. A. et Hubbell D. H. 1976. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the Rhizobium-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 166-171.
- Davis R. D. 1987. Use of sewage sludge on land in the United Kingdom. *Wat Sci. Technol.* 19: 1-8.
- Denarié J., Dedellé F., et Rosenberg C. 1992. Signalling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* 46:497-531.

Diaz-Ravina M., Baath E. et Frostegard A. 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (7): 2238-2247.

Eastman J. A. et Ferguson. J. F. 1981. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 53, 352-366.

Environnement Canada. 1985. L'épandage des eaux usées traitées et des boues d'épuration d'origine urbaine. Service de la protection de l'environnement. Guide SPE 6-EP-8-1.

Ertola R. J., Mazza L. A., Balatti A. P., Cuevas C. M. et Daguerre R. 1969. Effect of Composition of Medium and oxygen supply rates on growth of *Rhizobium meliloti*. *Soil Sci.* 108: 373-380.

Everett J. G. 1973. Resent developments in heat treatment. *J Wat. Pollut. Control Fed.* 45: 428-435.

Ferreira E. M. et Castro I. V. 1995. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum l.*) in soils previously treated with sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry.* 27: 1177-1183.

Flynn F., Jalbert J. M., Robert J., St-Yves A., Terreault A., et Trudel G. 1987. Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Guide de bonnes pratiques. Ministère de l'Environnement du Québec, 60p.

Fisher R F., et Long, S. R. 1992. Rhizobium-plant signal exchange. *Nature (London)* 357: 655-660.

Frostegard A., Tunlid A. et Baath E. 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biol. and Biochem.* 28 (1): 55-63.

Giller K. E., McGrath S. P. et Hirsch P. R. 1989. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.* 21 (6): 841-843.

- Giroux L. 1986. Evaluation des sites pour l'épandage de boues d'usine d'épuration. INRS-EAU, Université du Québec, mémoire de maîtrise, 175 p.
- Gossett J. M. et Belser. R. L. 1982. Anaerobic digestion of waste activated sludge. J. Sanitary Eng. Div., ASCE. 108 (1): 1101-1119.
- Gouvernement du Québec. 1983. Rapport du groupe de travail sur le programme d'assainissement des eaux du Quebec. Ministere de l'Environnement. Quebec, Canada.
- Graham, P. H. 1963. Vitamin requirements of root-nodule bacteria. J. Gen. Microbiol. 30: 245-248.
- Grenier Y. et D. Couillard. 1989. Avantages et faisabilité de l'épandage forestier des boues résiduaires. Forêts Chroniques, 65:9-15.
- Gulati S. L. 1979. New nonsynthetic medium for *Rhizobium* culture production from wastes. Biotechnol. Bioeng. 21:1507-1515.
- Harper S. R., Ross C. C. et Valentine G. E. 1988. Agricultural wastes. J. Wat. Pollut. Control Fed. 60: 876-884.
- Heckman J. R., Angle J. S. et Chaney R. L. 1987a. Residual effects of sewage sludge on soybean: I. Accumulation of heavy metals. J. of Environmental Quality. 16: 113-117.
- Heckman J. R., Angle J. S. et Chaney R.L. 1987b. Residual effects of sewage sludge on soybean: II. Accumulation of soil and symbiotically fixed nitrogen. J. Environmental. Quality. 16: 117-124.
- Hernandez B. S. et Focht D. D. 1984. Invalidity of the concept of slow growth and alkali production in cowpea Rhizobia. Appl. Env. Microbiol. 48 : 206-210.
- Hirsch P.R., Jones M. J., Mc Grath S. P. et Giller K. E. 1993. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. Soil Biol. Biochem. 25 (11): 1485-1490.
- Ibekwe A. M., Angle J. S., Chaney R. L. et Van Berkum P. 1996. Zinc and cadmium

- toxicity to *alfalfa* and its microsymbiont. J. of Environ. Qual. 25:1032-1040.
- Ibekwe A. M., Angle J. S., Chaney R. L. et Van Berkum P. 1995. Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. J. of Environ. Qual. 24:1199-1204.
- Jordan, D.C. 1982. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1, (1984), p 235-244 Edit par N.R. Kneg, J.G. Holt; Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kandasamy, R., and Prasad, N. N. 1971. Lignite as a carrier of rhizobia. Curr. Sci. 40:496.
- Kelly J. J. et Tate R. L. 1998. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. J. of Environ. Qual. 27: 609-617.
- Kennedy L.D. et R.M. Greenwood. 1982. 6-Phosphogluconate and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities, growth rate, and acid production as taxonomic criteria for Rhizobia. N. Z. J of Sci. 25: 361-366.
- Kinkle B. K., Angle J. S. et keysere H. H. 1987. Long-term effects of metal sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. Applied and Environmental microbiology. 53: 315-319.
- Laguerre G. 1998. Etude expérimentale des populations et du fonctionnement microbien de sols affectés par des contaminations monométalliques de cuivre et de cadmium. AIP Ecosol.
- Lerouge P., Roche, P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.-C. et Denarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature 344: 781-784.
- Lester J. N., Stenitt R. M et Kirk P. W. W. 1983. Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes II. Sludge treatment and disposal. The Science of the Total Environment. 30: 45-83.
- Li Y. Y. et Noike, T. 1992. Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment. Wat Sci. Technol. 26(34): 857-806.

- Lopreto, C.R., Mazza L. A. et Balatti A. P. 1972. influencia delos componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generation de una cepa de *Rhizobium japonicum*. An Soc. Cient. Argent. CSCLII. 35-47.
- Lowe, R.H. et Evans H.J. 1962. Cobalt requirement for the growth of Rhizobia. J. Bact. 83: 210-211.
- Madariaga G. M. et Angle J.S. 1992. Sludge-borne salt effects on survival of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Environ. Qual. 21: 276-280.
- Mandeistam J. et McQuillen K. 1973. Biochemistry of Bacterial Growth. 2ème éd. Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburg-Melbourne.
- Martensson A. M. et Witter E. 1990. Influence of various soil amendments on nitrogen-fixing soil micro-organisms in tong-term field experiment, with special reference to sewage sludge. Soil Biol. Biochem. 22 (7): 977-982.
- Martensson A. M. 1992. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. Soil Biol. Biochem. 24 (5): 435-445.
- Martinez de Drets G. et Arias A. 1972. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast- and slow-growing groups. J. Bacteriol. 109 : 467-470.
- Martinez de Drets G. Arias A., et Rovira de Cultinella M. 1974. Fast- and slow-growing rhizobia : differences in sucrose utilization and invertase activity. Can. J. Microbiol. 20 : 605-609.
- Martinez E., Romero D. et Palacios R. 1990. The rhizobium genome. Critical Rev. Pant and Sci. 9 : 59-93.
- Martin W. E. et Matocha J. E. 1973. Plant analysis as an aid in the fertilization of forage crops. In Sol Testing and Plant Analysis. L.M. Walsh and J.D. Beaton (eds). pp. 393-426. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin USA.
- Meade J., Higgins P. et O'Gara F. 1985. Production and storage of *Rhizobium leguminosorum* cell concentrates for use as inoculants. J. Appl. Bacteriol. 58:517-524.

McBride M. B. 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: Are USEPA regulations protective. J. of Environ. Qual. 24: 5-18.

McGrath S. P., Brookes P.C. et Giller K. E. 1988. Effects of potentially toxic elements in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. Soil Biol. Biochem. 20: 415-424.

McGrath S. P., Chaudri A. M. et Giller K. E. 1995. Long-term effects of land application of sewage sludge: Soils, microorganisms and plants. J. of Ind. Microbiol. 14: 94-104.

McGrath S. P., Chang A. C., Page A. L. et Witter E.. 1994. Land application of sewage sludge : scientific perspectives of heavy metal loading limits in Europe and the United States. Environ. Rev. 2: 108-118.

MENVIQ et MAPAQ. 1991. Valorisation agricoles des boues de Stations d'épuration des eaux municipales: guide des bonnes pratiques. Quebec, 91 p.

Mercier O. 1988. L'extraction biologique des métaux lourds des boues anaérobies d'épuration. INRS-EAU, Mémoire de maîtrise No.207, 212 p.

Metcalf et Eddy.1972. Wastewater engineering : Treatment, disposal and reuse. San Francisco, McGraw-Hill, 1334 p.

Mukherjee S. R. et Levine. A. D. 1992. Chemical solubilization of particulate organics as a pretreatment approach. Wal. Sc. Tech. 26 (9/11), 2289.2292.

Muniruzzaman, S. and Khan, S. I. 1992. Suitability of some local agro-industrial wastes as a carrier materials for *Rhizobium*. sp infecting *Sesbania bispinosa*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8:329-330.

Mostaghimi S., Younos T. M. et Tim U. S. 1992. Effects of sludge and chemical fertilizer application on runoff water quality. Water Ressources Bulletin, American Water Resources Association. 28(3): 545-552.

Norris D.O. 1959. The role of calcium and magnesium in the nutrition of *Rhizobium*. Aust. J. Agric. Res. 10: 651-698.

OCDE 1995. Questions relatives à la sécurité en biotechnologie passage à l'échelle supérieure des micro-organismes utilisés comme biofertilisants, 77p.

Olivier. 1994. Des boues sans nuisance. Point, Sciences et Techniques. 5(1): 4-8.

Pahren H. R. 1980. Overview of the problem. Dans: Bitton, G, B. L. Dainron, G. T. Edds et J. M. Davidson (eds), Sludge health risks of land application. Ann Arbor, USA, Ann Arbor Science Publishers. 1-5.

Parke D. L. et Ornston L. N. 1984. Nutritional diversity of Rhizobiaceae revealed by auxonography. J. Gen. Microbiol. 130: 1743-1750.

Parkin G. F. et Owen W. F. 1986. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. Environ. Eng. 112(5): 867-920.

Pedrosa F. O et Zancan G. T. 1974. L-arabinose metabolism in *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriology. 119 : 336-338.

Pugashetti, B. K., Gopalgowda, H. S. and Patil, R. B. 1971. Cellulose powder as legume inoculant base. Curr. Sci. 40:494-485.

Qasim, R. S. 1982. Wastewater treatment plants : Planning, design and operations. New York, Holt, Rinehart and Winston, 726 p.

Quispel A. 1974. The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. Oxford Am. Elsevier Publ. Corp., Inc. N.Y.

Reddy G. B., Cheng C.N. et Dunn S. J. 1983. Survival of *Rhizobium japonicum* in soil. Soil Bio. Biochem. 15(3): 343-345.

Rother J.A., Millbant J.W., et Thornton T. 1983. Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens L.*) in grasslands on soil contaminated with cadmium, lead and zinc. J. Soil Sci. 34: 127-136.

Roques H. 1979. Fondements théoriques du traitement biologique des eaux V1 et V2. Paris techniques et documentation, 1813 p.

Sabey B. R. et Hart W. E. 1975. Land application of sewage sludge: effect on growth and chemical composition of plants. J. Environ. Qual. 4: 252-256.

- Sherwood M. T. 1972. Inhibition of *R. trifolii* by yeast extracts or glycine is prevented by calcium. J. Gen. Microbiol. 71: 351-358.
- Skinner F. A., Roughley R. J. et Chandler M.R. 1977. Viability and cell distortion in *Rhizobium* spp. J. Appl. Bact. 43: 287-297.
- Sparrow S. D. et Ham G. E. 1983. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. Agronomy Journal. 75: 181-184.
- Smith R. S. Legume inoculant formulation and application. Canadian Journal of Microbiology. 38: 485-492.
- Steinborn J. et Roughley R. J. 1975. Toxicity of sodium and chloride ions to *Rhizobium* spp. in broth and peat culture. J. Appl. Bact. 39: 133-138.
- Stephenson T. et Lester J. N. 1987a. Heavy metal removal during the activated sludge process. I. Extent of soluble and insoluble metal removal mechanisms. Sci. Total Environ. 63: 199-214.
- Stephenson T. et Lester J. N. 1987b. Heavy metal removal during the activated sludge process. II. Insoluble metal mechanisms. Sci. Total Environ. 63: 215-230.
- Sterrit R. M. et Lester J. N. 1984. Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes. III. Speciation in waste waters and relayed complex matrices Sci. Total Environ. 34: 117-141.
- Stuckey D. C. et McCarty P. L. 1984. The effect of thermal pretreatment on the anaerobic biodegradability and toxicity of waste activated sludge. Wat. Res. 18(11): 1343-1353.
- St-Yves A. et Beaulieu R. 1988. Caractérisation des boues de 34 stations d'épuration des eaux usées municipales. Ministère de l'Environnement du Québec, 11p.
- Tagaki M. 1987. Pretreatment of lignocellulosic materials with hydrogen peroxide in the presence of manganese compounds Biotechnol. Bioeng. 29: 165-170.
- Tjell J. C. 1986. Trace metal regulations for sludge utilisation in agriculture; a critical review. Communauté Européenne, EUR 1036L. 348-361.

- Trinick, M. J. 1980. Relationships amongst the fast growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp, *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl Bacteriol.* 157: 134-142.
- Tyagi R. D. et Couillard D. 1990. Bacterial leaching of metals from sludge. Dans: *Encyclopedia of Environmental Control Technology*. P.N. Cheremisinoff (éd.), Gulf, Houston, Texas, U.S.A., pp. 557-590.
- Tyagi R. D., Blais J. F., Meunier N. et Kluepfel D. 1993. Biolixivation des métaux lourds et stabilisation des boues d'épuration: essais en bioréacteur opéré en mode cuvée. *Canadian J. of Civil Eng.* 20: 57-64.
- UK Department of the Environment. 1993. UK sewage sludge survey. Final Report. Consultants in Environmental Sciences Ltd., Beckenham., Kent.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1984. Environmental regulations and technology. Use and disposal of municipal wastewater sludge. EPA-625/10-84-003, 78p.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1990. National sewage sludge survey: availability of information and data, and anticipated impacted impacts on proposed rules 40 CFR Parts 503. *U.S. Fed. Register*. 55: 47209-47283.
- U. S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1993. Standards for the use and disposal of sewage sludge, 40 CFR Parts 2S7, 403 and 503, Final Rule. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1979. Sludge treatment and disposal process design manual. U.S. A., EPA. 62511-79011.
- Vergès G. 1984. La disposition des boues des stations d'épuration. Colloque sur l'assainissement des eaux. U. M. Q., 11 p.
- Vesilind P. A. 1980. Treatment and disposal of wastewater sludges. Ann Arbor Science Publishers. Ann Arbor, U.S.A.
- Vincent J. M. 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of rhizobium.

J. Gen. Microbiol. 28: 653.

Vincent J. M. 1970. Improved synthetic medium for growth of rhizobium. J. Appl. Bact. 33: 708.

Vincent J. M. 1977. Rhizobium: general microbiology. In: Hardy R. W. F., Silver W. S. (eds.). A treatise on dinitrogen fixation, vol 3. John Wiley and Sons, New York , 277-364.

Vincent J. M. 1980. Factors controlling the Legume Rhizobium symbiosis .Pages 103-129 dans W.E. Newton et W.H. Orme-Johnson (éd.).Nitrogen fixation. Vol. II: Symbiotic associations and Cyanobacteria. University Park Press, Baltimore.U.S.A.

Walter, J.F., Paau, A.S. and Metting, F.B.J. 1992. Microbial inoculant production and formulation. Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker Inc., New York, USA. pp 579-594.

Webber M. D. 1984. Epandage des boues résiduaires sur les sols: une evaluation. Agriculture Canada. Direction Générale de la Recherche, Agriculture Canada, 45p.

Webber M.D. 1988. Controle de la concentration de métaux lourds dans les sols après épandage de boues d'égout municipales: l'approche canadienne. Sciences et Techniques de l'Eau. 21(1): 45-51.

Wilson D.O. et Reisenauer H. M. 1970a. Effects of some heavy metals on the cobalt nutrition of *Rhizobium meliloti*. Plant and Soil. 32: 81-89.

Wilson D.O. et Reisenauer H. M. 1970b. Effects of manganese and zinc ions on the growth of *Rhizobium*. J. Bact. 102: 729-732.

Wong L. et Henry J.G. 1984. Decontaminating biological sludge for agricultural use. Wat. Sci. Technol. 17: 575-586.

Wonzniak D. J. et Huang J. Y. C. 1982. Variables affecting metal removal from sludge. J. Wat. Pollut. Control. Fed. 54: 1574-1580.

- Woodard S. E. et Wukasch R. F. 1994. A hydrolysis/thickening/filtration process for the treatment of waste activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* 30(3): 29-38.
- Yasui H. et Shibata M. 1994. An innovative approach to reduce excess sludge production in the activated sludge process. *Wat. Sci. Technol.* 30(9): 11-20.
- Young J. P. W. et Haukka K. E. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133: 87-94.

**PARTIE II**  
**PUBLICATIONS**

**Chapitre 2 : WASTEWATER SLUDGE AS A NEW MEDIUM FOR RHIZOBIA GROWTH**

Ben Rebah F., Tyagi R. D. and Prévost D.

Submitted to Water Quality Journal Research of Canada (Accepted).

**Chapitre 3 : ACID AND ALKALINE TREATMENTS FOR ENHANCING THE GROWTH OF RHIZOBIA IN SLUDGE**

Ben Rebah F., Tyagi R. D. and Prévost D.

Canadian Journal of Microbiology (2001) 47: 467-474.

**Chapitre 4 : PRODUCTION OF *S. MELILOTI* USING WASTEWATER SLUDGE AS A RAW MATERIAL: EFFECT OF NUTRIENT ADDITION AND pH CONTROL**

Ben Rebah F., Tyagi R. D. and Prévost D.

Submitted to Environmental Technology (Accepted).

**Chapitre 5 : WASTEWATER SLUDGE AS A SUBSTRATE AND CARRIER FOR RHIZOBIA : THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON SURVIVAL OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI***

Ben Rebah F., Prévost D. and Tyagi R. D.

Submitted to Bioresources Technology (Accepted)

**Chapitre 6 : NODULATION AND YIELD OF ALFAFA GROWN IN SLUDGE AMENDED SOILS AND INOCULATED WITH RHIZOBIA PRODUCED IN SLUDGE**

Ben Rebah F., Prévost D. and Tyagi R. D.

Submitted to Journal of Environmental Quality (Accepted).

## **Chapitre 2**

### **WASTEWATER SLUDGE AS A NEW MEDIUM FOR RHIZOBIA GROWTH**

Submitted to:  
Water Quality Journal Research of Canada  
(Accepted)

Ben Rebah F., Tyagi R. D. and Prévost D.

INRS-Eau, Université de Québec  
C.P. 7500, Sainte-Foy  
Québec, Canada G1V 4C7

## RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est de démontrer que les boues d'épuration des eaux usées municipales et industrielles sont utilisables comme seule matière primaire pour soutenir la croissance des rhizobia. La croissance de deux groupes de rhizobia (à croissance rapide : *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* et à croissance lente: *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii*) a été testée dans des boues primaires, secondaires et mixtes obtenues à partir de différentes usines de traitement des eaux usées. Les résultats obtenus en Erlenmeyer ont indiqué que les rhizobia à croissance rapide et à croissance lente croissent bien dans les boues. Généralement, le nombre de cellules de rhizobia dépasse  $1 \times 10^9$  ufc/ml après 72h. La composition des boues varie avec le type et l'origine de la boue et affecte le temps de génération, le rendement en cellules et l'indice de nodulation. Une concentration élevée en solides totaux tend à donner un temps de génération élevé. La concentration élevée en métaux lourds n'affecte pas la cinétique de croissance du rhizobium. Cependant, les boues primaires peuvent inhiber la croissance des cellules. Les prétraitements acide, alcalin et oxydatif augmentent la biodégradabilité des boues primaires et en conséquence le compte cellulaire de *S. meliloti*. Le prétraitement de la boue des pâtes et papiers avec NaOH augmente la concentration en cellules à  $1 \times 10^{10}$  ufc/ml. Le prétraitement des boues réduit le temps de génération ainsi que le temps du procédé.

**Mots clés :** boues d'épuration, prétraitement, rhizobium, inoculum, biofertilisant, indice de nodulation.

## ABSTRACT

The objective of this study was to demonstrate that the municipal and the industrial wastewater sludges could be used as a sole raw material to sustain growth of rhizobia. Growth of two different groups of rhizobium (Fast growing: *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*; and slow growing: *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii*) was tested on primary, secondary and mixed sludges obtained from different wastewater treatment plants. The results obtained in Erlenmeyer flasks indicated that slow and fast growing rhizobia grew well in sludge. Generally, the number of cells of rhizobia exceeds  $1 \times 10^9$  cfu/ml in 72 h. The composition of sludges varies with the sludge type and origin. The sludge composition affected the generation time, cell yield and nodulation index. Higher solids concentration tends to give higher generation time. The high sludge metals concentration does not affect the growth kinetics of rhizobia. However, primary sludge can inhibit cell growth. Acid, alkaline and oxidative pre-treatments increased the primary sludge biodegradability and consequently the cell count of *S. meliloti*. Pretreatment of pulp and paper sludge with NaOH enhanced the bacterial cell concentration to a maximum  $1 \times 10^{10}$  cfu/ml. Sludge pre-treatment decreased the generation time and reduced the process time.

**Key words:** Wastewater sludge, rhizobium, inoculum, biofertiliser, sludge pre-treatment, nodulation index.

## 1. INTRODUCTION

The industrial production of legume inoculant of selected *Rhizobium* species in liquid medium is largely governed by the cost of production and availability of a suitable carbon source (Bissonnette et al., 1986). The standard medium usually includes mannitol, sucrose or glycerol as carbon source, yeast extract (YE) as a source of nitrogen, growth factors and mineral salts. The YMB medium (Yeast Mannitol Broth) has been used for a laboratory scale production, however, its industrial use is limited due to high cost. Some industrial by-products, such as corn-steep liquor (Burton, 1979), proteolyzed pea husks (Gulati, 1979), malt sprouts (Bioardi et al., 1985), industrial-grade yeast extract (Meade et al., 1985) and the whey generated by cheese industry (Bissonnette et al., 1986) have been used for commercial production of inoculums. All these materials contain growth factors, nitrogen and carbon for growth of various strains of *Rhizobium*. However, the majority of waste needs a pre-treatment and, most importantly, the standard medium could not be completely replaced by the by-products (Bioardi et al., 1985).

Industrial and municipal wastewater treatment plants produce a large amount of sludge. The disposal and/or utilisation of wastewater sludge is an increasing environmental problem. The sludge handling and disposal cost represents 30 to 40% of the capital cost and about 50% of the operating cost of a typical wastewater treatment facility (Vesilind, 1974). Land filling (Bradley et al., 1992; E.P.A., 1993), ocean discharge (Gross, 1993), land application (Golueke, 1992) are conventional sludge disposal methods. The conversion of sludge into building materials (Tay and Show, 1992) as well as oils (Campbell and Martinelli, 1991) are new techniques being developed for sludge disposal. The wastewater sludge contains nitrogen, phosphorus, biodegradable carbon nutrients and many other nutrients (Gouvernement du Quebec, 1991), suggesting that this material could serve as a raw material for bacterial cell growth. Therefore, the present study was conducted to explore the possibility of sewage sludge utilisation as a raw material for the production of rhizobia used to inoculate leguminous agriculture crops.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Sludge sampling

Sludge from six different municipal and industrial wastewater treatment plants located in the province of Quebec was sampled. The sludge samples were sterilised at 121 °C for 20 minutes. The sterile sludge samples were stored at 4°C until their use.

## **2.2. Sludge pre-treatments**

Acid pre-treatment: 100 ml of each type of autoclaved sludge (121°C during 20 minutes) was placed in 250 ml Flasks. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N) was added to adjust the pH to 2. After 24 h acid reaction, pH was re-adjusted to 7.0 with sodium NaOH (2N). The sample was autoclaved again and inoculated after cooling.

Alkaline pre-treatment: alkaline pre-treatment consisted of a 24 - h hydrolysis of 100 ml sterile sludge with 185 meq/l of sodium hydroxide (7.5 g NaOH/l of sludge) in 250 ml flask. After treatment, the pH was adjusted to 7.0 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N). The sample was autoclaved again and inoculated after cooling.

Oxidative pre-treatment: The oxidative pre-treatment of sludge was carried out for 3 h in 250 ml flasks in a shaking water bath (60 rpm, 70°C) using 100 ml sludge sample. The pH was adjusted to 3.0 using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ L of sludge) was added from a stock solution (30%v/v). The final concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in sludge was 32 mmol/l of sludge. After the treatment, the pH was adjusted to 7.0 using NaOH (2N) followed by sterilisation.

## **2.3. Micro-organisms**

Two class of *Rhizobium* strains (Agriculture and Agri-food Canada, Sainte-Foy, Que.) were used in the present study: (i) Fast-growing, *Sinorhizobium meliloti* A2 (alfalfa nodulating) and *Rhizobium leguminosarum* bv viciae ATCC10004 (pea nodulating); (ii) Slow-growing, *Bradyrhizobium japonicum* 532C (soya nodulating) and *Bradyrhizobium elkanii* USDA76 (soya nodulating). Cultures were maintained at 4°C on mannitol agar slants.

## **2.4. Inoculum preparation**

The inocula for the experiments were prepared by growing strains in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml of the sterilised standard medium (YMB: Yeast Mannitol Broth). The flasks were incubated at 30°C for 48 and 72 hours for the fast

and the slow-growing strains, respectively, on a rotary shaker at 200 rpm. The standard medium contained the following constituents (in grams per liter): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.2; NaCl, 0.1; yeast extract, 1; and mannitol, 10.

## 2.5. Growth experiments

The initial pH of the sludge samples (pre-treated or untreated) was adjusted to 7.0 using either NaOH or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The samples were sterilised at 121°C for 20 min. Growth experiments were carried out in 250 ml Erlenmyer flasks each containing 50 ml of the sterile medium (sludge or standard medium). Flasks were inoculated with 3% (v/v) inoculum. The conditions used in the experiments were the same as those used to prepare the corresponding inoculum. The samples were drawn at regular intervals. The cell count was performed on agar plates using YMA (Yeast Mannitol Agar) with Congo red (0.25%) after appropriate serial dilution of samples with salt buffer (NaCl 0.85%). After fermentation, the samples of sludge grown rhizobia were stored at -20 °C until their use for the nodulation test. All experiments were conducted in duplicate.

## 2.6. Verification of the nodulation potential

The nodulation potential of rhizobia was evaluated on plants (soya, alfalfa and pea) in seed growth pouches (Mega International, Minneapolis) fed with nutrient N-free solution (Vincent, 1970). Two millilitres of each culture was used to inoculate plants. After 28 days of growth, plants were observed for nodulation. The nodulation index was determined according to the nodule size, colour and number as given in Table 1.

## 2.7. Sludge analysis

Total solid, total suspended solid, volatile solids and volatile suspended solids (VSS) were determined (w/v) according to the Standard Methods (APHA *et al.*, 1992). The total Kjeldahl Nitrogen (TKN), Phosphorus (P<sub>t</sub>) and total Organic Carbon (TOC) were analysed after digestion following the Standard Methods. Chemical Oxygen demand (COD), ammonium (N-NH<sub>4</sub>) and soluble phosphates (PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) were also analysed in the sludge liquid fraction (APHA *et al.*, 1992). Heavy metals (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) as well as mineral salts (Mg, Ca and Na) were determined after digestion using an ICP Thermogel Ash Corp.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Sludge composition

Composition of different sludges is presented in Tables 2 and 3. The sludges are different from each other with respect to both physical and chemical characteristics. The sludge composition is strongly influenced by the process of a wastewater treatment and the origin of the wastewater. The total solids and total suspended solids were generally higher in the primary sludge (VALP, BLKP and CUQ). All the six sludges showed pH between 6 and 7 except for the primary sludge of Valcartier (VALP) which had lower pH. Total organic carbon was higher in VALP, CUQ and PPS sludges. The secondary sludge of Valcartier (VALS) had a higher organic C and total N. Various concentrations of C and N in raw sludge gave a large variation in C/N ratio. Liquid fraction of sludge contains large quantity of ammonium, COD and PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. This indicates that the sludge origin is likely to affect growth of rhizobia.

Na, Ca and Mg concentrations were high in all sludges. It is generally conceded that rhizobia needs small amount of magnesium, calcium and potassium (Vincent, 1977) and it appears that fast growers need more calcium than slow growers do (Burton, 1979). Ca stimulates the growth of the bacteria and Mg acts as an enzymatic regulator (Vincent, 1962; Sherwood, 1972; Norris, 1959). The Ca/Mg ratio seems to have more impact on growth of rhizobia than the quantity of Ca and Mg considered separately (Vincent, 1962). While varying the ratio, rhizobia strains react differently. For example, *R. trifolii* seems to be not affected by a Ca/Mg ratio ranged between 10 to 1/30, while *S. meliloti* seems to grow better with lower ratio (Steinborn and Roughley, 1975).

Heavy metals concentration was strongly influenced by the origin of sludge. The metal concentrations were, generally, under the level recommended for agricultural practices except for copper. Copper concentration exceeds the recommended level (600-mg/Kg dry sludge) for VALP, VALS, BLKP and BLKS. However, Cu concentration is below the obligatory level of 1000mg/kg sludge. Certain metals, such as zinc, manganese and iron are necessary for growth of rhizobium. Zn stimulates the rhizobium growth (Willson and Reisenauer, 1970b) and Fe plays an important part in the transport of the electrons and acts as a cofactor (Quispel, 1974). However, certain

elements (Ni and Cu) can be toxic for the rhizobia (Willson and Reisenauer, 1970a; Lowe and Evans, 1962).

Sludge seems to contain nutritive substances (C, N, P and macronutrients) at concentrations sufficient to sustain the rhizobial growth. But the more important observation from the sludge analysis is that the composition of sludges varies with their origin. This can influence the growth, the survival of the selected rhizobium species and, consequently, the nodulation process.

### 3.2. Influence of sludge origin on growth of rhizobia

**Fast growing strains.** The growth curves of *S. meliloti* and *R. leguminosarum bv viciae* obtained using different sludges as substrate are shown in Fig.1. The results of various experiments carried out with *S. meliloti* show that this bacteria grow well in all sludges. For secondary sludges (BLKS and VALS), no lag period was detected or the lag phase finished before the first sampling (after six hours of inoculation). However, for VALP, BLKP and PPS an adaptation phase was observed. In all cases, the stationary growth phase was attained within 48 to 54 hours. A summary of cell count, initial and final pH and the generation time is presented in Table 4. All secondary sludges gave markedly higher cell count than that demonstrated by primary sludges. In PPS sludge, the cell concentration reached a maximum of  $3.3 \times 10^9$  cfu/ml, statistically similar to that obtained on YMB media (Table 4). Moreover, concentration of cells attained in all primary sludges was significantly lower than that achieved by using YMB medium. There was a significant variation of generation time ( $t_g$ ) using different sludge as substrate (Table 4). The values of  $t_g$  for all sludges are definitely higher than that obtained on YMB medium (5.53 hours). The generation time range from 6 to 9 h for VALS, BLKS, PPS and CUQ sludge. However, for VALP and BLKP the generation time exceeds 9 hours.

It seems that the rhizobia growth was strongly influenced by the sludge composition. For *S. meliloti*, high solids concentration tends to increase the generation time and decrease the cell yield. A generation time greater than 10 h was obtained with a 3500 mg/l of TSS (case of VALP) and 32000 mg/l of TSS (case of BLKP). However, a generation time between 6.27 and 8.25 was obtained with a TSS less than 20000 mg/l. Therefore, the generation time decreased as the solids concentration decreased. It is also clear from Table 2 that the C/N ratio increases with solids concentration

(considering different sludges). Thus, the C/N ratio tends to affect rhizobia growth in a similar way as described for solids.

On the other hand, Ca/Mg ratio has been found to affect rhizobia growth as described before. However, no correlation was observed between Ca/Mg ratio and rhizobia growth on different sludges in this work. For example, a Ca/Mg ratio of 3.5 (VALS), 1.66 (BLKP) and 1.06 (BLKS) gave similar generation time and cell count (values not significantly different). This behavior of sludge with respect to Ca/Mg ratio may be attributed to the form of these components (Ca and Mg) in sludge and that may control their bioavailability.

The metal composition of sludge varies with sludge origin. Sludge analyses shows that VALS which contains higher concentration of Al, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn, gives a generation time not significantly different from the value obtained with PPS which contains comparatively lower concentration of Cr, Cu, Fe, Ni, Pb and of Zn. Moreover, the variation of metal concentration in VALP, VALS, BLKP, BLKS and CUQ sludges are significantly different, the cell count values are not significantly different. Therefore, higher sludge metal content does not affect the final cell concentration and generation time (or specific growth rate). This may be due to the fact that metals in sludge do not exist in ionic form and hence are not available to affect the cell metabolism. However, a more accurate comparison is only possible by conducting experiments using the same sludge with different metals concentration.

Contrary to *S. meliloti*, an inhibition of *R. leguminosarum* bv viciae was observed when VALP and CUQ sludges were used as a growth media (Fig 1). This shows that the two strains do not grow in a similar way on different sludges. This difference in growth can not be explained exactly with the present data due to the variation and complex nature of different sludges. For *R. leguminosarum* bv viciae, no difference in the growth curves was observed between BLKS, VALS and PPS (Fig. 1). For these cases, the exponential growth was finished within 50 h and the generation time was about 5 h. In addition, it is interesting to note that a lag period of about 30 h was observed with BLKP sludge. Similar cell yields were obtained with BLKP, BLKS, VALS and PPS, and the lowest value of cell yield was obtained on VALS ( $2.45 \times 10^9$  cfu/ml) (Table 4). These yields were not significantly different from YMB media. The

maximum cell number was attained in 50 h. In standard medium, the maximum cell number was attained, within 40 hours.

**Slow-growing strains:** The results obtained with *B. japonicum* and *B. elkanii* are shown in Fig 2 and Table 5. The result show that secondary sludges (PPS, VALS and BLKS) well sustain growth of *B. japonicum*, but a lag period of 12 h was observed. During this period the cell count decreased. The exponential growth persisted between 12 and 70 h. The generation time was 8, 8.67 and 11.79 h for PPS, VALS and BLKS, respectively. The high cell count ( $1.58 \times 10^9$  cfu/ml) was observed using PPS sludge, but it was significantly lower than cell count in the standard medium ( $4.2 \times 10^9$  cfu/ml). Similar results were obtained with *B. elkanii*. However, the maximum cell concentration was not significantly different compared with that obtained in the standard medium (Table 5). The generation time was within 10 to 11 h.

The two slow-growing rhizobial strains were not able to grow on primary sludges except BLKP. This inhibition, again, could be the result of a similar effect to that mentioned above. In the case of BLKP, an important period of adaptation was observed. This period was about 65 and 30 hours, respectively, for *B. japonicum* and *B. elkanii*. This reflects the different behaviour of different strains in the same (BLKP) sludge.

### 3.3. Variation of pH during growth of rhizobia

Before inoculation all sludge samples were adjusted to pH 7. For fast-growing strains, pH values obtained at the end of sludge fermentation ranged between 8.3 and 9.1 (Table 4). However, for the mannitol (standard) medium, the final pH decreased to 5.8. It is well known that fast growing bacteria accumulate organic acids in the standard medium. However, sludge buffering capacity is very high and that neutralises the acids produced. On the other hand, sludge alkalinity may also increase (during uncontrolled pH) due to the release of some sludge components, for example, the liberation of calcium from its complex form. This explanation was suggested during growth of rhizobium on cheese whey as a media (Bissonnette *et al.*, 1986). Moreover, degradation of protein in sludge due to bacterial growth may also increase the pH by the release of ammonium nitrogen. In contrast, slow-growers increase the final pH in

standard as well as in sludge medium (Table 5). The final pH could also be influenced by the varying sludge composition.

### **3.4. Influence of sludge grown rhizobia on the nodulation**

The nodulation potential was tested with alfalfa, soya and pea plants. Table 6 summarises the nodulation index for all rhizobia strains tested in this study. *S. meliloti* and *R. leguminosarum* bv *viciae* nodulated, their plants respectively alfalfa and pea to various degrees depending probably on the origin of media used for growth. The nodulation index ranges from 6 to 12 and from 11.2 to 12.4 for *S. meliloti* and *R. leguminosarum* bv *viciae*, respectively. For *S. meliloti*, only BLKS was capable to give a nodulation index similar to that obtained with standard media. However, for *R. leguminosarum* bv *viciae* the nodulation index for all media was not significantly different.

*B. japonicum* showed a nodulation index with soya, varying from 8.8 to 15.6. *B. japonicum* grown in secondary sludges (PPS, VALS) gave a nodulation index significantly lower than that obtained with YMB. The nodulation index for *B. elkanii* was not tested.

The variability of the nodulation index from one sludge to another and from one rhizobial strain to another may be attributed to: (1) The survival rate of rhizobial grown sludge after freezing could result in low cell number; (2) The effect of sludge content (toxic metals and others) on the nodulation process, on the interaction plants – bacteria and/or on the physiology of the strain.

### **3.5. Influence of pre-treatments on the production of *S. meliloti***

The degree of sludge hydrolysis and/or increase in the availability of organic substrate before and after various treatments was evaluated by growth of *S. meliloti*. The results of these experiments are presented in Figure 3 and Table 7. All the sludge samples indicate an increase in the final pH (Table 7). Thus, the pre-treatment of sludges does not affect the pattern of pH change during growth of rhizobia.

It seems that the sludge solids concentration is a factor that influenced the extent of acid, alkali and oxidative hydrolysis. For a given NaOH concentration (185 meq NaOH/l of sludge) the alkali concentration varied with sludge origin. The alkali

concentration was 0.21, 1.88, 0.24, 3.75, 0.4, 0.47 g NaOH/g TSS for VALP, VALS, BLKP, BLKS, CUQ and PPS sludge, respectively. Also the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in the oxidative treatment was 28.57, 250, 31.5, 500, 53.33 and 62.5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g TSS for the sludges in the same order.

For all sludges, the lag period was not detected and the stationary phase was attained within 40 to 70 hours depending on type pre-treatment (Fig 3). The effect of pre-treatment on rhizobium growth varied with sludge origin and the type of treatment. In general, for the same sludge, all treatments except oxidative treatment tend to decrease significantly the generation time (Table 7). In case of BLKS sludge, the maximum cell count was  $2.2 \times 10^9$  without treatment and  $3.9 \times 10^9$  cfu/ml with acid treatment. In the case of PPS sludge, the maximum count was significantly enhanced with alkali and oxidative treatments. The cell counts were  $1.74 \times 10^9$ ,  $10.7 \times 10^9$  and  $3.83 \times 10^9$  cfu/ml for without treatment, with alkali and oxidative treatments, respectively. The generation time was also significantly reduced with PPS sludge treatment. For VALS, acid treatment significantly increased the cell count but decreased in the other two treatments. However, generation time remain unchanged (4.95 h) with acid treatment and increased with the other treatments. The decrease in cell yield and increase in generation time with certain sludge pre-treatment (Table 7) may be due to a deterioration of some biodegradable compounds in sludge, especially for the sludge which contain a lower solids concentration.

It seems that the concentration of NaOH (0.47 g NaOH/g TSS) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62.5 µl/g TSS) was suitable for PPS sludge, whereas 1.88gNaOH/gTSS and 250 µl/g TSS for VALS were too high. High concentration of treating chemical might have caused deterioration of the biodegradable solids. This necessitates optimising the hydrolysis conditions for individual sludges.

It is difficult to generalise the effect of various treatments on primary sludges of different origin. For VALP sludge no significant improvement was observed in terms of cell count and generation time. For BLKP, there was a decrease in generation time after acid and alkali treatments (without treatment: 9 h; acid treatment: 6.9 h and alkali treatment: 6.96 h). It was also observed that, after alkali treatment, the cell count was significantly increased (from  $0.88 \times 10^9$  to  $4.1 \times 10^9$  cfu/ml) in CUQ sludge.

The enhancement of the maximum cell count and the decrease of the generation time are a result of an increase in the sludge biodegradability. The acid hydrolysis solubilizes the sludge organic matter (Rajan *et al*, 1989). Alkaline and oxidative treatment of lignocellulosic materials have been observed to induce swelling in particulate organics, making the cellular substances more susceptible to enzymatic attack during saccharification (Tagaki, 1987; Baccay *et al*, 1984). It is also important to mention that there are many factors that may influence the enhancement of biodegradability of the sludge. Among these are concentration of solids, fibre or cellulose, organic component, various forms of nitrogen, grease, particle size and type of sludge (Karr and Keinath, 1978). Therefore, it is apparent that the reaction conditions to be used in each pre-treatment to enhance the cell yield and decrease the generation time need to be optimised in each type of sludge separately.

The nodulation capacity of the rhizobium grown in sludge with and without pre-treatment is shown in table 7. The nodulation index ranged between 5 and 12 and depends on the pre-treatment process and the sludge origin. In general, the nodulation index increased with sludge treatment except for BLKS sludge, where values of this index were affected by the sludge pre-treatment method. For BLKS sludge, acid and alkali pre-treatments decreased the nodulation index. For VALP sludge, pre-treatment tended to increase the nodulation index, which became almost same to that obtained with YMB medium. The variability of the nodulation index for different sludge may be also due to the initial composition of sludges and to the changes in physical and chemical composition after pre-treatment. Further, systematic investigations are required to optimise the pre-treatment process and understand the growth and the nodulation processes. The research is being conducted in our laboratory to optimise the effect of sludge solids concentration, aeration rate, sludge pre-treatment parameters, and amount of sludge inoculum to be used for nodulation.

#### 4. CONCLUSIONS

The use of wastewater sludge for legume inoculants production represents a new alternative for disposal/recycling and can substantially minimise the production cost of inoculants. This research has shown that wastewater sludge contains sufficient carbon, nitrogen, phosphorus and micronutrients to sustain growth of various strains of rhizobia. Sludge composition strongly affected growth of rhizobia. The pre-

treatment of primary sludge resulted in an increase in the cell count and a decrease in the generation time of rhizobia. The efficiency of sludge pre-treatment to improve the growth and nodulation capacity of rhizobia depends on the sludge solids concentration and on the origin of sludge.

**Acknowledgement.** The authors sincerely thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant A 4984) for providing financial assistance to conduct the research work.

## REFERENCES

- 1 APHA, American Public Health Association. 1992. Standard methods for examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- 2 Baccay, R. A., and Hashimoto, A. G. 1984. Acidogenic and methanogenic fermentation of causticized straw. Biotechnol. Bioeng. 26, 885.
- 3 Bioardi, J. L., and R. J. Ertola. 1985. Rhizobium biomass production in batch and continuous culture with a malt-sprouts medium. MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1:163-172
- 4 Bissonette, N., R. Lanande and L., M. Bordeleau. 1986. Large-scale production of Rhizobium meliloti on whey . Appl. Environ. Microbiol. 52:838-841.
- 5 Burton, J. C. 1979. Rhizobium species, p. 29-58. In H. J. Peppler (ed.), Microbial technology. Academic Press, Inc., New-York.
- 6 Bradley J.W., S. Kyosai, P. Matthews, K. Sato and M. Webber 1992. Worldwide sludgemanagement practices. Dans: Municipal sewage sludge management: processing, utilization and disposal. C.LueHing, D.I.L Zejjiz and T. Kuchenrither (éds), Water Quality Management Libraiy, Vol.4, Technomic Publishing Co., Inc.; Lancaster, Pennsylvanie, U.S.A., Chap. 13, pp.537-657.
- 7 Campbell H.W. and D.k Martinoli. 1991. Canada's oil-from-sludge technology. Wat. Environment Technol. July, 3: 64-66.

- 8** Environmental Protection Agency (EPA). 1993. Standards for the use and disposal of sewage sludge, 40 CFR Parts 257, 403 and 503, Final Rule. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A
- 9** Gulati, S. L. 1979. New nonsynthetic medium for Rhizobium culture production from wastes. Biotechnol. Bioeng. 21:1507-1515.
- 10** Golueke C. G. 1992. Bacteriology of composting Biocycle Jan., 33: 55-57.
- 11** Gross T.S.C. 1993. Thermal drying of sewage sludge. J. IWEM, 7: 255-261.
- 12** Gouvernement du Québec. 1991a. Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales - Guide de bonnes pratiques. Ministère de l'Environnement, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, juillet, 91 pages.
- 13** Karr, P. R. and Keinath, T. M. 1978. Influence of particle size on sludge dewaterability. J. Water Pollut. Control. Fed, 50: 1911-1930
- 14** Lowe, R.H. and H.J. Evans. 1962. Cobalt requirement for the growth of Rhizobia. J. Bact. 83: 210-211.
- 15** McGrath S.P., A.C. Chang, A.L. Page and E. Witter. 1994 Land application of sewage sludge : scientific perspectives of heavy metal loading limits in Europe and the United States. Environ. Rev., 2, 108-118.
- 16** Meade, J., P. Higgins, and F. O'Gara. 1985. Production and storage of Rhizobium leguminosorum cell concentrates for use as inoculants. J. Appl. Bacteriol. 58:517-524.
- 17** Norris, D.O. 1959. The role of Calcium and Magnesium in the nutrition of Rhizobium. Aust. J. Agric. Res. 10: 651-698.
- 18** Quispel, A. 1974. The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. Oxford Am. Elsevier Publ. Corp., Inc. N.Y.
- 19** Rajan, R. V., Lin, J. G. and Ray, B. T. 1989. Lower-level chemical pretreatment for enhance sludge solubilisation. J. Water Pollut. Control. Fed. 29, 12, 31-40

- 20** Sherwood, M.T. 1972. Inhibition of *R. trifolii* by yeast extracts or glycine is prevented by calcium. J.Gen. Microbiol. 71: 351-358.
- 21** Steinborn, J. and R. J. Roughley. 1975. Toxicity of sodium and chloride ions to Rhizobium spp. In broth and peat culture. J. Appl. Bact. 39: 133-138.
- 22** Tay J.H. and K.Y. Show .1992. Reuse of wastewater sludge in manufacturing non-conventional construction materials - an innovative approach to ultimate sludge disposal. Wat. Sci. Technol. 26 (5/6), 1165-1174.
- 23** Takagi, M. 1987. Pretreatment of lignocellulosic materials with hydrogen peroxide in the presence of manganese compounds Biotechnol. Bioeng 29, 165-170.
- 24** Vincent, J. M. 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of rhizobium. J. Gen. Microbiol.. 28: 653.
- 25** Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme handbook no. 15. Blackwell Scientific Publication, Ltd., Oxford
- 26** Vincent, J. M. 1977 Rhizobium: general microbiology. In: Hardy R. W. F., Silver W. S. (eds.). A treatise on dinitrogen fixation, vol 3. John Wiley and Sons, New York pp 277-364.
- 27** Vesilind, P. A. 1974. Treatment and Disposal of Wastewater Sludges. Ann Arbor Sci. Publishers, Ann Arbor, Mich.
- 28** Wilson, D.O. and H.M. Reisenauer. 1970a. Effects of some heavy metals on the cobalt nutrition of Rhizobium meliloti. Plant and Soil 32: 81-89.
- 29** Wilson, D.O. and H.M. Reisenauer. 1970b. Effects of manganese and zinc ions on the growth of Rhizobium. J. Bact. 102: 729-732.

**Nomenclature of the symbols**

BLKP - Primary sludge of Black lake

BLKS - Secondary sludge of Black Lake

CUQ - Mixed sludge from Communauté Urbaine du Québec Wastewater treatment plant.

PPS - Secondary sludge of pulp and paper wastewater treatment

VALP - Primary sludge of Valcartier

VALS - Secondary sludge of Valcartier

COD - chemical oxygen demand (mg/l)

N-NH<sub>4</sub> - Ammonia nitrogen (mg/l)

NI - Nodulation index

pH<sub>i</sub> - initial pH

pH<sub>f</sub> - final pH

PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> - Soluble phosphorus (mg/l)

P<sub>t</sub> - Total phosphorus (mg/l)

t<sub>g</sub> - generation time (h)

TKN - Total Kjeldahl nitrogen (mg/l)

TOC - Total organic carbon (mg/l)

TS - Total solids (mg/l)

TSS - Total suspended solids (mg/l)

VS - Volatile solids (mg/l)

VSS - Volatile suspended solids (mg/l)

X - cell count (cfu/ml)

$X_{max}$  - maximum cell count (cfu/ml)

YMA - Yeast Mannitol Agar

YMB - Yeast Mannitol Broth

**Table 1.** Determination of the nodulation index

| <b>Nodule size</b>   | <b>Value (A)</b> |
|----------------------|------------------|
| Large                | 3                |
| Medium               | 2                |
| Small                | 1                |
| <b>Nodule Colour</b> | <b>Value (B)</b> |
| Pink                 | 2                |
| White                | 1                |
| <b>Nodule number</b> | <b>Value (C)</b> |
| No nodules           | 0                |
| Few nodules          | 2                |
| Many nodules         | 3                |

**Nodulation index = A\*B\*C ≤ 18**

**Table 2.** Physical and chemical characteristics of original sludges

|  | <b>VALP</b> | <b>VALS</b> | <b>BLKP</b> | <b>BLKS</b> | <b>CUQ</b> | <b>PPS</b> |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| <b>Physical characteristics : solids content (mg/L) and pH</b> |             |             |             |             |            |            |
| <b>TS</b>  | 35750       | 3850        | 34250       | 2600        | 23100      | 16300      |
| <b>VS</b>  | 29000       | 3100        | 22000       | 1850        | 16850      | 14550      |
| <b>TSS</b>   | 35000       | 3400        | 31750       | 2000        | 18750      | 16000      |
| <b>VSS</b>   | 28500       | 3000        | 21000       | 1250        | 13500      | 12500      |
| <b>pH</b>  | 5.18        | 6.8         | 6.4         | 6.75        | 6.3        | 6.2        |
| <b>C, N and P content (g/kg of dry sludge)</b>                 |             |             |             |             |            |            |
| <b>TOC</b>   | 435         | 387         | 337         | 298         | 400        | 410        |
| <b>NTK</b>   | 24          | 55          | 21          | 31          | 40         | 42         |
| <b>P<sub>t</sub></b>   | 7           | 24          | 12          | 10          | 15         | 11         |
| <b>C/N</b>   | 18.12       | 7           | 16          | 9.61        | 10         | 9.76       |
| <b>C, N and P contents of liquid fraction (mg/L)</b>           |             |             |             |             |            |            |
| <b>COD</b>   | 6169        | 1426        | 4620        | 1340        | 3355       | 6606       |
| <b>N-NH<sub>4</sub></b>  | 289         | 71          | 155         | 14          | 428        | 73         |
| <b>PO<sup>2-</sup><sub>4</sub></b>                             | 3           | 16          | 20          | 5           | 2          | 33         |
| <b>Ca, Na and Mg content (mg/kg of dry sludge)</b>             |             |             |             |             |            |            |
| <b>Ca</b>  | 6315        | 17610       | 10431       | 19231       | 20925      | 6525       |
| <b>Mg</b>  | 2968        | 4835        | 8924        | 18153       | 3111       | 2124       |
| <b>Na</b>  | 4116        | 40297       | 7337        | 44933       | 5292       | 15588      |
| <b>Ca/Mg</b>   | 2.13        | 3.5         | 1.66        | 1.06        | 6.7        | 3          |

**Table 3.** Metals content of sludges and recommended levels for agricultural practices

| Sludges                              | Concentration (mg/kg of dry sludge) |       |      |                   |       |       |      |      |       |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------|------|-------------------|-------|-------|------|------|-------|
|                                      | Al                                  | Cd    | Cr   | Cu                | Fe    | Mn    | Ni   | Pb   | Zn    |
| <b>VALP</b>                          | 13874                               | 4     | 46   | 899 <sup>b</sup>  | 6662  | 66    | 25   | 82   | 420   |
| <b>VALS</b>                          | 27470                               | n     | 132  | 1254 <sup>b</sup> | 15498 | 292   | 35   | 158  | 1308  |
| <b>BLKP</b>                          | 15817                               | 16    | 72   | 1051 <sup>b</sup> | 13461 | 214   | 78   | 75   | 303   |
| <b>BLKS</b>                          | 27692                               | n     | 91   | 709 <sup>b</sup>  | 8615  | 294   | 64   | 87   | 403   |
| <b>CUQ</b>                           | 21416                               | n     | 60   | 197               | 11110 | 147   | 11   | 57   | 318   |
| <b>PPS</b>                           | 25067                               | n     | 40   | 72                | 1998  | 377   | 7    | 35   | 92    |
| Recommended level (mg/kg dry sludge) |                                     |       |      |                   |       |       |      |      |       |
| <b>MENVIQ (*)</b>                    | a                                   | 10-15 | 500- | 600-              | a     | 1500- | 100- | 300- | 1750- |
|                                      |                                     |       | 1000 | 1000              |       | 3000  | 180  | 500  | 2500  |
| <b>E.E. C. (**)</b>                  | a                                   | 20-40 | a    | 1000-             | a     | a     | 300- | 750- | 2500- |
|                                      |                                     |       |      | 1750              |       |       | 400  | 1200 | 4000  |

\* : Government of Quebec (1991).

\*\* : European Economic Community (McGrath et al., 1994).

a : no limit, b : values exceeded the recommended level

n : not determined

**Table 4.** Growth results of fast-growing strains using different sludges

|             | <i>Sinorhizobium meliloti</i> |                 |                                     |                     | <i>Rhizobium leguminosarum bv viciae</i> |                 |                                     |                     |
|-------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------|--|-----------------|-------------------------------------|---------------------|
|             | pH <sub>i</sub>               | pH <sub>f</sub> | 10 <sup>9</sup> ×X <sub>max</sub> * | t <sub>g</sub> (h)* | pH <sub>i</sub>                          | pH <sub>f</sub> | 10 <sup>9</sup> ×X <sub>max</sub> * | t <sub>g</sub> (h)* |
| <b>YMB</b>  | 6.9                           | 5.8             | 4.8a                                | 5.53a               | 6.9                                      | 6.3             | 3.8a                                | 3.92a               |
| <b>VAP</b>  | 7                             | 8.              | 0.7b                                | 11b                 | 7  | N               | N                                   | N                   |
| <b>VALS</b> | 7                             | 8.5             | 2.32b                               | 6.52a               | 7  | 7.9             | 2.45a                               | 4.94a               |
| <b>BLKP</b> | 7                             | 8.7             | 1.12b                               | 10.22b              | 7  | 8.1             | 3.1a                                | 7.5                 |
| <b>BLKS</b> | 7                             | 9.1             | 2.2b                                | 7.7a                | 7  | 8               | 2.96a                               | 4.48a               |
| <b>CUQ</b>  | 7                             | 8.7             | 0.85b                               | 8.25a               | 7  | N               | N                                   | N                   |
| <b>PPS</b>  | 7                             | 8.3             | 3.3a                                | 6.27a               | 7  | 8.3             | 2.8a                                | 4.19a               |

pH<sub>i</sub> : initial pHpH<sub>f</sub> : final pHt<sub>g</sub> : generation time (h)X<sub>max</sub> : maximum cell count (cfu/ml)

\* means of two replicates; values in the same column (fore the same strain) flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance.

N : No growth

**Table 5.** Growth result of slow-growing rhizobium strains using different sludges

|             | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |                 |                                     |                     | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> |                 |                                     |                     |
|-------------|---------------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------|
|             | pH <sub>i</sub>                 | pH <sub>f</sub> | 10 <sup>9</sup> ×X <sub>max</sub> * | t <sub>g</sub> (h)* | pH <sub>i</sub>               | pH <sub>f</sub> | 10 <sup>9</sup> ×X <sub>max</sub> * | t <sub>g</sub> (h)* |
| <b>YMB</b>  | 6.9                             | 7.4             | 4.2                                 | 7.35a               | 6.9                           | 7.5             | 1.28a                               | 9.80a               |
| <b>VAP</b>  | 7                               | N               | N                                   | N                   | 7                             | N               | N                                   | N                   |
| <b>VALS</b> | 7                               | 7.3             | 1a                                  | 8.67a               | 7                             | 8               | 1.5a                                | 10.58a              |
| <b>BLKP</b> | 7                               | 7.3             | 0.67a                               | 8.82a               | 7                             | 7.4             | 1.2a                                | 11.37a              |
| <b>BLKS</b> | 7                               | 7.4             | 0.47a                               | 11.79a              | 7                             | 7.5             | 0.5a                                | 10.58a              |
| <b>CUQ</b>  | 7                               | N               | N                                   | N                   | 7                             | N               | N                                   | N                   |
| <b>PPS</b>  | 7                               | 7.7             | 1.58a                               | 8.08a               | 7                             | 7.5             | 1.29a                               | 10.01a              |

pH<sub>i</sub> : initial pHpH<sub>f</sub> : final pHt<sub>g</sub> : generation time (h)X<sub>max</sub> : maximum cell count (cfu/ml)

\* means of two replicates; values in the same column (fore the same strain) flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance.

N: No growth

**Table 6.** Nodulation capacity of rhizobia strains produced in different sludges

|      | Nodulation index (NI)*          |                                     |                                  |
|------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
|      | <i>S. meliloti</i> <sup>a</sup> | <i>R. I. bv viciae</i> <sup>b</sup> | <i>B. japonicum</i> <sup>c</sup> |
| YMB  | 12a                             | 12.4a                               | 15.6a                            |
| VALP | 7.2bd                           | N                                   | N                                |
| VALS | 8be                             | 11.2a                               | 8.8bc                            |
| BLKP | 6b                              | 12a                                 | 15.6a                            |
| BLKS | 11.2ac                          | 11.5a                               | 12ab                             |
| CUQ  | 9,2cde                          | N                                   | N                                |
| PPS  | 6b                              | 11.2a                               | 8.8bc                            |

a : NI for alfalfa; b : NI for pea; c: NI for soya.

N: not tested

\* means of five replicates; numbers in the same column flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance.

**Table 7.** Growth results of *S. meliloti* after sludge pre-treatments

|  | pH <sub>i</sub> | pH <sub>f</sub> | $10^9 \times X_{\max}^*$ | t <sub>g</sub> (h)* | NI**    |
|--|-----------------|-----------------|--------------------------|---------------------|---------|
| <b>YMB</b>                                   | 6.9             | 5.8             | 4.8                      | 3.83                | 12      |
| <b>VALP</b>                                  |                 |                 |                          |                     |         |
| <b>No treatment</b>                          | 7               | 8.7             | 0.73a(-)                 | 8.19a(+)            | 7.2a(-) |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment</b> | 7               | 7.6             | 1.99a(-)                 | 8.4a(+)             | 9.6ab   |
| <b>NaOH treatment</b>                        | 7               | 7.6             | 1.79a(-)                 | 8.4a(+)             | 10.4b   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment</b>  | 7               | 8               | 0.83a(-)                 | 7.49a(+)            | 9.6ab   |
| <b>VALS</b>                                  |                 |                 |                          |                     |         |
| <b>No treatment</b>                          | 7               | 8.6             | 3.6                      | 4.96a               | 8a(-)   |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment</b> | 7               | 8.34            | 5.8                      | 4.93a               | 10a     |
| <b>NaOH treatment</b>                        | 7               | 8.3             | 0.4a(-)                  | 10.58b(+)           | 10a     |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment</b>  | 7               | 7.7             | 0.31a(-)                 | 10.12b(+)           | 8a(-)   |
| <b>BLKP</b>                                  |                 |                 |                          |                     |         |
| <b>No treatment</b>                          | 7               | 8.7             | 1.09a(-)                 | 9a(+)               | 4.8a(-) |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment</b> | 7               | 8.5             | 1.7a(-)                  | 6.9b(+)             | 8a(-)   |
| <b>NaOH treatment</b>                        | 7               | 8.7             | 2.7a(-)                  | 6.96b(+)            | 4.8a(-) |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>            | 7               | 8.1             | 1.9a(-)                  | 8.27ab(+)           | 7.2a(-) |
| <b>BLKS</b>                                  |                 |                 |                          |                     |         |
| <b>No treatment</b>                          | 7               | 9.1             | 2.2a(-)                  | 7.7a(+)             | 11.2a   |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment</b> | 7               | 8.9             | 3.9a                     | 5.56bc              | 8a(-)   |
| <b>NaOH treatment</b>                        | 7               | 8.9             | 2.14a(-)                 | 4.28b               | 8a(-)   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment</b>  | 7               | 8.8             | 1.86a(-)                 | 6.52ac(+)           | 11.2a   |
| <b>CUQ</b>                                   |                 |                 |                          |                     |         |
| <b>No treatment</b>                          | 7               | 8.8             | 0.88a(-)                 | 7.87a(+)            | 9.6a    |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment</b> | 7               | 8.6             | 2.25ab(-)                | 7.44a(+)            | 10a     |
| <b>NaOH treatment</b>                        | 7               | 8.3             | 4.1b                     | 6.83a(+)            | 7.2a(-) |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment</b>  | 7               | 8.3             | 2.14a(-)                 | 7.12a(+)            | 7.2a(-) |
| <b>PPS</b>                                   |                 |                 |                          |                     |         |
| <b>No treatment</b>                          | 7               | 8.8             | 1.74a (-)                | 7.36a (+)           | 5.2a(-) |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment</b> | 7               | 8.7             | 1.74a(-)                 | 5.51ab              | 8a(-)   |
| <b>NaOH treatment</b>                        | 7               | 8.7             | 10.7(+)                  | 4.39b               | 8a(-)   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment</b>  | 7               | 8.3             | 3.83                     | 4.99b               | 5.6a(-) |

pH<sub>i</sub> : initial pHpH<sub>f</sub> : final pHt<sub>g</sub> : generation time (h)X<sub>max</sub> : maximum cell count (cfu/ml)

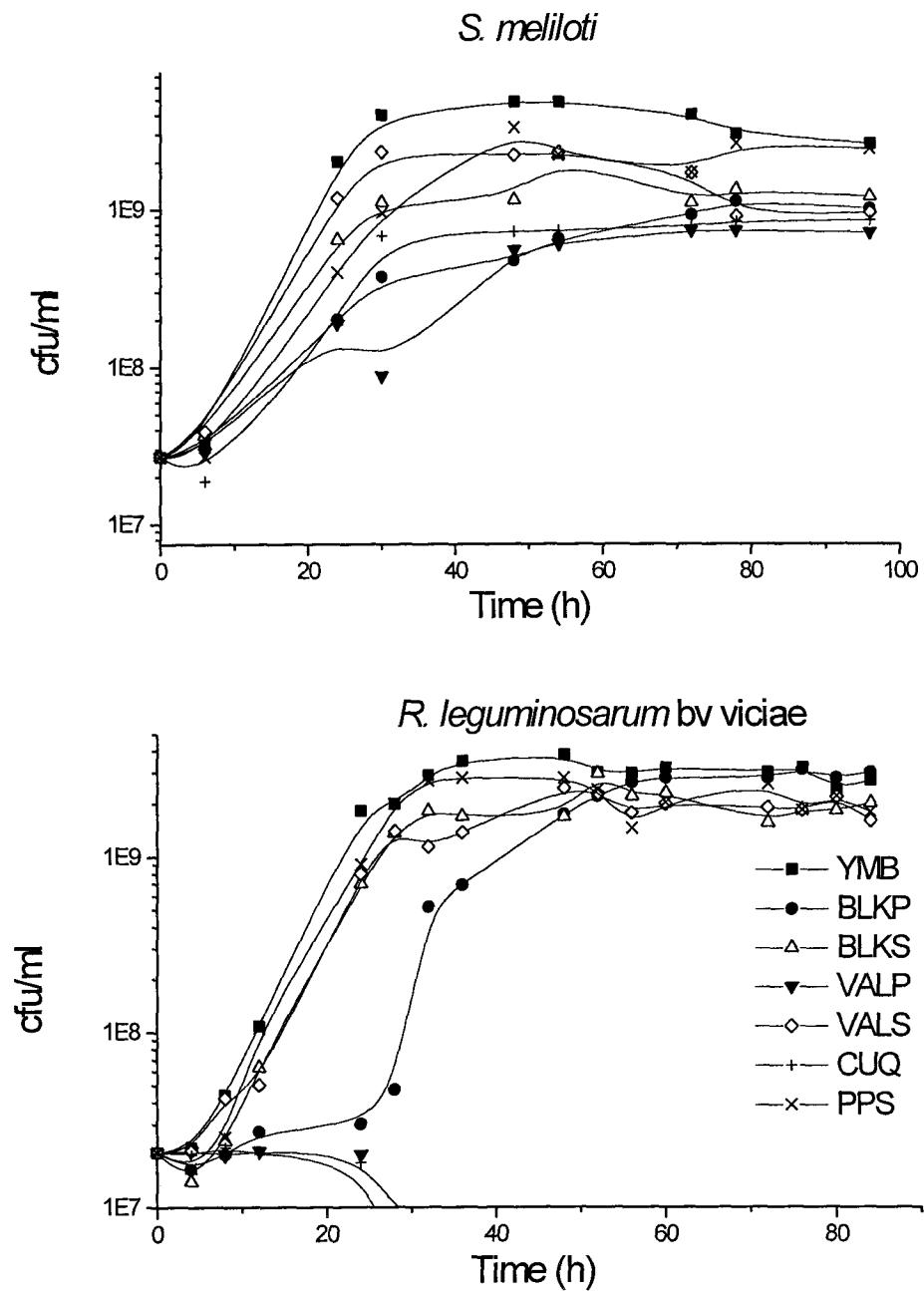
NI : Nodulation index

\* means of two replicates; values in the same column flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance

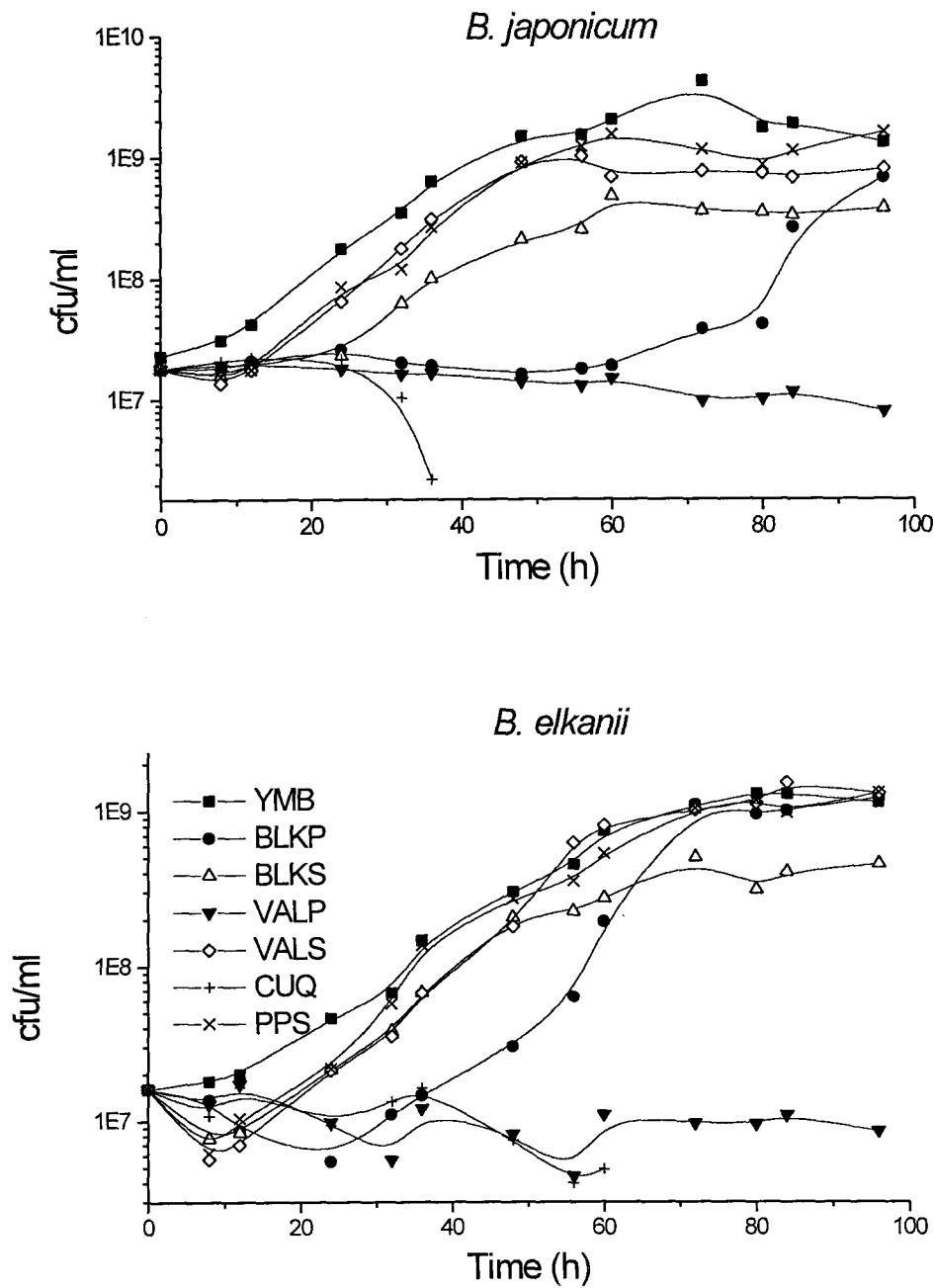
\*\* means of five replicates; numbers in the same column flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance

(-) significantly lower than value obtained with YMB

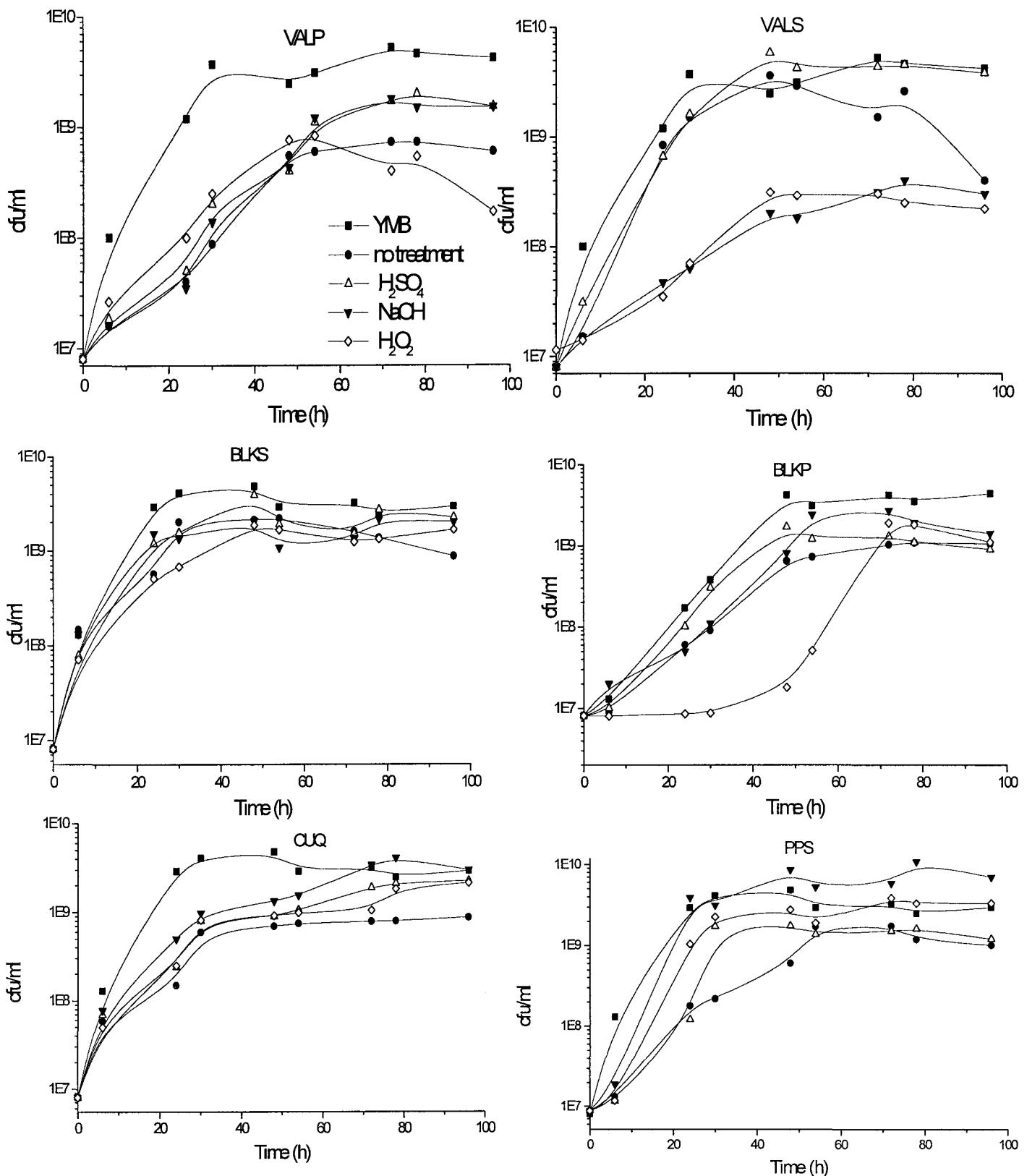
(+) significantly higher than value obtained with YMB



**Figure 1.** Growth of fast-growing rhizobia on different sludges and on YMB media; means of two replicates.



**Figure 2.** Growth of slow-growing rhizobia on different sludges and on YMB media.; means of two replicates



**Figure 3.** Growth of *S. meliloti* on different pre-treated sludges and on YMB media; means of two replicates

## **Chapitre 3**

### **ACID AND ALKALINE TREATMENTS FOR ENHANCING THE GROWTH OF RHIZOBIA IN SLUDGE**

Published

Canadian Journal of Microbiology (2001) 47: 467-474.

Ben Rebah F., Tyagi, R. D. and Prévost, D.

INRS-Eau, Université de Québec  
C.P. 7500, Sainte-Foy  
Québec, Canada G1V 4C7

## RÉSUMÉ

Les boues d'épuration ont été proposées comme un milieu de culture efficace pour la production des rhizobiums. L'effet de la concentration des solides totaux en suspension (TSS) et de prétraitements des boues a été étudié sur la croissance de *S. meliloti*. Des traitements acides (pH 2.0 à pH 6.0 obtenu avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et des traitements alcalins (50 à 200 meq/L NaOH) ont été appliqués pour augmenter la biodégradabilité des boues primaires (0.325 à 3.2% TSS obtenus par dilution de l'échantillon original) et des boues secondaires (0.2 à 0.4% TSS obtenus par concentration de l'échantillon original). Dans les boues primaires non traitées, le nombre le plus élevé de cellules ( $11.10 \times 10^9$  ufc/mL) a été obtenu avec 1.3% TSS. Cependant, un dénombrement maximum de  $13.00 \times 10^9$  ufc/mL a été atteint avec un traitement acide à pH 2.0 sous une concentration de 0.325% TSS. De plus, le traitement de 100 meq/L NaOH à 0.65% TSS a augmenté le rendement des cellules à  $21.00 \times 10^9$  cfu/mL. Pour les boues secondaires sans prétraitement, il n'y a pas eu d'amélioration de la croissance avec l'augmentation de la concentration des TSS. Ceci peut-être du à l'augmentation des substances inhibitrices comme les métaux lourds, et aux éléments Ca et Mg. Comme dans les boues primaires, quelques traitements acides et alcalins des boues secondaires ont causé une augmentation des comptes cellulaires de *S. meliloti*. Cependant, la valeur la plus élevée de  $9.80 \times 10^9$  ufc/mL obtenue avec 0.4% TSS à pH 2.0 est plus faible que celle obtenue avec les boues primaires. Il a été aussi observé que *S. meliloti* produit dans les boues traitées a maintenu sa capacité à noduler la luzerne.

**Mots clés :** boues d'épuration, rhizobium, inoculum, prétraitement des boues, nodulation

## ABSTRACT

Wastewater sludges have been proposed as an effective media for the production of rhizobia. The effect of total suspended solid (TSS) concentrations and pre-treatments of sludge on the growth of *S. meliloti* were investigated. Acid (pH 2.0 to pH 6.0 obtained with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and alkaline (50 to 200 meq/L of NaOH) treatments were applied to enhance the biodegradability of primary (0.325 to 3.2% TSS obtained by dilution of original sample) and secondary (0.2 to 0.4% TSS obtained by concentration of original sample) sludges. In primary sludge without pre-treatment, the highest cell count ( $11.10 \times 10^9$  cfu/mL) was obtained with 1.3% TSS. However, a maximum cell count of  $13.00 \times 10^9$  cfu/mL was reached using an acid treatment of pH 2.0 and 0.325% TSS concentration. Moreover, the alkaline treatment with 100 meq/L NaOH and 0.65% TSS increased the cell yield to  $21.00 \times 10^9$  cfu/mL. For secondary sludge without pre-treatment, no enhancement of growth was observed while increasing TSS concentration. This may be due to the increase of the inhibitory substances, such as heavy metals, and of the Ca and Mg concentrations. Like in primary sludge, some acid and alkaline treatments of secondary sludge tend to improve the cell count of *S. meliloti*. However, the highest value of  $9.80 \times 10^9$  cfu/mL obtained with 0.4% TSS at pH 2.0 was lower than that obtained with primary sludge. It was also observed that *S. meliloti* grown in treated sludges maintained its capacity to nodulate alfalfa.

**Key words :** Wastewater sludge, rhizobium, inoculum, sludge pre-treatment, nodulation

## 1. INTRODUCTION

Wastewater treatment process produces a large amount of sludge. The disposal and/or utilisation of wastewater sludge is an increasing environmental problem. The sludge handling and disposal cost varies from 30 to 40% of the capital cost and represents about 50% of the operating costs of a typical wastewater treatment facility (Vesilind 1974). Land filling (Bradley et al. 1992; E.P.A. 1993), ocean discharge (Gross 1993) and land application (Golueke 1992) are conventional sludge disposal methods. The application of sludge to agricultural soils improves the soil physical and biological properties because it contains organic matter and plant nutrients (Pagliai et al. 1981; Wei et al. 1985). In Canada, 29% of municipal sludges is used in agricultural soils (Webber 1988). For this practice, the concentration of heavy metals should not exceed the recommended levels (Gouvernement du Québec 1991). The conversion of sludge into building materials (Tay and Show 1992) and oils (Campbell and Martinoli 2000) are new techniques being developed for sludge disposal. Moreover, the wastewater sludge was used for producing *Bacillus thuringiensis* (Sachdeva et al. 1999) and has been proposed as an effective substrate for the growth of rhizobia in production of legume inoculants (Ben Rebah et al. 2000). Although the amount of sludge required for the production of bacterial inoculum is low, this new application constitutes an additional and suitable alternative for wastewater sludge recycling.

The presence of complex organic material plays an important role in bacterial growth. Thus, the transformation of organic complex into an available carbon source is an important step in biological treatment. Many technologies are applied as pre-treatment to increase the biodegradable carbon in sludge. The available methods include heat treatment, ultrasound treatment, enzymatic treatment and chemical treatment by acidification or alkaline hydrolysis. To evaluate the effect of thermal treatment on the digestibility and on the methane production of waste activated sludge, it was demonstrated that a thermal treatment at 175°C for 30 min showed an increase of the methane gas production and a destruction of volatile solids (Haug et al. 1978). Studies published by Woodard and Wukasch (1994) indicated that acidification at room temperature using sulphuric acid allows to solubilize 50 to 60% of activated sludge suspended solids. It was also demonstrated that alkaline treatment is effective in solubilizing nitro-cellulose into soluble organics (Alleman et al. 1994). Moreover,

Rajan et al. (1989) showed that low level alkaline treatment of sludge with NaOH could increase levels of solubilization of organic matter up to 46%. Pre-treatments of activated sludge by ultrasound, alkaline hydrolysis and a combination of both treatments were evaluated by Chiu et al. (1997). Best results were obtained with a combination of both treatments, resulting in an increase of the total volatile fatty acids to total COD (chemical oxygen demand) ratio from 10 to 84.

The purpose of this study was to determine the potential of using acid or alkaline pre-treatments in sludges having different solid concentrations to increase the biodegradability of organic material and hence to enhance growth of rhizobia while using sludge as a culture medium.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Sludge sampling and characterisation**

Primary and secondary sludges were sampled from Black Lake wastewater treatment plant located in the province of Quebec. The sludge samples were sterilised at 121°C for 20 minutes. The sterile sludge samples were stored at 4°C until use.

The pH was measured with a pH meter Orion model 420A. Total suspended solid (TSS), total Kjedahl Nitrogen (TKN), Phosphorus ( $P_t$ ), dissolved organic carbon (DOC) and total Organic Carbon (TOC) were determined according to the Standard Methods (APHA 1992). For the liquid fraction, soluble chemical oxygen demand (SCOD), ammonium ( $N-NH_4$ ) and soluble phosphates ( $PO_4^{2-}$ ) were also analysed according to the Standard Methods (APHA 1992). Heavy metals (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) and mineral salts (Mg, Ca and Na) were determined after digestion using ICP Thermogerell Ash Corp (APHA 1992).

### **2.2. Alkaline pre-treatment**

Variables considered in the hydrolysis experiments were alkali (meq/L) and sludge solids (TSS). In this experiment, sodium hydroxide (NaOH) was used as hydrolysis reagent. Alkali was added such that the final concentrations varied from 50 to 200 meq NaOH /L of sludge. The sludge solid concentrations ranged from 0.325% to 3.2% and from 0.2 to 0.4% for primary and secondary sludge, respectively. For the primary sludge, TSS concentrations of samples were obtained by the dilution of the original

sludge. Secondary sludge was concentrated by centrifugation and solids were suspended in the supernatant to obtain the desired TSS concentration. The alkaline pre-treatment consisted of a 24 - hour hydrolysis, at ambient temperature, of 100-mL sterile sludge with sodium hydroxide in 250-ml flask. After the pre-treatment, the pH was adjusted to 7.0 with variable amounts of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N), depending on the treatments combination and representing 1 to 10% of the total volume. The sample was autoclaved at 121°C for 20 minutes.

### **2.3. Acid pre-treatment**

The pH of 2.0, 4.0 and 6.0 were obtained by adding sulphuric acid (1N) to 100 mL of sludge samples having different solid concentrations as indicated for alkaline pre-treatment. After 24 hours acid reaction at ambient temperature, pH was adjusted to 7.0 with variable amounts of NaOH (2N) ranging between 0.5 and 8.5% of the total volume. The samples were autoclaved as indicated above.

### **2.4. Rhizobial strain and inoculum preparation**

The fast-growing *Sinorhizobium meliloti* strain A<sub>2</sub> (Agriculture and Agri-food Canada, Sainte-Foy, Que., Canada) was used throughout this study. Cultures were maintained at 4°C on yeast mannitol agar (YMA) slants (Vincent 1970). The inocula for growth experiments were prepared by growing strain in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 25 ml of YMB (yeast mannitol broth). The flasks were incubated at 30°C for 48 hours on a rotary shaker at 200 rpm. The YM medium contained the following constituents (in grams per liter): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.2; NaCl, 0.1; yeast extract, 1; and mannitol, 10.

### **2.5. Growth experiments**

Cell growth was studied in treated and untreated sludges in 250 mL Erlenmyer flasks each containing 50 mL of the sterile medium (treated and untreated sludges). Each flask was inoculated with 3% (vol/vol) inoculum containing 1×10<sup>9</sup> cfu/mL. Growth conditions were the same as those used to prepare the inoculum. The samples were drawn at regular intervals. The cell count was performed on agar plates using YMA with Congo red (0.25%) after appropriate serial dilutions of samples with salt buffer (NaCl 0.85%). The maximum cell count was determined and the mean generation time was calculated during exponential growth phase. Experiments were conducted in

duplicate. Statistical analysis was performed for each TSS concentration and means were compared by using LSD test. At the end of the experiments, samples were stored at -20°C until their use for the nodulation test.

## 2.6. Evaluation of the nodulation

The nodulation potential of rhizobia produced in sludge was evaluated on alfalfa plants grown in seed growth pouches (Mega International, Minneapolis) and fed with nutrient N-free solution (Vincent 1970). Two mL of each culture was used to inoculate five plant seedlings per growth pouch. Cells grown in YMB were used as a control. After 28 days growth, roots were observed for nodulation. The nodulation index was evaluated according to the nodule size, colour and number as indicated in Table 1.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Characterisation of waste water sludge

Table 2 describes the characteristics of the original sludges generated from municipal wastewater treatment. The pH of both primary and secondary sludges were similar (6.40 and 6.75 respectively). N-NH<sub>4</sub> concentration differed considerably and represented only 22 and 17% of the TKN for primary and secondary sludges respectively. However, SCOD value was 42.6% of TOC for secondary sludge and only 2.2% for primary sludge. The concentration of soluble phosphorus (PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) was only 5 and 20% of the total phosphorus respectively for primary and secondary sludges.

In general, the concentration of Ca and Mg and the ratio Ca/Mg has an impact on growth of rhizobia. *S. meliloti* seems to grow better with lower Ca/Mg ratio (Vincent 1962; Steinborn and Roughley 1975). The ratio of Ca/Mg in the primary and the secondary sludge used in these experiments was about 1.16 and 1.06 respectively (Table 2). In primary sludge, the metals Zn and Fe, which are necessary for rhizobial growth (Wilson and Reisenauer 1970b; Quispel 1974) had a concentration of 10.4 and 461 mg/L, respectively. However, these metals were much lower in secondary sludge (1.0 and 22 mg/L respectively for Zn and Fe). Other studies reported a toxic effect of Ni and Cu on rhizobia (Wilson and Reisenauer 1970a; Lowe and Evans 1962) at

concentrations of about 2.7 and 36 mg/L, respectively. The form of metals and mineral salts are not known in the sludge and they can be complexed with organic matter. It was reported that metals are generally less toxic when complexed with organic compounds than in the free ionic form (Babich and Stotzky 1980). Therefore, pre-treatment can affect the form of these elements and consequently the growth of *S. meliloti*.

### **3.2. Effect of total suspended soild concentration and acid hydrolysis on *S. meliloti* growth**

**Primary sludge:** Table 3 summarises growth characteristics of *S. meliloti* grown in primary sludge with different TSS concentrations under acid hydrolysis. In general, no adaptation period was detected during the growth or the lag phase finished before the first sampling. With the original sludge (TSS 3.2%), the stationary growth phase was attained within 55 hours. However, for other TSS concentrations and hydrolysis at different pH, the exponential phase did not exceed 48 hours (results not shown).

Results with untreated samples indicate that TSS concentration affects the growth of *S. meliloti*. In comparison to the original sludge (TSS 3.2%), the cell count increased in all diluted samples (1.3% to 0.325% TSS). The highest cell count ( $11.10 \times 10^9$  cfu/mL) was obtained with 1.3% TSS. Also, the generation time decreased significantly with the reduction of sludge TSS content (9.61 h for 3.2% TSS and 4.15 h for 0.365 % TSS). The dilution of the original sludge may be responsible for the growth improvement. For instance, a dilution by 40% gave a concentration of 1.3% TSS. Consequently, the reduction of soluble nutriments such as SCOD (103.2 mg/L), N-NH<sub>4</sub> (62 mg/L) and PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (8 mg/L) may be optimal for the growth of rhizobium. The reduction of the generation time and the increase of the cell concentration may be also attributed to the following effects of dilutions: 1- A decrease in the concentration of heavy metals which are considered inhibitory to rhizobium growth (Wilson and Reisenauer 1970a; Lowe and Evans 1962); 2- Lower Ca and Mg concentrations which can affect rhizobial growth (Vincent 1962; Steinborn and Roughley 1975). 3- A low TSS concentration which may allow a good oxygen transfer for cell growth. On the other hand, the cell counts of untreated sludges decreased by about 50% for the lowest TSS concentrations (0.65 and 0.325%) compared to the highest count obtained at 1.3 % TSS (Table 3). This could be the

result of the sludge over dilution which involves a reduction of nutrient concentrations that reduce rhizobial growth. For example, the 0.325% TSS sample represented 10% of the composition of the original sludge and contained only 25.8, 15.5 and 2 mg/L respectively for SCOD, N-NH<sub>4</sub> and PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

Generally, acid pre-treatment improved conditions for bacterial growth. For 3.2% TSS, the acid treatment at pH 2.0 did not increase cell count significantly, but reduced the generation time from 9.61 (without treatment) to 7.11 hours (after pH 2.0 treatment). With sludges of 2.6% and 1.3% TSS, no significant improvement was observed after acid pre-treatment, neither for the maximum cell count nor for the generation time. However, for both sludges of 0.65 and 0.325% TSS, a treatment at pH 2.0 doubled the cell concentration but did not change the generation time. Hence, the maximum cell number increased from  $4.00 \times 10^9$  (without treatment) to  $9.00 \times 10^9$  cfu/ml (after pH 2.0 treatment) for 0.65% TSS, and from  $6.75 \times 10^9$  (without treatment) to  $13.00 \times 10^9$  cfu/mL (after pH 2.0 treatment) for 0.325% TSS.

According to these results, the acid hydrolysis level affects the biodegradability of primary sludge and enhances the growth of *S. meliloti* and this effect is controlled by the TSS concentration. The significant improvement was obtained with TSS of 0.65 and 0.325 % under pH 2.0 treatment. It seems that low TSS concentration was suitable for pH 2.0 treatment.

**Secondary sludge :** Contrary to primary sludge, secondary sludge contains a higher percentage of soluble nutrients. Hence, the different TSS concentrations obtained by centrifugation of the original sludge were lower than those obtained with primary sludge. In growth experiments, all samples reached the stationary phase within 40 hours and no lag period was detected except for untreated 0.4% TSS samples which had a lag period of 8 hours (results not shown). The maximum cell count was lowest in the sludge without acid treatment, and the cell count tended to decrease with the increase of TSS concentration (Table 4). However, the generation time was similar for the three TSS concentrations. Low cell counts at higher solid concentrations may be due to the increased concentration of inhibitors such as heavy metals. Also, the Ca and Mg concentrations doubled in TSS 0.4% compared to 0.2% TSS and this increasing may be not optimal for the growth of rhizobia.

Acid hydrolysis at pH 2.0 increased the maximum cell number and decreased the generation time for all TSS concentrations. For TSS of 0.3 and 0.4%, the pH 2.0 treatment increased the maximum cell number by approximately 10 times, and the greatest cell count was obtained with TSS 0.4% ( $0.66 \times 10^9$  without treatment and  $9.80 \times 10^9$  cfu/mL at pH 2.0). However, the mean generation time for TSS 0.4% was not significantly changed with acid treatments. For TSS 0.2%, cell number with pH 2.0 was enhanced by only 2 times, but the generation time was approximately half of that without treatment.

These results indicate that an increase in TSS brings more organic matter susceptible to be hydrolysed by acid treatment. In TSS 0.4% samples, the organic matter is about 2 times higher than in original sludge (TSS 0.2%) and this factor may be beneficial for the efficiency of the pH treatment. However, high TSS% may also increase inhibitors concentration as indicated above for untreated sludges, which can explain the almost constant value of generation time for all pH treatments.

### 3.3. Effect of total suspended solid and alkaline dose on *S. meliloti* growth

**Primary sludge:** Alkaline treatment could increase the growth of *S. meliloti* in primary sludge (Table 5). As observed in acid hydrolysis experiments, the concentration of sludge solids also influenced the final cell counts. For all TSS concentrations, alkaline treatment with 50 or 100 meq/L NaOH significantly increased the final cell count and decreased the generation time. For example, with 3.2% TSS, the maximum cell count was only  $0.96 \times 10^9$  (without treatment) and increased to  $13.40 \times 10^9$  cfu/mL after pre-treatment with 100 meq/L NaOH, while for 1.3% TSS the cell count of untreated sample was  $11.10 \times 10^9$  and increased to  $18.80 \times 10^9$  cfu/mL. Although the cell counts of the untreated sludges at 0.65% and 0.325% TSS were low, the alkali treatments increased cell counts to the same level than those obtained with higher TSS concentrations. In all treatments (except 100 and 150 meq/L NaOH at TSS 0.325%), the generation time was shortened, and 100 meq/L NaOH gave the lowest value (2.16 to 3.60 hours in comparison to 4.15 to 9.61 hours for untreated sludge).

Alkaline treatment using 150 and 200 meq/L NaOH did not improve the process performances in terms of cell count. For a sludge at 3.2% TSS, the maximum cell count of *S. meliloti* decreased from  $13.40 \times 10^9$  to  $1.84 \times 10^9$  cfu/mL when NaOH dose

increased from 100 to 150 meq/L. A similar decline in cell count was observed for all others TSS concentrations and for NaOH treatment of 200 meq/L. This decrease can be due to the over dose of NaOH that probably caused chemical deterioration of biodegradable organic matter. Moreover, the dilution effect due to volume of acid (about 10%) needed to adjust the pH to 7.0 may have reduced the concentration of nutrients for rhizobial growth.

The level of hydrolysis expressed in mg NaOH /g TSS varied to a large extent for the same dose of NaOH (meq/L) with different TSS concentrations and gave different results of cell count. For instance, the 616 mg NaOH /g TSS corresponded to 200 meq NaOH /L at TSS 1.3% and gave a cell count of  $7.30 \times 10^9$  cfu/mL, while at TSS 0.65% and 0.325%, it corresponded to 100 and 50 meq NaOH /L and gave  $21.00 \times 10^9$  and  $16.50 \times 10^9$  cfu/mL, respectively. The same tendency was observed for the 308 mg NaOH/g TSS treatment level (Table 5). These results reflect the complexity of the composition of sludge and the multiple interactions which can affect the behaviour of rhizobial growth.

On the basis of the above results, the optimal conditions to get the maximal increase in cell concentration of *S. meliloti* in primary sludge are 0.65% TSS and hydrolysis with 100 meq NaOH/L (616 mg/g TSS). This treatment resulted in a cell count of  $21.00 \times 10^9$  cfu/mL with a very short generation time of 2.92 hours.

**Secondary sludge:** In general, the alkaline treatments of secondary sludge increased significantly the cell count of *S. meliloti* (Table 6), but at a level much lower than that found with primary sludge. The highest cell count of  $2.52 \times 10^9$  cfu/mL was obtained with NaOH dose of 50 meq/L and 0.2% TSS, while a maximum cell count of  $21.00 \times 10^9$  cfu/mL was observed in primary sludge (0.65%TSS, 100 meq NaOH/L). The mean values of generation time in secondary sludge were also reduced by alkaline treatment, but remained longer (4.18 to 5.88 hours) than those found in primary sludge (2.16 to 4.64 hours). For all TSS %, the increase of NaOH dose did not improve the enhancement of cell count. For example with 0.3% TSS, the cell count increased from  $0.61 \times 10^9$  cfu/mL without treatment to almost similar cell counts of  $2.22 \times 10^9$ ,  $1.87 \times 10^9$ ,  $2.30 \times 10^9$  and  $2.00 \times 10^9$  cfu/mL for 50, 100, 150 and 200 meq NaOH/L treatments, respectively. Thus, these results indicate that a NaOH dosage

higher than 50 meq/L does not improve the cell count of *S. meliloti*. Similarly to the explanations given for the acid treatment of secondary sludge, this may be due to: 1- the doses of NaOH superior to 50 meq/L are not suitable for TSS concentrations tested; 2- the concentration of sludge by centrifugation tends to increase the concentration of toxic elements.

### 3.4. Evaluation of the nodulation potential

The nodulation potential with alfalfa of *S. meliloti* grown in treated sludges did not significantly differ from that obtained in untreated sludges. For primary sludge, nodulation indexes ranged from 5.6 to 11.2 for acid and from 6.4 to 12.0 for alkali treatments in comparison to 8.8 to 11.2 for untreated samples. Similarly, the values observed for secondary sludge varied from 8.4 to 11.2 for acid and from 8.8 to 11.2 for alkali treatments. These values were similar to the nodulation index of *S. meliloti* grown in standard YMB media (11.0). In a previous study using the same rhizobial strain *S. meliloti* A<sub>2</sub> (Ben Rebah et al. 2000), the nodulation index slightly varied with the origin of sludges and, in most cases, was close to that obtained for rhizobium grown in standard YMB media.

According to the results of our experiment, it can be concluded that alkali and acid treatments of sludges do not affect the nodulation capacity of *S. meliloti*. Moreover, there is no correlation between the cell concentration (about  $1 \times 10^9$  to  $10 \times 10^9$  cells/mL) and the nodulation index. This may be explained by the fact that the number of cells applied per seed ( $2.5$  to  $25 \times 10^8$  cells) was in excess for the infection process for nodulation. These numbers were much higher than the number required to meet the standard ( $10^3$  cells/seed) of the Canadian legume inoculant and pre-inoculated program (CFIA 1997). However, correlation between nodulation and rhizobial cell number has been reported for values within  $10^3$  to  $10^6$  cells/seed (Hume and Blair 1992). Because the nodulation index is a qualitative value, more investigations are required to study the effect of using sludge as a media on the nodulation process and plant yields.

## 4. CONCLUSIONS

The use of treated and untreated sludges as a culture media does not affect the nodulation capacity of rhizobia. In general, both acid and alkaline treatments

improved the rhizobial cell count and reduced the mean generation time in primary and secondary sludges, but the efficiency of the treatments was also dependant on solid concentrations (TSS). Also, a diminution in TSS concentrations increased the number of cells in primary sludge while no change was obtained by the augmentation of TSS in secondary sludge. It is also important to mention that there are factors others than TSS and type of sludge that may influence the efficiency of pre-treatment to enhance the biodegradability of sludge. Among them are fibre or cellulose, organic component, various forms of nitrogen and particle size (Karr and Keinath, 1978).

From all treatments, the highest cell count ( $21.00 \times 10^9$  cfu/mL) was obtained with primary sludge at 0.65% TSS under alkaline treatment (100 meq NaOH/L). For secondary sludge, a high cell count of  $9.80 \times 10^9$  cfu/mL was reached under acid hydrolysis (pH 2.0) with 0.4% TSS. These cell counts are slightly higher than the value of  $5 \times 10^9$  cfu/mL obtained with rhizobia grown in other wastes such as malt-sprouts (Bioardi et al. 1985) and cheese whey (Bissonnette et al. 1986). It is also interesting to note that the mean generation time was considerably reduced by both pretreatments, with the best values (2-4 hours) obtained for alkaline treatment in primary sludge.

According to our results, the dilution of primary sludge for decreasing TSS enhanced the efficiency of acid and alkaline treatments for improving growth of rhizobia, which is probably due to the improved solubilization of organic matter. However, the process of concentration of secondary sludge for increasing TSS was less efficient. This can be explained by the fact that primary sludge contains more organic matter while the reverse is observed in secondary sludge. Although the treatments of secondary sludge can increase 10 times the maximum cell count, this value remains in general lower than that observed with primary sludge. However, as stated above, a higher yield is obtained with primary sludge and alkaline treatment.

**Acknowledgement.** The authors sincerely thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant A4984) for providing financial assistance to conduct the research work.

## REFERENCES

APHA American Public Health Association. 1992. Standard methods for examination

of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Alleman, J.E., Kim, B.J., Quivey, D.M., and Wquihua, L.O. 1994. Alkaline hydrolysis of munitions-grade nito-cellulose. *Wat. Sci. Tech.*, **30**: 63-72.

Babich, H., Stotzky, G., 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to micro-organisms. CRC Critical Reviews in Microbiology. **8**: 99-145.

Ben Rebah, F., Tyagi, R.D., and Prévost, D. 2000. Wastewater sludge as a new medium for the growth of rhizobia. Submitted for *Wat. Environ. Res.* Submitted for publication.

Bissonnette, N., Lalande, R., and Bordeleau, L.M. 1986. Large-scale production of *Rhizobium meliloti* on whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 838-841.

Boardi, J.L., and Ertola, R.J. 1985. Rhizobium biomass production in batch and continous culture with a malt-sprouts medium. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 163-172

Bradley, J.W., Kyosai, S., Matthews, P., Sato, K., and Webber, M. 1992. Worldwide sludgemanagement practices. In: Municipal sewage sludge management: processing, utilization and disposal. C.LueHing, D.I.L Zejiz and T. Kuchenrither (eds), Water Quality Management Libraiy, Vol.4, Technomic Publishing Co., Inc.; Lancaster, Pennsylvanie, U.S.A., Chap. 13, pp. 537-657.

Campbell, H.W., and Martinoli, D. A. 1991. Canada's oil-from-sludge technology. *Wat. Environ. Technol.* **3**: 64-67.

Canadian Food Inspection Agency (CFIA). 1997. Canadian legume inoculant and pre-inoculated seed product testing report. Nepean, Ont.

Chiu, Y.C., Chang, C.N., Lin, J.G., and Huang, S.J. 1997. Alkaline and ultrasonic pretreatment of sludge before anaerobic digestion. *Wat. Sci. Technol.* **36** : 155.

Environmental Protection Agency (E.P.A). 1993. Standards for the use and disposal of sewage sludge, 40 CFR Parts 257, 403 and 503, Final Rule. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A.

Golueke, C.G. 1992. Bacteriology of composting. Biocycle. **33**: 55-57.

Gross, T.S.C. 1993. Thermal drying of sewage sludge. J. Institution of water and Environment management . **7**: 255-261.

Haug, R.T., Stucky, D.C., Gossett, J.M., and McCarty, P.L. 1978. Effect of thermal pretreatment on digestibility and dewaterability of organic sludges. J. Water Pollu. Control. Fed. **50**: 73-85.

Hume, D.J., and Blair, D.H. 1992. Effect of number of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean seed yield in Ontario. Can. J. Microbiol. **38**: 337-346.

Karr, P.R., and Keinath, T.M. 1978. Influence of particle size on sludge dewaterability. J. Water Pollut. Control. Fed. **50**: 1911-1930.

Lowe, R.H., and Evans, H.J. 1962. Cobalt requirement for the growth of Rhizobia. J. Bact. **83**: 210-211.

Pagliari, M., Guidi G., La Marca, M., Giachetti, M., and Lucameute, G. 1981. Effects of sewage sludges and composts on soil porosity and aggregation. J. Environ. Quality **10**: 556-561.

Quispel, A. 1974. The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. Oxford Am. Elsevier Publ. Corp., Inc. N.Y.

Rajan, R.V., Lin, J.G., and Ray, B. T. 1989. Lower-level chemical pretreatment for enhance sludge solubilisation. J. Water Pollut. Control. Fed. **29**: 31-40.

Sachdeva, V., Tyagi, R.D., and Valero, J. R. 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilisation/disposal. Water Sci Technol. **42**: 211-216

- Steinborn, J., and Roughley, R. J. 1975. Toxicity of sodium and chloride ions to *Rhizobium spp.* in broth and peat culture. *J. Appl. Bact.* **39**: 133-138.
- Tay, J.H., and Show, K.Y. 1992. Reuse of wastewater sludge in manufacturing non-conventional construction materials - an innovative approach to ultimate sludge disposal. *Wat. Sci. Technol.* **26**: 1165-1174.
- Vesilind, P.A. 1974. Treatment and Disposal of Wastewater Sludges. Ann Arbor Sci. Publishers, Ann Arbor, Mich
- Vincent, J.M. 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of rhizobium. *J. Gen. Microbiol.*, **28**: 653.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme handbook no. 15. Blackwell Scientific Publication, Ltd., Oxford
- Wilson, D.O., and Reisenauer, H.M. 1970a. Effects of some heavy metals on the cobalt nutrition of *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil*. **32**: 81-89.
- Wilson, D.O., and Reisenauer, H.M. 1970b. Effects of manganese and zinc ions on the growth of Rhizobium. *J. Bact.* **102**: 729-732.
- Wei, Q.F., Lowery B., and Peterson, A. 1985. Effect of sludge application on physical properties of silty clay loam soil. *J. Environ. Quality* **14**: 178-180.
- Woodard , S.E., and Wukash, R.F. 1994. A hydrolysis/thickening/filtration process for the treatment of wastewater treatment of waste activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* **30**: 29-38.
- Webber, M.D., 1988. Contrôle de la concentration de métaux lourds dans les sols après épandage de boues d'égout municipales: l'approche canadienne. *Sc. Tech. Eau*. **21**: 45-51

**Table 1.** Determination of the nodulation index.

| Nodule size   | Value (A) |
|---------------|-----------|
| Large         | 3         |
| Medium        | 2         |
| Small         | 1         |
| Nodule Colour | Value (B) |
| Pink          | 2         |
| White         | 1         |
| Nodule number | Value (C) |
| Many          | 3         |
| Few           | 2         |
| No nodules    | 0         |

Nodulation index = A×B×C ≤ 18

**Table 2.** The characteristics of the original sludges.

| Item                                 | Primary sludge | Secondary sludge |
|--------------------------------------|----------------|------------------|
| pH                                   | 6.40           | 6.75             |
| TSS (mg/L)                           | 31 750         | 2000             |
| DOC (mg/L)                           | 4620           | 1340             |
| TOC (mg/L)                           | 11 540         | 775              |
| SCOD (mg/L)                          | 258            | 330              |
| N-NH <sub>4</sub> (mg/L)             | 155            | 14               |
| NTK (mg/L)                           | 711            | 82               |
| P <sub>t</sub> (mg/L)                | 397            | 25               |
| PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L) | 20             | 5                |
| Ca (mg/L)                            | 357            | 50               |
| Mg (mg/L)                            | 306            | 47               |
| Na (mg/L)                            | 251            | 117              |
| Al (mg/L)                            | 542            | 72               |
| Cd (mg/L)                            | 0.5            | N                |
| Cr (mg/L)                            | 2.5            | 0.3              |
| Cu (mg/L)                            | 36             | 2                |
| Fe (mg/L)                            | 461            | 22               |
| Mn (mg/L)                            | 7.0            | 0.8              |
| Ni (mg/L)                            | 2.7            | 0.3              |
| Pb (mg/L)                            | 2.5            | 0.3              |
| Zn (mg/L)                            | 10.4           | 1.0              |

N : not detected.

**Table 3.** Effect of TSS concentration and acid hydrolysis on *S. meliloti* grown in primary sludge.

| Treatments          | $10^9 \times X_{\text{max}}$ (cfu/mL)* | Tg (h)* |
|---------------------|--|---------|
| <b>TSS 3.2%</b>     |  |         |
| No treatment        | 0.96a                                  | 9.61a   |
| pH 6.0              | 0.98a                                  | 8.46a   |
| pH 4.0              | 1.00a                                  | 7.75b   |
| pH 2.0              | 1.11a                                  | 7.11b   |
| <b>TSS 2.6%</b>     |  |         |
| No treatment        | 9.25a                                  | 6.26a   |
| pH 6.0              | 9.40a                                  | 6.03a   |
| pH 4.0              | 9.50a                                  | 6.18a   |
| pH 2.0              | 9.90a                                  | 5.98a   |
| <b>TSS 1.3%</b>     |  |         |
| <b>No treatment</b> | 11.10ab                                | 5.34a   |
| pH 6.0              | 8.90a                                  | 5.41a   |
| pH 4.0              | 9.00a                                  | 4.78a   |
| pH 2.0              | 12.00b                                 | 4.64a   |
| <b>TSS 0.65%</b>    |  |         |
| <b>No treatment</b> | 4.00a                                  | 4.33a   |
| pH 6.0              | 4.60a                                  | 4.95a   |
| pH 4.0              | 5.60a                                  | 4.86a   |
| pH 2.0              | 9.00b                                  | 4.51a   |
| <b>TSS 0.325%</b>   |  |         |
| <b>No treatment</b> | 6.75a                                  | 4.15a   |
| pH 6.0              | 7.20a                                  | 3.98a   |
| pH 4.0              | 8.80a                                  | 4.05a   |
| pH 2.0              | 13.00b                                 | 5.86a   |

Xmax : maximum cell count (cfu/mL); tg : generation time (h)

\* means of two replicates; values in the same column (for the same TSS %) flanked by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$ .

**Table 4.** Effect of TSS and acid hydrolysis treatment on *S. meliloti* grown in secondary sludge.

| Treatments          | $10^9 \times X_{\text{max}}$ (cfu/mL)* | tg (h)* |
|---------------------|--|---------|
| <b>TSS 0.2%</b>     |  |         |
| No treatment        | 0.99a                                  | 7.34a   |
| pH 6.0              | 0.96a                                  | 7.00a   |
| pH 4.0              | 1.14a                                  | 5.17b   |
| pH 2.0              | 2.23b                                  | 4.24c   |
| <b>TSS 0.3%</b>     |  |         |
| No treatment        | 0.61a                                  | 7.03ac  |
| pH 6.0              | 0.90c                                  | 7.50a   |
| pH 4.0              | 8.20b                                  | 6.27bc  |
| pH 2.0              | 8.40b                                  | 5.47b   |
| <b>TSS 0.4%</b>     |  |         |
| <b>No treatment</b> | 0.66a                                  | 6.90a   |
| pH 6.0              | 0.73a                                  | 6.90a   |
| pH 4.0              | 0.70a                                  | 6.10a   |
| pH 2.0              | 9.80b                                  | 6.10a   |

Xmax : maximum cell count (cfu/mL); tg : generation time (h)

\* means of two replicates; values in the same column (for the same TSS %) flanked by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$ .

**Table 5.** Effect of TSS and alkaline dose on *S. meliloti* grown in primary sludge

| Treatments        |               | $10^9 \times X_{\text{max}}$<br>(cfu/mL)* | tg (h)* |
|-------------------|---------------|---|---------|
| NaOH(meq/L)       | NaOH(mg/gTSS) |   |         |
| <b>TSS 3.2%</b>   |               |   |         |
| 0                 | 0             | 0.96a                                     | 9.61c   |
| 50                | 62            | 11.00b                                    | 4.00a   |
| 100               | 125           | 13.40b                                    | 3.60a   |
| 150               | 187           | 1.84a                                     | 4.03ab  |
| 200               | 250           | 2.02a                                     | 4.64b   |
| <b>TSS 2.6%</b>   |               |   |         |
| 0                 | 0             | 9.25a                                     | 6.26c   |
| 50                | 77            | 14.00a                                    | 3.75a   |
| 100               | 154           | 19.30c                                    | 2.16d   |
| 150               | 231           | 2.50b                                     | 3.88ab  |
| 200               | 308           | 2.47b                                     | 4.59b   |
| <b>TSS 1.3%</b>   |               |   |         |
| 0                 | 0             | 11.10ac                                   | 5.34c   |
| 50                | 154           | 14.00ab                                   | 3.56a   |
| 100               | 308           | 18.80b                                    | 2.80b   |
| 150               | 462           | 13.10ab                                   | 3.31ab  |
| 200               | 616           | 7.30c                                     | 3.30ab  |
| <b>TSS 0.65</b>   |               |   |         |
| 0                 | 0             | 4.00a                                     | 4.33c   |
| 50                | 308           | 15.60b                                    | 3.21ab  |
| 100               | 616           | 21.00c                                    | 2.92a   |
| 150               | 924           | 6.25a                                     | 3.51ab  |
| 200               | 1232          | 5.69a                                     | 3.88b   |
| <b>TSS 0.325%</b> |               |   |         |
| 0                 | 0             | 6.75ab                                    | 4.15a   |
| 50                | 616           | 10.50a                                    | 3.60b   |
| 100               | 1232          | 16.50c                                    | 3.60b   |
| 150               | 1848          | 2.83b                                     | 4.39a   |
| 200               | 2464          | 2.61b                                     | 4.56a   |

Xmax : maximum cell count (cfu/mL); tg : generation time (h)

\* means of two replicates; values in the same column (for the same TSS %) flanked by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$ .

**Table 6.** Effect of TSS and alkaline dose on *S. meliloti* grown in secondary sludge.

|                 | Treatments  |                | $10^9 \times X_{\text{max}}$<br>(cfu/mL)* | tg (h)* |
|-----------------|-------------|----------------|---|---------|
|                 | NaOH(meq/L) | NaOH (mg/gTSS) |   |         |
| <b>TSS 0.2%</b> |             |                |   |         |
| 0               | 0           | 0              | 0.99a                                     | 7.34c   |
| 50              | 1000        | 2000           | 2.52b                                     | 4.18a   |
| 100             | 2000        | 4000           | 2.39b                                     | 4.54ab  |
| 150             | 3000        | 6000           | 1.91bc                                    | 4.64ab  |
| 200             | 4000        | 8000           | 1.66ac                                    | 4.99b   |
| <b>TSS 0.3%</b> |             |                |   |         |
| 0               | 0           | 0              | 0.61b                                     | 7.03c   |
| 50              | 667         | 1334           | 2.22a                                     | 5.88a   |
| 100             | 1334        | 2668           | 1.87a                                     | 5.12b   |
| 150             | 2001        | 4002           | 2.30a                                     | 5.85a   |
| 200             | 2668        | 5336           | 2.00a                                     | 5.01b   |
| <b>TSS 0.4%</b> |             |                |   |         |
| 0               | 0           | 0              | 0.60b                                     | 6.90b   |
| 50              | 500         | 1000           | 1.82a                                     | 5.16c   |
| 100             | 1000        | 2000           | 1.81a                                     | 5.76d   |
| 150             | 1500        | 3000           | 2.40a                                     | 4.62a   |
| 200             | 2000        | 4000           | 2.40a                                     | 4.67a   |

Xmax : maximum cell count (cfu/mL); tg : generation time (h)

\* means of two replicates; values in the same column (for the same TSS %) flanked by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$ .

## **Chapitre 4**

### **PRODUCTION OF *S. MELILOTI* USING WASTEWATER SLUDGE AS A RAW MATERIAL: EFFECT OF NUTRIENT ADDITION AND pH CONTROL**

Submitted to:  
Environmental Technology  
(Accepted)

Ben Rebah F., Tyagi, R. D. and Prévost D.

INRS-Eau, Université de Québec  
C.P. 7500, Sainte-Foy  
Québec, Canada G1V 4C7

## ÉSUMÉ

L'utilisation des boues d'épuration des eaux usées comme matière primaire pour la production des inoculants pour les légumineuses est considérée comme une nouvelle alternative de recyclage. L'effet de l'addition de sources de nutriments (extrait de levure et glycérol) et du contrôle du pH sur la croissance de *S. meliloti* a été étudié en Erlenmeyer et en fermenteur de 15 litres équipé d'un contrôleur de pH. Différentes concentrations d'extrait de levure (0.5, 1, 2 et 4 g/l) et de glycérol (2.5, 5, 7.5 et 10 g/l) ont été additionnées à une boue secondaire. Le nombre de cellules ainsi que le temps de génération ont été affectés par l'addition de ces sources de nutriments. Le nombre maximal de cellules de  $8.85 \times 10^9$  ufc/ml a été observé après 32 heures d'incubation dans une boue enrichie de 4 g/l d'extrait de levure. Ce compte de cellules est 3.2 fois élevé comparativement à la boue sans ajout. En plus, à cette concentration d'extrait de levure, le nombre de cellules de la phase stationnaire n'a pas chuté. L'addition du glycérol aux échantillons de boue contenant 4 g/l d'extrait de levure a amélioré encore la croissance rhizobiale. La valeur la plus élevée de  $16.5 \times 10^9$  ufc/ml a été obtenue avec 7.5 g/l de glycérol et 4 g/l d'extrait de levure. Dans les expériences en fermenteur, il a été observé que le pH n'était pas un facteur limitant et l'augmentation du pH à 8.85 dans le fermenteur non contrôlé semble n'avoir aucun effet sur le temps de génération et le compte cellulaire.

**Mots clés :** boues d'épuration, rhizobium, inoculant, biofertilisant, fermentation, recyclage des boues, disposition des boues.

## ABSTRACT

The utilization of wastewater sludge as a raw material for the production of legume inoculant is considered as a new viable alternative for recycling. The effect of addition of nutrient sources (yeast extract and glycerol) and the pH control on the growth of *S. meliloti* was investigated in Erlenmeyer flask and at controlled pH in 15L fermentor. Different concentrations of yeast extract (0.5, 1, 2 and 4 g/l) and glycerol (2.5, 5, 7.5 and 10 g/l) were added to the secondary sludge. The cell counts as well as the generation time were affected by the addition of these nutrient sources. The maximum cell count of  $8.85 \times 10^9$  cfu/ml was obtained after 32 hours of incubation in the presence 4g/l of yeast extract was observed. This value of cell count was 3.2 times higher than the non-supplemented sludge. Moreover, at this yeast extract concentration, the cell number in stationary phase did not decrease. The addition of glycerol to sludge samples containing 4 g/l of yeast extract further improved the rhizobial growth, but not significantly, compared to the control. The highest value cell count of  $16.5 \times 10^9$  cfu/ml was obtained with 7.5 g/l of glycerol and 4 g/l of yeast extract. In fermentor experiments, it was observed that pH was not a limiting factor and the increase of pH from 7.0 to 8.85 in uncontrolled fermentor seems to have no effect on rhizobial growth and cell count.

**Key Words:** Wastewater sludge, rhizobium, inoculant, biofertiliser, fermentation, sludge recycling, sludge disposal.

## 1. INTRODUCTION

Sludge produced at wastewater treatment plant poses serious disposal problems. The current sludge disposal methods include, land filling (Bradley et al., 1992; E.P.A., 1993), ocean discharge (Gross, 1993), land application (Golueke, 1992) and the conversion of sludge into building materials (Tay and Show, 1992) as well as oils (Campbell and Martinoli, 1991). Recently, emphasis has been laid on the utilisation of sludge as a raw material for the production of value added products such as biopesticides, enzyme, biofertilizers, etc...

The production of legume inoculants (biofertilizers) is largely controlled by the cost related to the growth media. The standard medium (Yeast Mannitol Broth) has been used for laboratory scale production and its industrial use is limited due to high cost. Therefore, different industrial wastes, such as corn-steep liquor (Burton, 1979), proteolyzed pea husks (Gulati, 1979), malt sprouts (Bioardi and Ertola., 1985), industrial-grade yeast extract (Meade et al., 1985) and whey (Bissonnette et al., 1986) have been used as industrial rhizobial production media. The majority of these material needs a pre-treatment and also the standard medium could not be completely replaced with the by-products (Bioardi and Ertola., 1985). Wastewater sludge which contain nitrogen, phosphorus, biodegradable carbon and many other nutrients has been exploited for rhizobial growth (Ben Rebah et al., 2000, 2001, 2001a). The cell yield and nodulation index obtained on various crops was comparable with the rhizobium produced on standard medium.

In the production of rhizobium, a large cell count at the end of fermentation is necessary to achieve efficient nodulation and nitrogen fixation during leguminous plant growth. Therefore, in search of a high rhizobial count, the effect of addition of nutrient sources and the control of pH on *S. meliloti* grown in secondary sludge was investigated.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Rhizobial strain

The fast-growing *Sinorhizobium meliloti* strain A<sub>2</sub> (Agriculture and Agri-food Canada, Sainte-Foy, Que., Canada) was used throughout this study. The culture was

maintained on yeast mannitol agar (YMA) slants (Vincent 1970) at 4°C.

## 2.2. Sludge samples

Secondary sludge from Quebec wastewater treatment plant was sampled. The sludge samples were sterilised at 121°C for 20 minutes. The sterile sludge samples were stored at 4°C until their use. The composition of sludge (Table 1) used in the experiments was determined according to the Standard Methods (APHA et al., 1992).

## 2.3. Shake flask experiments

Inoculum preparation: The inocula for growth experiments were prepared by growing strain in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 25 ml of YMB (yeast mannitol broth). The flasks were incubated at 30°C for 48 hours on a rotary shaker at 200 rpm. The YMB medium contained the following constituents (in grams per liter): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.2; NaCl, 0.1; yeast extract, 1; and mannitol, 10.

Effect of addition of nutrient sources : The rhizobium production was investigated using sludge supplemented with different concentration of yeast extract and glycerol. Two different groups of sludge samples were prepared. The first group of samples was prepared using 50 ml of raw sludge in each 250 mL Erlenmeyer flasks (four flasks) supplemented with 0.5, 1, 2 and 4 g/l of yeast extract. The other group of sludge samples was supplemented with 4 g/l of yeast extract and different concentrations of glycerol (2.5, 5, 7.5 and 10 g/l). All samples were adjusted to pH 7.0 using NaOH (2N) and autoclaved at 121°C for 20 min. Flasks were inoculated with 3% (v/v) inoculum. The conditions used in the experiments were the same as those used to prepare the corresponding inoculum. The samples were drawn at regular intervals. The cell count was performed on agar plates using YMA (Yeast Mannitol Agar) supplemented with Congo red (0.25%) after appropriate serial dilution of samples with salt buffer (NaCl 0.85%). Experiments were conducted in duplicate.

## 2.4. Fermentor experiments

The experiments were conducted in two 15-liter fermentors, fitted with temperature and pH probes and containing 8 litre of secondary sludge. The sludge was sterilised in situ at 121°C for 30 min. The temperature was controlled at 30 ± 1°C. The agitation

was set at 400 rpm, and the aeration rate was set at 2 liters/min. In the beginning of the experiment, the pH in both the fermentors was adjusted at 7.0 (with 2N NaOH). During the experiments, in one fermentor the pH was controlled at 7.0 (with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) while in the other fermentor the pH was not controlled. Fermentors were inoculated with 3% (v/v) inoculum. Samples were drawn at regular interval for cell enumeration. At the beginning and at the end of each experiment, the soluble fraction of samples was subject to chemical analyses (Chemical oxygen demand (COD), ammonium (N-NH<sub>4</sub>) and phosphates (PO<sup>2-</sup><sub>4</sub>) according to the Standard Methods (APHA et al., 1992).

### 3. RESULTS

#### 3.1. Effect of yeast extract on rhizobial growth

The growth curves of *S. meliloti* obtained by supplementing the sludge with different concentrations of yeast extract are shown in Figure 1. For all samples, no lag period was detected, or the lag period finished before the first sampling (after four hours). In all cases, the stationary growth phase was attained within 32 to 36 hours. A summary of the cell counts and the generation time is presented in Table 2. An increase in cell count was observed even at lower yeast extract concentration (0.5 g/l). The cell concentration as well as the generation time was affected by the addition of yeast extract. The maximum cell count varied proportionally with the yeast extract added. Thus, yeast extract had generally a favourable effect on rhizobial cell yield. It tended to increase the cell number and decrease the generation time. The highest maximum cell number was obtained with 4 g/l of yeast extract. However, this value was not significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) from the value obtained by adding only 2 g/l of yeast extract. For all samples, except for 4 g/l yeast extract sample, the decline phase started within 30 to 32 hours. For the 4 g/l yeast extract, the maximum cell count reached in about 35 hrs and stayed almost constant until the end (56 hours after inoculation) of experiment (Fig.1).

#### 3.2. Effect of yeast extract and glycerol on rhizobial growth

The growth curves for *S. meliloti* on sludge supplemented with 4 g/l of yeast extract and different glycerol concentrations are shown in Figure 2. No difference in growth curves was observed between sludge samples supplemented with glycerol. Similar cell counts were obtained with samples containing 4 g/l of yeast extract (YE) or

supplemented with 4 g/l YE and 2.5 g/l of glycerol. The addition of 5, 7.5 and 10 g/l of glycerol tended to increase the number of cell. However, these cell counts were not significantly different and they were obtained within 36 to 48 hours of fermentation. The highest value of cell count was obtained with 7.5 g/l of glycerol ( $16.5 \times 10^9$  ufc/ml). The addition of 5 g/l of glycerol increased the maximum cell number by almost 1.6 time in comparison to the control. For all samples, the maximum cell counts reached during growth remain almost unchanged and only a slight decline was observed after 56 hours of fermentation. The mean generation time was not significantly changed (remained around 3 hours) for all samples (Table 3).

### 3.3. The effect of pH control on rhizobial growth

Figure 3 presents the growth curve and the pH variation in pH controlled and uncontrolled fermentor experiments. In the uncontrolled experiment, the pH started increasing after 16 hours of fermentation and reached 8.58 at the end of fermentation. The cell concentration in controlled fermentation ( $2.96 \times 10^9$  cfu/ml) was similar to the uncontrolled fermentation ( $2.8 \times 10^9$  cfu/ml). It is interesting to point out that even inspite of a large pH difference in two experiments (Fig. 3), no differences in the growth curve was observed. Hence, no lag period was detected at the beginning of growth, the maximum cell count was similar and the stationary phase reached within 32 hours. The generation time computed for pH controlled and uncontrolled fermentors was 3.75 and 3.6 h, respectively, which is not significantly different than what was observed in shake flask without amending the sludge with yeast extract or glycerol (table 2).

Figure 4 shows the soluble sludge fraction composition (COD, N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) at the beginning and at the end of the fermentation for the two experiments (pH controlled and uncontrolled). According to these data, at the end of fermentation the COD consumed in the two reactors was about 40% of the initial concentration. However, controlled and uncontrolled reactors gave slightly different consumption of N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. For controlled reactor N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> consumed represent 19.41 and 18.18%, respectively. In the uncontrolled reactor, the values of N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> consumed were respectively 34.43 and 27.93% of their initial values.

## 4. DISCUSSION

Sludge is a cheap raw material generated at the industrial and municipal wastewater treatment plants. It contains carbon, nitrogen, phosphorus and micronutrients. The use of sludge as a substrate for rhizobial growth is a new alternative of sludge recycling. Sludge composition, origin and sludge pre-treatment can affect strongly the rhizobial growth (Ben Rebah et al, 2000; 2001). The sludge contains a mixture of complex components (organic component, various forms of nitrogen fibre and cellulose), however, the addition of some growth factors and carbon source that can be easily assimilated by bacteria can influence rhizobial growth in sludge. The results indicate that using sludge as the only source of carbon, nitrogen and mineral salts induced the growth of *S. meliloti* and yielded an acceptable cell population. In previous study secondary sludges gave a population comparable to that obtained with the standard medium (Ben Rebah et al., 2001a). Sludge supplemented with different concentrations of yeast extract gave higher cell count than that obtained without supplementation. With a concentration of 4 g/l YE, the cell count increased 3.2 times compared to the control. This may be the result of the utilization of yeast extract by bacteria. Hence, it was demonstrated that yeast extract might be used as a carbon and nitrogen source by rhizobia (Meade et al., 1985). Similar effect on growth was observed while using whey supplemented with yeast extract (Bissonnette et al., 1986). Yeast extract contains, amino acids, inorganic nitrogen and growth factors (iron, calcium, magnesium, strontium, sodium, potassium, barium, manganese, copper, lead, aluminium and vanadium) at a concentration that is enough for nutritional requirement of rhizobial growth (Burton, 1979). A better growth is usually obtained when low molecular weight amino acids are added (Burton, 1979). However, the use of high concentration of yeast extract can not be suitable for large industrial production due to the economic consideration. Moreover, the use of YE concentration higher 0.35% is not beneficial for growth because it produces distorted cell and decreases the viability for some rhizobial strains (Skinner et al., 1977). In this research, increase in yeast extract concentration above 2 g/l did not significantly affect the maximum cell concentration and generation time.

The addition of glycerol tends also to increase the cell count. However, the increase was not statistically significant and the highest cell concentration ( $16.5 \times 10^9$  cfu/ml) was obtained by adding 7.5 g/l of glycerol. At this concentration the maximum cell count increased by 1.86 time compared to the control (without glycerol

supplementation). However, the mean generation time remains unchanged for all glycerol concentrations. This observation confirms the beneficial effect of using glycerol as a carbon source for some rhizobial strains. For example, the slow growing rhizobial strains have a shorter generation time while growing on glycerol than on glucose, mannitol, galactose or sucrose (Arias et al., 1976). Moreover, it was known that glycerol is an excellent and economical carbon source for commercial production of several rhizobial strains (Lopreto and al., 1972).

The value of pH in the uncontrolled fermentation increased during the fermentation to 8.58. The same observation was obtained for other strains and for other sludge types in Erlenmeyer experiments (Ben Rebah et al., 2000). The increase of pH was also mentioned for other substrates used for rhizobial growth such as whey and trial-grade yeast extract respectively for *S. meliloti* and *R. leguminosarum* (Meade et al., 1985; Bissonnette et al., 1986). In the standard medium, the fast growing rhizobia accumulates organic acids and decreases the pH, however, in sludge the buffering capacity was very high and that neutralised the acids produced. The increase of pH may be the result of the release of some alkali elements and the degradation of protein during bacterial growth as indicated by Ben Rebah et al (2000) and Bissonnette et al. (1986). However, the increase of pH seems to have no effect on rhizobial growth. An automatic control of pH did not significantly improve the cell count. The same observation was recorded while growing the same strain in a pH controlled fermentor while using whey as a growth medium (Bissonnette et al., 1986). Therefore, pH was not a limiting factor while using sludge as substrate for growth. The chemical analyses of the soluble fraction of sludge at the beginning and at the end of the fermentation (pH controlled and uncontrolled) showed that *S. meliloti* consumed only a part of the sludge contents present in the liquid phase. This could be attributed to the presence of some non-biodegradable contents in the sludge liquid phase, which rhizobium was unable to assimilate. It is known that fast growing rhizobia utilize a large variety of carbon sources such as monosaccharides, disaccharides, trisaccharide, pentoses, hexoses and organic acids (Allen and Allen, 1950). Therefore, growth of *S. meliloti* depends on the presence of easy metabolisable substrate, which satisfied bacterial requirement. For N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> analyses, the differences between the two fermentors (a higher reduction was noted for the uncontrolled fermentor) can be explained due to the influence of pH on the behaviour of N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. For

example, alkaline pH can contribute to the stripping of ammonium and to the phosphorus precipitation. Moreover, sludge is a complex media and the limiting component is unknown. For these reasons results are difficult to interpret.

## 5. CONCLUSIONS

Wastewater sludge is the most abundantly available raw material, which can be used for rhizobial growth without any pre-treatment and any nutrient addition. The addition of some growth factors (Yeast extract and glycerol) to sludge, however, tend to improve the performance of the fermentation and gave a cell count similar or slightly higher than the normal limit ( $5 \times 10^9$  cfu/ml) for the industrial production (Subba Rao, 1982). The increase in cell concentration by the addition of glycerol to sludge was not statistically significant. The control of pH during rhizobial growth in sludge does not affect the growth and the pH was not be considered as a limiting factor. However, other limiting factors in the use of sludge as a growth medium are not known because of the complexity of its composition.

**Acknowledgement.** The authors sincerely thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant A4984) for providing financial assistance to conduct the research work.

## REFERENCES

- American Public Health Association (APHA). 1992. Standard methods for examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Allen, E.K. and Allen O. N. 1950. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia Bacteriol. Rev. 14 : 273-330.
- Arias, A. and Martinez-Drets G.1976. Glycerol metabolism in Rhizobium. Can. J. Microbiol. 22 :150-153.
- Ben Rebah F., Tyagi, R.D. and Prévost, D. 2000. Wastewater sludge as a new medium for the growth of rhizobia. Submitted for Wat. Env. Res.

Ben Rebah F., Tyagi, R.D. and Prévost, D. 2001. Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. Canadian Journal of Microbiology. 47: 467-474.

Ben Rebah F., Tyagi, R.D. and Prévost, D. 2001a. Wastewater sludge as a Substrate For Growth and carrier for rhizobia : The effect of storage conditions on Survival of *Sinorhizobium meliloti*. Submitted for Bioresource Technology.

Bioardi, J. L., and Ertola R. J. 1985. Rhizobium biomass production in batch and continous culture with a malt-sprouts medium. MIRCEN Journal. 1:163-172

Bissonette, N., Lanande R. and Bordeleau L. M. 1986. Large-scale production of *Rhizobium meliloti* on whey. Appl. Environ. Microbiol. 52:838-841.

Burton, J. C. 1979. Rhizobium species, In H. J. Peppler (ed.), Microbial technology. Academic Press, Inc., New-York. p. 29-58.

Bradley J. W., Kyosai S., Matthews P., Sato K. and Webber M. 1992. World wide sludge management practices. In : Municipal sewage sludge management: processing, utilization and disposal. C.LueHing, D.I.L Zejiz and T. Kuchenrither (éds), Water Quality Management Libraiy, Vol.4, Technomic Publishing Co., Inc.; Lancaster, Pennsylvanie, U.S.A., Chap. 13, pp.537-657.

Campbell H.W. and Martinoli D. K. 1991. Canada's oil-from-sludge technology. Wat. Environment Technol. 3: 64-66.

Environmental Protection Agency (EPA). 1993. Standards for the use and disposal of sewage sludge, 40 CFR Parts 257, 403 and 503, Final Rule. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A

Gulati, S. L. 1979. New non synthetic medium for Rhizobium culture production from wastes. Biotechnol. Bioeng. 21:1507-1515.

Golueke C. G. 1992. Bacteriology of composting. Biocycle. 33: 55-57.

Gross T.S.C. 1993. Thermal drying of sewage sludge. J. Institution of Water Environmental Management. 7: 255-261.

Meade, J., Higgins P., and O'Gara F. 1985. Production and storage of *Rhizobium leguminosarum* cell concentrates for use as inoculants. J. Appl. Bacteriol. 58:517-524.

Lopreto, C.R., Mazza L. A. and Balatti A. P. 1972. Influencia delos componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generacion de una cepa de *Rhizobium japonicum*. An Soc. Cient. Argent. CSCLII: 35-47.

Skinner, F.A., Roughley R. J. and Chandler M. R. 1977. Viability and cell distortion in *Rhizobium* spp. J. appl. Bact. 43: 287-297.

Tay J.H. and Show K.Y..1992. Reuse of wastewater sludge in manufacturing non-conventional construction materials - an innovative approach to ultimate sludge disposal. Wat. Sci. Technol. 26 : 1165-1174.

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook no. 15. Blackwell Scientific Publication, Ltd., Oxford

**Table.1** Characteristics of sludge used in the experiments

| <b>Parameter</b>             | <b>Value</b> |
|------------------------------|--------------|
| PH                           | 5.60         |
| Total solid (g/l)            | 10           |
| Total organic carbon (mg/kg) | 404380       |
| Total nitrogen (mg/kg)       | 52570        |
| Total phosphorus (mg/kg)     | 20866        |
| Ca (mg/kg)                   | 20492        |
| Mg (mg/kg)                   | 4066         |
| Na (mg/kg)                   | 23485        |
| K (mg/kg)                    | 7849         |
| Al (mg/kg)                   | 21703        |
| Cd (mg/kg)                   | 1.969        |
| Cr (mg/kg)                   | 85.62        |
| Cu (mg/kg)                   | 259.62       |
| Fe (mg/kg)                   | 13175        |
| Mn (mg/kg)                   | 175.12       |
| Ni (mg/kg)                   | 14.65        |
| Pb (mg/kg)                   | 46.3         |
| Zn (mg/kg)                   | 414.74       |

**Table 2.** Effect of yeast extract on rhizobial growth

| <b>Yeast extract added<br/>(g/L)</b> | $10^9 \times X_{max}^1$<br>(cfu/ml) | $10^9 \times X_f^2$<br>(cfu/ml) | $t_g^3$<br>(h) |
|--------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------|
| <b>0</b>                             | 2.71a                               | 0.51                            | 3.71a          |
| <b>0.5</b>                           | 4.7ab                               | 1.68                            | 3.39a          |
| <b>1</b>                             | 6.05bc                              | 1.11                            | 3.23a          |
| <b>2</b>                             | 7.8cd                               | 1.24                            | 3.07a          |
| <b>4</b>                             | 8.85d                               | 7.5                             | 3.09a          |

<sup>1</sup> : maximal cell count obtained within 32 to 36h, means of two replicates; values in the same column flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance

<sup>2</sup> : final cell count at 56h of fermentation

<sup>3</sup> : mean generation time, means of two replicates; values in the same column flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance

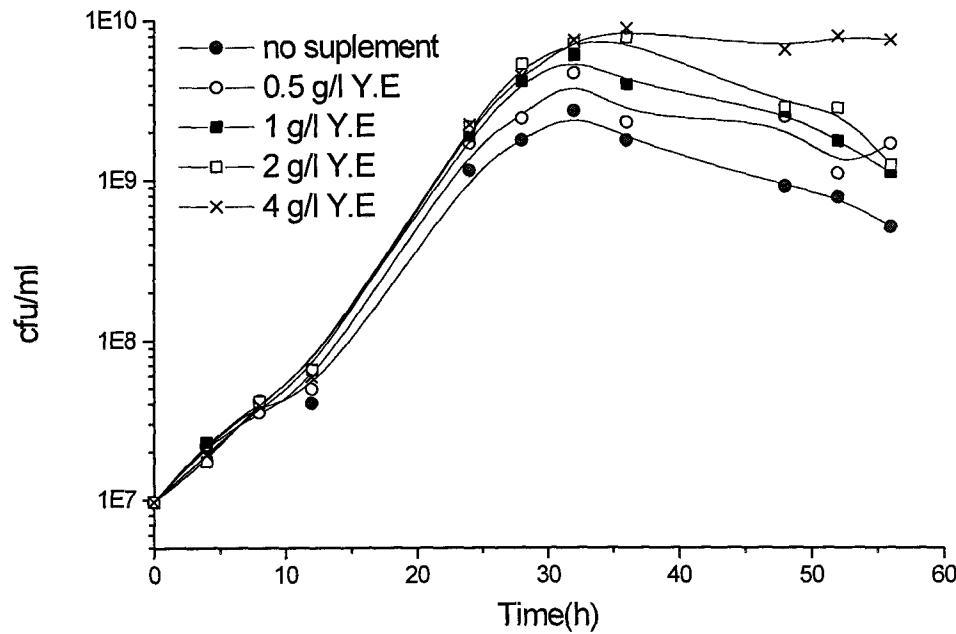
**Table 3.** Effect of glycerol on rhizobial growth.

| Glycerol added<br>(g/L) | $10^9 \times X_{max}^1$<br>(cfu/ml) | $10^9 \times X_f^2$<br>(cfu/ml) | $t_g^3$<br>(h) |
|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------|
| 0                       | 8.85a                               | 7.5                             | 3.09a          |
| 2.5                     | 8.7a                                | 7.2                             | 3.10a          |
| 5                       | 14a                                 | 12.5                            | 3.09a          |
| 7.5                     | 16.5a                               | 13.3                            | 3.08a          |
| 10                      | 13.1a                               | 12.9                            | 3.04a          |

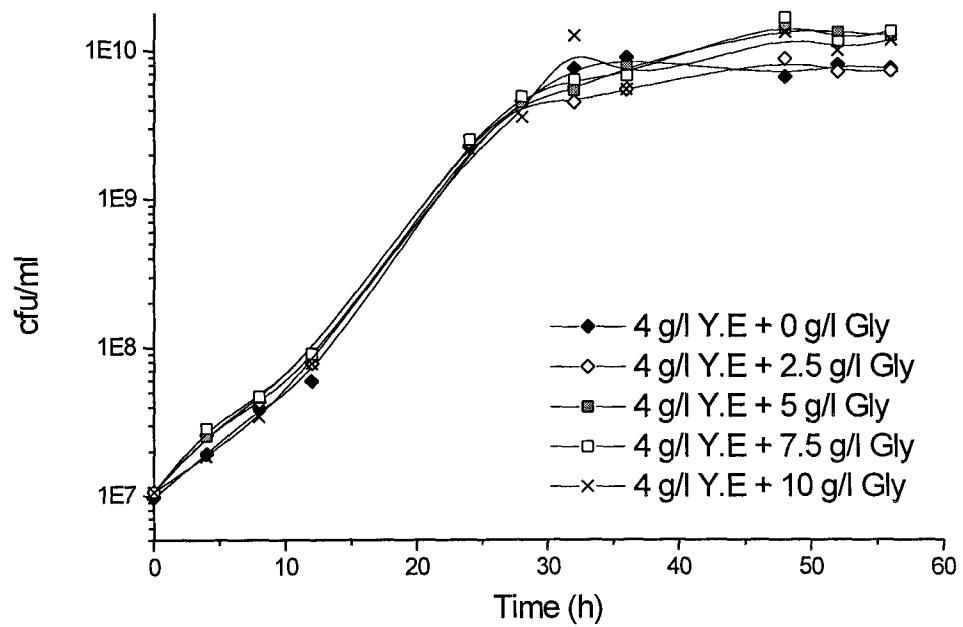
<sup>1</sup> : maximal cell count obtained within 36 to 48h, means of two replicates; values in the same column flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance

<sup>2</sup> : final cell count at 56h of fermentation.

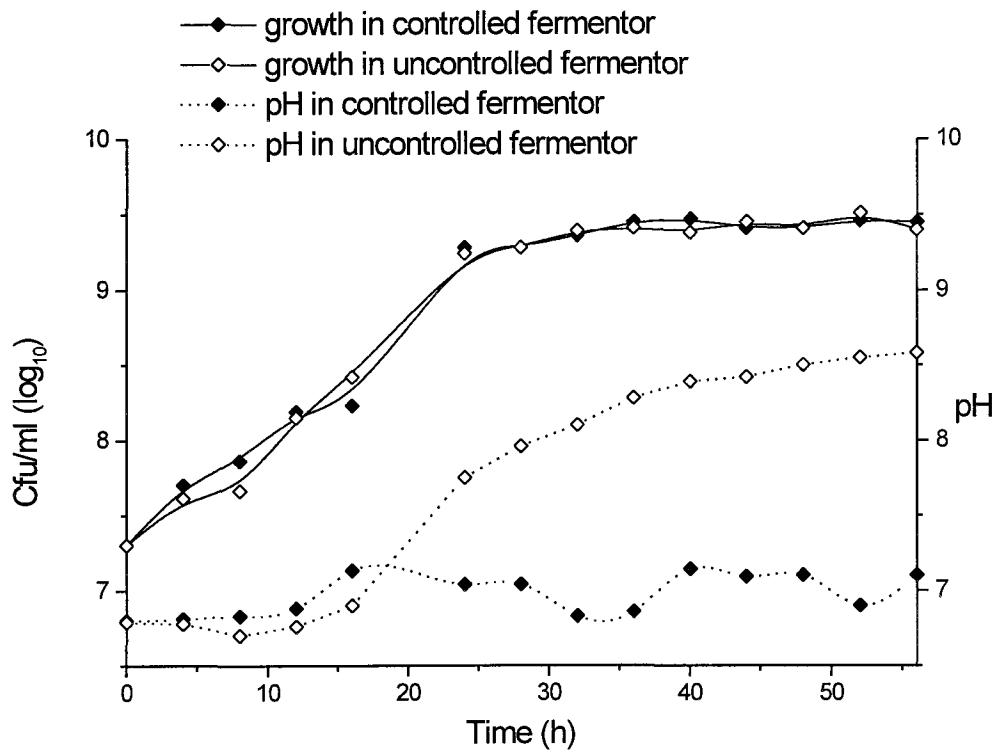
<sup>3</sup> : mean generation time, means of two replicates; values in the same column flanked by the same letter are not significantly different at the 5% level of probability by analysis of variance



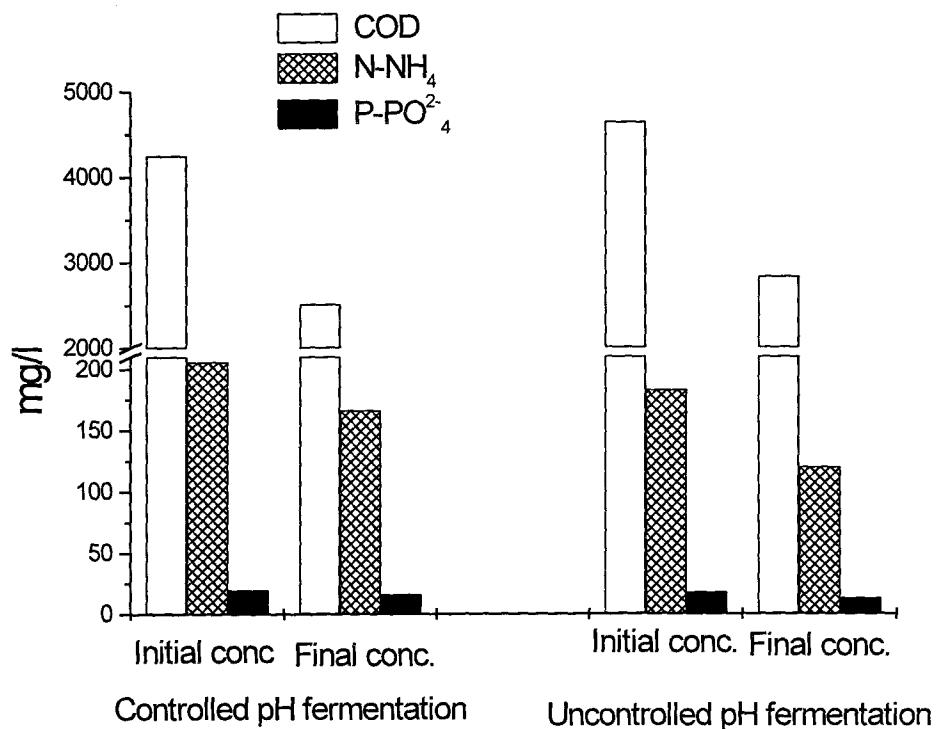
**Figure 1.** Growth of *S. meliloti* in secondary sludge supplemented with different concentrations of yeast extract (Y.E).



**Figure 2.** Growth of *S. meliloti* in secondary sludge supplemented with 4 g/l of yeast extract (Y.E) and different concentrations of glycerol (Gly).



**Figure 3.** Growth of *S. meliloti* and pH variation using secondary sludge in fermentor experiment.



**Figure 4.** Initial and final concentrations of the soluble COD, N-NH<sub>4</sub> and P-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> of the sludge supporting *S. meliloti* growth in pH controlled and uncontrolled fermentors.

## **Chapitre 5**

### **WASTEWATER SLUDGE AS A SUBSTRATE AND CARRIER FOR RHIZOBIA : THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON SURVIVAL OF *SINORHIZOBIUM MELIOTI***

Submitted to:  
Bioresources Technology  
(Accepted)

Ben Rebah F., Prévost D. and Tyagi R. D.

INRS-Eau, Université de Québec  
C.P. 7500, Sainte-Foy  
Québec, Canada G1V 4C7

## RÉSUMÉ

Les effets du milieu de croissance, du support, de la température et de la période de stockage sur la survie du *S. meliloti* ont été déterminés. La boue secondaire de la station de traitement des eaux usées de la Communauté urbaine de Québec et le milieu standard (YMB) ont été utilisés pour la croissance du rhizobium. La boue déshydratée de la station de traitement des eaux usées de Jonquière, la tourbe et un mélange tourbe boue ont été utilisés comme support. Les résultats ont prouvé que la boue offre une meilleure protection pour la survie du rhizobia durant la congélation-décongélation à -20°C que le milieu standard. En général, les résultats ont montré, également, la possibilité d'utiliser la boue comme support parce qu'elle a un potentiel similaire ou plus élevé que la tourbe à supporter la survie de *S. meliloti*. Dans le cas du rhizobium cultivée dans YMB, les supports à base de boue et de tourbe semblent être similaires en terme de taux de survie durant la conservation à 4 et 25°C. Pour des rhizoba cultivées dans la boue, la survie a été meilleure dans la boue que dans la tourbe. Généralement, le compte de cellules est maintenu supérieur à  $10^8$  cellules/g jusqu'à 80 jours à 4 et 25°C dans les deux supports (boue et tourbe). Cependant, pour les cellules cultivées dans la boue et conservées dans un support à base de tourbe à 4°C le nombre de cellules viables a chuté au-dessous de  $10^8$  cellules/g au quatre-vingtième jour du stockage, mais demeure acceptable comparativement au standard qui exige  $10^7$  cellules/g de support.

**Mots clés:** boue dépuration, rhizobium, inoculant, support, utilisation des boues, disposition des boues.

## ABSTRACT

The inoculation of legumes with rhizobia was used to maximises nitrogen fixation and enhances the plants yield without using N fertilisers. For this raisons many inoculant types were developed and optimised. In our study, the effects of the growth medium, the carrier, the temperature and the storage period were determined on the survival of *S. meloliti*. Secondary sludge from Communauté Urbaine de Québec wastewater treatment plant and standard medium (YMB) were used for rhizobial growth. Dehydrated sludge from Jonquière wastewater treatment plant, peat and a mixture of peat and sludge were used as carrier materials. Results showed that the wastewater sludge offered better protection for rhizobia survival during freezing and thawing at -20°C than the standard medium. In general, results showed also the suitability of using sludge as a carrier because it had the same or a higher potential than peat to support survival of *S. meliloti*. In the case of YMB-grown rhizobia, peat and sludge based carriers appeared to be similar in terms of survival rate during the storage at 4 and 25°C. For secondary sludge-grown rhizobia, the survival was better in sludge than in peat based carrier. Generally, the cell count remained higher than  $10^8$  cells/g for up to 80 days at 4 and 25°C in both carriers (sludge and peat). However, for the secondary sludge-grown cells stored in peat based carrier at 4°C, the viable cells decreased under  $10^8$  cells/g at the 81 day of storage but remained acceptable compared to the standard of  $10^7$  cells/g of carrier.

**Key words :** Wastewater sludge, rhizobium, inoculant, carrier, sludge utilization, sludge disposal.

## 1. INTRODUCTION

The inoculation of legumes with rhizobia is a common international practice, which ensures and maximises biological nitrogen fixation and enhances the plant yield potentials without using exogenous N fertilisers. Generally, inoculants are prepared by the addition of rhizobial cells to a powdered carrier followed by a period of incubation (Roughley and Pulsford, 1982) to allow development of maximum rhizobia cell numbers. Inoculants are commercially sold in powder, liquid and/or granular form. The powder form (rhizobial and peat powder) is the most popular method for industrial legume inoculant production. However, liquid and granular products are available in limited quantities in North America and Europe (Stephens and Rask, 2000). In order to facilitate inoculation and maintain rhizobial survival in soil, a variety of carriers have been tested. A good carrier material should support growth of rhizobia and maintain a desired population of cell numbers over an acceptable time period. So a carrier should have a high organic matter, an optimum nitrogen, pH around neutral, a high water holding capacity, should be non toxic and permit growth after incubation. It should also be available all year round and inexpensive.

Peat is the most widely used carrier (Burton, 1967; Peterson and Loynachan, 1981). It can sustain high numbers of rhizobia ( $>10^8$  cells/g), during storage at a temperature range from 3 to 28°C, (Burton, 1967; Van Schreven, 1970; Vincent, 1965). However, peat is not available in a number of countries (Halliday and Graham, 1978; Tilak and Subba Rao, 1978; Corby, 1976). Therefore, different materials, such as perlite (Daza et al., 2000), vermiculite (Walter, 1992), filter mud (Philpotts, 1976.), lignite (Kandasamy and Prasad. 1971), coal (Crawford and Berryhill. 1983), cellulose (Pugashetti et al., 1971), compost of coir dust and soil (John, 1966) and some industrial wastes (Muniruzzaman and Khan, 1992; Ajay et al., 1996) have been evaluated as rhizobial carriers. However, some of these materials are not available in certain areas of the world. Sludge, which is produced by wastewater treatment plants, can be exploited in the legume inoculant production. Generally, the land filling (Bradley et al., 1992; E.P.A., 1993) and land application (Golueke 1992) are considered as conventional sludge disposal methods. However, the conversion of sludge into building materials (Tay and Show, 1992) and oils (Campbell and Martinolli, 1991) are new techniques being developed for sludge utilization. Recently,

the wastewater sludge was used for producing *Bacillus thuringiensis* based biopesticides (Sachdeva et al., 1999; Vidyarthi et al., 2000). Sludge has also been proposed as an effective medium for rhizobia growth (Ben Rebah et al. 2000a; 2000b). Hence, the use of sludge in legume inoculant production creates a new avenue for sludge disposal/utilisation. The dehydrated sludge may be useful as a carrier that can possibly sustain high numbers of rhizobia during storage conditions.

The objectives of this study are to investigate the use of wastewater sludge as a medium for rhizobial growth and as a carrier for inoculum production/application and the evaluation of the effect of storage conditions on the survival of *Sinorhizobium meliloti*.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Rhizobial growth

The fast-growing *Sinorhizobium meliloti* strain A<sub>2</sub> (Agriculture and Agri-food Canada, Sainte-Foy, Que., Canada) was used throughout this study. Cultures were maintained at 4°C on yeast mannitol agar (YMA) slants (Vincent, 1970). Cell production was carried out in two different liquid media: the standard medium yeast mannitol broth (YMB) and secondary sludge from the Communauté Urbaine de Quebec wastewater treatment plant as described by Ben Rebah et al. (2000a; 2000b). The YMB medium contained the following constituents in grams per liter : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.2; NaCl, 0.1; yeast extract, 1; and mannitol, 10. The composition of sludge was determined as follows: total suspended solids (TSS), total nitrogen (N<sub>t</sub>), phosphorus (P<sub>t</sub>) and total organic carbon (TOC) were determined according to the Standard Methods (APHA, 1992). Heavy metals (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) and mineral salts (Mg, Ca, K and Na) were determined after digestion using ICP Thermogerell Ash Corp. (*MENVIQ 89.12/213-MET.1.3*).

The strain A<sub>2</sub> was grown at 30°C for 72 hours on a rotary shaker at 200 rpm and the cell counts were determined on YMA plate supplemented with Congo red (0.25%) after a serial dilution on saline solution (NaCl 0.85%). Colonies were counted after incubation of plates for 72 h at 30°C.

## 2.2. Freezing and thawing of *S. meliloti* cultures

Fresh culture samples (50 ml) grown on standard medium YMB or on secondary sludge were frozen at - 20°C to evaluate their survival to freezing stress. After storage for three months, samples were thawed rapidly by placing in hot water and the cell count was determined as already indicated. The percentage of survival was calculated by using the cell numbers obtained at the end of growth before freezing and after thawing.

## 2.3. Preparation of carrier based inoculants

Dewatered sludge from Jonquière, peat and a mixture of sludge and peat (1:1) were compared as carriers during this study. The sludge was obtained from the activated sludge wastewater treatment plant of Jonquière and the peat was obtained from Microbio Rhizogen Corporation (Saskatoon). The general characteristics of sludge and peat were determined using the analytical methods indicated earlier.

The carriers were autoclaved at 121°C for 45 min on three successive days. Before autoclaving, the moisture of dried sludge was adjusted to 10%, the same level as that of peat, by adding water. A sufficient volume of the culture of *S. meliloti* grown in YMB or in secondary sludge containing  $6.1 \times 10^8$  and  $2.7 \times 10^8$  cells/ml, respectively was added to 50 g of each carrier contained in 500 ml flask to achieve about 50% moisture. The flasks containing the carrier-based inoculants were covered and incubated at 30°C to allow development of maximum cell numbers. After one week of incubation, flasks were stored at 4 and 25°C for 130 days. Samples were stored in duplicate for each inoculant. Samples of one gram of inoculant were taken aseptically, transferred to 10 ml saline solution (NaCl 0.85%) and the number of viable rhizobia was determined on YMA plates as indicated above. At the end of experiment, pH and moisture were also determined.

## 3. RESULTS

### 3.1. Characterisation of waste water sludges and peat

Table 1 lists the characteristics of sludges and peat used in this study. The two sludges were different with respect to their characteristics. The secondary sludge from Communauté Urbaine de Quebec had higher concentrations of organic carbon, total

nitrogen and total phosphorus than that of the Jonquière sludge. Compared to sludge, peat contained the lowest concentrations of TOC, N<sub>t</sub> and P<sub>t</sub>. Na, Mg and K were higher in sludges. However, peat contained the highest concentration of Ca.

The heavy metal concentrations in peat and sludge were at acceptable levels for sludge for agriculture use as prescribed by the Environment Ministry of Quebec (Gouvernement du Quebec, 1991). However, they were more abundant in sludges than in peat except for Ni (17.26 mg/kg in peat and 14.65 mg/kg in secondary sludge).

### 3.2. Effect of freezing on rhizobial survival

The cell count obtained in YMB ( $6.1 \times 10^8$  cells/ml) was similar to that obtained in secondary sludge ( $2.7 \times 10^8$  cells/ml). In the case of cells grown on two media and frozen at -20°C, sludge reported the best protective medium for *S. meliloti*. The survivability for sludge-grown cells was 18%. However, growth on mannitol based medium gave poor protection to the rhizobia with only 1% survivability.

### 3.3. Survival of YMB grown-rhizobia in carriers

Figure 1 shows the cell count of *S. meliloti* in peat, sludge and sludge-peat mixture carriers. Before the storage at 4 and 25°C and for all carriers, the pre-incubation at 30°C increases the cell counts. During the period of storage at 4 and 25°C, no significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) in survival were noted among all carriers. The storage of the inoculant at a low temperature had generally a favourable effect on the survival (Figure 1A). After 81 days of incubation at 4°C the cell numbers remained higher than  $10^9$  cells/g. Although not statistically different, the viable numbers of rhizobia declined slightly in all carriers and varied between  $6.1 \times 10^8$  (for the sludge-peat mixture) and  $2.08 \times 10^9$  cells/g (for peat) over 130 days. In fact, 22.3% of the maximum cell numbers obtained in peat carrier survived, compared to 8.5% and 6.4% for the sludge and for the sludge-peat mixture carriers, respectively (Figure 3). The moisture level for all carrier materials stored at 4°C was maintained at more than 40%. However, the pH remained unchanged around 7.0 (Table 2).

Cell count of *S. meliloti* increased during storage at 25°C. After 18 days, the number of cells reached  $4.2 \times 10^9$ ,  $4.9 \times 10^9$  and  $1.3 \times 10^{10}$  cells/g respectively for sludge, peat and the mixture of sludge and peat (Figure 1B). After this period, the numbers of

viable rhizobia declined but remained higher than  $10^8$  cells/g at the end of the study. However, the survival based on the maximum cell count obtained during the experiments was under 11% for all carriers (Figure 3).

Compared to the highest numbers obtained during the storage (at 18 days sampling), a significant change at the end of storage was noted in the case of sludge based carriers. These final values were  $1.0 \times 10^8$  (for sludge) and  $2.0 \times 10^8$  cells/g (for the mixture sludge-peat). These values represent respectively only 2.0 and 1.5% of the maximum cell count (Figure 3). At 25°C, some water loss occurred in the carrier materials. At the end of storage (130 days) the moisture content was 36.45, 42.05 and 39.5% for peat, sludge and the mixture of sludge and peat, respectively. Except in the case of peat carrier which maintained a pH near 7.0 (Table 2), a slight increase of pH was observed for sludge based carriers (7.8 and 7.4 respectively for sludge and the sludge-peat carriers).

### **3.4. Survival of secondary sludge-grown rhizobia in carriers**

Results of experiments with *S. meliloti* grown in secondary sludge are presented in Figure 2. In peat carrier, the viable cell numbers decreased slightly during the pre-incubation at 30°C. The numbers of cells remained nearly constant throughout the incubation at 4°C. At the end of study (130 days), the cell count was  $1.5 \times 10^7$  cells/g which represented only 8% of the maximum cell count (Figure 3). The same tendency was observed in the peat-sludge mixture. However, in sludge carrier, the cell count increased slightly during the first 7 days of pre-incubation and remained higher than  $10^9$  cells/g up to 80 days. Then a decrease in cell count was observed at the 130 days sampling. The value was  $1.7 \times 10^8$  cells/g but not significantly different from the initial number.

At 25°C in peat carrier, after an initial decline in cell number during the first 18 days, an increase of the viable cell count was observed. After 32 days the value reached  $3.6 \times 10^9$  cells/g and at the end of sampling (130 days) the cell count remained statistically unchanged. For sludge based carriers (sludge and the mixture of sludge and peat) the same tendency was observed during the storage at 25°C. Thus, an increase of the viable cell count followed by a slight decline was observed and at the end of experiment the numbers were  $2.6 \times 10^7$  and  $1.0 \times 10^8$  cells/g respectively for

sludge and the sludge-peat carriers. In terms of survival, the final cell count represent only 33.88%, 0.42% and 1.29% of the maximum cell number obtained during the storage respectively for peat, sludge and the mixture sludge-peat, respectively (Figure 3). The pH remained near 7.0 during storage at 4°C but a little increase was observed at 25°C for sludge based carriers. Also the water loss was slightly greater at 25°C than at 4°C (Table 2).

#### 4. DISCUSSION

In this study, it was demonstrated that sludge may protect rhizobia against stress like freezing-thawing and provide a higher potential for survival than the YMB medium. This indicated that standard medium did not confer on rhizobial cells an ability to survive freezing as demonstrated by Bissonette and Lalande (1988). In some studies, sucrose, glucose, peptone and dextrans are used as additives to the standard medium in order to enhance survivability of different micro-organisms (Obayashi et al., 1961). In our study the survival to freezing in secondary sludge seemed to be the result of the presence of suspended solids which may protect cells during thawing. In order to optimise survivability in wastewater sludge, it would be interesting to test different solids concentrations. It is likely that YMB-grown cells might be physiologically different than sludge-grown cells as indicated by Bissonnette et al. (1988) while using whey as a media for rhizobial growth.

The most important factor which contributes to the high quality inoculants is the high viable cell (rhizobia) count capable of nodulation and nitrogen fixation with the host legume. Therefore, the evaluation of inoculant quality by enumerating the viable rhizobia present is considered as an accurate index of inoculant potential (Hiltbold et al., 1980). In order to facilitate inoculation and maintain a sufficiently high number of cells, a variety of carriers such as peat have been tested. The lack of availability of suitable peat in some countries has prompted efforts to identify alternative carriers. This study showed that sludge seemed to have a good potential as a carrier for rhizobia. Sludge is a very good source of carbon, nitrogen, phosphorus and other nutrients that support growth and viability of rhizobia. Sludge also contains a high concentration of organic matter and possesses a high water-holding capacity, which are usually necessary properties of a suitable rhizobial carrier. Therefore, sludge supported an acceptable survival rate of *S. meliloti* throughout the experimental

period. It is possible that a higher concentration of nitrogen phosphorus and mineral salts in sludge may be the reason for good rhizobial survival. Generally, rhizobia needs a small amount of magnesium, calcium and potassium. The presence of mineral salts has an impact on rhizobial growth (Vincent, 1977). Ca stimulates the growth of the bacteria and Mg acts as enzymatic regulator (Vincent, 1962, Sherwood, 1972; Norris, 1959). The acceptable standard for the number of rhizobia per g of carrier material varies from one country to another. However, in many countries  $10^7$  viable cells/g or more is taken as a standard (Burton, 1978). In this study the viable cell count remained higher than  $10^8$  cells/g for up to 80 days at 4 and 25°C with both carriers (sludge and peat). However, survival of *S. meliloti* grown in sludge and stored in peat based carrier at 4°C, was under  $10^8$  cells at 81 days of storage but stills remained acceptable compared to the standard.

Our results showed that the type of the culture media (YMB or secondary sludge) used for the growth affects the survivability in the different types of carriers. Mixing the secondary sludge grown rhizobia with sludge based carriers showed an appreciable increase in cell count during the pre-incubation at 30°C. However, with peat there was no significant enhancement of cell number compared to the initial number. In addition to that, the use of YMB-grown rhizobia gave an increase of the rhizobial number (after the pre-incubation at 30°C) in all carriers but the highest enhancement was obtained with peat based carrier. During the storage at 4 and 25°C and for YMB-grown *S. meliloti*, peat and sludge based carriers appeared to be similar in terms of survival. While using secondary sludge as a media for rhizobial growth, the survival was better in sludge than in peat based carrier. This indicated that cells of rhizobia grown in sludge are pre-adapted and thus provided a high potential of multiplication in sludge based carriers than in peat. Therefore, it seems better to use sludge grown bacteria to inoculate sludge-based carrier. The different responses of YMB-grown rhizobia and sludge-grown rhizobia in different carrier materials at 4 and 25°C indicated that sludge-grown cells might be physiologically different than YMB-grown cells. Hence, culture conditions have been reported to affect the survivability of rhizobium cells (Bissonette and Lalande, 1988). It seemed that sludge tested in this study was equivalent to peat as carrier of *S. meliloti*. These results also indicated that the mixture of sludge and peat did not have a significant beneficial effect. Therefore

sludge need not be mixed with peat. Moreover, sludge based inoculants can be stored at 4 and 25°C for more than three months.

Generally, a better survival of rhizobia was obtained under refrigeration than at or near room temperature. However, not all studies have reported the same conclusion. Paczkowski and Berryhill (1979) found that the survival of *R. phaseoli* in coal was about the same at 22 or 4°C. Our study also showed that the survival of rhizobia was about the same at 4 or 25°C especially for the sludge grown *S. meliloti* and for a storage period of about four months in sludge and peat based carriers. This could be the result of the difference of the strain responses, which depend on the carrier material and on the storage temperatures (Sparrow and Ham, 1983).

The pH of the sludge based carriers increased during storage at 25°C, this may be the result of the release of some sludge alkaline elements like calcium. The degradation of some complex component such as protein during the pre-incubation at 30°C and during the storage at 25°C might have also contributed to the increased pH. The increase in pH seemed to have no effect on *S. meliloti* survival.

In sludge, *S. meliloti* was exposed to heavy metals, which could be toxic. Some metals such as Zn, Mn and Fe are necessary for the rhizobial growth (Willson and Reisenauer, 1970b, Quiespel, 1974). Others like Ni and Cu can be toxic for rhizobia (Willson and Reisenauer, 1970a, Lowe and Evans, 1962). However, metals are generally less toxic when complexed with the sludge organic matter than in free ionic forms (Babich and Stotzky, 1980). Moreover, the activities of ionic species depend on the pH and are affected by the concentration of a wide range of organic and inorganic compounds. Ravishankar et al. (1994) demonstrated that the organic and residual fraction of the sludge was the principal binding phases and the majority of metals were mostly organically bound for some Québec municipal wastewater sludges. However, metal speciation depends on sludge origin. In our study, the form of metals is not known and they can be complexed with organic matter. It was reported that metals are generally less toxic when complexed with organic compounds than in the free form (Babich and Stotzky, 1980). The pH was maintained high or equal to 7.0 and the metals do not exist in ionic form and hence seems to have no interaction with rhizobia.

## 5. CONCLUSIONS

Wastewater sludge contain organic matter, nitrogen, phosphorus, mineral salts and other trace elements which could be successfully demonstrated as supporting growth and survivability of rhizobia. The use of sludge as a medium offers a good protection for rhizobial cells against freezing than a standard medium. Dewatered sludge could be used as a carrier similar to peat. However, the type of culture media used for growth affects the cell numbers in carriers and it seemed better to use sludge-grown rhizobia than YMB-grown rhizobia to inoculate a sludge-based carrier. For all carriers except peat inoculated with sludge-grown rhizobia, results showed that the viable rhizobia remained higher than  $10^8$  cells/g up to 80 days at 4 and 25°C. Our study here is however limited for one type of sludge used as a carrier and for one rhizobial strain. Therefore, it may be necessary to test other rhizobial strains and other sludge types.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Sincere thanks are due to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (A4984) for supporting this research.

## REFERENCES

- APHA, American Public Health Association. 1992. Standard methods for examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Ajay, k., Rawlat, A.K., Verman, L.N., Khare, A.K. and Kaushal, A. 1996. Oxalic acid industrial waste as a carrier for *Rhizobium* inoculants and its effect on soybean. J. of the Indian Society of soil Science. **44**: 249-252.
- Babich, H., Stotzky, G., 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to micro-organisms. CRC Critical Reviews in Microbiology. **8**: 99-145.
- Ben Rebah F., Tyagi R. D. and Prévost D. 2000. Wastewater sludge as a new medium for the growth of rhizobia. Submitted to Wat. Env. Res.

- Ben Rebah, F., Tyagi, R. D. and Prévost, D. 2001. Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. Canadian Journal of Microbiology. **47**: 467-474.
- Babich, H., Stotzky, G., 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to micro-organisms. CRC Critical Reviews in Microbiology. **8**: 99-145.
- Bissonette N. et Lanande R. 1988. High survivaility of cheese whey-grown *rhizobium meliloti* cells upon exposure to physical stress. Appl. Environ. Microbiol. **54**:183-187.
- Burton, J. C. 1967. Rhizobium culture and use, p. 1-33. In H. J. Peppler (ed), Microbia; technology. Reinhold Publishing Corp., New York.
- Bradley J.W., Kyosai, S. Matthews, P., Sato, K. and Webber, M. 1992. Worldwide sludge management practices. In: Municipal sewage sludge management: processing, utilization and disposal. C.LueHing, D.I.L Zejiz and T. Kuchenrither (eds), Water Quality Management Libraiy, Vol.4, Technomic Publishing Co., Inc.; Lancaster, Pennsylvanie, U.S.A., Chap. 13, pp. 537-657.
- Corby, H.D.L. 1976. A method of making a pure-culture, peat-type legume inoculant, using a substitute for peat. P.169-173 In P.S. Numtman (ed.) Symbiotic nitrogen fixation in plants, IBP Vol.7. Cambridge University press, London.
- Crawford, S. L., and Berryhill, D. L. 1983. Survival of Rhizobium phaseoli in coal-based legume inoculnats applied to seeds. Appl. Environ. Microbiol. **45**:703-705
- Campbell, H.W. and Martinoli, D.k. 1991. Canada's oil-from-sludge technology. Wat. Environment Technol. July. **3**: 4-66.
- Daza, A., Santamaria, C., Rodriguez, N.D.N., Camacho, M., Orive, R. and Temprano, F. 2000. Perlite as a carrier for bacterial inoculants. Soil Biollogy and biochemistry. **32**: 567-5722.

E.P.A, Environmental Protection Agency. 1993. Standards for the use and disposal of sewage sludge, 40 CFR Parts 257, 403 and 503, Final Rule. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A.

Gouvernement du Québec. 1991. Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales - Guide de bonnes pratiques. Ministère de l'Environnement, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, juillet, 91 pages.

Golueke, C. G. 1992. Bacteriology of composting. Biocycle January. **33**: 55-57.

Halliday, J., and P. H. Graham. 1978. Coal compared to peat as a carrier of rhizobia. Turrialba. **28**:348-349.

Hiltbold, A. E., Thurlow D. L. and Skipper, H. D. 1980. Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. Agronomy Journal. **72**:675-681.

John, K. P. 1966. A coir-dust soil compost for *Rhizobium*. J. Rubber Res. Inst. Malay. **19**:173-175

Kandasamy, R., and Prasad, N. N. 1971. Lignite as a carrier of rhizobia. Curr. Sci. **40**:496.

Lowe, R.H. and Evans, H.J. 1962. Cobalt requirement for the growth of Rhizobia. J. Bact. **83**: 210-211.

Muniruzzaman, S. and Khan, S. I. 1992. Suitability of some local agro-industrial wastes as a carrier materials for *Rhizobium*. Sp infecting *Sesbania bispinosa*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **8**:329-330.

Norris, D.O. 1959. The role of calcium and magnesium in the nutrition of *Rhizobium*. Aust. J. Agric. Res. **10**: 651-698.

Peterson, H. I., and Loynachan, T. E. 1981. The significance and application of *Rhizobium* in agriculture. Int. Rev. Cytol. Suppl. **13**:311-331

Paczkowski, M.E., and Berryhill, D.L. 1979. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal-based inoculants. Appl. Environ. Microbiol. **38**:612-615.

- Pugashetti, B. K., Gopalgowda, H. S. and Patil, R. B. 1971. Cellulose powder as legume inoculant base. *Curr. Sci.* **40**:494-485.
- Philpotts, H. 1976. Filter mud as a carrier for *Rhizobium* inoculants. *J. Appl. Bacteriol.* **41**:277-281.
- Obayashi, J., Ota, S. and Arai, S. 1961. Some factors affecting preservability of freeze-dried bacteria. *J. Hyg.* **59**:77-91.
- Quispel, A. 1974. The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. Oxford Am. Elsevier Publ. Corp., Inc. N.Y.
- Ravishankar, B.R., Auclair, J.C., and Tyagi, R.D. 1994. Partitioning of heavy metals in some Québec municipal sludges. *J. Water Poll. Res.* **29**: 457-470.
- Roughley, R.J. and Plusford, D.J. 1982 Production and control of legume inoculants. In Nitrogen Fixation in Legumes (J.M. Vincent, Ed), pp. 193-209. Academic Press, Sydney.
- Sachdeva, V., Tyagi, R.D. and Valero, J. R. 1999. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilisation/disposal. Specialised conference on disposal and utilisation of sewage sludge treatment methods and application modalities. IAWQ. Athens, Greece. pp 401-408.
- Stephens, J.H.G. and Rask, H.M. 2000 Inoculant production and formulation. *Field Crops Research.* **65**: 249-258.
- Sherwood, M.T. 1972. Inhibition of *R. trifolii* by yeast extracts or glycine is prevented by calcium. *J.Gen. Microbiol.* **71**: 351-358.
- Sparrow, S. D., and Ham, G. E. 1983. Survival of *Rhizobium phasesli* in six carrier materials. *Agronomy Journal* **75**:181-184.
- Tay J.H. and Show, K.Y. 1992. Reuse of wastewater sludge in manufacturing non-conventional construction materials - an innovative approach to ultimate sludge disposal. *Wat. Sci. Technol.* **26**: 1165-1174.

Tilak, K.V.B.R., and Subba Rao, N.S. 1978 Carriers for legume (*Rhizobium*) inoculants. *Fert. News* **23**:25-28

Van Schreven, D. A. 1970. Some factors affecting growth and survival of *rhzobium* spp. in soil-peat cultures. *Plant Soil* **32**:113-130.

Vidyarthi, A.S., Desrosiers, M., Tyagi, R.D. and Valero, J.R. 2000. Foam control in biopesticide production from sewage sludge. *J. industrial Microbiology and biotechnology*. **25**: 86-92.

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme handbook no. 15. Blackwell Scientific Publication, Ltd., Oxford

Vincent, J. M. 1977 Rhizobium: general microbiology. In: Hardy R. W. F., Silver W. S. (eds.). *A treatise on dinitrogen fixation*, vol 3. John Wiley and Sons, New York pp 277-364.

Vincent, J. M. 1965 Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legume. *Agronomy* **10**:384-435.

Vincent, J. M. 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of rhizobium. *J. Gen. Microbiol.* **28**: 653.

Walter, J.F., Paau, A.S. and Metting, F.B.J. 1992. Microbial inoculant production and formulation. *Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental management*. Marcel Dekker Inc., New York, USA. pp 579-594.

Wilson, D.O. and Reisenauer, H.M. 1970a. Effects of some heavy metals on the cobalt nutrition of *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil*. **32**: 81-89.

Wilson, D.O. and Reisenauer, H.M. 1970b. Effects of manganese and zinc ions on the growth of Rhizobium. *J. Bact.* **102**: 729-732.

**Table 1.** The characteristics of the original sludges and peat.

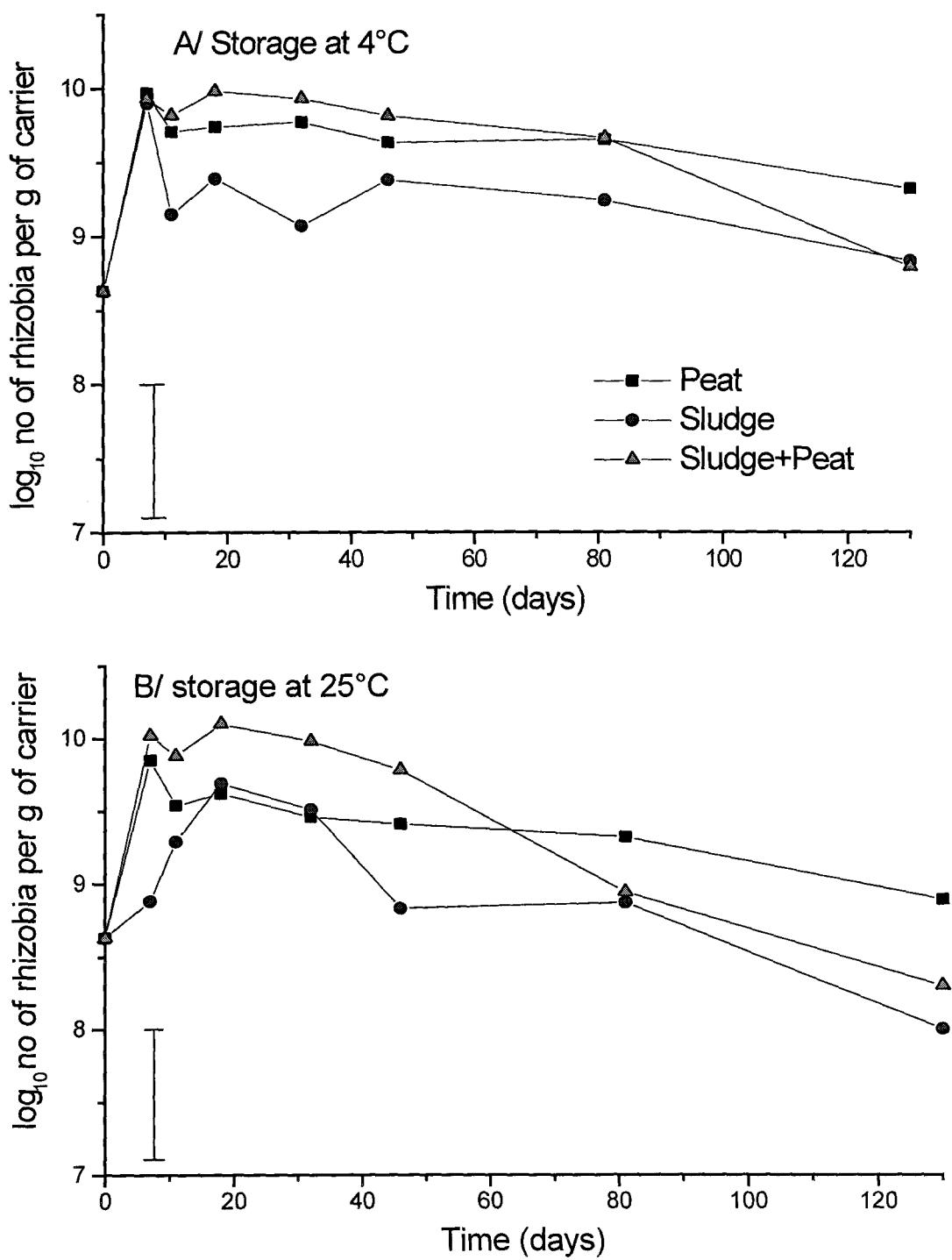
| Parameters*    | Secondary sludge used | Dewatered sludge used | Peat   |
|----------------|-----------------------|-----------------------|--------|
|                | as growth media       | as a carrier          |        |
| pH             | 5.60                  | 7.17                  | 6.98   |
| TSS (%)        | 1                     | -                     | -      |
| TOC            | 404380                | 284130                | 348450 |
| N <sub>t</sub> | 52570                 | 39990                 | 18290  |
| P <sub>t</sub> | 20866                 | 27040                 | 514.97 |
| Ca             | 20492                 | 18600                 | 28910  |
| Mg             | 4066                  | 5540                  | 3967.3 |
| Na             | 23485                 | 6268                  | 2852.8 |
| K              | 7849                  | 7457                  | 6872.2 |
| Al             | 21703                 | 56548                 | 32092  |
| Cd             | 1.969                 | 2.082                 | n      |
| Cr             | 85.62                 | 85.88                 | 64.023 |
| Cu             | 259.62                | 378.18                | 14.146 |
| Fe             | 13175                 | 17286                 | 9884.6 |
| Mn             | 175.12                | 905.11                | 103.86 |
| Ni             | 14.65                 | 29.96                 | 17.262 |
| Pb             | 46.3                  | 63.4                  | 5.099  |
| Zn             | 414.74                | 395.73                | 53.77  |

\*All parameters are in mg/kg except for pH and TSS.

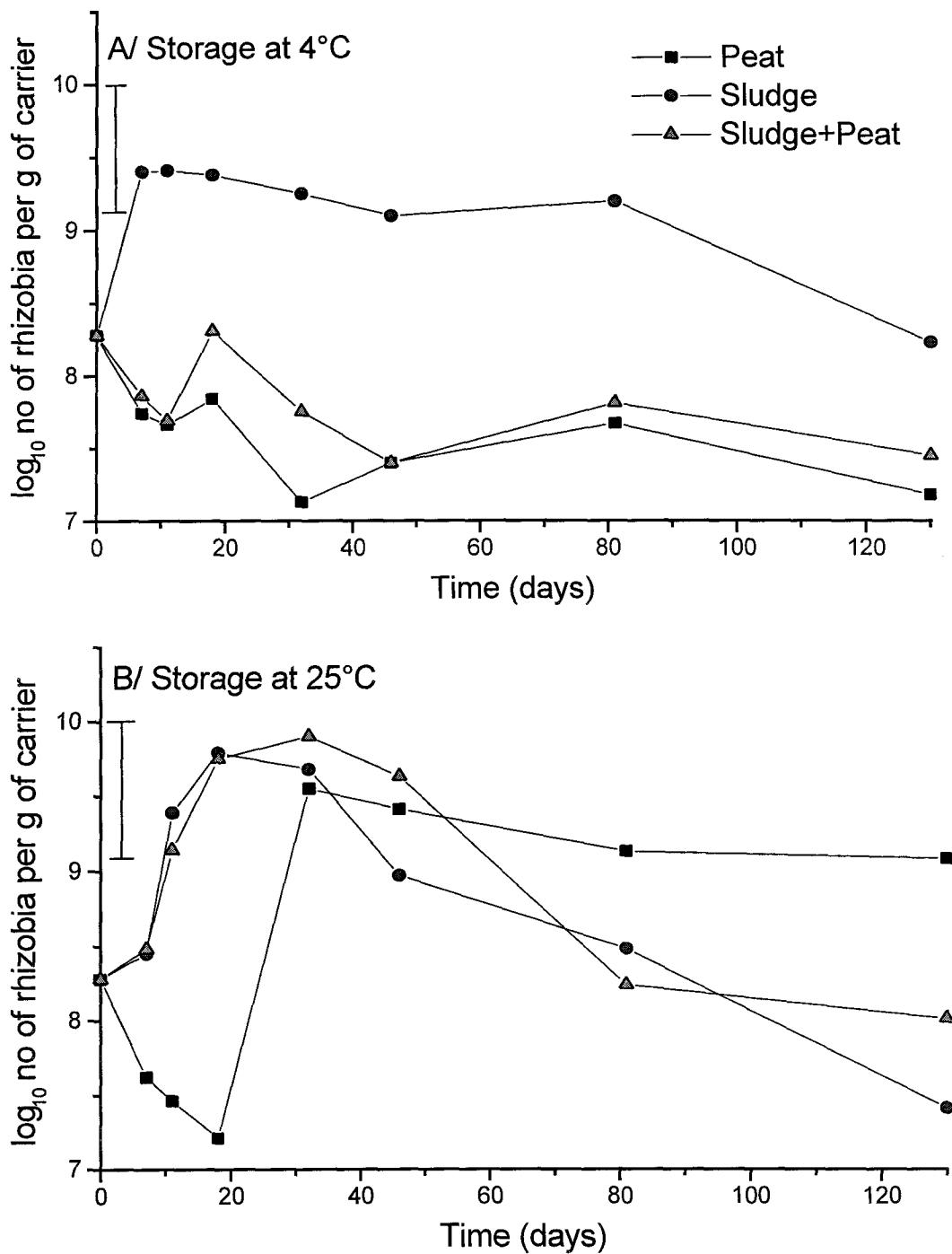
n : not determined

**Table 2.** pH and moisture at the end of storage.

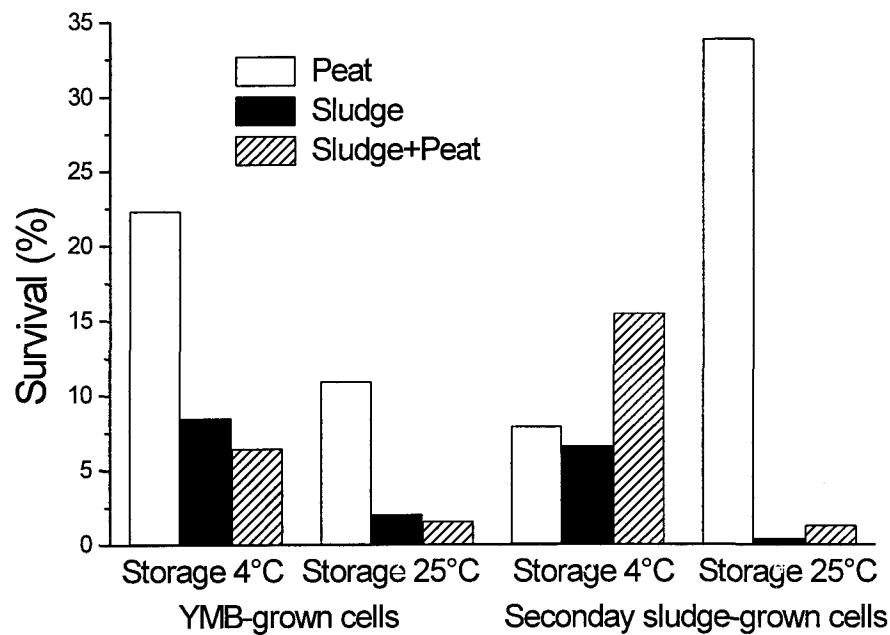
|  | Storage at 4°C |              | Storage at 25°C |              |
|--|----------------|--------------|-----------------|--------------|
|  | pH             | Moisture (%) | pH              | Moisture (%) |
| <b>YMB-grown rhizobia</b>              |                |              |                 |              |
| <b>peat</b>                            | 6.95           | 40.70        | 6.87            | 36.45        |
| <b>Sludge</b>                          | 7.03           | 48.00        | 7.8             | 42.05        |
| <b>Sludge + peat</b>                   | 6.89           | 44.85        | 7.36            | 39.50        |
| <b>Secondary sludge-grown rhizobia</b> |                |              |                 |              |
| <b>peat</b>                            | 6.91           | 42.90        | 6.91            | 39.66        |
| <b>Sludge</b>                          | 6.48           | 44.15        | 7.7             | 39.95        |
| <b>Sludge + peat</b>                   | 6.66           | 44.00        | 7.52            | 35.95        |



**Figure 1.** Survival of YMB-grown rhizobia in sludge, peat and mixture sludge-peat based carriers at 4°C (A) and 25°C (B). The 7 day values corresponding to the end of the pre-incubation at 30°C. Vertical bars indicate LSD (0.05).



**Figure 2.** Survival of secondary sludge-grown rhizobia in sludge, peat and mixture sludge-peat based carriers at 4°C (A) and 25°C (B). The 7 day values corresponding to the end of the pre-incubation at 30°C. Vertical bars indicate LSD (0.05).



**Figure 3.** Survival percentages of *S. meloliti* in different carriers after 130 days of storage. (Calculation based on the maximum cell numbers obtained during storage).

## **Chapitre 6**

### **NODULATION AND YIELD OF ALFAFA GROWN IN SLUDGE AMENDED SOILS AND INOCULATED WITH RHIZOBIA PRODUCED IN SLUDGE**

Submitted to:  
Journal of Environmental Quality  
(Accepted)

Ben Rebah F., Prévost D. and Tyagi R. D.

INRS-Eau, Université de Québec  
C.P. 7500, Sainte-Foy  
Québec, Canada G1V 4C7

## RÉSUMÉ

L'efficacité d'inoculants (liquides et solides) de rhizobium produits dans les boues d'épuration (utilisées comme milieu de culture et comme support) a été comparée à celle des inoculants produits dans le milieu standard (YMB) et en utilisant la tourbe comme support. La luzerne a été inoculée avec des inoculants de *S. meliloti* sous forme solide et liquide et cultivée dans des pots contenant deux types de sol (Kamouraska : sol argileux et Saint-André : sol sableux). L'effet de différents taux d'amendement avec des boues (60 et 120 kgN/ha) et de la fertilisation azotée (60 kgN/ha) a été aussi étudié. Les inoculants à base de boue ont le même potentiel que ceux à base d'YMB. Tous les types d'inoculants ont montré la même tendance, l'inoculation augmente l'indice de nodulation (passe de 6 à 8 et 12) et le nombre de rhizobia (Kamouraska:  $10^7$  cellules/g, Saint-André : $10^6$  cellules/g). Cependant, les poids secs et le contenu en azote n'ont pas augmenté de manière significative suite à l'inoculation probablement à cause de la présence d'un nombre important de rhizobia indigènes du sol capables de noduler adéquatement les plantes. L'application des boues comme amendement a augmenté le nombre du rhizobia dans les sols (passe de  $10^3$  à  $10^4$  cellules/g) et a amélioré significativement la croissance des plantes (poids sec et le contenu en azote). Cette amélioration augmente avec l'augmentation du taux des boues et avec la coupe (3 coupes). Comparativement à la boue, le fertilisant azoté a donné des faibles rendements des plantes. Le processus de nodulation a été toujours maintenu dans les sols amendés et fertilisés. Les plus hauts rendements obtenus avec le sol Kamouraska par rapport à celui de Saint-André semble être le résultat de leurs textures et leurs caractéristiques. Dans cette étude les macroéléments et les métaux lourds sont à un niveau acceptable et ne sont pas considérés comme des facteurs négatifs.

**Mots clés :** boue d'épuration, inoculant, rhizobium, fixation d'azote.

## ABSTRACT

The efficiency of rhizobial inoculants (solid and liquid inoculants) produced in wastewater sludge (used as a medium and as a carrier) was compared to that of inoculants produced in standard medium (YMB) and by using peat as a carrier. Alfalfa plants were inoculated with solid and liquid *S. meliloti* inoculants and grown in pots containing two soil types (Kamouraska: clay soil and Saint-André: sandy soil). The effect of various levels of sludge amendment (60 and 120 kgN/ha) and nitrogen fertilizer (60 kgN/ha) was also studied. The sludge-based inoculants gave the same tendency than YMB-based. The inoculation increased the nodulation index (passed from 6 to 8 and 12) and the rhizobial number in soils (Kamouraska:  $10^7$  cells/g, Saint-André:  $10^6$  cells/g). However, the dry shoot weights and the nitrogen contents did not increase significantly due to the presence of indigenous soil rhizobia at acceptable concentration to adequately nodulate the plants. The application of sludge as amendment enhanced the rhizobial number in soils (passed from  $10^3$  to  $10^4$  cells/g) and improved significantly the plant growth (dry shoot weights and nitrogen contents). This improvement increased with increasing sludge rate and with the cut (3 cuts). Compared to sludge, N-fertilizer gave lower plant yields. The nodulation process still remained in amended and N-fertilized soils. The best yields obtained in Kamouraska soil in comparison to Saint-André seems to be a result of its texture and characteristics. In this study, macroelements and heavy metals were at acceptable level and were not considered to be negative factors.

**Key words :** Wastewater sludge, inoculant, rhizobium, nitrogen fixation.

## 1. INTRODUCTION

Wastewater treatment process produces a large amount of sludge. The disposal and/or utilisation of wastewater sludge is an increasing environmental problem. The sludge handling and disposal cost varies from 30 to 40% of the capital cost and represents about 50% of the operating costs of a typical wastewater treatment facility (Vesilind, 1974). Land filling (Bradley et al. 1992; E.P.A., 1993), ocean discharge (Gross, 1993) and land application (Golueke, 1992) are conventional sludge disposal methods. The application of sludge to agricultural soils improves the soil physical and biological properties because it contains organic matter and plant nutrients (Pagliai et al., 1981; Wei et al., 1985). It can enhance microbial growth (Pichtel and Hayes, 1990) such as the rhizobial growth (Kinkle et al., 1987; Heckman et al., 1987ab). In Canada, 29% of municipal sludges is used in agricultural soils (Webber, 1988). However, wastewater sludge often contains materials potentially toxic for rhizobia, such as heavy metals and soluble salts (Madariaga and Angle, 1992, McGrath et al., 1988; Giller et al., 1989). According to Huang et al. (1974) low metal concentration stimulate slightly the nodulation, but higher concentration can affect the number of nodules and reduce the root and the shoot weight. McGrath et al. (1988), reported that sludge application reduced nitrogen fixation and the growth of white clover (inoculated by *Trifolium repens* L.). In order to reduce the toxicity in agriculture practice, the concentration of heavy metals should not exceed the recommended levels (Gouvernement du Québec, 1991).

Recently, the wastewater sludge was used for producing *Bacillus thuringiensis* based biopesticides (Sachdeva et al. 2000; Vidyarthi et al., 2000) and has been proposed as an effective medium for rhizobia growth (Ben Rebah et al., 2000; 2001). The dehydrated sludge was also tested as a carrier that can sustain high numbers of rhizobia during storage conditions (Ben Rebah et al., 2001a). This new application constitutes an additional and suitable alternative for wastewater sludge recycling.

Hence, the objective of the current study was to evaluate the effects of inoculation with sludge-grown rhizobia and the amendment of soils with sludge on nodulation and growth of alfalfa.

## 2. MATERIAL AND METHODS

## 2.1. Soil and sludge origins

Two soil samples from Saint-André (sandy soil) and Kamouraska (clay soil) located in the province of Quebec and an aerobically digested secondary sludge from the Communauté Urbaine de Québec (CUQ) wastewater treatment plant were used in this study. A portion of the secondary sludge was sterilised at 121°C for 20 minutes and used for rhizobial growth.

## 2.2. Chemical analysis

**Sludge analysis:** Total organic carbon, total nitrogen, total phosphorus, ammonium ( $\text{N-NH}_4$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) were determined according to the Standard Methods (APHA, 1992). Heavy metals (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) and mineral salts (Mg, Ca and K) were determined after digestion using ICP Thermogerell Ash Corp (APHA, 1992).

**Soil analysis:** The pH of soils was measured in water and characteristics (total nitrogen, total phosphorus and total organic carbon) were determined using the analytical methods as indicated above for the sludge. However, heavy metals and mineral salts were determined according to Mehlich III method (Tran et al., 1993)

## 2.3. Estimation of population size of the indigenous rhizobia

The most probable number (MPN) method (Vincent, 1970) was used to estimate the number of rhizobia in soils by using dilution series and alfalfa as a host. Five replicate plant infection growth pouches (Mega International, Minneapolis) were inoculated with 1 mL aliquots at each dilution step and pouches placed in a controlled growth cabinet (with 16 h days at 20°C and 15°C nights). After 28 days growth, roots were observed for nodulation. The numbers of rhizobia were calculated using a MPNES computer program (Woomer et al., 1990).

## 2.4. Procedures and experimental design

**General soil preparation:** Soils were prepared as recommended by CPVQ (1994) for alfalfa growth. Number of indigenous rhizobia was determined by the MPN method. Both soils were amended with lime equivalent to 14 and 12.2 t/ha respectively for Kamouraska and Saint-André to increase the pH to 6.5. Standard mineral fertiliser

(46%- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) equivalent to 40 and 20 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha was added respectively for Kamouraska and Saint-André soil. Because of the composition of soils, no K was added in this experiment.

**Soils amendment :** Secondary sludge was applied to soils to give 60 and 120 kg of available N/ha. Two controls were included : one without sludge amendment and second with nitrogen fertiliser (27%-N) equivalent to 60 kg N/ha. 60 kg N/ha was chosen as an acceptable level for nitrogen amendment for alfalfa growth recommended by CPVQ (1994).

**Rhizobial inoculants:** The fast-growing *Sinorhizobium meliloti* strain A<sub>2</sub> (Agriculture and Agri-food Canada, Sainte-Foy, Que., Canada) was used for the inoculant preparation. Two types of inoculants (liquid and solid inoculants) were used. Liquid inoculants were prepared by growing strain in standard medium yeast mannitol broth (YMB) and in secondary sludge as described by Ben Rebah et al. (2000; 2001, 2001a). The YMB medium contained the following constituents in grams per liter : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.2; NaCl, 0.1; yeast extract, 1; and mannitol, 10. However, solid inoculants were obtained by mixing culture of *S. meliloti* grown in YMB or in secondary sludge with sterile peat (obtained from Microbio Rhizogen Corporation, Saskatoon) and sterile dried sludge respectively as described by Ben Rebah et al. (2001a).

## 2.5. Plant growth and nodulation assessment

Three germinated seeds of alfalfa were sown in each 6"pot (Riviera pot, Marseille, France). Pots of all treatments of the two soil types (unamended, sludge 60 and 120 kgN/ha, N-fertilizer 60 kgN/ha) were inoculated with liquid inoculant (YMB-grown rhizobia and secondary sludge-grown rhizobia) to give an equivalent of 10<sup>8</sup> cells/seed. However, solid inoculants were tested only for unamended soils (without sludge or nitrogen fertilization). For each treatment, uninoculated pots were used as a control. Plants were kept in growth room (16 h days at 20°C and 15°C nights) and irrigated with deionised water as needed. Pots were placed in a randomized complete block design with five replicates for all treatments. Plant growth yields were determined on three cuttings at the beginning of flowering (10-20%). The first cut was done after 60 day-growth, the second cut was done 26 days later and the third cut was done 35 days

after the second cut. Shoot samples were collected, dried at 70°C for 48h, weighed and ground for chemical analysis. Total nitrogen was determined on the five plant replicates and heavy metal and mineral salts were determined on plant composite samples by using the same methodology as indicated for sludge. At the end of experiment, roots were washed free of soil and the number, the colour and size of root nodules were recorded to calculate the nodulation index as indicated in Table 1. MPN evaluation was also done in soils at the end of experiments.

Except for MPN, heavy metals and salts analysis, data were subjected to analyses by using least significant difference (LSD) test. Orthogonal contrasts were used to detect differences among treatments.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Sludge and soil chemical characteristics**

Table 2 lists the characteristics of the original soils. For both soils, the pH values were similar (around pH 6). Total nitrogen and total carbon were also almost similar and they gave a small variation in C/N ratio (12.1 and 12.2 respectively for Kamouraska and Saint-André soils). However, total phosphorus for Saint-André was almost two-fold higher than for Kamouraska. Heavy metal concentrations were similar for both soils except for Al and Fe. The Al concentration was 1036 and 1490 mg/kg respectively for Kamouraska and Saint-André. However, Fe concentration was lower in Saint-André (217 mg/kg) than in Kamouraska (347 mg/kg). The numbers of rhizobia in the soil samples estimated by the most probable number were similar in both soils ( $1.5 \times 10^3$  and  $2.26 \times 10^3$  respectively for Kamouraska and Saint-André soils).

Unlike soils, the secondary sludge from Communaute Urbaine de Quebec contained high concentrations of carbon, nitrogen, phosphorus and mineral salts (Table 3). These values gave a C/N ratio of 7.7. The concentrations of Ca, Mg and K were also higher. Moreover, sludge contain higher concentrations of heavy metals but at acceptable levels for agricultural use as prescribed by the environment of Quebec and the European Economic Community (Gouvernement du Quebec, 1991; McGrath et al., 1994).

#### **3.2. Assessment of nodulation of alfalfa and the population size of *S. meliloti***

Table 4 shows the nodulation index and the MPN of some soil samples at the end of experiments. The observation of alfalfa roots showed that all plants were nodulated efficiently with all nodules pink indicating active N<sub>2</sub>-fixation. However, nodulation of alfalfa was closely related to the soil type. The level of nodulation was more important for Kamouraska soil (the nodulation index ranging between 6 and 12) than in Saint-André soil (the nodulation index ranging between 2 and 12). For the uninoculated and unamended treatments, plants showed only a few large nodule clusters located along the secondary roots. Except for N-fertilised soils, plants in amended soils showed more large nodules than in the unamended soil which was reflected in the high nodulation index.

The inoculation was successful, with large or medium pink nodules spread throughout the entire root system. However, in the case of the N-fertilised Saint-André soil, the nodule number remain similar to the uninoculated sample and dominated with small size nodules which gave a nodulation index of 4 and 2 respectively for the inoculation with YMB-grown rhizobia and the inoculation with the sludge-grown rhizobia.

At the end of the experimen, according to Table 4, the number of indigenous rhizobial in Kamouraska soil was similar to that in Saint-André soil ( $4.83 \times 10^3$  and  $3.25 \times 10^3$  cfu/g dry soil respectively). However, the rhizobial population increased by applying 60KgN/ha of sludge and reached  $2.57 \times 10^4$  and  $1.72 \times 10^4$  cfu/g dry soil. These values are one log higher than values obtained in the original soils ( $2.26 \times 10^3$  cfu/g dry soil for Kamouraska and  $1.5 \times 10^3$  cfu/g dry soil for Saint-André) but lower than these obtained for the inoculated soil samples. Comparing the two inoculated soils, the MPN test showed that the number of the introduced *S. meliloti* was higher in Kamourska soil compared to Saint-André soil and it was 10 times higher (about  $10^7$  and  $10^6$  ufc/g dry soil respectively for Kamouraska and Saint-André soils). Moreover, for each soil, rhizobia numbers were not significantly different among the examined samples.

### **3.3. Shoot dry weight and nitrogen content**

#### *Alfalfa plants growing in Kamouraska soil*

According to the results of the first cutting, there was no significant differences in the shoot dry weight between inoculated (with liquid or solid) and uninoculated plants (Table 5). However, the type of liquid inoculant (YMB or sludge) showed an effect for the unamended soils because plants had a significant higher nitrogen content when inoculated with rhizobia produced in YMB. Values of both shoot dry weight and nitrogen content obtained by fertilization and by a sludge amendment with a rate of 60 kgN/ha were statistically similar to these obtained for unamended soil. However, for all inoculated or uninoculated treatments, the 120 kgN/ha sludge amendment rate gave a significant enhancement of the shoot weight and the nitrogen content. For example, in inoculated treatment, the addition of 120 kgN/ha of sludge, increased the shoot weight and the nitrogen content respectively from 2.68 to 4.08 g/pot and from 74 to 123 mg/pot. Moreover, compared to a rate of 60 kgN/h of sludge or fertilizer, the 120 kgN/ha showed a significant improvement of shoot dry weight and nitrogen content.

At the second cut, shoot dry weight and nitrogen values were increased for all samples and as indicated for the first cut the inoculation and the inoculant types had no significant effect on plant growth. Similar to the first cut, the contrast analyses indicated that the shoot dry weight and nitrogen fixation tend to increase by increasing the amendment rate. For example, with alfalfa inoculated with sludge-grown rhizobia the shoot weight increased form 5.4 g/pot to 6.68 g/pot and the nitrogen yield from 128 to 171 mg/pot while doubling the sludge rate (from 60 to 120 kgN/ha of sludge). The N-fertilizer (60 kgN/ha) gave a similar effect on the plant growth as the sludge rate of 60 kgN/ha but enhanced slightly the shoot dry weight and the nitrogen content compared to the unamended samples.

In comparison to the first and the second cut, the third cut indicated greatest shoot dry weights (ranged between 7.42 and 9.83g/pot) and nitrogen contents (ranged between 171 and 269 mg/pot). However, there were no significant differences among values obtained for unicoculated and inoculated plants. In addition to that, the amendment and the fertilization of soil tended to enhance the nitrogen content but not the shoot dry weight. The values obtained by adding 60 kgN/ha of sludge were statistically higher from those obtained with the fertilizer indicating that sludge gave a greater improvement of plant growth than N-fertilizer. As observed for the first and the second cut, 120 kgN/ha of sludge gave also the highest improvement.

The total shoot weight and the total nitrogen accumulation during the whole experiment (sum of the three cuts) showed the same tendency as indicated for each individual cut. However, a significant difference was observed between 60 kgN/ha sludge and fertilizer indicating that fertilizer was less efficient than sludge.

#### Alfalfa plants growing in Saint-André soil

The growth of alfalfa on Saint-André soil, showed that both shoot dry weight and total nitrogen content (Table 6) were generally lower than values obtained in Kamouraska soil (Table 5). However, as in Kamouraska soil both the shoot dry weight and the nitrogen content increased from the first to the third cut. This was observed specially at the third cut and this can be attributed to the soil characteristics. Contrasts indicated no significant differences between inoculated and uninoculated plants. Generally, all inoculants gave similar yields except differences in shoot dry weight between liquid inoculants (YMB and sludge) at the first cut and between solid inoculants (peat and sludge) at the third cut.

The sludge amendment influenced the plant growth. For the first cut, 120 kgN/ha of sludge had the highest improvement for both dry weight and nitrogen content in comparison to 60 kgN/ha of sludge or N-fertilizer. For example, a shoot dry weight of 4.69 g/pot and a nitrogen content of 152 mg/pot were obtained for soil inoculated with YMB-grown rhizobia and amended with 120 kgN/ha of sludge. These values were almost 1.5 time the values obtained with sludge rate of 60 kgN/ha.

At the second cut, the effect of the N-fertilizer had the same tendency as indicated for the first cut and remained significantly lower while compared to the sludge amendment treatments (60 and 120 kgN/ha). At the third cut, the contrast analyses suggested the same conclusions as observed for the first and the second cuts except for the comparison of YMB solid inoculant to sludge-solid inoculant. In fact, YMB solid inoculant gave higher shoot dry weight (6.56 g/pot) but the nitrogen content (82 mg/pot) was statistically similar to that given by sludge-solid inoculant (99 mg/pot).

Also, the total yields obtained from the three cuts, showed the beneficial effect of the sludge application to soil which improved plant growth more than the use of the N-fertilizer and this benefit increased with increasing the sludge rate.

### 3.4. Macronutrients and heavy metals uptake by alfalfa plants

#### Macronutrients uptakes

Shoot concentrations of macronutrients (P, Mg, K and Ca) and heavy metals are presented in Tables 7 and 8 respectively for Kamouraska and Saint-André soils. In both soils, phosphorus concentrations were similar among treatments at the first cut. However, the sludge amendment caused an increase of P uptake at the third cut. For example, at the first cut in Kamouraska soil, the phosphorus concentrations ranged between 1227 mg/kg (for 60 kgN/ha of sludge and uninoculated) and 1531 mg/kg (for 120 kgN/ha of sludge and uninoculated). These concentration increased at the third cut to reach values ranged between 1663 mg/kg (for unamended) and 2354 mg/kg (for 120 kgN/ha of sludge and uninoculated). The same tendency was observed for the Saint-André soil. Since the values were similar for inoculated and uninoculated soils, it seems that the inoculation had no effect on P uptake.

For both soils, K, Ca and Mg concentrations were generally similar among all treatments at each cut, but they were slightly lower at the third cut than at the first cut. However, K and Mg uptakes were higher in the Kamouraska than in Saint-André soil. For example at the first cut, K values ranged between 22361 mg/kg (for 120 kgN/ha of sludge and inoculated by YMB-grown rhizobia) and 25094 mg/kg (for 60 kgN/ha of sludge and inoculated by sludge-grown rhizobia) and between 19995 mg/kg (for unamended) and 22756 mg/kg (for 60 kgN/ha of sludge and inoculated by sludge-grown rhizobia) respectively for Kamouraska and Saint-André soil.

#### Heavy metals uptake

Generally , metal (Cu, Zn, Fe, Al and Mn) uptakes by alfalfa were higher at the first cutting than at the third cutting in both soils (Table 7 and 8). In Kamouraska soil, the Cu concentrations from amended treatments were similar to the unamended and uninoculated soil at the first cut. Although, generally lower than at the first cut, values of the third cut showed a positive effect of sludge on Cu uptake. Also, the Cu content showed a tendency to decrease from 10 mg/kg (uninoculation) to 8 mg/kg (inoculated with sludge-grown rhizobia) suggesting an effect of inoculation. Plants cultivated in Saint-André soil presented Cu uptakes slightly lower than in Kamouraska soil, but the same tendency was observed among cuts and among treatments. The Zn

concentrations were two times higher for Kamouraska (31 to 34 mg/kg for the first cut) than in Saint-André soil (12 to 16 mg/kg for the first cut). For both soils, the values at the third cut decreased by about 50% in comparison to the first cut.

The highest concentrations of metals in alfalfa shoots were noted for Fe, Al and Mn. Fe shoot concentrations were similar in both soils (Saint-André: 83 to 108 mg/kg and Kamouraska: 85-117 mg/kg) at the first cut. In each soil, Fe concentration accumulated by plants was slightly lower at the third cut. Sludge amendment tended to enhance the Fe uptake. As observed for Fe, the uptakes of Al and Mn were also affected by the sludge amendments, but they were considerably reduced at the third cut.

#### **4. DISCUSSION**

The main objective of this work was to evaluate the potential of using sludge in the legume inoculant production. As we reported earlier, sludge is a cheap and good raw material generated by industrial and municipal wastewater treatment plants, which can support the rhizobial growth and could substitute completely the standard medium (Ben Rebah et al., 2000a, 2000b). Also sludge has a good potential as a carrier for rhizobia (Ben Rebah et al., 2001). Hence, the use of sludge as a substrate and carrier for rhizobia is a new alternative of waste recycling. This alternative with some other new applications such as the conversion of sludge into building materials (Tay and Show, 1992) and oils (Campbell and Martinelli, 1991) and the production of biopesticides (Sachdeva et al., 2000) helps to minimise the environmental problem of sludge disposal. In this study we demonstrated that the use of sludge-based inoculants might have the same potential as YMB-based inoculants on alfalfa growing in unamended and sludge amended soils. The inoculation was successful as demonstrated by the enhancement of nodulation and by the increase of rhizobial population in soils after inoculation. Solid or liquid sludge or YMB-based inoculant did not affect the efficiency of nodulation. Therefore, the inoculation with  $10^8$  cells/seed seems to be beneficial because it increased the nodulation indexes and the rhizobial number. In all inoculated treatments the number of rhizobia was about one log higher in Kamouraska than in Saint-André soil. This may be attributed to the composition of soils. The clay soil (Kamouraska) may have a greater capacity of adsorption than sandy soil such as Saint-André.

Independently of the soil type, the amendment with secondary sludge had a beneficial effect on indigenous rhizobia and the enhancement of their numbers in both soils is confirmed by other workers (Kinkle et al., 1987 and Heckman et al., 1987a, 1987b). Because sludge contains numerous components required for microbial growth, it may increase the activity of soil microorganisms (Speaker and Sopper, 1988; Pichtel and Hayes, 1990). However, other studies reported that sludge might affect negatively indigenous rhizobia. For example, significant reduction in number of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* was found in soils previously treated with sewage sludge containing heavy metals (Giller et al., 1989, 1993). These results can not be compared to our results because it reported the problem of long-term sludge application while the present study dealt with the short-term effect of sludge application.

The sludge amendment had a positive effect in increasing nodulation in both soils, even in the uninoculated treatments. However, compared to sludge amendment, nitrogen fertiliser seemed to reduce the nodulation index in Saint-André soil. The reduction of the nodulation index can be attributed to the fact that sludge amendment can be more beneficial because it improves the structure and the water holding capacity of soils and the differences between the two soils may be related to their characteristics. Generally, sandy soil (Saint-André) contributed to fast leaching of fertilizer nutrient and rhizobia during the irrigation of plants.

The sludge application increased the population of indigenous rhizobia and the nodulation index in uninoculated treatments while it increased only the nodulation index in inoculated treatments. Since the nodulation index is a qualitative value, we can not conclude if there is a correlation between the number of rhizobia, the rate of sludge amendment and the nodulation index. However, the most important conclusion which confirms the quality of the sludge-based inoculant (solid or liquid) is the similarity of its nodulation index to that of YMB-based inoculant. In a previous study using the same rhizobial strain A<sub>2</sub> with alfalfa grown in seed growth pouches, the nodulation indexes obtained with sludge-grown rhizobia were, in general, similar to that obtained with YMB-grown rhizobia (Ben Rebah et al., 2000, 2001).

The equivalent quality of the sludge and YMB based inoculants was also confirmed by the similar shoot dry weight and the plant nitrogen content, although the effect of inoculation was not reflected on plant shoot growth. Introducing 10<sup>8</sup>cells/seed in soils

by inoculation did not allow to significantly increase both biomass and nitrogen content. We can suppose that the presence of indigenous soil rhizobia was at acceptable level ( $10^3$  cells/g dry soil) to adequately nodulate the plants and assure optimal symbiotic nitrogen fixation. One important fact after inoculation is the nodulation of the plant by the introduced strain. This fact was observed by the examination of the nodule distribution in the root system. In the uninoculated soils, the nodules formed some clusters along the secondary roots but in the inoculated soils the nodules were spread throughout the entire root system indicating a more homogenous distribution of rhizobia in soils close to the root system due to inoculation. It would be important to study the genetic diversity of some isolates of rhizobia from the root system of inoculated and uninoculated plants, which may possibly confirm this conclusion.

The results of present research agreed with those of Ferreira and Castro (1995) and these of Giller et al. (1989) about the effect of sludge amendment on soil rhizobial population. For example, Giller et al (1989) demonstrated that the addition of *R. leguminosarum* bv. trifolii to sludge amended soils enabled the survival of enough rhizobia to establish nodulation. Contrary to the fast growing rhizobia, Bradyrhizobia strains, were negatively affected by the application of high rates of sewage sludge to the soil over the short-term application (Madariaga and Angle 1992 and Reddy et al. 1983).

The increase in dry matter and the nitrogen content of alfalfa growing in sludge amended soils may be attributed to high organic matter content and high macro and micronutrient concentrations. This enhancement also confirms the increase in shoot weight of legumes grown in sludge-amended soil as previously reported by Heckman et al. (1987a; 1987b) and by Ibekwe et al. (1995). Although the presence of available nitrogen in sludge and in standard fertiliser amended soils, the nodulation was not inhibited indicating that the available forms of nitrogen were not enough for supplying the alfalfa plants needs. The same tendency was observed with clover plants cultivated in soils amended with sludge rates ranged from 5 to 60 t/ha (Ferreira and Castro, 1995). The non-inhibition of nodulation by available nitrogen especially high in aerobically digested sludge (rate of 120 kgN/ha) can be related to the maturity of sludge (Diaz-Burgos et al., 1991). The increase of both shoot dry weight and the

nitrogen content in alfalfa plants from the first to the third cut mainly due to the plant establishment. However, sludge maturity can offer also an explanation for the enhancement. In our study the used sludge is non-digested secondary sludge applied directly in liquid form, and was used immediately after the samples were taken. Therefore, it may not too mature to be used as organic fertilizers (Chardas et al., 1991) and plants can not benefit rapidly of its nutrients content. Moreover, sludge can loose nitrogen by evaporation and can have a negative effect on plant growth due to a high salt concentration, greatly increasing the electrical conductivity of the soil solution (Cabral at al., 1991), and to the presence of reduced forms of nitrogen (Cabral at al., 1991; Diaz-Burgos et al., 1991). In the same perspective, Ferreira and Castro (1995) indicated that the sludge application in the first year exerted harmful effects on the growth of clover plants at the highest rate (60 t/h of sludge) but the second year showed beneficial effects, increasing with the increasing of sludge. In our study, the beneficial effect of sludge increased by increasing the application rate. For example, in Kamouraska soil, the total nitrogen enhancement (sum of three cuts) due to the application of 60 kgN/ha of sludge was only 8.1% but was much higher at the rate of 120kgN/ha with of 34.6%. This proves the beneficial effects on legume of the short-term application of sludge.

The better plant yields obtained in Kamouraska soil (clay soil) may be due to its higher water holding capacity than in Saint-André soil (sandy soil). Although the N-fertilizer was used at acceptable level, it had non-significant improvement of plant yields. Moreover, yields obtained by using the standard fertilizer remain much lower compared to the improvement given by the sludge application indicating the lower nutritive value of fertilizer than sludge. This may also be due to the leaching process of mineral nitrogen compounds from soil (specially in sandy soil) which decreases their concentrations in the root zone.

Macroelements (P, Mg, Ca and K) were within the normal range for most small legumes (Mratin et Matocha, 1973). At the first harvest, it seems that phosphorus uptake was limited. This limitation may be attributed to the soil composition, the pH effect and the salinity. To explain the lower content on phosphorus of younger plants of *Glycine wightii*, Willson (1970) mentioned the fixation of phosphorus by sand and the lower rates of phosphorus uptake at pH 7.0. He concluded also that salinity can

reduce the phosphorus concentrations in the leaves and stem of the inoculated plants. In our study, phosphorus uptake increased at the third cut and remained at the acceptable levels for alfalfa. This enhancement may be related to factors controlling the availability of phosphorus such as the irrigation which could saturate the fixation sites in sand and also decrease the pH to a value about 6.0 as indicated by Willson (1970). In our study, the sludge used for the amendment contained a high concentration of mineral salts which could control the behaviour of phosphorus. Because salts are easily leached in soils from the root zone by the irrigation, the plant salt uptakes should diminish with time and this can be responsible of the increasing of phosphorus uptake. This is in agreement with the results obtained for each soil. Moreover, the texture of soil had also an impact on salt uptakes. Soil clay with fine texture (Kamouraska) is able to adsorb and hold more cations reducing the leaching of these elements from soil favouring higher mineral uptakes (K and Mg) than the sandy soil (Saint-André soil). However, the higher concentrations of Ca in plants cultivated in Saint-André indicated that other factors may influence cation uptakes such as the concentration, the interaction and the distribution of each element in soils. For example the concentrations of Al and K affect the uptakes of Ca by plants (Doll and Lucas, 1973).

The total metal content of the soils and sludge were respectful for limits for agriculture application. It was reported that under some conditions such as acid soils, lower organic matter and high base saturation metals become potentially toxic to plant because of the increasing solubility. According to Chaney et al. (1978) the phytotoxicity levels for small legumes were 500 for Mn, 500 for Zn, 40 for Cu and 50 mg/kg for Ni. In the present work, shoot analysis showed no possibility of toxicity because the concentrations of Cu, Zn, Fe , Al and Mn were under phytotoxic levels. This could partially explain the increase of dry weight and nitrogen content during the whole experiment. However, according to Angle et al. (1992) the negative responses for short-term application of sludge may be caused by sludge-borne salts and not by sludge-borne metals. Therefore, heavy metals were not considered to be a negative factor in this study. However, their concentrations in shoots seem to be influenced by the cut, the sludge rate, the inoculation, and by the soil types. The decrease of some metal shoot concentrations at the third cut can be attributed to the reduction of metals concentration in soils as a result of the leaching process by irrigation. The sludge

application seems to affect the metal uptakes without any correlation between uptakes and sludge rates. The difference of results among treatments can be partially attributed to the fact that metals are not uniformly distributed in soils. Moreover, the variability from one soil to another may be related to their texture and composition. Cu and Zn, seem to be affected by inoculation especially in the case of Kamouraska soil. Inoculation tends to decrease the metal uptakes by alfalfa. This can be related to the higher rhizobia concentration in soil. It was known that rhizobia produce thick polysaccharide capsule that binds and sequesters metals preventing uptake into cell (Beveridge and Doyle, 1989). The presence of higher rhizobia concentration in soil and consequently polysaccharides may affect the mobility and the availability of metal for plants.

## 5. CONCLUSIONS

This study showed that the inoculation of alfalfa with sludge-grown *S. meliloti* was beneficial for increasing nodulation at the same level as the inoculation with YMB-grown *S. meliloti*. Moreover, sludge based inoculant can be used in liquid or in solid form without affecting the nodulation efficiency. Sludge may also be used as an organic fertilizer with great beneficial effect on rhizobial number, nodulation, shoot dry weight and nitrogen content of alfalfa. The current study showed that none of the parameters examined were negatively affected neither by the application of sludge (salts and heavy metals contents) nor by the use of sludge-based inoculants.

**Acknowledgement.** The authors sincerely thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant A 4984) for providing financial assistance to conduct the research work

## REFERENCES

- Angle J. S., Madariaga G. M. and Heger E. A. 1992. Sewage sludge effects on growth and nitrogen fixation of soybean. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 14: 231-239.
- APHA, American Public Health Association. 1992. Standard methods for examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Ben Rebah F., Tyagi R. D. and Prévost D. 2000. Wastewater sludge as a new medium for the growth of rhizobia. Submitted for Wat. Env. Res.

Ben Rebah, F., Tyagi, R. D. and Prévost, D. 2001. Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. Canadian Journal of Microbiology.47: 467-474.

Ben Rebah F., Tyagi R. D. and Prévost D. 2001a. Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia : The effect of storage conditions on survival of Sinorhizobium meliloti. Submitted for Bioresources Technology. Submitted for publication.

Beveridge T. J. and Doyle R. J. 1989. Metals ions and bacteria. John Wiley and Sons, New York.

Bradley J. W., Kyosai, S., Matthews P., Sato K. and Webber M. 1992. World wide sludge management practices. In: Municipal sewage sludge management: processing, utilization and disposal. C. LueHing, D.I.L Zejjiz and T. Kuchenrither (eds), Water Quality Management Libraiy, Vol.4, Technomic Publishing Co., Inc.; Lancaster, Pennsylvanie, U.S.A., Chap. 13, pp. 537-657.

Campbell H. W. and Martinoli D. k. 1991. Canada's oil-from-sludge technology. Wat. Environment Technol.. 3 : 4-66.

Chardas G., Karayianni-Christou M., Kollias A., Nikolaou T. and Papadopoulos N. 1991. The use of sewage sludge from the center of biological cleaning, in Metamorphosis Attiki, for the improvement of soil fertility and the protection of the environment. In Treatment and Use of Sewage and Liquid Agricultural Wastes (P. L'Hermite, Ed). pp. 388-392. Elsevier Applied Science. London.

Cabral F., Vasconcelos E., Pinto F. C. and Santoss J.Q. 1991. Agricultural use of pollutant organic wastes. In Treatment and Use of Sewage and Liquid Agricultural Wastes (P. L'Hermite, Ed). pp. 425-428. Elsevier Applied Science. London.

Chaney R. L., Hunderman R. L., Palmer W. T., Small. R.J., White M.C. and Decker A. M. 1978. Plant accumulation of heavy metals and phytotoxic resulting from utilisation of sewage sludge and sludge compost on cropland. P. 86-97. In Proc. National

Conference on composting of Municipal Residues and Sludges. Information Transfer, Rockville, MD.

CPVQ. Conseil des productions végétales du Québec. 1994. Grilles de fertilisation, Gouvernement du Québec. Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'alimentation. 91p.

Doll E. C. and Lucas R. E. 1973. Testing soil for potassium, calcium and magnesium. In Sol Testing and Plant Analysis. L.M. Walsh and J.D. Beaton (eds). pp. 133-151. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin USA.

Diaz-Burgos M. A., Ceccanti B. and Polo A. 1991. Changes in the inorganic nitrogen fraction during sewage sludge composting. In Treatment and Use of Sewage and Liquid Agricultural Wastes (P. L'Hermite, Ed). pp. 513-519. Elsevier Applied Science. London.

Ferreira E. M. and Castro I. V. 1995. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium Subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. Soil Biology and Biochemistry. 27: 1177-1183.

E.P.A, Environmental Protection Agency. 1993. Standards for the use and disposal of sewage sludge, 40 CFR Parts 257, 403 and 503, Final Rule. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A.

Giller K. E., McGrath S. P. and Hirsch P. R. 1989. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective rhizobium. Soil Biology and Biochemistry. 21: 841-848.

Giller K. E., Nussbaum R., Chaudri A. M. and McGrath S. P. 1993. Rhizobium meliloti is less sensitive to heavy metal contamination in soil than *R. leguminosarum* bv. Trifolii or *R. loti*. Soil Biology and Biochemistry. 25: 273-278.

Golueke C. G. 1992. Bacteriology of composting. Biocycle January. 33: 55-57.

Gouvernement du Québec. 1991. Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales - Guide de bonnes pratiques. Ministère de

l'Environnement, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, juillet, 91 pages.

Gross T. S. C. 1993. Thermal drying of sewage sludge. J. Institution of Water and Environmental Mangement. 7: 255-261.

Heckman J. R., Angle J. S. and Chaney R. L. 1987a. Residual effects of sewage sludge on soybean: I. Accumulation of heavy metals. J. of Environmental Quality. 16 : 113-117.

Heckman J. R., Angle J. S. and Chaney R.L. 1987b. Residual effects of sewage sludge on soybean: II. Accumulation of soil and symbiotically fixed nitrogen. J. Environmental. Quality. 16: 117-124.

Huang C., Bazzaz F. A. and Vanderhoef L. N. 1974. The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. Plant Physiology 54: 122-124.

Ibekwe A. M., Angle J. S., Chaney R. L. and Van Berkum P. 1995. Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. J. of Environ. Qual. 24: 1199-1204.

Kinkle B. K., Angle J. S. and keysere H. H. 1987 Long-term effects of metal sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. Applied and Environmental microbiology. 53: 315-319.

Martin W. E. and Matocha J. E. 1973. Plant analysis as an aid in the fertilization of forage crops. In Soil Testing and Plant Analysis. L.M. Walsh and J.D. Beaton (eds). pp. 393-426. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin USA.

Madariaga G. M. and Angle J. S. 1992 Sludge-born salt effects on survival of *Bradyrhizobium japonicum*. J. of Environmental Quality. 21 : 276-280.

McGrath S. P., brooks P. C. and Giller K. E. 1988. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. Soil Biology and Biochemistry 20: 415-424.

- McGrath S.P., Chang A. C., Page A. L., Witter E. 1994. Land application of sewage sludge : scientific perspectives of heavy metal loading limits in Europe and the United States. Environ. Rev., 2, 108-118.
- Pagliai M., Guidi G., La Marca M., Giachetti M. and Lucameute G. 1981 Effects of sewage sludges and compost on soil porosity and aggregation. J. of Environmental Quality. 10: 556-561.
- Pichtel J. R. and Hayes J. M. 1990. Influence of fly ash on soil microbial activity and populations. Journal of Environmental Quality. 19: 593-597.
- Reddy G. B. Cheng C. N. and Dunn S. J. 1983. Survival of Rhizobium japonicum in soil-sludge environment. Soil Biology and Biochemistry. 15: 343-345
- Sachdeva, V., Tyagi, R. D. and Valero, J. R. 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilisation/disposal. Water Sci. Technol. 42: 211-216.
- Speaker E. M. and Sopper W. E. 1988. Municipal sludge for minespoil reclamation : I. Effects on microbial populations and activity. J. of Environmental Quality. 17: 591-597.
- Tay J.H. and K.Y. Show. 1992. Reuse of wastewater sludge in manufacturing non-conventional construction materials - an innovative approach to ultimate sludge disposal. Wat. Sci. Technol. 26 : 1165-1174.
- Tran, T. S. and Simard R. R. 1993. Mehlich III. Extractable elements pages 43-49 in M.R. Carter, ed Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Vesilind P. A. 1974. Treatment and Disposal of Wastewater Sludges. Ann Arbor Sci. Publishers, Ann Arbor, Mich.
- Vidyarthi A.S., Desrosiers M., Tyagi R. D. and Valero J. R. 2000. Foam control in biopesticide production from sewage sludge. J. industrial Microbiology and Biotechnology. 25: 86-92.

- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme handbook no. 15. Blackwell Scientific Publication, Ltd., Oxford.
- Webber M. D. 1988. Controle de la concentration de métaux lourds dans les sols après épandage de boues d'égout municipales: l'approche canadienne. Sciences et Techniques de l'Eau, 21: 45-51.
- Willson J. R. 1970. Response to salinity in Glycine: Some effects of range of short-term salt stresses on the growth, nodulation, and nitrogen fixation of Glycine wghtii (Formerly javanica). Aust. J. Agric. Res. 10: 571-582.
- Woomer P., Bernnet J. and Yost R. 1990. Overcoming the inflexibility of most-probable number procedures. Agronomy Journal 82: 349-353.
- Wei Q. F., Lowery B. and Peterson A. E. 1985. Effect of sludge application on physical proprieties of silty clay loam soil. J. of Environmental Quality 14: 178-180

**Table 1** Determination of the nodulation index.

| Nodule size   | Value (A) |
|---------------|-----------|
| Small         | 1         |
| Medium        | 2         |
| Large         | 3         |
| Nodule Colour | Value (B) |
| White         | 1         |
| Pink          | 2         |
| Nodule number | Value (C) |
| Few           | 1         |
| Several       | 2         |
| Many          | 3         |

Nodulation index = A\*B\*C ≤ 18

**Table 2.** Soils characteristics

| <b>Item</b>     | <b>Kamouraska</b>  | <b>Saint-André</b> |
|-----------------|--------------------|--------------------|
| pH              | 5.94               | 6.08               |
| Total N (mg/kg) | 2470               | 2140               |
| Total C (mg/kg) | 29980              | 26160              |
| Total P (mg/kg) | 43                 | 78                 |
| Al (mg/kg)      | 1036               | 1490               |
| Cu (mg/kg)      | 4                  | 2                  |
| Zn (mg/kg)      | 3                  | 2                  |
| Mn (mg/Kg)      | 18                 | 16                 |
| Fe (mg/kg)      | 347                | 217                |
| K (mg/kg)       | 263                | 244                |
| Ca (mg/kg)      | 757                | 433                |
| Mg (mg/kg)      | 1430               | 98                 |
| MPN(ufc/g soil) | $2.26 \times 10^3$ | $1.5 \times 10^3$  |

**Table 3.** Total composition of sludge, quantity added to soil and recommended levels of heavy metals for agricultural practices

| Item              | Sludge composition<br>(mg/kg) | Quantity added <sup>1</sup><br>(Kg/ha) | Recommended levels<br>(mg/kg) |                      |
|-------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|----------------------|
|                   |                               |  | MENVQ <sup>2</sup>            | E.E. C. <sup>3</sup> |
| Total C           | 404380                        | 1460                                   |                               |                      |
| Total N           | 52570                         | 190                                    |                               |                      |
| N-NH <sub>4</sub> | 947                           | 3.42                                   |                               |                      |
| N-NO <sub>3</sub> | 19.74                         | 0.07                                   |                               |                      |
| Total P           | 20866                         | 75,33                                  |                               |                      |
| Ca                | 20492                         | 73,98                                  |                               |                      |
| Mg                | 4066                          | 14,68                                  |                               |                      |
| K                 | 7849                          | 28,33                                  |                               |                      |
| Al                | 21703                         | 78,35                                  | a                             |                      |
| Cd                | 2                             | 0,01                                   | 10-15                         | 20-40                |
| Cr                | 86                            | 30,91                                  | 500-1000                      | a                    |
| Cu                | 260                           | 0,94                                   | 600-1000                      | 1000-1750            |
| Fe                | 13175                         | 47,56                                  | a                             | a                    |
| Mn                | 175                           | 0,63                                   | 1500-3000                     | a                    |
| Ni                | 15                            | 0,05                                   | 100-180                       | 300-400              |
| Pb                | 46                            | 0,17                                   | 300-500                       | 750-1200             |
| Zn                | 415                           | 1.50                                   | 1750-2500                     | 2500-4000            |

<sup>1</sup> Based on 3.61 metric ton of sludge/ha application rate equivalent to plant available nitrogen of 60 kgN/ha

<sup>2</sup> Government of Quebec (1991).

<sup>3</sup> European Economic Community (McGrath et al., 1994).

a : no limit.

**Table 4.** Nodulation index of alfalfa and rhizobial number in soils at the end of the experiment

| <b>Treatments</b>  | <b>Kamouraska soil</b> |                         | <b>Saint-André soil</b> |                         |
|--|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|  | <b>NI/pot</b>          | <b>MPN (cfu/g soil)</b> | <b>NI/pot</b>           | <b>MPN (cfu/g soil)</b> |
| <b><i>Uninoculated</i></b>   |                        |                         |                         |                         |
| Unamended  | 6                      | $4.83 \times 10^3$      | 4                       | $3.25 \times 10^3$      |
| Sludge 60 kgN/ha   | 12                     | $2.57 \times 10^4$      | 12                      | $1.72 \times 10^4$      |
| Sludge 120 kgN/ha  | 12                     | n                       | 12                      | n                       |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 6                      | n                       | 2                       | n                       |
| <b><i>Inoculated with YMB-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b>    |                        |                         |                         |                         |
| Unamended  | 8                      | $2.06 \times 10^7$      | 8                       | $2.27 \times 10^6$      |
| Sludge 60 kgN/ha   | 12                     | $2.02 \times 10^7$      | 4                       | $2.24 \times 10^6$      |
| Sludge 120 kgN/ha  | 12                     | n                       | 12                      | n                       |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 12                     | n                       | 4                       | n                       |
| <b><i>Inoculated with sludge-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b> |                        |                         |                         |                         |
| Unamended  | 8                      | $1.62 \times 10^7$      | 8                       | $5.06 \times 10^6$      |
| Sludge 60 kgN/ha   | 12                     | $1.25 \times 10^7$      | 8                       | $6.67 \times 10^6$      |
| Sludge 120 kgN/ha  | 12                     | n                       | 12                      | n                       |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 12                     | $5.72 \times 10^7$      | 2                       | $5.17 \times 10^6$      |
| <b><i>Inoculated with solid inoculant</i></b>                          |                        |                         |                         |                         |
| Unamended + YMB based inoculant  | 12                     | n                       | 8                       | n                       |
| Unamended+ sludge based inoculant                                      | 12                     | n                       | 12                      | n                       |

n: not determined

**Table 5.** Shoot dry weight and nitrogen content for alfalfa cultivated in Kamouraska soil

| Treatments   | Shoot dry weight ( $\text{g pot}^{-1}$ ) |         |         |        | Nitrogen content ( $\text{mg pot}^{-1}$ ) |         |         |        |
|--|--|---------|---------|--------|---|---------|---------|--------|
|  | 1st cut                                  | 2nd cut | 3rd cut | Total  | 1st cut                                   | 2nd cut | 3rd cut | Total  |
| <b><i>Uninoculated</i></b>   |  |         |         |        |   |         |         |        |
| Unamended  | 2.68                                     | 4.66    | 8.49    | 15.83  | 74  | 112     | 205     | 390    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 3.16                                     | 5.10    | 8.00    | 16.26  | 89  | 110     | 222     | 422    |
| Sludge 120 kgN/ha  | 4.08                                     | 6.50    | 8.93    | 19.51  | 123                                       | 164     | 238     | 526    |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 3.11                                     | 5.29    | 8.00    | 16.40  | 96  | 125     | 188     | 409    |
| <b><i>Inoculated with YMB-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b>    |  |         |         |        |   |         |         |        |
| Unamended  | 3.04                                     | 4.17    | 7.82    | 15.03  | 95  | 121     | 208     | 424    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 3.23                                     | 5.28    | 9.26    | 17.77  | 100                                       | 125     | 240     | 465    |
| Sludge 120 kgN/ha  | 4.68                                     | 6.26    | 9.35    | 20.29  | 154                                       | 158     | 269     | 582    |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 3.04                                     | 5.12    | 8.32    | 16.48  | 89  | 116     | 175     | 379    |
| <b><i>Inoculated with sludge-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b> |  |         |         |        |   |         |         |        |
| Unamended  | 2.13                                     | 4.70    | 8.17    | 15.00  | 67  | 114     | 208     | 389    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 3.16                                     | 5.40    | 9.83    | 18.39  | 92  | 128     | 253     | 472    |
| Sludge 120 kgN/ha  | 3.97                                     | 6.68    | 8.44    | 19.09  | 121                                       | 171     | 260     | 553    |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 3.18                                     | 4.98    | 7.42    | 15.58  | 90  | 122     | 171     | 383    |
| <b><i>Inoculated with solid inoculant</i></b>                          |  |         |         |        |   |         |         |        |
| Unamended + YMB based inoculant  | 3.10                                     | 4.66    | 8.89    | 16.65  | 89  | 123     | 218     | 431    |
| Unamended + sludge based inoculant                                     | 2.77                                     | 4.94    | 8.23    | 15.94  | 86  | 119     | 205     | 410    |
| <b>LSD (0.05%)</b>   | 0.65                                     | 0.90    | 1.41    | 2.10   | 22  | 21      | 28      | 43     |
| <b>Contrast (significance probability)</b>                             |  |         |         |        |   |         |         |        |
| YMB liq ino. vs Slud liq ino.  | NS                                       | NS      | NS      | NS     | 0.0480                                    | NS      | NS      | NS     |
| YMB soli ino. vs Slud soli ino.  | NS                                       | NS      | NS      | NS     | NS  | NS      | NS      | NS     |
| Liq ino. vs Soli ino.  | NS                                       | NS      | NS      | NS     | NS  | NS      | NS      | NS     |
| Ino. vs Unino.(Unamen.)  | NS                                       | NS      | NS      | NS     | NS  | NS      | NS      | NS     |
| Ino. vs Unino.(Amen+fert.)   | NS                                       | NS      | NS      | NS     | NS  | NS      | NS      | NS     |
| Slud.120 vs Slud.60, Fert.60   | 0.0001                                   | 0.0001  | 0.0080  | 0.0001 | 0.0001                                    | 0.0001  | 0.0001  | 0.0001 |
| Slud.60 vs Fert.60   | NS                                       | NS      | NS      | 0.0320 | NS  | NS      | 0.0001  | 0.0001 |

NS: not significant at P&lt;0.05

**Table 6.** Shoot dry weight and nitrogen content for alfalfa cultivated in Saint-André soil

| Treatments   | Shoot dry weight ( $\text{g pot}^{-1}$ ) |         |         |        | Nitrogen content ( $\text{mg pot}^{-1}$ ) |         |         |        |
|--|--|---------|---------|--------|---|---------|---------|--------|
|  | 1st cut                                  | 2nd cut | 3rd cut | Total  | 1st cut                                   | 2nd cut | 3rd cut | Total  |
| <b><i>Uninoculated</i></b>   |  |         |         |        |   |         |         |        |
| Unamended  | 2.53                                     | 3.37    | 4.8     | 10.7   | 65  | 81      | 99      | 245    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 3.11                                     | 4.88    | 6.52    | 14.51  | 98  | 111     | 159     | 368    |
| Sludge 120 kgN/ha  | 4.35                                     | 6.65    | 8.36    | 19.36  | 141                                       | 146     | 195     | 481    |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 2.62                                     | 3.04    | 4.09    | 9.75   | 62  | 67      | 90      | 219    |
| <b><i>Inoculated with YMB-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b>    |  |         |         |        |   |         |         |        |
| Unamended  | 2.46                                     | 2.82    | 5.11    | 10.39  | 68  | 74      | 116     | 257    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 2.87                                     | 5.63    | 6.75    | 15.25  | 96  | 132     | 157     | 385    |
| Sludge 120 kgN/ha  | 4.69                                     | 6.80    | 7.73    | 19.22  | 151                                       | 154     | 179     | 486    |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 2.41                                     | 2.99    | 4.60    | 10.00  | 76  | 60      | 93      | 229    |
| <b><i>Inoculated with sludge-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b> |  |         |         |        |   |         |         |        |
| Unamended  | 2.59                                     | 3.61    | 4.70    | 10.90  | 71  | 81      | 98      | 251    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 3.55                                     | 5.43    | 6.78    | 15.76  | 123                                       | 107     | 167     | 397    |
| Sludge 120 KgN/ha  | 4.55                                     | 6.57    | 7.79    | 18.91  | 137                                       | 142     | 176     | 455    |
| Fertiliser 60 kg/ha  | 3.07                                     | 2.89    | 4.68    | 10.64  | 86  | 62      | 97      | 245    |
| <b><i>Inoculated with solid inoculant</i></b>                          |  |         |         |        |   |         |         |        |
| Unamended + YMB based inoculant  | 2.53                                     | 3.10    | 4.55    | 10.18  | 71  | 82      | 112     | 266    |
| Unamended + sludge based inoculant                                     | 2.70                                     | 3.81    | 6.56    | 13.07  | 77  | 99      | 146     | 322    |
| <b>LSD (0.05%)</b>   | 0.68                                     | 0.88    | 1.45    | 2.25   | 26  | 22      | 48      | 69     |
| <b>Contrast (significance probability)</b>                             |  |         |         |        |   |         |         |        |
| YMB liq ino. vs Slud liq ino.  | 0.0461                                   | NS      | NS      | NS     | NS  | NS      | NS      | NS     |
| YMB soli ino. vs Slud soli ino.  | NS                                       | NS      | 0.0078  | 0.0133 | NS  | NS      | NS      | NS     |
| Liq ino. vs Soli ino.  | NS                                       | NS      | NS      | NS     | NS  | NS      | NS      | NS     |
| Ino. vs Unino.(Unamen.)  | NS                                       | NS      | NS      | NS     | NS  | NS      | NS      | NS     |
| Ino. vs Unino.(Amen+fert.)   | NS                                       | NS      | NS      | NS     | NS  | NS      | NS      | NS     |
| Slud.120 vs Slud.60, Fert.60   | 0.0001                                   | 0.0001  | 0.0001  | 0.0001 | 0.0001                                    | 0.0001  | 0.0001  | 0.0001 |
| Slud.60 vs Fert.60   | 0.0191                                   | 0.0001  | 0.0001  | 0.0001 | 0.0001                                    | 0.0001  | 0.0001  | 0.0001 |

NS: not significant at P&lt;0.05

**Table 7.** P, mineral salts and heavy metal concentrations (mg/kg) in alfalfa shoots cultivated in Kamouraska soil

| Treatments  | P    | K     | Mg   | Ca    | Cu | Zn | Fe  | Al | Mn |
|---|------|-------|------|-------|----|----|-----|----|----|
| <b>1st cut</b>  |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| <b>Uninoculated</b>   |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Unamended   | 1323 | 23392 | 3268 | 28003 | 11 | 33 | 85  | 29 | 51 |
| Sludge 60 kgN/ha  | 1227 | 24103 | 3865 | 32265 | 11 | 32 | 107 | 52 | 73 |
| Sludge 120 kgN/ha   | 1531 | 24087 | 3316 | 26330 | 11 | 31 | 92  | 48 | 59 |
| <b>Inoculated with YMB-grown rhizobia (liquid inoculant)</b>    |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Sludge 60 kgN/ha  | 1248 | 23823 | 3581 | 25976 | 11 | 31 | 117 | 76 | 57 |
| Sludge 120 kgN/ha   | 1340 | 22361 | 3576 | 29532 | 10 | 33 | 100 | 50 | 66 |
| <b>Inoculated with sludge-grown rhizobia (liquid inoculant)</b> |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Sludge 60 kgN/ha  | 1230 | 25094 | 3755 | 29580 | 11 | 34 | 107 | 74 | 64 |
| Sludge 120 kgN/ha   | 1255 | 22938 | 3162 | 27690 | 10 | 34 | 90  | 72 | 65 |
| <b>3rd cut</b>  |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| <b>Uninoculated</b>   |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Unamended   | 1663 | 18315 | 2763 | 20493 | 7  | 12 | 67  | 25 | 46 |
| Sludge 60 kgN/ha  | 2244 | 19173 | 2616 | 17123 | 10 | 16 | 73  | 30 | 47 |
| Sludge 120 kgN/ha   | 2354 | 16611 | 3039 | 17144 | 10 | 17 | 78  | 37 | 47 |
| <b>Inoculated with YMB-grown rhizobia (liquid inoculant)</b>    |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Sludge 60 kgN/ha  | 2280 | 15975 | 2826 | 16390 | 8  | 14 | 68  | 21 | 46 |
| Sludge 120 kgN/ha   | 2127 | 17508 | 3313 | 18829 | 9  | 15 | 81  | 31 | 53 |
| <b>Inoculated with sludge-grown rhizobia (liquid inoculant)</b> |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Sludge 60 kgN/ha  | 2078 | 16229 | 2711 | 16463 | 8  | 13 | 75  | 22 | 48 |
| Sludge 120 kgN/ha   | 2232 | 17018 | 3085 | 17501 | 9  | 16 | 86  | 34 | 55 |

**Table 8.** P, mineral salts and heavy metal concentrations (mg/kg) in alfalfa shoots cultivated in Saint-André soil.

| Treatments   | P    | K     | Mg   | Ca    | Cu | Zn | Fe  | Al | Mn |
|--|------|-------|------|-------|----|----|-----|----|----|
| <b>1st cut</b>   |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| <b><i>Uninoculated</i></b>   |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Unamended  | 1342 | 19995 | 1881 | 39557 | 7  | 12 | 83  | 28 | 54 |
| Sludge 60 kgN/ha   | 1161 | 22675 | 2148 | 38080 | 8  | 15 | 108 | 63 | 63 |
| Sludge 120 kgN/ha  | 1192 | 21135 | 2073 | 37092 | 8  | 15 | 102 | 65 | 63 |
| <b><i>Inoculated with YMB-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b>    |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 1503 | 22434 | 2137 | 36348 | 8  | 16 | 88  | 26 | 61 |
| Sludge 120 kgN/ha  | 1267 | 20718 | 1835 | 32563 | 7  | 13 | 92  | 28 | 51 |
| <b><i>Inoculated with sludge-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b> |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 1319 | 22756 | 1848 | 31603 | 7  | 16 | 99  | 38 | 51 |
| Sludge 120 kgN/ha  | 1109 | 21261 | 2076 | 35579 | 8  | 15 | 86  | 31 | 57 |
| <b>3rd cut</b>   |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| <b><i>Uninoculated</i></b>   |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Unamended  | 1915 | 15474 | 1867 | 25929 | 6  | 5  | 62  | 12 | 31 |
| Sludge 60 kgN/ha   | 2619 | 16960 | 2257 | 26408 | 8  | 6  | 77  | 33 | 44 |
| Sludge 120 kgN/ha  | 2169 | 16800 | 2018 | 26544 | 8  | 6  | 69  | 17 | 43 |
| <b><i>Inoculated with YMB-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b>    |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 2364 | 14111 | 2201 | 28822 | 7  | 7  | 79  | 23 | 42 |
| Sludge 120 kgN/ha  | 1969 | 11272 | 2194 | 26548 | 8  | 6  | 71  | 21 | 46 |
| <b><i>Inoculated with sludge-grown rhizobia (liquid inoculant)</i></b> |      |       |      |       |    |    |     |    |    |
| Sludge 60 kgN/ha   | 2338 | 13481 | 2067 | 27376 | 8  | 6  | 68  | 15 | 42 |
| Sludge 120 kgN/ha  | 2023 | 10930 | 2228 | 28681 | 8  | 6  | 71  | 18 | 49 |

## **ANNEXES**

## ANNEXE A

### TECHNIQUES GÉNÉRALES D'ANALYSE

#### 1. TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION DES BOUES

Les caractéristiques des boues utilisées : solides totaux (ST), solides totaux volatils (SV), matières en suspension (MES) et matières volatiles en suspension (MVES) ont été déterminées selon les méthodes standardisées (APHA, 1992). Les MES et MVES ont été déterminés à partir des culots obtenus par centrifugation à 7600 g pendant 15 minutes de 30 ml de chaque boue.

L'azote ammoniacal ( $\text{N-NH}_4$ ) et l'azote Kjeldahl total (TKN) sont obtenus par la même méthode analytique, la différence est que les échantillons destinés à l'analyse de TKN sont préalablement digérés (digestion avec du peroxyde), alors que la filtration avec des filtres de 0.45  $\mu\text{m}$  a été utilisée pour l'obtention de  $\text{NH}_4$  soluble. Les analyses ont été effectuées selon la technique automatisée du Technicon autoanalyzer II (Industrial Method No. 98-70N) basée sur la méthode 417 G de Standard Methods.

Les analyses du phosphore total ont été réalisées selon la technique automatisée du Technicon autoanalyser II (industrial method No.94-70W), basée sur la méthode 424 G de Standard Methods. La digestion avec du peroxyde, est combinée à celle nécessaire à l'analyse du NTK. Le phosphore soluble a été déterminé par la même technique après filtration avec des filtres de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Le carbone organique total et l'azote total ont été évalués par la technique automatisée du Technicon autoanalyzer II (industrial method No. 455-76W/a) basée sur la méthode 505 B de Standard Methods. Pour la détermination du carbone organique dissout (COD), l'échantillon a été filtré en utilisant des filtres de 0.45  $\mu\text{m}$  de diamètre. La DCO est déterminé en utilisant la méthode standard 5220D de APHA (1992).

Les concentrations en métaux (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, Pb et Zn) ont été déterminées après digestion des boues d'épuration en utilisant l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ), l'acide hydrofluorydrique (HF) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (MENVIQ 89.12/213-met. 1.3). Les analyses ont été réalisées par spectrophotomètre à émission de plasma (ICP) (spectrophotomètre modèle Atom Scan 25 de Thermo Jarrell Ash

Corporation) selon la méthode 305 de Standard Methods). Pour contrôler la qualité des analyses, des étalons certifiés étaient digérés et analysés (étalons PACS-1, échantillons de sédiments fournis par le Conseil national de recherches du Canada, CNRC, Ottawa, Ontario).

Le pH été mesuré à l'aide d'un potentiomètre "Fisher Accumet" Model 805 MP.

## 2. TECHNIQUES DE FERMENTATION ET DE DÉNOMBREMENT

### Préparation de l'inoculum de rhizobium

Pour l'obtention d'un inoculum destiné à ensemencer les milieux de cultures à bas de boue, le milieu de base YMB (YMA sans agar) tamponné avec  $K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$  a été utilisé.

Composition de du milieu YMB (Vincent, 1970) :

| Composant              | Quantité |
|------------------------|----------|
| $K_2SO_4$              | 0.5 g    |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O_2$ | 0.2 g    |
| NaCl                   | 0.1 g    |
| Extrait de levure      | 1 g      |
| Mannitol               | 10 g     |
| $H_2O$                 | 1000 ml  |

Le milieu est ajusté à pH 6.9 et autoclavé pendant 20 min. à 121°C.

Pour préparer l'inoculum, dans un Erlenmeyer de 250 ml, 25 ml du milieu YMB ont été déposés stérilement. Par la suite, on ensemence les 25 ml du milieu liquide à partir d'une culture de rhizobioum, sur milieu gélosé (YMA). Le tout est incubé à 29 °C sous agitation constante (200 rpm) pendant 2 (pour la souche à croissance rapide) à 3 jours (pour la souche à croissance lente).

### Culture de rhizobium en Erlenmeyer

La procédure générale et la suivante : un volume de 50 ml de milieu de culture (YMB, boue traitée ou non ) est placé dans un Erlenmeyer de 250 ml. L'échantillon est inoculé avec 3% (V/V) d'inoculum préparé comme déjà indiqué, puis incubé à 29 °C sous agitation constante (200 rpm). Les comptes des bactéries sont déterminés à des

différents intervalles de temps. Après culture, les échantillons sont gardés au froid (-20°C) jusqu'à leur utilisation pour le test de nodulation.

### Dénombrement du rhizobium

Pour suivre la croissance du rhizobium, on utilise la technique de comptage direct sur milieu gélosé en faisant des dilutions décimales successives de l'échantillon. Le compte se fait sur milieu YMA avec Congo rouge (0.25%) :

#### Composition de du milieu YMA avec le Congo rouge

| Composant   | Quantité |
|-------------|----------|
| YMB         | 1000 ml  |
| Agar        | 15 g     |
| Congo rouge | 0.025 g  |

Le milieu est ajusté à pH 6.9 et autoclavé pendant 20 min à 121°C.

Pour ce faire, un volume de 0.5 ml de l'échantillon a été prélevé de l'Erlenmeyer et dilué dans un tube contenant 4.5 ml de solution saline (NaCl 0.85%) préalablement stérilisée. Cette suspension est bien mélangée à l'aide d'un vortex et ensuite un volume de 0.5 ml est prélevé de cette dilution et dilué dans un autre tube contenant la même quantité de la solution saline. La même opération est réalisée afin d'obtenir les dilutions convenables. Un aliquote de 0.1 ml est étalé sur des boites de Pétri contenant le milieu solide (YMA). Seuls les résultats compris entre 30 et 300 colonies sont retenus pour évaluer le nombre de bactéries /ml (ufc/ml). Les Pétris sont incubés à 29 °C. Le comptage des colonies est fait environ après 2 (cas de rhizobium à croissance rapide) à 5 jours (cas de rhizobium à croissance lente) d'incubation.

### 3. TEST DE NODULATION EN SACHETS DE CROISSANCE

#### Solution nutritive pour les plantes

La solution nutritive (sans azote) stérile utilisée contenait par litre d'eau distillée : 174 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 136 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mg de citrate de fer, 493 mg de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 147 mg de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O et 1 ml de la solution de Hoagland :

Solution de Hoagland et Arnon (1938) :

| Composant  | Quantité |
|--|----------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>   | 2.86 mg  |
| MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O                                      | 1.81 mg  |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                                      | 0.22 mg  |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                                      | 0.008 mg |
| H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (85% MoO <sub>3</sub> ) | 0.09 mg  |
| CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                                      | 0.004 mg |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 1000 ml  |
| pH 7   |          |

**Stérilisation des graines**

Les graines de luzerne ont été stérilisées en surface en les trempant successivement dans du méthanol à 95% pendant 30 secondes et dans l'eau de Javel (NaOCl 5 %) pendant 10 minutes. Après cinq rinçages consécutifs avec de l'eau distillée stérile, les semences sont prêtes à être utilisées immédiatement. Pour le cas du graine de pois et de soja l'eau de Javel est remplacée par le peroxyde d'hydrogène 3%.

**Germination des graines et inoculation des sachets**

Les graines de luzerne désinfectées en surface ont été semées dans des sachets de croissance. Chaque sachet contient 30 ml de solution nutritive et 12 graines. Après 2 jours de germination à l'obscurité à 20°C, les plantules étaient sélectionnées pour en conserver cinq d'apparence uniforme par sachet. Les autres graines (soya et pois) ont été semées dans des sachets (cinq graines par sachet), après germination dans le vermiculite stérile. L'inoculation des jeunes plantules se fait avec 2 ml de la culture bactérienne par sachet. Les sachets sont transférés dans une chambre de croissance.

**Conditions de croissance des plantes**

La chambre de croissance a une photopériode de 16 heures avec une température de 20°C le jour et 15°C la nuit. On laisse croître les plantes pendant 28 jours avec arrosage deux fois par semaine avec de l'eau distillée stérile.

## Détermination de l'indice nodulaire

L'indice nodulaire est une valeur qualitative qui tient compte de la grosseur, de la couleur et de nombre des nodules. Il s'agit d'affecter des valeurs pour ces trois variables selon le tableau suivant :

### Calcul de l'indice nodulaire :

| Grosseur des nodules | Valeur (A) |
|----------------------|------------|
| Gros                 | 3          |
| Moyen                | 2          |
| Petit                | 1          |

| Couleur des nodules | Valeur (B) |
|---------------------|------------|
| Rose                | 2          |
| Blanc               | 1          |

| Nombre de nodules | Valeur (C) |
|-------------------|------------|
| Pas de nodules    | 0          |
| Peu de nodules    | 2          |
| Beaucoup          | 3          |

  
| **Indice nodulaire = A\*B\*C ≤ 18** |  |

## ANNEXE B

### RÉSULTATS DE LA CROISSANCE DE RHIZOBIA DANS LES DIFFÉRENTES BOUES

#### Croissance du *S meloliti* (A<sub>2</sub>) dans les boues d'épuration de différentes origines, nombre de cellules (ufc/ml) (p. 77)

| Temps (h) | YMB      | BLKP     | BLKS     | VALP     | VALS     | CUQ      | PPS      |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0         | 2,70E+07 |
| 6         | 3,48E+07 | 3,10E+07 | 3,70E+07 | 2,90E+07 | 3,90E+07 | 1,90E+07 | 2,70E+07 |
| 24        | 2,00E+09 | 2,00E+08 | 6,40E+08 | 1,90E+08 | 1,18E+09 | 1,88E+08 | 4,00E+08 |
| 30        | 4,00E+09 | 3,74E+08 | 1,11E+09 | 8,80E+07 | 2,32E+09 | 6,80E+08 | 9,50E+08 |
| 48        | 4,80E+09 | 4,70E+08 | 1,14E+09 | 5,50E+08 | 2,20E+09 | 7,20E+08 | 3,30E+09 |
| 54        | 4,80E+09 | 6,50E+08 | 2,20E+09 | 6,00E+08 | 2,29E+09 | 7,30E+08 | 2,20E+09 |
| 72        | 4,00E+09 | 9,20E+08 | 1,10E+09 | 7,30E+08 | 1,70E+09 | 7,80E+08 | 1,71E+09 |
| 78        | 3,00E+09 | 1,12E+09 | 1,32E+09 | 7,30E+08 | 9,00E+08 | 8,30E+08 | 2,60E+09 |
| 96        | 2,60E+09 | 1,01E+09 | 1,20E+09 | 7,10E+08 | 9,50E+08 | 8,50E+08 | 2,40E+09 |

#### Croissances de *B japonicum* (532C)dans les boues d'épuration de différentes origines, nombre de cellules (ufc/ml) (p. 78)

| Temps (h) | YMB      | BLKP     | BLKS     | VALP     | VALS     | CUQ      | PPS      |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0         | 2,29E+07 | 1,80E+07 | 1,80E+07 | 1,80E+07 | 1,80E+07 | 1,80E+07 | 1,80E+07 |
| 8         | 3,10E+07 | 1,79E+07 | 1,58E+07 | 1,94E+07 | 1,36E+07 | 2,07E+07 | 1,56E+07 |
| 12        | 4,20E+07 | 2,09E+07 | 2,03E+07 | 1,97E+07 | 1,76E+07 | 2,24E+07 | 1,77E+07 |
| 24        | 1,78E+08 | 2,60E+07 | 2,31E+07 | 1,80E+07 | 6,50E+07 | 2,17E+07 | 8,60E+07 |
| 32        | 3,50E+08 | 2,00E+07 | 6,20E+07 | 1,62E+07 | 1,77E+08 | 1,04E+07 | 1,20E+08 |
| 36        | 6,30E+08 | 1,90E+07 | 1,00E+08 | 1,65E+07 | 3,10E+08 | 2,20E+06 | 2,65E+08 |
| 48        | 1,47E+09 | 1,61E+07 | 2,10E+08 | 1,40E+07 | 9,10E+08 | --       | 8,90E+08 |
| 56        | 1,50E+09 | 1,78E+07 | 2,54E+08 | 1,30E+07 | 1,00E+09 | --       | 1,21E+09 |
| 60        | 2,00E+09 | 1,89E+07 | 4,70E+08 | 1,50E+07 | 6,80E+08 | --       | 1,52E+09 |
| 72        | 4,20E+09 | 3,81E+07 | 3,57E+08 | 9,80E+06 | 7,60E+08 | --       | 1,14E+09 |
| 80        | 1,73E+09 | 4,18E+07 | 3,50E+08 | 1,02E+07 | 7,30E+08 | --       | 8,50E+08 |
| 84        | 1,86E+09 | 2,63E+08 | 3,30E+08 | 1,15E+07 | 6,70E+08 | --       | 1,11E+09 |
| 96        | 1,30E+09 | 6,70E+08 | 3,74E+08 | 8,00E+06 | 7,90E+08 | --       | 1,58E+09 |

#### Croissances de *B elkanii* (USDA 76)dans les boues d'épuration de différentes origines, nombre de cellules (ufc/ml) (p. 78)

| Temps (h) | YMB      | BLKP     | BLKS     | VALP     | VALS     | CUQ      | PPS      |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0         | 1,60E+07 |
| 8         | 1,80E+07 | 1,36E+07 | 7,70E+06 | 1,29E+07 | 5,70E+06 | 1,08E+07 | 6,20E+06 |
| 12        | 2,00E+07 | 8,70E+06 | 8,40E+06 | 1,73E+07 | 7,00E+06 | 1,65E+07 | 1,04E+07 |
| 24        | 4,60E+07 | 5,50E+06 | 2,15E+07 | 9,80E+06 | 2,13E+07 | 9,40E+06 | 2,17E+07 |
| 32        | 6,70E+07 | 1,10E+07 | 3,80E+07 | 5,60E+06 | 3,50E+07 | 1,33E+07 | 5,70E+07 |
| 36        | 1,47E+08 | 1,46E+07 | 6,70E+07 | 1,20E+07 | 6,70E+07 | 1,63E+07 | 1,37E+08 |
| 48        | 3,00E+08 | 3,02E+07 | 2,05E+08 | 8,20E+06 | 1,80E+08 | 7,50E+06 | 2,72E+08 |
| 56        | 4,50E+08 | 6,30E+07 | 2,23E+08 | 4,40E+06 | 6,20E+08 | 4,00E+06 | 3,50E+08 |
| 60        | 7,40E+08 | 1,93E+08 | 2,71E+08 | 1,09E+07 | 8,00E+08 | 4,90E+06 | 5,30E+08 |
| 72        | 1,07E+09 | 1,09E+09 | 5,00E+08 | 9,60E+06 | 1,01E+09 | --       | 1,03E+09 |
| 80        | 1,28E+09 | 9,50E+08 | 3,09E+08 | 9,50E+06 | 1,11E+09 | --       | 1,16E+09 |
| 84        | 1,27E+09 | 1,00E+09 | 4,00E+08 | 1,08E+07 | 1,50E+09 | --       | 9,70E+08 |
| 96        | 1,12E+09 | 1,20E+09 | 4,50E+08 | 8,50E+06 | 1,28E+09 | --       | 1,29E+09 |

#### Croissances de *R leguminosarum* bv *viciae* (ATCC10004) dans les boues d'épuration de différentes origines, nombre de cellules (ufc/ml) (p. 77)

| temp (h) | YMB      | BLKP     | BLKS     | VALP     | VALS     | CUQ      | PPS      |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0        | 2,06E+07 |
| 4        | 2,20E+07 | 1,65E+07 | 1,40E+07 | 2,10E+07 | 2,10E+07 | 2,00E+07 | 1,67E+07 |

|    |          |          |          |          |          |          |          |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 8  | 4,40E+07 | 2,00E+07 | 2,40E+07 | 1,99E+07 | 4,20E+07 | 2,20E+07 | 2,53E+07 |
| 12 | 1,08E+08 | 2,70E+07 | 6,30E+07 | 2,10E+07 | 5,00E+07 | 2,01E+07 | 1,05E+08 |
| 24 | 1,82E+09 | 3,00E+07 | 7,00E+08 | 2,00E+07 | 8,00E+08 | 1,80E+07 | 9,00E+08 |
| 28 | 1,99E+09 | 4,70E+07 | 1,36E+09 | 9,50E+06 | 1,39E+09 | 5,20E+06 | 2,00E+09 |
| 32 | 2,90E+09 | 5,20E+08 | 1,81E+09 | 8,20E+06 | 1,14E+09 | --       | 2,70E+09 |
| 36 | 3,50E+09 | 6,90E+08 | 1,69E+09 | 5,50E+06 | 1,37E+09 | --       | 2,80E+09 |
| 48 | 3,80E+09 | 1,74E+09 | 1,68E+09 | --       | 2,45E+09 | --       | 2,80E+09 |
| 52 | 3,00E+09 | 2,20E+09 | 2,96E+09 | --       | 2,27E+09 | --       | 2,40E+09 |
| 56 | 2,97E+09 | 2,64E+09 | 2,20E+09 | --       | 1,77E+09 | --       | 1,45E+09 |
| 60 | 3,20E+09 | 2,80E+09 | 2,29E+09 | --       | 1,99E+09 | --       | 2,03E+09 |
| 72 | 3,00E+09 | 2,79E+09 | 1,55E+09 | --       | 1,89E+09 | --       | 2,57E+09 |
| 76 | 3,20E+09 | 3,10E+09 | 1,83E+09 | --       | 1,82E+09 | --       | 1,83E+09 |
| 80 | 2,40E+09 | 2,78E+09 | 1,81E+09 | --       | 2,16E+09 | --       | 2,19E+09 |
| 84 | 2,70E+09 | 3,00E+09 | 2,00E+09 | --       | 1,59E+09 | --       | 1,78E+09 |

**Croissance du *S. meliloti* (A<sub>2</sub>) dans les boues d'épuration de différentes origines sous différents traitements, nombre de cellules (ufc/ml) (p. 79)**

**Boue BLKP**

| Temps (h) | YMB      | Sans trai. | Trai. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Trai. NaOH | Trai. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|-----------|----------|------------|--------------------------------------|------------|-------------------------------------|
| 0         | 8,10E+06 | 8,10E+06   | 8,10E+06                             | 8,10E+06   | 8,10E+06                            |
| 6         | 1,30E+07 | 9,00E+06   | 1,00E+07                             | 2,00E+07   | 8,00E+06                            |
| 24        | 1,71E+08 | 6,00E+07   | 1,01E+08                             | 5,00E+07   | 8,50E+06                            |
| 30        | 3,80E+08 | 9,00E+07   | 3,00E+08                             | 1,10E+08   | 8,70E+06                            |
| 48        | 4,20E+09 | 6,50E+08   | 1,70E+09                             | 8,00E+08   | 1,80E+07                            |
| 54        | 3,10E+09 | 7,30E+08   | 1,20E+09                             | 2,40E+09   | 5,10E+07                            |
| 72        | 4,20E+09 | 1,03E+09   | 1,30E+09                             | 2,70E+09   | 1,90E+09                            |
| 78        | 3,50E+09 | 1,09E+09   | 1,10E+09                             | 1,90E+09   | 1,80E+09                            |
| 96        | 4,40E+09 | 1,05E+09   | 9,00E+08                             | 1,40E+09   | 1,10E+09                            |

**Boue BLKS**

| Temps (h) | YMB      | Sans trai. | Trai. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Trai. NaOH | Trai. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|-----------|----------|------------|--------------------------------------|------------|-------------------------------------|
| 0         | 8,04E+06 | 8,04E+06   | 8,04E+06                             | 8,04E+06   | 8,04E+06                            |
| 6         | 1,30E+08 | 1,47E+08   | 7,80E+07                             | 1,31E+08   | 7,10E+07                            |
| 24        | 2,90E+09 | 5,69E+08   | 1,19E+09                             | 1,51E+09   | 5,10E+08                            |
| 30        | 4,10E+09 | 2,01E+09   | 1,55E+09                             | 1,33E+09   | 6,80E+08                            |
| 48        | 4,80E+09 | 2,12E+09   | 3,90E+09                             | 2,07E+09   | 1,86E+09                            |
| 54        | 2,90E+09 | 2,20E+09   | 1,90E+09                             | 1,07E+09   | 1,66E+09                            |
| 72        | 3,20E+09 | 1,60E+09   | 1,51E+09                             | 1,32E+09   | 1,23E+09                            |
| 78        | 2,48E+09 | 1,36E+09   | 2,70E+09                             | 2,14E+09   | 1,32E+09                            |
| 96        | 2,94E+09 | 8,70E+08   | 2,24E+09                             | 2,00E+09   | 1,65E+09                            |

**Boue VALP**

| Temps (h) | YMB      | Sans trai. | Trai. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Trai. NaOH | Trai. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|-----------|----------|------------|--------------------------------------|------------|-------------------------------------|
| 0         | 8,00E+06 | 8,00E+06   | 8,00E+06                             | 8,00E+06   | 8,00E+06                            |
| 6         | 1,00E+08 | 1,60E+07   | 1,85E+07                             | 1,60E+07   | 2,64E+07                            |
| 24        | 1,19E+09 | 4,00E+07   | 5,00E+07                             | 3,50E+07   | 1,00E+08                            |
| 30        | 3,70E+09 | 8,80E+07   | 2,00E+08                             | 1,38E+08   | 2,50E+08                            |
| 48        | 2,46E+09 | 5,50E+08   | 4,00E+08                             | 4,30E+08   | 7,60E+08                            |
| 54        | 3,10E+09 | 6,00E+08   | 1,10E+09                             | 1,21E+09   | 8,30E+08                            |
| 72        | 5,20E+09 | 7,30E+08   | 1,71E+09                             | 1,79E+09   | 4,00E+08                            |
| 78        | 4,60E+09 | 7,30E+08   | 1,99E+09                             | 1,50E+09   | 5,40E+08                            |
| 96        | 4,20E+09 | 6,00E+08   | 1,52E+09                             | 1,51E+09   | 1,70E+08                            |

**Boue VALS**

| Temps (h) | YMB      | Sans trai. | Trai. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Trai. NaOH | Trai. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|-----------|----------|------------|--------------------------------------|------------|-------------------------------------|
| 0         | 8,00E+06 | 8,00E+06   | 8,00E+06                             | 8,00E+06   | 1,15E+07                            |
| 6         | 1,00E+08 | 1,52E+07   | 3,10E+07                             | 1,50E+07   | 1,40E+07                            |
| 24        | 1,19E+09 | 8,40E+08   | 6,60E+08                             | 4,70E+07   | 3,50E+07                            |
| 30        | 3,70E+09 | 1,50E+09   | 1,60E+09                             | 6,30E+07   | 7,00E+07                            |
| 48        | 2,46E+09 | 3,60E+09   | 5,80E+09                             | 2,00E+08   | 3,10E+08                            |
| 54        | 3,10E+09 | 2,90E+09   | 4,20E+09                             | 1,80E+08   | 2,90E+08                            |
| 72        | 5,20E+09 | 1,50E+09   | 4,30E+09                             | 3,10E+08   | 3,00E+08                            |
| 78        | 4,60E+09 | 2,60E+09   | 4,50E+09                             | 4,00E+08   | 2,50E+08                            |
| 96        | 4,20E+09 | 4,00E+08   | 3,80E+09                             | 3,00E+08   | 2,20E+08                            |

**Boue CUQ**

| Temps (h) | YMB      | Sans trai. | Trai. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Trai. NaOH | Trai. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|-----------|----------|------------|--------------------------------------|------------|-------------------------------------|
| 0         | 8,04E+06 | 8,04E+06   | 8,04E+06                             | 8,04E+06   | 8,04E+06                            |
| 6         | 1,30E+08 | 5,90E+07   | 7,00E+07                             | 7,80E+07   | 5,00E+07                            |
| 24        | 2,90E+09 | 1,50E+08   | 2,40E+08                             | 5,00E+08   | 2,50E+08                            |
| 30        | 4,10E+09 | 6,00E+08   | 8,00E+08                             | 9,80E+08   | 8,20E+08                            |
| 48        | 4,80E+09 | 7,00E+08   | 9,00E+08                             | 1,33E+09   | 9,20E+08                            |
| 54        | 2,90E+09 | 7,50E+08   | 1,06E+09                             | 1,55E+09   | 9,90E+08                            |
| 72        | 3,20E+09 | 7,90E+08   | 1,90E+09                             | 3,40E+09   | 1,05E+09                            |
| 78        | 2,48E+09 | 8,00E+08   | 2,10E+09                             | 4,10E+09   | 1,83E+09                            |
| 96        | 2,94E+09 | 8,80E+08   | 2,25E+09                             | 3,00E+09   | 2,14E+09                            |

**Boue PPS**

| Temps (h) | YMB      | Sans trai. | Trai. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Trai. NaOH | Trai. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|-----------|----------|------------|--------------------------------------|------------|-------------------------------------|
| 0         | 8,04E+06 | 8,80E+06   | 8,80E+06                             | 8,80E+06   | 8,80E+06                            |
| 6         | 1,30E+08 | 1,33E+07   | 1,16E+07                             | 1,91E+07   | 1,18E+07                            |
| 24        | 2,90E+09 | 1,79E+08   | 1,20E+08                             | 3,84E+09   | 1,04E+09                            |
| 30        | 4,10E+09 | 2,17E+08   | 1,71E+09                             | 3,10E+09   | 2,25E+09                            |
| 48        | 4,80E+09 | 6,00E+08   | 1,74E+09                             | 8,50E+09   | 2,74E+09                            |
| 54        | 2,90E+09 | 1,70E+09   | 1,37E+09                             | 5,20E+09   | 1,89E+09                            |
| 72        | 3,20E+09 | 1,74E+09   | 1,50E+09                             | 5,80E+09   | 3,83E+09                            |
| 78        | 2,48E+09 | 1,18E+09   | 1,60E+09                             | 1,07E+10   | 3,28E+09                            |
| 96        | 2,94E+09 | 1,00E+09   | 1,20E+09                             | 6,90E+09   | 3,30E+09                            |

**ANNEXE C**  
**RÉSULTATS DE LA CROISSANCE DE *S. MELILOTI* DANS LES BOUES (BLKS ET BLKP) TRAITÉES**

**Croissance du *S meloliti* (A<sub>2</sub>) dans les boues BLKS et BLKP  
(Traitement acide), nombre de cellules (ufc/ml)**

**BLKS 0.2% TSS**

| Temps | sans trai | pH 6     | pH4      | pH 2     |
|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 0     | 1,80E+07  | 1,80E+07 | 1,80E+07 | 1,80E+07 |
| 4     | 2,50E+07  | 2,70E+07 | 2,19E+07 | 2,30E+07 |
| 8     | 3,00E+07  | 3,50E+07 | 3,40E+07 | 5,50E+07 |
| 12    | 4,40E+07  | 4,90E+07 | 8,00E+07 | 1,00E+08 |
| 24    | 6,90E+07  | 7,90E+07 | 3,00E+08 | 4,00E+08 |
| 28    | 2,10E+08  | 2,50E+08 | 5,00E+08 | 9,90E+08 |
| 32    | 5,50E+08  | 3,70E+08 | 7,10E+08 | 2,20E+09 |
| 36    | 8,90E+08  | 8,50E+08 | 1,14E+09 | 2,23E+09 |
| 48    | 9,50E+08  | 9,60E+08 | 8,00E+08 | 1,90E+09 |
| 56    | 9,90E+08  | 8,80E+08 | 7,70E+08 | 1,81E+09 |
| 60    | 7,80E+08  | 8,50E+08 | 1,10E+09 | 1,84E+09 |

**BLKS 0.3%TSS**

| Temps | sans trai | pH 6     | pH4      | pH 2     |
|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 0     | 1,80E+07  | 1,80E+07 | 1,80E+07 | 1,80E+07 |
| 4     | 2,70E+07  | 2,16E+07 | 2,48E+07 | 2,90E+07 |
| 8     | 2,80E+07  | 3,14E+07 | 3,10E+07 | 5,10E+07 |
| 12    | 3,50E+07  | 4,00E+07 | 4,80E+07 | 8,00E+07 |
| 24    | 9,90E+07  | 1,00E+08 | 1,25E+08 | 2,01E+08 |
| 28    | 1,90E+08  | 1,57E+08 | 2,90E+08 | 3,00E+08 |
| 32    | 6,10E+08  | 3,29E+08 | 7,70E+08 | 6,10E+08 |
| 36    | 5,40E+08  | 5,50E+08 | 8,20E+08 | 8,40E+08 |
| 48    | 5,30E+08  | 9,00E+08 | 8,10E+08 | 7,00E+08 |
| 56    | 2,20E+08  | 8,70E+08 | 6,70E+08 | 3,50E+08 |
| 60    | 2,50E+08  | 5,00E+08 | 6,00E+08 | 3,00E+08 |

**BLKS 0.4%TSS**

| Temps | sans trai | pH 6     | pH4      | pH 2     |
|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 0     | 1,80E+07  | 1,80E+07 | 1,80E+07 | 1,80E+07 |
| 4     | 1,69E+07  | 2,60E+07 | 1,80E+07 | 3,20E+07 |
| 8     | 2,00E+07  | 4,80E+07 | 5,40E+07 | 7,00E+07 |
| 12    | 2,40E+07  | 5,20E+07 | 8,40E+07 | 9,90E+07 |
| 24    | 1,00E+08  | 2,00E+08 | 2,70E+08 | 3,42E+08 |
| 28    | 2,00E+08  | 3,00E+08 | 3,40E+08 | 4,00E+08 |
| 32    | 3,90E+08  | 4,70E+08 | 6,60E+08 | 9,00E+08 |
| 36    | 6,60E+08  | 5,60E+08 | 7,00E+08 | 9,80E+08 |
| 48    | 6,00E+08  | 5,30E+08 | 4,40E+08 | 6,70E+08 |
| 56    | 4,50E+08  | 7,30E+08 | 5,00E+08 | 6,00E+08 |
| 60    | 4,00E+08  | 6,70E+08 | 6,60E+08 | 6,00E+08 |

**BLKP 3.2%TSS**

| Temps | sans trai | pH 6     | pH4      | pH2      |
|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 0     | 2,40E+07  | 2,33E+07 | 2,33E+07 | 2,33E+07 |
| 4     | 2,90E+07  | 3,00E+07 | 3,50E+07 | 4,00E+07 |
| 8     | 3,90E+07  | 4,00E+07 | 4,60E+07 | 4,70E+07 |
| 24    | 1,37E+08  | 1,50E+08 | 2,00E+08 | 2,50E+08 |
| 28    | 1,46E+08  | 1,60E+08 | 2,90E+08 | 2,70E+08 |
| 32    | 3,40E+08  | 3,90E+08 | 4,00E+08 | 4,20E+08 |
| 48    | 6,30E+08  | 6,50E+08 | 7,10E+08 | 9,50E+08 |

|    |          |          |          |          |
|----|----------|----------|----------|----------|
| 52 | 9,60E+08 | 9,80E+08 | 1,00E+09 | 1,11E+09 |
| 56 | 8,50E+08 | 9,50E+08 | 8,00E+08 | 8,50E+08 |

**BLKP 2.6%TSS**

| Temps | sans trai | pH 6     | pH4      | pH 2     |
|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 0     | 2,19E+07  | 2,33E+07 | 2,33E+07 | 2,33E+07 |
| 4     | 3,05E+07  | 5,00E+07 | 5,50E+07 | 5,90E+07 |
| 8     | 3,93E+07  | 6,00E+07 | 6,90E+07 | 7,00E+07 |
| 24    | 7,85E+07  | 2,00E+08 | 2,50E+08 | 2,90E+08 |
| 28    | 2,01E+08  | 3,00E+08 | 3,20E+08 | 4,00E+08 |
| 32    | 2,36E+08  | 5,90E+08 | 6,00E+08 | 9,00E+08 |
| 48    | 8,60E+09  | 9,00E+09 | 9,50E+09 | 9,90E+09 |
| 52    | 9,25E+09  | 9,40E+09 | 9,40E+09 | 9,80E+09 |
| 56    | 8,85E+09  | 8,90E+09 | 9,50E+09 | 9,00E+09 |

**BLKP 1.3%TSS**

| Temps | sans trai | pH 6     | pH4      | pH 2     |
|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 0     | 2,40E+07  | 2,33E+07 | 2,33E+07 | 2,33E+07 |
| 4     | 2,80E+07  | 3,00E+07 | 3,00E+07 | 4,00E+07 |
| 8     | 4,17E+07  | 3,50E+07 | 3,90E+07 | 6,50E+07 |
| 24    | 1,56E+09  | 2,00E+09 | 3,00E+09 | 4,00E+09 |
| 28    | 4,80E+09  | 5,00E+09 | 5,00E+09 | 5,90E+09 |
| 32    | 4,00E+09  | 4,10E+09 | 6,00E+09 | 7,00E+09 |
| 48    | 7,90E+09  | 6,80E+09 | 5,80E+09 | 1,00E+10 |
| 52    | 1,02E+10  | 8,90E+09 | 9,00E+09 | 1,20E+10 |
| 56    | 1,11E+10  | 6,60E+09 | 4,00E+09 | 1,00E+10 |

**BLKP 0.65%TSS**

| Temps | sans trai | pH 6     | pH4      | pH2      |
|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 0     | 2,18E+07  | 2,33E+07 | 2,33E+07 | 2,33E+07 |
| 4     | 2,87E+07  | 3,30E+07 | 4,00E+07 | 4,30E+07 |
| 8     | 3,33E+07  | 4,70E+07 | 4,90E+07 | 6,80E+07 |
| 24    | 1,38E+09  | 3,00E+08 | 3,10E+08 | 1,00E+09 |
| 28    | 1,41E+09  | 1,50E+09 | 1,50E+09 | 1,52E+09 |
| 32    | 1,90E+09  | 1,70E+09 | 2,30E+09 | 3,00E+09 |
| 48    | 2,85E+09  | 3,90E+09 | 5,00E+09 | 6,50E+09 |
| 52    | 3,90E+09  | 4,00E+09 | 5,60E+09 | 9,00E+09 |
| 56    | 4,00E+09  | 4,60E+09 | 5,00E+09 | 8,60E+09 |

**BLKP 0.325%TSS**

| Temps | sans trai | pH 6     | pH4      | pH 2     |
|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 0     | 2,18E+07  | 2,33E+07 | 2,33E+07 | 2,33E+07 |
| 4     | 2,72E+07  | 5,00E+07 | 5,00E+07 | 4,80E+07 |
| 8     | 5,05E+07  | 7,80E+07 | 7,50E+07 | 6,80E+07 |
| 24    | 9,25E+08  | 2,23E+09 | 1,96E+09 | 3,13E+08 |
| 28    | 1,68E+09  | 2,20E+09 | 2,10E+09 | 5,00E+08 |
| 32    | 3,55E+09  | 2,93E+09 | 3,20E+09 | 6,90E+08 |
| 48    | 5,85E+09  | 5,31E+09 | 6,60E+09 | 8,40E+09 |
| 52    | 6,70E+09  | 7,20E+09 | 8,80E+09 | 1,30E+10 |
| 56    | 6,75E+09  | 7,00E+09 | 8,00E+09 | 1,11E+10 |

**Croissance du *S meloliti* ( $A_2$ ) dans les boues BLKS et BLKP  
(Traitement alcalin), nombre de cellules (ufc/ml)****BLKP 3.2%TSS**

| Temps | sans trai | NaOH (meq/l) |          |          |          |  |
|-------|-----------|--------------|----------|----------|----------|--|
|       |           | 50           | 100      | 150      | 200      |  |
| 0     | 2,40E+07  | 2,40E+07     | 2,40E+07 | 2,40E+07 | 2,40E+07 |  |

|    |          |          |          |          |          |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|
| 4  | 2,90E+07 | 3,15E+07 | 7,60E+07 | 3,46E+07 | 4,00E+07 |
| 8  | 3,92E+07 | 1,02E+08 | 1,39E+08 | 4,15E+07 | 7,00E+07 |
| 24 | 1,37E+08 | 1,32E+09 | 2,56E+09 | 1,25E+09 | 8,20E+08 |
| 28 | 1,46E+08 | 1,98E+09 | 2,50E+09 | 1,49E+09 | 9,00E+08 |
| 32 | 3,39E+08 | 2,59E+09 | 2,58E+09 | 1,71E+09 | 1,70E+09 |
| 48 | 6,34E+08 | 1,00E+10 | 1,34E+10 | 1,84E+09 | 1,99E+09 |
| 52 | 9,63E+08 | 1,10E+10 | 1,14E+10 | 1,70E+09 | 2,02E+09 |
| 56 | 8,50E+08 | 1,00E+10 | 5,90E+09 | 1,66E+09 | 1,99E+09 |

**BLKP 2.6%TSS**

| Temps | sans trai | NaOH (meq/l) |          |          |          |
|-------|-----------|--------------|----------|----------|----------|
|       |           | 50           | 100      | 150      | 200      |
| 0     | 2,19E+07  | 2,19E+07     | 2,19E+07 | 2,19E+07 | 2,19E+07 |
| 4     | 3,05E+07  | 6,10E+07     | 1,70E+08 | 3,50E+07 | 5,10E+07 |
| 8     | 3,93E+07  | 1,02E+08     | 2,81E+08 | 4,20E+07 | 9,00E+07 |
| 24    | 7,85E+07  | 2,00E+09     | 1,80E+09 | 1,37E+09 | 8,90E+08 |
| 28    | 2,01E+08  | 2,79E+09     | 2,60E+09 | 1,98E+09 | 9,10E+08 |
| 32    | 2,36E+08  | 3,00E+09     | 2,65E+09 | 2,00E+09 | 1,87E+09 |
| 48    | 8,60E+09  | 9,50E+09     | 1,70E+10 | 2,50E+09 | 2,03E+09 |
| 52    | 9,25E+09  | 1,40E+10     | 1,93E+10 | 2,15E+09 | 1,87E+09 |
| 56    | 8,85E+09  | 1,30E+10     | 7,80E+09 | 2,00E+09 | 2,47E+09 |

**BLKP 1.3%TSS**

| Temps | sans trai | NaOH (meq/l) |          |          |          |
|-------|-----------|--------------|----------|----------|----------|
|       |           | 50           | 100      | 150      | 200      |
| 0     | 2,40E+07  | 2,40E+07     | 2,40E+07 | 2,40E+07 | 2,40E+07 |
| 4     | 2,80E+07  | 7,00E+07     | 2,45E+07 | 3,10E+07 | 4,70E+07 |
| 8     | 4,17E+07  | 1,13E+08     | 3,16E+08 | 2,51E+08 | 5,50E+08 |
| 24    | 1,56E+09  | 2,70E+09     | 6,60E+09 | 3,10E+09 | 3,70E+09 |
| 28    | 4,80E+09  | 6,00E+09     | 8,50E+09 | 3,34E+09 | 4,90E+09 |
| 32    | 4,00E+09  | 6,50E+09     | 9,95E+09 | 6,15E+09 | 5,10E+09 |
| 48    | 7,90E+09  | 1,05E+10     | 1,62E+10 | 7,90E+09 | 5,45E+09 |
| 52    | 1,02E+10  | 1,40E+10     | 1,88E+10 | 1,27E+10 | 6,15E+09 |
| 56    | 1,11E+10  | 1,01E+10     | 1,58E+10 | 1,31E+10 | 7,30E+09 |

**BLKP 0.65%TSS**

| Temps | sans trai | NaOH (meq/l) |          |          |          |
|-------|-----------|--------------|----------|----------|----------|
|       |           | 50           | 100      | 150      | 200      |
| 0     | 2,18E+07  | 2,18E+07     | 2,18E+07 | 2,18E+07 | 2,18E+07 |
| 4     | 2,87E+07  | 4,70E+07     | 2,73E+07 | 3,77E+07 | 5,05E+07 |
| 8     | 3,33E+07  | 2,09E+08     | 1,79E+08 | 7,10E+07 | 2,14E+08 |
| 24    | 1,38E+09  | 3,79E+09     | 5,00E+09 | 2,18E+09 | 1,72E+09 |
| 28    | 1,41E+09  | 7,50E+09     | 1,61E+10 | 2,48E+09 | 3,28E+09 |
| 32    | 1,90E+09  | 7,60E+09     | 2,10E+10 | 2,83E+09 | 5,69E+09 |
| 48    | 2,85E+09  | 1,56E+10     | 1,89E+10 | 4,75E+09 | 3,70E+09 |
| 52    | 3,90E+09  | 1,12E+10     | 2,03E+10 | 5,05E+09 | 4,48E+09 |
| 56    | 4,00E+09  | 7,40E+09     | 1,54E+10 | 6,25E+09 | 3,47E+09 |

**BLKP 0.325%TSS**

| Temps | sans trai | NaOH (meq/l) |          |          |          |
|-------|-----------|--------------|----------|----------|----------|
|       |           | 50           | 100      | 150      | 200      |
| 0     | 2,18E+07  | 2,18E+07     | 2,18E+07 | 2,18E+07 | 2,18E+07 |
| 4     | 2,72E+07  | 2,70E+07     | 2,73E+07 | 3,70E+07 | 5,10E+07 |
| 8     | 5,05E+07  | 1,14E+08     | 6,50E+07 | 7,60E+07 | 3,00E+08 |
| 24    | 9,25E+08  | 1,81E+09     | 1,77E+09 | 1,57E+09 | 2,50E+09 |
| 28    | 1,68E+09  | 4,50E+09     | 5,60E+09 | 1,78E+09 | 2,61E+09 |
| 32    | 3,55E+09  | 8,70E+09     | 7,30E+09 | 2,39E+09 | 2,51E+09 |
| 48    | 5,85E+09  | 1,05E+10     | 1,65E+10 | 2,59E+09 | 2,34E+09 |
| 52    | 6,70E+09  | 5,50E+09     | 5,80E+09 | 2,79E+09 | 2,43E+09 |
| 56    | 6,75E+09  | 5,00E+09     | 6,00E+09 | 2,83E+09 | 2,48E+09 |

**BLKS 0.2%TSS**

| temps | sans tr  | NaOH (meq/l) |          |          |          |
|-------|----------|--------------|----------|----------|----------|
|       |          | 50           | 100      | 150      | 200      |
| 0     | 1,80E+07 | 2,38E+07     | 2,38E+07 | 2,38E+07 | 2,38E+07 |
| 4     | 2,50E+07 | 2,70E+07     | 3,50E+07 | 4,00E+07 | 4,40E+07 |
| 8     | 3,00E+07 | 7,30E+07     | 5,00E+07 | 5,40E+07 | 1,01E+08 |
| 12    | 4,40E+07 | 1,12E+08     | 1,50E+08 | 1,60E+08 | 1,35E+08 |
| 24    | 6,90E+07 | 2,52E+09     | 1,78E+09 | 1,66E+09 | 1,58E+09 |
| 28    | 2,10E+08 | 2,40E+09     | 1,81E+09 | 1,84E+09 | 1,05E+09 |
| 32    | 5,50E+08 | 1,91E+09     | 1,43E+09 | 1,40E+09 | 1,66E+09 |
| 36    | 8,90E+08 | 2,10E+09     | 2,39E+09 | 1,65E+09 | 1,60E+09 |
| 48    | 9,50E+08 | 1,81E+09     | 1,48E+09 | 1,91E+09 | 1,58E+09 |
| 56    | 9,90E+08 | 1,99E+09     | 1,74E+09 | 1,87E+09 | 1,04E+09 |
| 60    | 7,80E+08 | 2,48E+09     | 1,73E+09 | 1,73E+09 | 1,00E+09 |

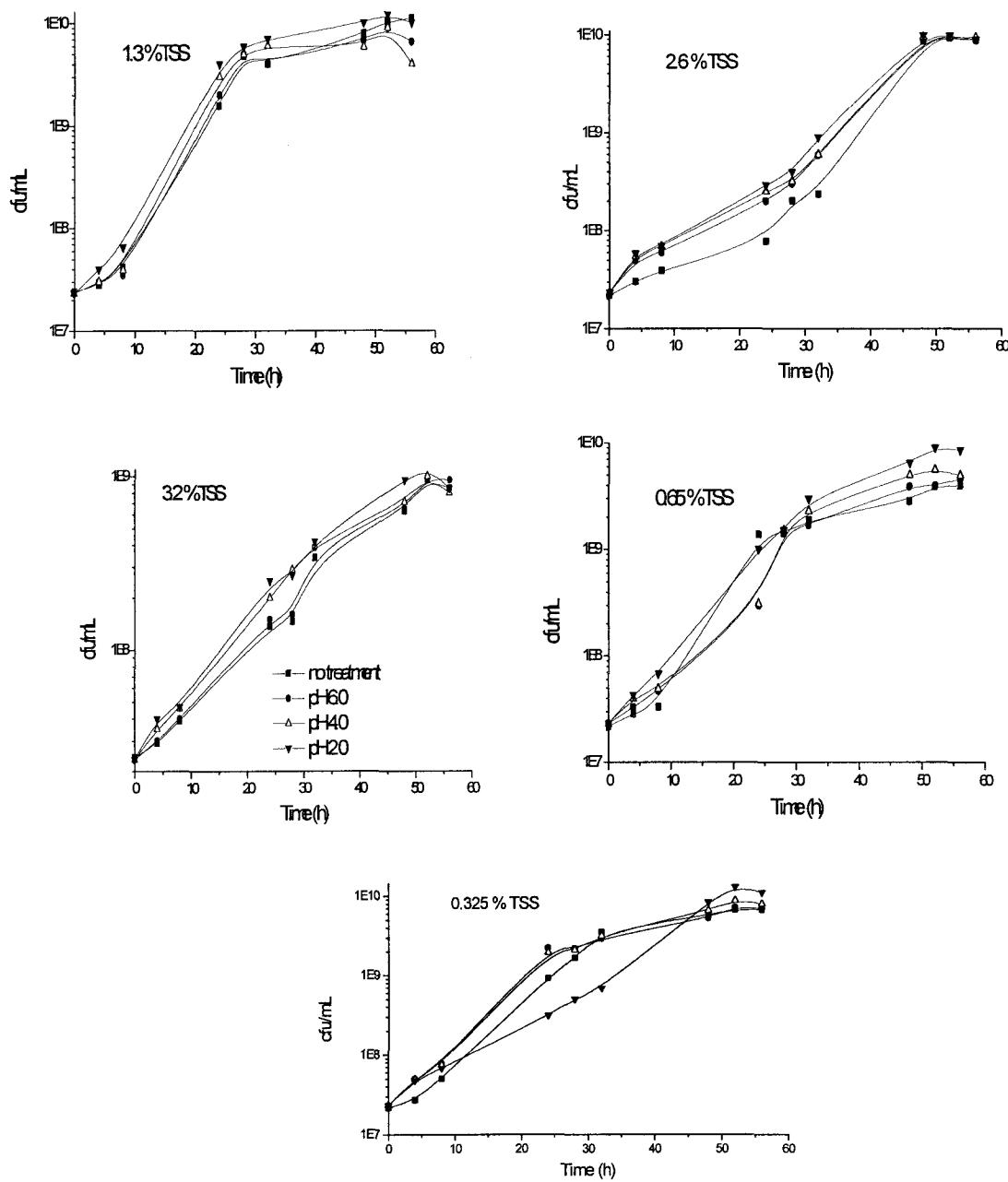
**BLKS 0.3%TSS**

| temps | sans tr  | NaOH (meq/l) |          |          |          |
|-------|----------|--------------|----------|----------|----------|
|       |          | 50           | 100      | 150      | 200      |
| 0     | 1,80E+07 | 2,38E+07     | 2,38E+07 | 2,38E+07 | 2,38E+07 |
| 4     | 2,70E+07 | 5,30E+07     | 6,20E+07 | 8,50E+07 | 4,00E+07 |
| 8     | 2,80E+07 | 9,00E+07     | 9,10E+07 | 1,80E+08 | 1,00E+08 |
| 12    | 3,50E+07 | 2,00E+08     | 2,00E+08 | 2,50E+08 | 2,26E+08 |
| 24    | 9,90E+07 | 4,90E+08     | 1,27E+09 | 1,42E+09 | 1,04E+09 |
| 28    | 1,90E+08 | 1,00E+09     | 1,50E+09 | 1,48E+09 | 1,10E+09 |
| 32    | 6,10E+08 | 1,13E+09     | 1,53E+09 | 9,90E+08 | 2,00E+09 |
| 36    | 5,40E+08 | 1,80E+09     | 1,87E+09 | 1,33E+09 | 1,55E+09 |
| 48    | 5,30E+08 | 2,22E+09     | 1,44E+09 | 1,48E+09 | 1,23E+09 |
| 56    | 2,20E+08 | 2,00E+09     | 1,63E+09 | 2,30E+09 | 1,90E+09 |
| 60    | 2,50E+08 | 1,12E+09     | 1,59E+09 | 1,53E+09 | 1,00E+09 |

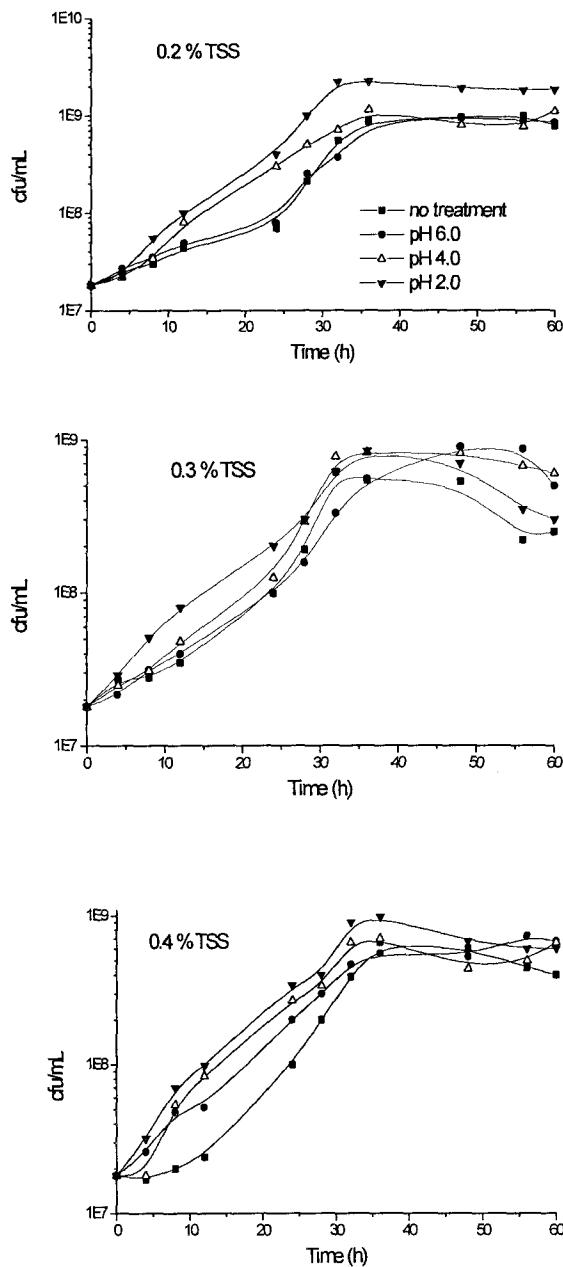
**BLKS 0.4%TSS**

| temps | sans tr  | NaOH (meq/l) |          |          |          |
|-------|----------|--------------|----------|----------|----------|
|       |          | 50           | 100      | 150      | 200      |
| 0     | 1,80E+07 | 2,38E+07     | 2,38E+07 | 2,38E+07 | 2,38E+07 |
| 4     | 1,69E+07 | 4,40E+07     | 6,00E+07 | 3,00E+07 | 3,20E+07 |
| 8     | 2,00E+07 | 8,00E+07     | 7,00E+07 | 3,90E+07 | 3,70E+07 |
| 12    | 2,40E+07 | 1,85E+08     | 1,50E+08 | 7,80E+07 | 6,80E+07 |
| 24    | 1,00E+08 | 6,50E+08     | 7,40E+08 | 1,15E+09 | 5,70E+08 |
| 28    | 2,00E+08 | 1,31E+09     | 9,40E+08 | 1,14E+09 | 1,36E+09 |
| 32    | 3,90E+08 | 1,65E+09     | 1,00E+09 | 1,56E+09 | 1,77E+09 |
| 36    | 1,00E+09 | 1,82E+09     | 1,71E+09 | 2,40E+09 | 2,40E+09 |
| 48    | 6,00E+08 | 1,75E+09     | 1,68E+09 | 1,99E+09 | 2,10E+09 |
| 56    | 4,50E+08 | 1,02E+09     | 1,75E+09 | 2,00E+09 | 2,30E+09 |
| 60    | 4,00E+08 | 1,06E+09     | 1,81E+09 | 1,01E+09 | 2,00E+09 |

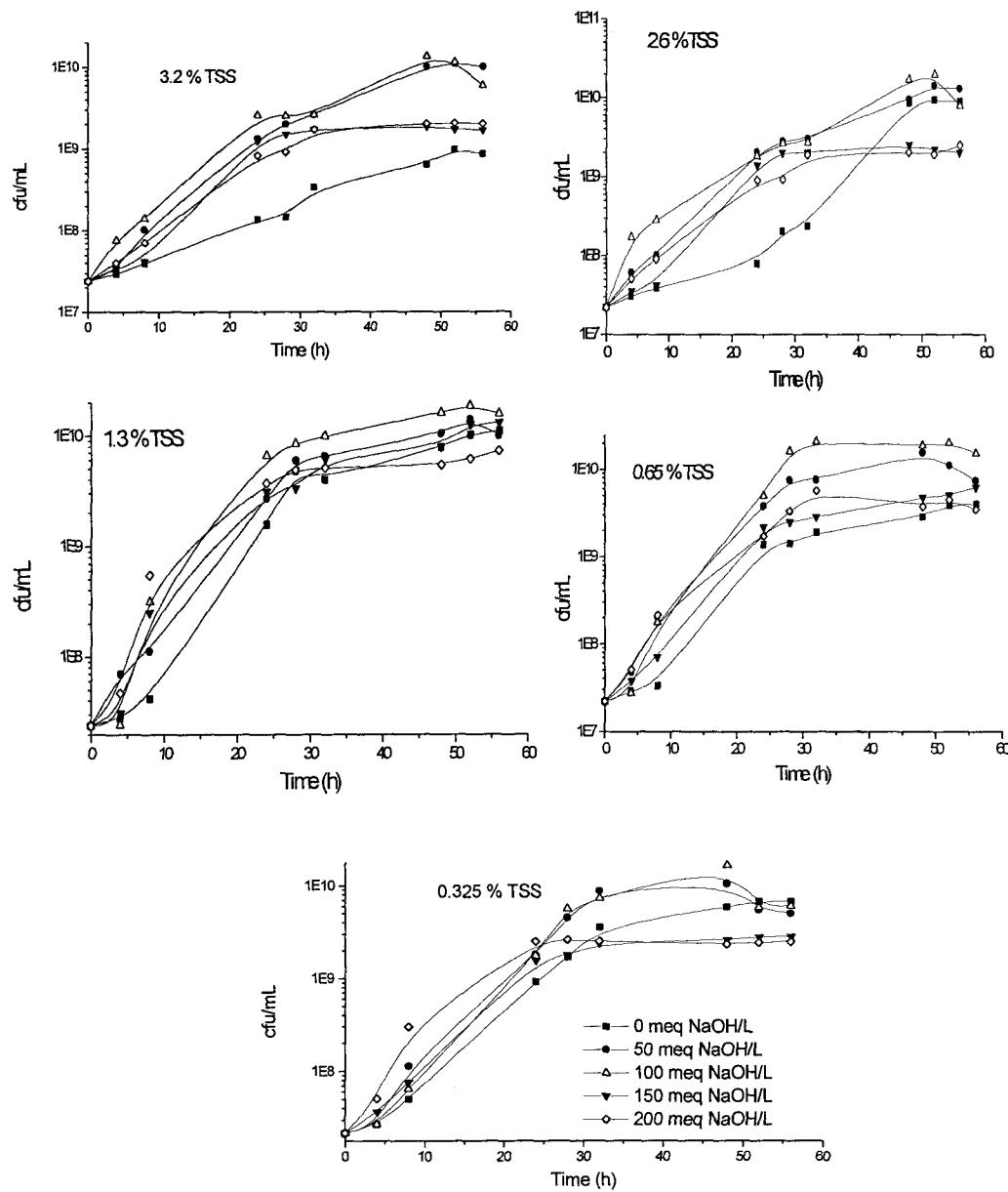
Courbes de croissances de *S. meliloti* dans la boue primaire ( BLKP) traitée  
(traitement acide)



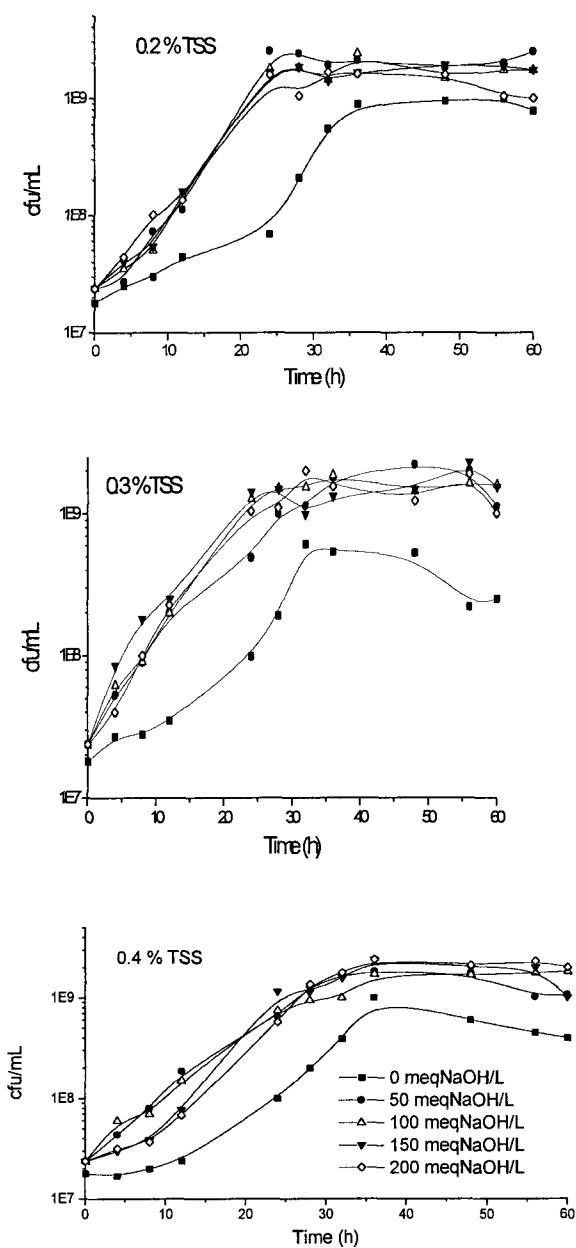
Courbes de croissance de *S. meliloti* dans la boue secondaire (BLKS) traitée  
(traitement acide)



Courbes de croissance de *S. meliloti* dans la boue primaire (BLKP) traitée  
(traitement alcalin)



Courbes de croissance *S. meliloti* dans la boue secondaire (BLKS) traitée  
(traitement alcalin)



## ANNEXE D

### RÉSULTAT DE L'EFFET DE L'ADDITION DES NUTRIMENTS ET DU CONTRÔLE DU pH

**Effet de l'addition d'extrait de levure : croissance de *S. meliloti* dans la boue secondaire CUQ, nombre de cellules (ufc/ml) (p. 103)**

| Temps | Extrait de levure g/l |                      |                      |                      |                      |
|-------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|       | 0                     | 0,5                  | 1                    | 2                    | 4                    |
| 0     | 9,70 <sup>E+06</sup>  | 9,70 <sup>E+06</sup> | 9,70 <sup>E+06</sup> | 9,70 <sup>E+06</sup> | 9,70 <sup>E+06</sup> |
| 4     | 2,17 <sup>E+07</sup>  | 2,21 <sup>E+07</sup> | 2,31 <sup>E+07</sup> | 1,74 <sup>E+07</sup> | 1,91 <sup>E+07</sup> |
| 8     | 4,20 <sup>E+07</sup>  | 3,55 <sup>E+07</sup> | 4,05 <sup>E+07</sup> | 4,15 <sup>E+07</sup> | 3,90 <sup>E+07</sup> |
| 12    | 4,05 <sup>E+07</sup>  | 4,95 <sup>E+07</sup> | 6,65 <sup>E+07</sup> | 6,55 <sup>E+07</sup> | 5,90 <sup>E+07</sup> |
| 24    | 1,15 <sup>E+09</sup>  | 1,70 <sup>E+09</sup> | 1,88 <sup>E+09</sup> | 2,16 <sup>E+09</sup> | 2,22 <sup>E+09</sup> |
| 28    | 1,77 <sup>E+09</sup>  | 2,43 <sup>E+09</sup> | 4,15 <sup>E+09</sup> | 5,35 <sup>E+09</sup> | 4,50 <sup>E+09</sup> |
| 32    | 2,71 <sup>E+09</sup>  | 4,70 <sup>E+09</sup> | 6,05 <sup>E+09</sup> | 7,15 <sup>E+09</sup> | 7,50 <sup>E+09</sup> |
| 36    | 1,77 <sup>E+09</sup>  | 2,30 <sup>E+09</sup> | 4,00 <sup>E+09</sup> | 7,80 <sup>E+09</sup> | 8,85 <sup>E+09</sup> |
| 48    | 9,15 <sup>E+08</sup>  | 2,50 <sup>E+09</sup> | 2,68 <sup>E+09</sup> | 2,87 <sup>E+09</sup> | 6,55 <sup>E+09</sup> |
| 52    | 7,80 <sup>E+08</sup>  | 1,10 <sup>E+09</sup> | 1,75 <sup>E+09</sup> | 2,81 <sup>E+09</sup> | 7,90 <sup>E+09</sup> |
| 56    | 5,10 <sup>E+08</sup>  | 1,68 <sup>E+09</sup> | 1,11 <sup>E+09</sup> | 1,24 <sup>E+09</sup> | 7,50 <sup>E+09</sup> |

**Effet de l'addition du glycerol : croissance de *S. meliloti* dans la boue secondaire CUQ, nombre de cellules (ufc/ml) (p. 103)**

| Temps | 4g/l extrait de levure + glycerol g/l |          |          |          |          |
|-------|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
|       | 0                                     | 2,5      | 5        | 7,5      | 10       |
| 0     | 9,70E+06                              | 1,06E+07 | 1,06E+07 | 1,06E+07 | 1,06E+07 |
| 4     | 1,91E+07                              | 2,59E+07 | 2,54E+07 | 2,85E+07 | 2,69E+07 |
| 8     | 3,90E+07                              | 4,30E+07 | 4,60E+07 | 4,65E+07 | 4,63E+07 |
| 12    | 5,90E+07                              | 7,80E+07 | 9,10E+07 | 9,00E+07 | 9,05E+07 |
| 24    | 2,22E+09                              | 2,25E+09 | 2,47E+09 | 2,49E+09 | 2,48E+09 |
| 28    | 4,50E+09                              | 4,50E+09 | 4,45E+09 | 4,85E+09 | 4,65E+09 |
| 32    | 7,50E+09                              | 4,45E+09 | 5,35E+09 | 6,30E+09 | 5,83E+09 |
| 36    | 8,85E+09                              | 5,40E+09 | 7,70E+09 | 6,70E+09 | 7,20E+09 |
| 48    | 6,55E+09                              | 8,70E+09 | 1,40E+10 | 1,65E+10 | 1,53E+10 |
| 52    | 7,90E+09                              | 7,10E+09 | 1,31E+10 | 1,13E+10 | 1,22E+10 |
| 56    | 7,50E+09                              | 7,20E+09 | 1,25E+10 | 1,33E+10 | 1,29E+10 |

**Contrôle du pH: croissance de *S. meliloti* dans la boue secondaire CUQ, nombre de cellules (ufc/ml) (p.104-105)**

| Temps  | ufc/ml   |            | PH       |            |
|--|----------|------------|----------|------------|
|  | Con. Fer | Uncon. Fer | Con. Fer | Uncon. Fer |
| 0  | 7.30     | 7.30       | 6.8      | 6.79       |
| 4  | 7.70     | 7.61       | 6.81     | 6.78       |
| 8  | 7.86     | 7.66       | 6.83     | 6.7        |
| 12   | 8.19     | 8.15       | 6.88     | 6.76       |
| 24   | 9.28     | 9.24       | 7.04     | 7.75       |
| 28   | 9.28     | 9.28       | 7.04     | 7.96       |
| 32   | 9.36     | 9.39       | 6.83     | 8.1        |
| 36   | 9.45     | 9.41       | 6.86     | 8.28       |
| 40   | 9.47     | 9.38       | 7.14     | 8.39       |
| 44   | 9.41     | 9.45       | 7.09     | 8.42       |
| 48   | 9.41     | 9.41       | 7.1      | 8.5        |
| 52   | 9.46     | 9.51       | 6.9      | 8.55       |
| 56   | 9.45     | 9.4        | 7.1      | 8.58       |
| DCO (mg/l)    N-NH <sub>4</sub> (mg/l)    P-PO <sub>4</sub> (mg/l) |          |            |          |            |
| con.fer. Init  | 4251     | 206        | 19,8     |            |
| con.fer. Fin   | 2515     | 166        | 16,2     |            |

|                 |      |     |      |
|-----------------|------|-----|------|
| Uncon.fer. Init | 4641 | 183 | 17,9 |
| Unco.fer. Fin   | 2835 | 120 | 12,9 |

**ANNEXE E**  
**RÉSULTATS DE L'UTILISATION DES BOUES COMME SUPPORT**

Survie de *S. meliloti* dans la boue et dans la tourbe à 4°C

( $\log_{10}$  no rhizobia / g de support)

| <b>Inoculum préparé dans YMB</b> |          |          |           |           |           |           |           |            |
|----------------------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                                  | <b>0</b> | <b>7</b> | <b>11</b> | <b>18</b> | <b>32</b> | <b>46</b> | <b>81</b> | <b>130</b> |
| Tourbe                           | 8.63     | 9.97     | 9.71      | 9.74      | 9.77      | 9.63      | 9.65      | 9.32       |
| Boue                             | 8.63     | 9.9      | 9.15      | 9.39      | 9.07      | 9.38      | 9.24      | 8.83       |
| Tourbe + Boue                    | 8.63     | 9.93     | 9.82      | 9.98      | 9.93      | 9.81      | 9.66      | 8.79       |

| <b>Inoculum préparé dans la boue</b> |      |      |      |      |      |     |      |      |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|-----|------|------|
| Tourbe                               | 8.28 | 7.74 | 7.66 | 7.84 | 7.13 | 7.4 | 7.67 | 7.18 |
| Boue                                 | 8.28 | 9.4  | 9.41 | 9.38 | 9.25 | 9.1 | 9.20 | 8.23 |
| Tourbe + Boue                        | 8.28 | 7.86 | 7.69 | 8.31 | 7.75 | 7.4 | 7.81 | 7.45 |

Survie de *S. meliloti* dans la boue et dans la tourbe à 25°C

( $\log_{10}$  no rhizobia / g de support)

| <b>Inoculum préparé dans YMB</b> |          |          |           |           |           |           |           |            |
|----------------------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                                  | <b>0</b> | <b>7</b> | <b>11</b> | <b>18</b> | <b>32</b> | <b>46</b> | <b>81</b> | <b>130</b> |
| Tourbe                           | 8.63     | 9.85     | 9.54      | 9.62      | 9.46      | 9.41      | 9.32      | 8.89       |
| Boue                             | 8.63     | 8.88     | 9.29      | 9.69      | 9.51      | 8.83      | 8.87      | 8          |
| Tourbe + Boue                    | 8.63     | 10.02    | 9.88      | 10.10     | 9.98      | 9.78      | 8.94      | 8.3        |

| <b>Inoculum préparé dans la boue</b> |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Tourbe                               | 8.28 | 7.62 | 7.46 | 7.21 | 9.55 | 9.41 | 9.13 | 9.08 |
| Boue                                 | 8.28 | 8.45 | 9.39 | 9.79 | 9.68 | 8.97 | 8.48 | 7.41 |
| Tourbe + Boue                        | 8.28 | 8.48 | 9.14 | 9.75 | 9.9  | 9.63 | 8.24 | 8.01 |

**ANNEXE F****RÉSULTATS DES RENDEMENTS DE LA LUZERNE****Poids sec, sol Kamouraska (g) (Coupe 1)**

| Traitemet   | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SKYL     | 3,21 | 3,11 | 3,48 | 2,49 | 2,92 |
| 2/ SKCL     | 2,64 | 2,41 | 1,68 | 1,8  | 2,1  |
| 3/ SKYS     | 3,33 | 3,2  | 2,95 | 3,6  | 2,43 |
| 4/ SKCS     | 2,24 | 2,81 | 3,14 | 3,13 | 2,52 |
| 5/ SKN      | 1,92 | 2,76 | 2,94 | 3,07 | 2,71 |
| 6/ SK60BY   | 3,06 | 3,13 | 3,66 | 2,63 | 3,67 |
| 7/ SK60BC   | 2,31 | 3,18 | 3,82 | 3,25 | 3,25 |
| 8/ SK60BN   | 2,67 | 3,38 | 3,52 | 3,6  | 2,65 |
| 9/ SK120BY  | 5,41 | 5,09 | 3,9  | 4,24 | 4,74 |
| 10/ SK120BC | 3,74 | 5,09 | 3,85 | 3,78 | 3,4  |
| 11/ SK120BN | 4,89 | 3,55 | 3,5  | 4,01 | 4,44 |
| 12/ SK60FY  | 2,46 | 2,79 | 2,56 | 4,52 | 2,87 |
| 13/ SK60FC  | 3,1  | 3,7  | 3,55 | 3,03 | 2,51 |
| 14/ SK60FN  | 3,13 | 3,23 | 3,48 | 2,77 | 2,94 |

**Poids sec, sol Saint-André (g) (Coupe 1)**

| Traitemet   | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SSYL     | 2,23 | 2,08 | 2,39 | 2,42 | 3,16 |
| 2/ SSCL     | 2,97 | 2,51 | 2,69 | 2,29 | 2,48 |
| 3/ SSYS     | 2,53 | 2,07 | 2,2  | 2,91 | 2,94 |
| 4/ SSCS     | 3,77 | 2,59 | 2,25 | 2,43 | 2,47 |
| 5/ SSN      | 3,57 | 2,69 | 2,36 | 2,11 | 1,9  |
| 6/ SS60BY   | 2,92 | 2,02 | 3,87 | 3,4  | 2,14 |
| 7/ SS60BC   | 3,37 | 4,3  | 3,49 | 3,69 | 2,9  |
| 8/ SS60BN   | 2,91 | 2,87 | 3,22 | 3,76 | 2,8  |
| 9/ SS120BY  | 4,18 | 4,85 | 5,31 | 5,11 | 4    |
| 10/ SS120BC | 3,48 | 4,55 | 5,6  | 4,48 | 4,66 |
| 11/ SS120BN | 3,98 | 3,85 | 5,62 | 4,01 | 4,29 |
| 12/ SS60FY  | 3,09 | 1,92 | 2,78 | 2,71 | 1,56 |
| 13/ SS60FC  | 3,1  | 3,58 | 3,28 | 3,28 | 2,13 |
| 14/ SS60FN  | 2,85 | 2,6  | 2,79 | 2,51 | 2,34 |

**Azote total, sol Kamouraska (%) (Coupe 1)**

| Traitemet   | E1    | E2    | E3    | E4    | E5    |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1/ SKYL     | 2,658 | 3,568 | 3,939 | 3,257 | 2,106 |
| 2/ SKCL     | 2,873 | 2,952 | 3,738 | 3,398 | 3,165 |
| 3/ SKYS     | 2,748 | 3,11  | 3,353 | 2,385 | 2,877 |
| 4/ SKCS     | 3,558 | 3,239 | 3,146 | 2,54  | 3,29  |
| 5/ SKN      | 3,02  | 3,086 | 2,772 | 2,334 | 2,725 |
| 6/ SK60BY   | 2,619 | 3,261 | 2,784 | 3,033 | 3,719 |
| 7/ SK60BC   | 3,228 | 3,044 | 2,711 | 2,536 | 3,113 |
| 8/ SK60BN   | 2,784 | 3,157 | 2,653 | 2,693 | 2,83  |
| 9/ SK120BY  | 3,357 | 3,403 | 3,003 | 3,457 | 3,193 |
| 10/ SK120BC | 3,417 | 3,303 | 3,214 | 2,704 | 2,512 |
| 11/ SK120BN | 3,311 | 3,159 | 2,869 | 2,725 | 2,988 |
| 12/ SK60FY  | 3,575 | 3,582 | 3,098 | 2,113 | 2,818 |
| 13/ SK60FC  | 3,319 | 2,494 | 2,844 | 2,478 | 3,225 |
| 14/ SK60FN  | 3,165 | 2,826 | 2,981 | 2,756 | 3,727 |

**Azote total, sol Saint André (%) (Coupe 1)**

| Traitemet | E1   | E2    | E3    | E4    | E5   |
|-----------|------|-------|-------|-------|------|
| 1/ SSYL   | 2,58 | 2,985 | 2,381 | 3,341 | 2,67 |

|             |       |       |       |       |       |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2/ SSCL     | 2,687 | 3,12  | 2,557 | 2,978 | 2,49  |
| 3/ SSYS     | 2,997 | 3,029 | 3     | 2,484 | 2,679 |
| 4/ SSCS     | 2,376 | 2,868 | 3,2   | 3,271 | 2,757 |
| 5/ SSN      | 1,988 | 2,298 | 2,675 | 3,209 | 3,225 |
| 6/ SS60BY   | 3,274 | 3,362 | 3,779 | 3,033 | 3,221 |
| 7/ SS60BC   | 3,831 | 3,122 | 3,303 | 3,856 | 3,233 |
| 8/ SS60BN   | 2,977 | 3,332 | 2,851 | 3,227 | 3,381 |
| 9/ SS120BY  | 3,042 | 3,312 | 2,734 | 3,64  | 3,514 |
| 10/ SS120BC | 2,992 | 3,032 | 2,687 | 3,481 | 2,932 |
| 11/ SS120BN | 4,297 | 3,254 | 2,939 | 2,757 | 3,052 |
| 12/ SS60FY  | 3,531 | 2,891 | 2,996 | 3,089 | 3,206 |
| 13/ SS60FC  | 2,995 | 2,487 | 3,521 | 2,123 | 3,046 |
| 14/ SS60FN  | 3,255 | 2,667 | 3,254 | 3,191 | 2,907 |

| Traitement  | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SKYL     | 3,98 | 3,98 | 3,5  | 4,23 | 5,14 |
| 2/ SKCL     | 6,07 | 4,58 | 4,03 | 3,64 | 5,18 |
| 3/ SKYS     | 5,31 | 4,58 | 3,46 | 5,21 | 4,74 |
| 4/ SKCS     | 4,39 | 5,23 | 5,23 | 5,19 | 4,67 |
| 5/ SKN      | 4,32 | 4,26 | 4,88 | 5,24 | 4,62 |
| 6/ SK60BY   | 5,43 | 4,38 | 5,71 | 5,26 | 5,64 |
| 7/ SK60BC   | 3,74 | 5,18 | 6,46 | 6,2  | 5,42 |
| 8/ SK60BN   | 6,34 | 4,5  | 4,98 | 4,46 | 5,23 |
| 9/ SK120BY  | 6,35 | 5,63 | 5,27 | 8,18 | 5,86 |
| 10/ SK120BC | 7,17 | 6,28 | 6    | 7,19 | 6,74 |
| 11/ SK120BN | 6,68 | 6,05 | 5,83 | 6,49 | 7,43 |
| 12/ SK60FY  | 5,6  | 3,97 | 4,32 | 5,36 | 6,36 |
| 13/ SK60FC  | 5,23 | 4,57 | 4,45 | 5,79 | 4,88 |
| 14/ SK60FN  | 6,49 | 5,76 | 4,19 | 5,18 | 4,67 |

**Poids sec, sol Sainte André (g) (Coupe 2)**

| Traitement  | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SSYL     | 1,81 | 2,02 | 3,34 | 3,05 | 3,87 |
| 2/ SSCL     | 3,74 | 3,53 | 3,51 | 3,5  | 3,76 |
| 3/ SSYS     | 2,86 | 2,58 | 3,71 | 4,25 | 2,12 |
| 4/ SSCS     | 4,01 | 4,04 | 4,17 | 3,16 | 3,65 |
| 5/ SSN      | 4,37 | 3,07 | 3,91 | 3,11 | 2,41 |
| 6/ SS60BY   | 5,7  | 3,41 | 6,51 | 6,32 | 6,23 |
| 7/ SS60BC   | 5,01 | 4,81 | 6,11 | 5,18 | 6,04 |
| 8/ SS60BN   | 4,93 | 4,43 | 5,43 | 5,36 | 4,23 |
| 9/ SS120BY  | 7,21 | 6,41 | 5,54 | 7,99 | 6,84 |
| 10/ SS120BC | 5,49 | 6,58 | 7,24 | 6,01 | 7,51 |
| 11/ SS120BN | 6,29 | 6,62 | 8,01 | 6,74 | 5,58 |
| 12/ SS60FY  | 2,73 | 3,09 | 3,02 | 2,97 | 3,12 |
| 13/ SS60FC  | 3,64 | 2,57 | 2,05 | 2,89 | 3,28 |
| 14/ SS60FN  | 2,84 | 2,77 | 3,34 | 3,04 | 3,22 |

**Azote total, sol Saint André (%) (Coupe 2)**

| Traitement  | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SKYL     | 2,75 | 2,99 | 3,31 | 2,74 | 2,8  |
| 2/ SKCL     | 2,33 | 2,22 | 2,15 | 3,5  | 2,17 |
| 3/ SKYS     | 2,36 | 2,84 | 2,6  | 2,74 | 2,7  |
| 4/ SKCS     | 2,24 | 2,12 | 2,86 | 2,41 | 2,35 |
| 5/ SKN      | 2,77 | 2,36 | 2,32 | 2,02 | 2,56 |
| 6/ SK60BY   | 2,09 | 2,48 | 2,32 | 2,08 | 2,86 |
| 7/ SK60BC   | 2,93 | 2,44 | 1,93 | 2,19 | 2,61 |
| 8/ SK60BN   | 2,26 | 1,82 | 2,15 | 2,24 | 2,3  |
| 9/ SK120BY  | 2,82 | 2,23 | 3,05 | 1,83 | 3    |
| 10/ SK120BC | 2,42 | 2,58 | 2,76 | 2,44 | 2,65 |
| 11/ SK120BN | 2,36 | 2,06 | 2,91 | 3,11 | 2,23 |
| 12/ SK60FY  | 2,54 | 1,98 | 2,78 | 2,46 | 1,66 |

|            |      |      |      |      |      |
|------------|------|------|------|------|------|
| 13/ SK60FC | 2,44 | 2,41 | 2,76 | 2,23 | 2,44 |
| 14/ SK60FN | 1,94 | 2,23 | 2,89 | 2,6  | 2,47 |

**Azote total, sol Sainte Andre (%) (Coupe 2)**

| Traitement  | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SSYL     | 2,68 | 2,44 | 2,52 | 2,18 | 3,08 |
| 2/ SSCL     | 2,47 | 2,05 | 2,45 | 2,24 | 2    |
| 3/ SSYS     | 2,57 | 2,75 | 2,14 | 2,83 | 3,22 |
| 4/ SSCS     | 3,17 | 2,33 | 2,65 | 2,26 | 2,55 |
| 5/ SSN      | 2,15 | 2,55 | 2,38 | 2,47 | 2,65 |
| 6/ SS60BY   | 2,4  | 3,3  | 2,02 | 2,07 | 2,36 |
| 7/ SS60BC   | 1,82 | 1,94 | 1,97 | 2,05 | 2,08 |
| 8/ SS60BN   | 2,01 | 2,36 | 2,12 | 2,47 | 2,4  |
| 9/ SS120BY  | 2,47 | 2,54 | 2,05 | 1,77 | 2,58 |
| 10/ SS120BC | 2,73 | 2,12 | 1,92 | 2,02 | 2,16 |
| 11/ SS120BN | 2,09 | 2,42 | 1,9  | 2,23 | 2,45 |
| 12/ SS60FY  | 2,44 | 2,08 | 1,87 | 1,72 | 1,95 |
| 13/ SS60FC  | 2,24 | 2,4  | 2,52 | 2,13 | 1,71 |
| 14/ SS60FN  | 1,83 | 2,03 | 2,18 | 2,63 | 2,35 |

**Poids sec, sol Kamouraska (g) (Coupe 3)**

| Traitement  | E1    | E2    | E3    | E4   | E5    |
|-------------|-------|-------|-------|------|-------|
| 1/ SKYL     | 8,14  | 8,89  | 7,31  | 7,68 | 7,07  |
| 2/ SKCL     | 8,84  | 8,41  | 7,43  | 7,73 | 8,45  |
| 3/ SKYS     | 10,95 | 9,55  | 7,92  | 8,34 | 7,58  |
| 4/ SKCS     | 6,9   | 9,16  | 9,15  | 8,76 | 7,2   |
| 5/ SKN      | 8,57  | 9,17  | 8,16  | 8,25 | 8,28  |
| 6/ SK60BY   | 9,02  | 7,3   | 10,42 | 9,93 | 9,63  |
| 7/ SK60BC   | 8,25  | 10,08 | 10,16 | 9,9  | 10,76 |
| 8/ SK60BN   | 6,85  | 7,66  | 8,55  | 9,44 | 7,55  |
| 9/ SK120BY  | 11,63 | 8,23  | 9,4   | 8,51 | 8,99  |
| 10/ SK120BC | 8,05  | 8,29  | 8,14  | 7,84 | 9,88  |
| 11/ SK120BN | 7,48  | 8,93  | 11,3  | 9,09 | 7,86  |
| 12/ SK60FY  | 9,56  | 7,14  | 7,74  | 7,13 | 10,01 |
| 13/ SK60FC  | 7,68  | 7,01  | 6,75  | 8,66 | 7     |
| 14/ SK60FN  | 7,47  | 9,78  | 6,69  | 8,58 | 7,5   |

**Poids sec , sol Sainte André (g) (Coupe 3)**

| Traitement  | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SSYL     | 3,89 | 3,7  | 4,95 | 5,57 | 7,46 |
| 2/ SSCL     | 4,18 | 3,84 | 3,96 | 6,9  | 4,64 |
| 3/ SSYS     | 3,48 | 3,48 | 5,26 | 7,12 | 3,43 |
| 4/ SSCS     | 6,21 | 6,58 | 8,82 | 4,78 | 6,39 |
| 5/ SSN      | 4,6  | 6,01 | 4,85 | 4,54 | 4,02 |
| 6/ SS60BY   | 4,45 | 5,54 | 7,27 | 7,49 | 8,98 |
| 7/ SS60BC   | 6,19 | 5,31 | 8,45 | 6,78 | 7,18 |
| 8/ SS60BN   | 5,69 | 7,56 | 5,41 | 7,59 | 6,37 |
| 9/ SS120BY  | 7,92 | 7,84 | 7,3  | 8,32 | 7,27 |
| 10/ SS120BC | 7,66 | 7,61 | 8,54 | 7,23 | 7,93 |
| 11/ SS120BN | 7,75 | 8,66 | 7,76 | 9,57 | 8,07 |
| 12/ SS60FY  | 6,01 | 3,88 | 4,86 | 3,9  | 4,37 |
| 13/ SS60FC  | 6,4  | 4,75 | 4    | 4,15 | 4,12 |
| 14/ SS60FN  | 5,27 | 3    | 3,91 | 3,92 | 4,34 |

**Azote total, sol Kamouraska (%) (Coupe 3)**

| Traitement | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SKYL    | 2,73 | 2,47 | 2,86 | 2,67 | 2,63 |
| 2/ SKCL    | 2,27 | 2,34 | 2,9  | 2,61 | 2,67 |
| 3/ SKYS    | 2,08 | 2,21 | 2,69 | 2,59 | 2,98 |
| 4/ SKCS    | 2,57 | 2,16 | 2,71 | 2,35 | 2,7  |
| 5/ SKN     | 2,49 | 2,4  | 2,62 | 2,29 | 2,27 |
| 6/ SK60BY  | 2,5  | 2,95 | 2,53 | 2,62 | 2,43 |
| 7/ SK60BC  | 2,67 | 2,5  | 2,35 | 2,89 | 2,48 |

|             |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 8/ SK60BN   | 3    | 2,61 | 2,86 | 2,6  | 2,87 |
| 9/ SK120BY  | 2,38 | 3,19 | 2,71 | 3,33 | 3    |
| 10/ SK120BC | 3,11 | 2,7  | 3,32 | 3,08 | 3,18 |
| 11/ SK120BN | 2,76 | 2,47 | 2,5  | 3,13 | 2,52 |
| 12/ SK60FY  | 1,93 | 2,53 | 2,51 | 1,93 | 1,76 |
| 13/ SK60FC  | 2,41 | 2,57 | 2,14 | 1,97 | 2,48 |
| 14/ SK60FN  | 2,3  | 1,94 | 3,09 | 2,29 | 2,33 |

**Azote total, sol Saint André (%) (Coupe 3)**

| Traitement  | E1   | E2   | E3   | E4   | E5   |
|-------------|------|------|------|------|------|
| 1/ SSYL     | 2,46 | 2,46 | 2,31 | 1,97 | 2,24 |
| 2/ SSCL     | 2,4  | 2,18 | 2,21 | 2,11 | 1,62 |
| 3/ SSYS     | 2,48 | 2,49 | 2,1  | 2,41 | 3,05 |
| 4/ SSCS     | 2,39 | 2,24 | 2,09 | 2,27 | 2,22 |
| 5/ SSN      | 1,88 | 2,23 | 2,05 | 1,99 | 2,07 |
| 6/ SS60BY   | 2,2  | 1,79 | 2,48 | 1,86 | 2,97 |
| 7/ SS60BC   | 2,03 | 2,19 | 2,97 | 2,33 | 2,53 |
| 8/ SS60BN   | 2,29 | 3,17 | 1,89 | 2,53 | 2,05 |
| 9/ SS120BY  | 2,04 | 2,49 | 2,04 | 2,06 | 3,02 |
| 10/ SS120BC | 2,05 | 2,43 | 2,39 | 2    | 2,38 |
| 11/ SS120BN | 1,97 | 2,41 | 2,99 | 2,06 | 2,24 |
| 12/ SS60FY  | 2,4  | 1,67 | 1,96 | 1,78 | 2,07 |
| 13/ SS60FC  | 2,06 | 2,18 | 2,33 | 1,62 | 2,11 |
| 14/ SS60FN  | 2,32 | 2,45 | 2,1  | 2,21 | 1,92 |

## REPROGRAPHIE DE LA REMISE FINALE DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE

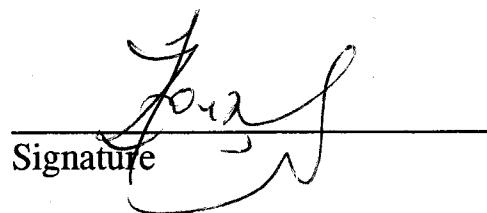
Lors de la remise finale de mon mémoire ou de ma thèse, les photocopies ont été effectuées par :

l'étudiant(e) :



*Les photocopies effectuées par l'étudiant(e)  
seront sous sa responsabilité.*

Faouzi Ben Rebah  
Nom

  
Signature

Nom du directeur de recherche:

*R.D Tyagi*

Nom du co-directeur de recherche:

*Danielle Prevost*

Boursier ou non-boursier:

~~Non boursier~~ Non Boursier