

Université du Québec  
INRS-Eau

**Écologie microbienne de la biolixiviation thermophile des  
boues d'usines d'épuration des eaux usées domestiques.**

par  
Frédéric Shooner

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

Mai 1996

## Table des matières

Remerciements	3
Avant-propos	4
Introduction	7
Revue de la littérature	10
Hypothèses de travail	19
Objectifs de recherche	19
Méthodologie	19
Résultats	24
Discussion	30
Conclusion	38
Articles scientifiques présentés	40
Annexes	97
Appendice	101
Bibliographie	106

## Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de thèse, le docteur R.D. Tyagi, et l'INRS-Eau sans qui la réalisation de ce grand projet aurait été impossible. En effet, dans le contexte économique actuel, il est difficile pour un étudiant qui n'excelle pas au niveau académique de dénicher les bourses gouvernementales de troisième cycle. Ces bourses sont destinées avant tout à l'élite académique. N'étant pas l'un de ceux-là, la seule possibilité de réaliser des études doctorales était de trouver un mécène. Le docteur R.D. Tyagi ainsi que l'INRS-Eau ont joué ce rôle.

Le docteur R.D. Tyagi a joué également un autre rôle important, soit celui de «générateur d'idées». Cette capacité de faire le rapprochement entre les choses pour imaginer de nouveaux projets est remarquable et me servit tout au long de mon séjour à l'INRS-Eau. Je tiens à souligner la grande liberté d'action qu'il me donna lors de la réalisation du projet, ce qui n'est pas toujours le cas dans la relation étudiant-chercheur et directeur de thèse.

Une autre personne a également joué un rôle de premier plan au tout début de ce projet, le professeur Joël de la Noüe. Je me souviendrai longtemps de notre discussion sur l'orientation d'une thèse de doctorat et la façon dont il faut structurer celle-ci: «Il faut enfoncer un coin,» disait-il. Je pense que c'est fait. Merci du conseil.

Évidemment, il n'est pas possible de passer sous silence le milieu dans lequel j'ai évolué durant les quatre dernières années. Je me souviens de ces fameux dîners au complexe scientifique où tous les débats étaient à l'ordre du jour. Imaginez, une table ronde (en faite, elle était plutôt carrée) sur le racisme avec des gens de l'Afrique du Nord, de l'Afrique centrale, de l'Inde, de la Chine, du Canada anglais et français, de la France, des États-Unis. Que dire de la politique provinciale et fédérale, des séries éliminatoires... ou des inquiétudes ou des joies de tous et chacun. Très enrichissant.

En plus des grandes discussions du dîner, il y avait le travail bien sûr. Même si l'espace de laboratoire était exigü et occasionnait des échauffements sporadiques, aucun problème ne demeurait insoluble. La communication était omniprésente. L'ensemble des étudiants et des travailleurs professionnels de laboratoire formait une espèce de grande encyclopédie vivante que j'ai consultée de nombreuses fois. Ce qui est amusant dans tout ça, c'est que le concept de multidisciplinarité, si chère à l'INRS-Eau, existe probablement

davantage à cause de la petitesse des locaux que du fait d'exiger des cours d'appoint aux étudiants ou de regrouper plusieurs disciplines sous une même institution.

Au risque de faire quelques absents, je tiens à remercier les personnes suivantes : Albert Graig, Michael Twist, Jean-Christian Auclair, Landis Hare, Michèle Bordeleau, Paul Boisvert, Pauline Fournier, Elaine Parent, Bernard Veilleux, Guy Roberge, Diane Fournier, Eric Emond, Hamel Benmoussa, Jean-François Blais, Nathalie Meunier, Robert Roy, Sylvie St-Pierre, Stéphane Prémont, Michelle et Lucie du ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, Roger Guay, T.R. Sreekrishnan, Yves Couillard, Luc Simon, Jean Renaud, Peter G. C. Campbell, Don P. Kelly, Alice Roy, Jean Bousquet et ses étudiants Jérôme et François, monsieur Du, Vishal Sachdeva, Miguel A. Huerta, Marc Lavoie, Sylvain Martin, Louis Bernatchez et ses étudiants. Et pour ceux que j'aurais oubliés, je vous salue.

Je dédie une pensée très particulière à mes grands amis ainsi qu'à mes parents qui m'ont encouragé d'une façon ou d'une autre, souvent sans le savoir.

En terminant, je tiens à souligner la bienveillance de ma compagne Sylvie Asselin qui a toujours su être présente pour me relever dans les moments de grands doutes existentiels. Elle n'a jamais failli à la tâche. Ce n'est pas tous les jours facile de vivre avec un écolier de 30 ans! C'est avec des femmes et des hommes de cette trempe que j'imaginerai, la mort venue, un monde meilleur. Merci beaucoup Sylvie.

## Avant-propos

Il y a quelques années à peine, les préoccupations environnementales étaient le lot de quelques scientifiques et de groupes d'extrémistes. Aujourd'hui, l'environnement est une préoccupation de tous les jours pour de plus en plus de citoyens et par conséquent est devenu un enjeu électoral pour les trois ordres de gouvernement, municipal, provincial et fédéral. Ainsi, les instances politiques, également influencées par un contexte économique morose, encouragent de plus en plus, par le biais d'organismes subventionnaires, la recherche pratique pour solutionner les problèmes environnementaux et créer de nouvelles activités économiques reliées à la mise au point et à l'exploitation de biotechnologies.

Dans la foulée de cette nouvelle tendance de recherche, où l'utilité et la rentabilité de l'innovation sont deux prémisses pour l'obtention du financement, plusieurs études furent réalisées à l'INRS-Eau en ce qui a trait au développement de biotechnologies de l'assainissement des eaux usées. Le principal axe de recherche en assainissement fut l'enlèvement des métaux contaminant les boues d'usines d'épuration des eaux usées municipales à l'aide de biotechnologies.

En effet, l'équipe dirigée par le professeur R.D. Tyagi a mis au point (et pour laquelle elle a présenté une demande de brevet) une biotechnologie basée sur la production microbienne d'acide sulfurique, à partir du soufre élémentaire, qui permet d'abaisser le pH des boues, ce qui provoque la mise en solution des métaux indésirables. Une caractérisation minutieuse du procédé a permis de mettre en évidence les souches microbiennes indigènes responsables de l'oxydation du soufre élémentaire. De plus, cette technologie, entièrement basée sur une action microbienne, permet une autre activité microbienne indispensable en assainissement, soit la stabilisation et la minéralisation de la matière organique. Il est donc possible de solubiliser les métaux tout en réduisant le contenu de la boue en matières organiques.

Après le succès technique et financier de cette technologie, parce que les biotechnologies thermophiles d'assainissement des eaux sont de plus en plus populaires en Europe et parce que l'activité microbienne d'oxydation du soufre élémentaire au-delà de 40 °C n'avait pas été étudiée, il était tout à fait justifié de continuer la recherche dans ce domaine. Un projet fut donc imaginé pour explorer la possibilité d'une biolixiviation des métaux contenus dans les boues d'usines d'épuration, mais cette fois-ci en conditions thermophiles. La recherche devait être axée sur l'oxydation du soufre élémentaire à l'aide de la microbiota

thermophile et indigène des boues, tout en permettant une stabilisation et une minéralisation de la matière organique.

À cause des exigences académiques des uns et des exigences économiques des autres, le projet de thèse fut rapidement scindé en deux volets, soit un volet appliqué où la possibilité et l'efficacité du processus devaient être démontrées, et le volet fondamental où la microbiota thermophile responsable de l'activité devait être isolée et caractérisée. Parce que le doctorat est avant tout une activité académique et qu'il est souvent difficile d'allier avancement des connaissances en science avec développement de biotechnologies à potentiel économique, davantage d'efforts furent mis sur l'aspect fondamental. Ainsi, une nouvelle espèce du genre *Thiobacillus*, nommée *Thiobacillus thermosulfatus*, fut isolée et caractérisée sur le plan phénotypique et génotypique. Une étude sur l'écologie microbienne associée au processus fut également réalisée. Ainsi, le volet fondamental satisfait à l'une des exigences universitaires intrinsèques à l'obtention d'un doctorat, soit une contribution originale à l'avancement des connaissances en science.

Pour ce qui est du volet pratique, la possibilité d'une biolixiviation thermophile des boues d'usines d'épuration fut investiguée. Même si cet aspect n'a pas été la principale occupation temporelle, suffisamment de données furent amassées pour répondre aux questions dictées par les exigences de faisabilité et de rentabilité.

Le présent document se veut une synthèse permettant au lecteur de prendre contact avec la problématique des boues d'usines d'épuration municipales. Il fait état des connaissances actuelles menant à la proposition des hypothèses de recherche et des résultats engendrés par cette même recherche. Finalement, une intégration résume l'ensemble de l'œuvre doctorale. Pour appuyer cette synthèse, trois articles scientifiques acceptés pour publication dans trois journaux scientifiques internationaux avec jury sont annexés. Ces trois articles couvrent toutes les facettes de l'étude doctorale, soit la biolixiviation thermophile, l'isolement et la caractérisation de la nouvelle espèce bactérienne ainsi que l'étude de l'écologie microbienne associée au processus.

## Introduction

### **Problématique des boues d'usines d'épuration municipales**

Depuis les dernières années, il existe une inquiétude quant à la disposition des boues produites par les usines d'épuration des eaux usées municipales. En effet, d'ici à la fin du siècle, la quantité de boues produites au Canada pourrait dépasser 1 million de tonnes par année, dont 200 000 tonnes juste au Québec (Webber, 1986). L'utilisation de ces boues comme agent fertilisant en agriculture (épandage direct ou compostage) est la solution la plus rentable à long terme du point de vue économique (Davis, 1987). Elle permet aussi de tirer avantage de la bonne teneur en azote et en phosphore de la boue en plus d'améliorer la structure du sol, le pouvoir de rétention d'eau, la capacité d'échange ionique et l'activité biologique (Environnement Canada, 1985; Gouvernement du Québec, 1984; Hattori, 1988). Cependant, une telle pratique pose un problème potentiel de contamination à cause de la présence d'éléments pathogènes (bactéries, parasites, virus) et de métaux lourds.

En effet, lors de l'épuration, les métaux sont concentrés dans les boues primaires et secondaires par précipitation (Sterrit et Lester, 1984), par complexation avec des polymères microbiens (Brown et Lester, 1979) ou par emprisonnement physique (Stephenson et Lester, 1987a, 1987b). De cette façon, plus de 80 % de la quantité totale de métaux dans l'affluent initial est retirée de l'effluent final pour se retrouver dans les boues produites.

Si les boues ne sont pas traitées en conséquence avant leur valorisation, certains métaux indésirables pourraient éventuellement contaminer les différentes chaînes trophiques et se retrouver, tôt ou tard, dans notre assiette ou notre verre d'eau. Par exemple, l'accumulation des métaux chez les plantes à la suite de l'épandage de boues d'usine d'épuration fut démontrée pour le cadmium, le cuivre, le nickel, le plomb et le zinc (Adamu et al., 1989; Davis et Carlton-Smith, 1980; Levine et al., 1989). Certains effets toxiques furent rapportés chez des bovins ayant été en contact avec une terre amendée avec des boues fortement contaminées par le plomb (Webber, 1986). Si ingéré en grande quantité, le cadmium s'accumule dans les reins et le foie de l'homme et des animaux, ce qui peut interférer avec les fonctions de ces organes. De plus il altère certains systèmes enzymatiques essentiels et interfère avec la synthèse des acides nucléiques (Doyle et al., 1978). Il fut également démontré que le Cd, tout comme le Cu, a un effet répressif sur l'activité de réduction des nitrates dans les lacs (Waara, 1992). Pour ce qui est du plomb, il interfère avec plusieurs systèmes enzymatiques et forme des complexes avec les acides nucléiques, ce qui

entrave leur synthèse (Mininni et Santori, 1987). Le Pb a également un effet répressif sur la réduction des nitrates dans les lacs (Waara, 1992).

Selon St-Yves et Beaulieu (1988), plus de 52 % des boues produites au Québec dépassaient les normes obligatoires en concentration de métaux pour la valorisation agricole en 1988. Si l'on prend en considération les concentrations acceptables, ce pourcentage augmente à 85 %. En 1984, plus de 50 % des boues produites par l'Ontario dépassaient les normes ontariennes (Wong et Henry, 1984). Aux États-Unis, en 1982, de 50 à 60 % des boues produites ne respectaient pas les normes de l'Environmental Protection Agency (Wozniak et Huang, 1982).

Les métaux présents dans les boues d'usines d'épuration proviennent de trois origines: des industries, des résidences et du ruissellement. Même si l'on effectue un contrôle à la sortie des usines ou l'on met en place des procédés moins polluants, les boues d'usines d'épuration restent toujours contaminées par les métaux. En effet, une grande partie des métaux proviennent des habitations et du ruissellement urbain (Davis, 1987; Tjell, 1986; Wozniak et Huang, 1982). Par exemple, 63 % du cadmium, 47 % du cuivre et 42 % du zinc retrouvés dans les boues peuvent provenir des résidences (Davis et Jacknow, 1975; Klein et al., 1974). Les sources de contamination des eaux usées domestiques sont nombreuses, comme les produits pharmaceutiques et cosmétiques, les peintures, les solvants, les produits nettoyants, la tuyauterie, etc. Quant au ruissellement urbain, il serait la principale source de plomb et de zinc dans les boues (Förstner et Wittmann, 1979).

Comme il a été dit précédemment, la présence de la microbiota potentiellement pathogène, pour l'homme et les animaux domestiques, dans les boues d'usines d'épuration pose également un problème évident de salubrité dans l'optique de la valorisation par épandage direct de la boue. Afin de diminuer les risques d'infection, une période d'attente minimale, avant l'utilisation de l'espace, doit être respectée après l'épandage. De plus, des mesures d'hygiène personnelle supplémentaires sont recommandées pour le personnel responsable du transport et de l'épandage. Par contre, si la boue est destinée au compostage, il est à supposer que l'aspect sanitaire de la manipulation est amélioré en raison de l'efficacité reconnue de ce procédé à produire un substrat allégé en éléments infectieux.

Finalement, pour des raisons économiques, il est fortement conseillé de réduire le plus possible la quantité d'eau de la boue si celle-ci doit subir un traitement de stabilisation, être épandue ou incinérée (Colin et Gazbar, 1995). Pour l'épandage la boue doit être concentrée

entre 4% et 6% de solides totaux et pour la digestion anaérobie ainsi que l'incinération, la boue doit avoir un minimum de 10% de solides totaux (Cizinska et al. 1992) La déshydratation des boues produites se fait généralement par un processus physique de décantation, de filtration, ou de centrifugation qui peut être préalablement précédé par l'ajout d'agents flocculants inorganiques (sels:  $Al^{3+}$  ou  $Fe^{3+}$ ) ou organiques (polymères ioniques) (Rasmussen et al. 1994). Certains agents flocculants, en particulier les polymères, pourraient avoir un effet pervers sur les organismes aquatiques une fois les boues disposées dans la nature (Biesinger et Stokes, 1986). Ainsi, les coûts du traitement et de l'élimination des boues produites peuvent représenter de 25 à 50 % du budget d'opération d'une station (Spinosa et al., 1984; U.S. Environ. Prot. Agency, 1979b; Vesilind, 1980) et certains produits employés ne seraient pas compatibles avec l'environnement. Suite à ces constatations il est évident que la mise au point de nouveaux traitements des eaux usées produisant des boues facilement déshydratables est une nécessité économique et environnementale.

D'ici à la fin du siècle, et même au-delà, il n'est pas réaliste de penser pouvoir éliminer toutes les sources de métaux qui polluent les eaux d'égout vu la grande diversité de celles-ci. La décontamination des rejets d'usines et la mise en œuvre de technologies propres permettront une diminution des métaux rejetés dans l'environnement. Cependant, les considérations économiques et politiques sont encore trop omniprésentes pour qu'il y ait une amélioration rapide de la situation. Il est donc pertinent de mettre au point des procédés qui permettront de réduire les concentrations des métaux dans les boues d'usines d'épuration en attendant le jour où le contrôle pourra se faire à la source.

## Revue de la littérature

### L'enlèvement des métaux dans les boues par biolixiviation

Plusieurs solutions au problème des métaux dans les boues d'usines d'épuration ont été étudiées et se regroupent principalement sous deux catégories : la solubilisation chimique et la solubilisation biologique. Ces deux types de solution sont basés sur le même principe, soit la solubilité des métaux en conditions acides. Lors de la solubilisation chimique, le pH de la boue est abaissé directement par l'ajout d'un acide, comme l'acide sulfurique par exemple. Pour ce qui est de la solubilisation biologique, l'acide nécessaire à l'abaissement du pH est produit par des bactéries qui se développent à même la boue si certains substrats sont présents. Dans les deux cas, une fois les métaux solubilisés, les matières solides sont séparées de la phase liquide. Les métaux présents en solution sont précipités par l'ajout de chaux pour être ensuite recueillis. De cette façon, il est possible d'obtenir une boue allégée en métaux.

La solubilisation chimique s'effectue à l'aide d'acides ajoutés à la boue, soit  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $HNO_3$ ,  $CH_3COOH$ , jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de 1,5 (Bloomfield et Pruden, 1975; Lo et Chen, 1990; Logan et Feltz, 1985; McNulty et al., 1977; Scott et Horling, 1975; Wozniak et Huang, 1982). Cependant, l'utilisation de ces acides ne permet pas une solubilisation acceptable du cuivre et du plomb car d'autres facteurs que le pH jouent un rôle dans la solubilisation, comme le potentiel d'oxydoréduction ou la concentration des métaux (Tyagi et Couillard, 1989). De plus, la quantité considérable d'acide qui doit être utilisé et entreposé rend cette solubilisation économiquement rébarbative (Tyagi et Couillard, 1989). D'autres solutions furent explorées, comme l'emploi de chlore (Oliver et al., 1975), d'échangeur d'ions (Cornwell et al., 1980) ou d'agents chélateurs tel que l'acide éthylènediaminetétraacétique et l'acide nitrilotriacétique (Jenkins et al., 1981; Lo et Chen, 1990). Les frais de fonctionnement élevés et certaines difficultés reliées à l'exploitation sont autant d'obstacles à l'utilisation de ces techniques.

La solution la plus prometteuse, tant du point de vue économique que du point de vue de l'efficacité, est la solubilisation biologique des métaux, soit la biolixiviation. Il existe deux procédés qui reposent sur la capacité que possèdent certaines bactéries d'oxyder le sulfate ferreux ou le soufre élémentaire pour en soutirer de l'énergie. Ces activités ont lieu aux températures usuelles des différents processus de traitement des eaux usées, soit de  $7^{\circ}C$  à  $25^{\circ}C$ .

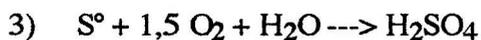
L'équation 1 représente l'oxydation bactérienne du sulfate ferreux :



Les ions ferriques produits provoquent l'oxydation chimique du sulfure métallique (MS), libérant ainsi l'ion métallique :



Le soufre produit peut être ensuite transformé en acide sulfurique par ces mêmes bactéries :



L'utilisation du sulfate ferreux pour la biolixiviation des boues a fait ses preuves (Couillard et Mercier, 1991; Tyagi et al., 1990). Cependant, il est nécessaire d'abaisser le pH de la boue à 4 afin d'assurer la croissance des bactéries oxydantes, ce qui suppose une opération supplémentaire en plus d'impliquer l'entreposage et la manipulation d'acides.

Pour ces raisons, un processus biologique pouvant être appliqué directement sur les boues sans ajustement préalable du pH a été développé à l'INRS-Eau par l'équipe du professeur Tyagi. Ce processus est basé uniquement sur l'oxydation microbienne du soufre élémentaire qui produit de l'acide sulfurique (équation 3). Il permet de réduire le temps alloué pour la solubilisation des métaux de 72-240 heures (oxydation du sulfate ferreux) à 40-50 heures, avec une solubilisation moyenne des métaux de 62,5 %, comparativement à 49,5 % pour le procédé utilisant le sulfate ferreux et à 48,8 % pour la lixiviation chimique, c'est-à-dire par l'ajout d'acide jusqu'à un pH de 2 (Blais et al., 1992b).

De plus, contrairement aux processus basés sur l'oxydation du sulfate ferreux ou ceux par l'ajout direct d'acide, celui au soufre permet une réduction des solides volatils en suspension de 1,4 % à 64,4 % pour une moyenne de 37,4 % et une réduction du carbone soluble de la phase aqueuse de 8 % à 73 %, pour une moyenne de 47 % (Blais et al., 1992c). Les odeurs nauséabondes sont également éliminées. Cette minéralisation de la matière est causée par des microorganismes hétérotrophes adaptés aux conditions acides. Ce procédé a aussi démontré son efficacité à inactiver certains organismes indicateurs de pollution fécale

comme les coliformes totaux, les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux (Blais et al., 1992c).

Deux populations bactériennes, présentes naturellement dans les boues d'usines d'épuration, sont responsables de la baisse du pH par oxydation du soufre élémentaire lors de la biolixiviation mésophile (Blais et al., 1992a). Une première population, *Thiobacillus thiooparus*, abaisse le pH de 7-8,5 à 4-4,5 et la seconde, *Thiobacillus thiooxidans*, de 4-4,5 à des valeurs égales ou inférieures à 2,0. Le genre *Thiobacillus* fait partie de la flore microbienne des eaux d'égout (Hutchinson et al., 1969), par le fait même des boues d'usines d'épuration (Schönborn et Hartman, 1978), et a même été reconnu comme étant responsable de la corrosion des conduites d'égout (Milde et al., 1983). À première vue, il peut sembler surprenant de retrouver des bactéries capables d'oxyder le soufre dans un milieu soi-disant exempt d'un tel élément. Trois hypothèses ont été proposées pour expliquer la présence de tels organismes : le rejet domestique de détergents riches en composés soufrés (Milde et al., 1983), la réduction des sulfates en H<sub>2</sub>S (Sand, 1987) et la production de composés soufrés résultant de la dégradation des acides aminés (Kadota et Ishida, 1972).

Ainsi, la biolixiviation basée sur l'oxydation bactérienne du soufre élémentaire représente jusqu'à maintenant la meilleure façon de réduire la concentration des métaux dans les boues. De plus, ce procédé permet d'éliminer les bactéries et les virus indicateurs de pollution fécale et cause une minéralisation de la boue.

Cependant, la biolixiviation basée sur l'oxydation microbienne du soufre élémentaire, ainsi que celle utilisant le sulfate ferreux, ne résout pas tous les problèmes. Même si la biolixiviation au soufre est la plus efficace, certains métaux restent récalcitrants et passent difficilement en solution comme le chrome et le plomb (Blais et al., 1992b). Il serait également souhaitable d'augmenter la solubilisation des métaux qui montrent une toxicité au sein de la chaîne alimentaire, comme le cadmium et le plomb.

Il a été démontré que la baisse du pH lors de la biolixiviation inactivait trois types de bactéries indicatrices (Blais et al., 1992c). Il est donc raisonnable de croire à un effet antibactérien et antiviral de ce procédé sur les bactéries pathogènes humains. Cependant, il subsiste un doute, car les quatre types d'indicateurs utilisés ne représentent que globalement les bactéries et les virus pathogènes, et leur utilisation comme indicateur ne peut tenir compte des spécificités de chaque organisme à tolérer certaines conditions, comme les pH acides par exemple.

Également, aucune donnée n'existe sur l'efficacité de la biolixiviation à détruire les œufs ou les kystes des parasites humains comme *Ascaris*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Taenia* et bien d'autres. Malheureusement, le plus connu des parasites, soit *Ascaris* et ses espèces, possède une résistance presque légendaire aux conditions acides et est considéré comme l'un des parasites les plus récalcitrants présents dans les boues (Schmidt et Roberts, 1989). Les œufs d'*Ascaris* peuvent se développer dans des solutions à 50 % d'acide acétique, d'acide chlorhydrique, d'acide nitrique ou d'acide sulfurique et dans des solutions saturées en sulfate de cuivre et de fer (Rudolfs et al., 1950). Ainsi, la biolixiviation au soufre n'a probablement aucun effet sur la viabilité d'*Ascaris*, puisque la concentration en sulfate produit par l'oxydation du soufre est d'environ 3 g/l pour un pH final de 2 (Blais et al., 1992c). Il est admis que la meilleure façon de se débarrasser d'*Ascaris* est un traitement thermique à 60 °C pendant trente minutes, ou plus si la température est inférieure (Hays, 1977).

### **Traitement en conditions thermophiles des eaux usées municipales**

Une solution au problème de la présence des pathogènes et de quelques contaminants organiques, comme les hydrocarbures, dans les boues d'usines d'épuration est la digestion aérobie thermophile, soit entre 40 °C et 70 °C. L'effet négatif de l'élévation de la température sur les microorganismes est bien connu (Mason et al., 1992) et il est démontré que la digestion en conditions aérobies est supérieure à celle en conditions anaérobies en ce qui a trait à la décomposition de certains polluants organiques, comme les hydrocarbures et les résidus de détergents (Hamer et Zwiefelhofer, 1986). De plus, la digestion thermophile augmenterait le taux de destruction des solides, d'où une diminution du temps de rétention et du volume du réacteur (Smith et al., 1975).

Pour chauffer la boue à la température désirée, il existe deux possibilités, soit par un apport extérieur d'énergie (système de chauffage au gaz, à l'électricité, etc.), appelé digestion aérobie thermophile, ou soit par la chaleur dégagée naturellement lors de l'oxydation de la matière, appelée digestion aérobie autothermique. La digestion aérobie thermophile ne suscite plus d'intérêt depuis qu'il a été démontré qu'il est possible d'accumuler la chaleur dégagée par l'oxydation microbienne de façon à augmenter la température du réacteur. Cette digestion est appelée par certains auteurs le «wet composting» ou compostage humide (Smith et al., 1975).

La température moyenne atteinte par les différents systèmes autothermiques connus est de 54,7 °C pour un maximum exceptionnel de 74 °C (Appleton et Venosa, 1986; Burt et

al., 1990; Hamer et Zwiefelhofer, 1986; Jewell et Kabrick, 1980; Messenger et al., 1990; Pöpel et Ohnmacht, 1972; Smith et al., 1975; Vismara, 1985). Tout comme les processus traditionnels de minéralisation des boues, la digestion autothermique permet de répondre aux exigences de l'EPA, à savoir que la boue doit subir une réduction de ses solides volatils d'au moins 38 % lors de la digestion (U.S. Environ. Prot. Agency, 1979a). Contrairement aux processus traditionnels, la digestion autothermique permet une telle réduction des solides volatils en moins de huit jours. Par exemple, la digestion anaérobie qui est très répandue exige une vingtaine de jours d'exploitation.

Certains auteurs proposent l'utilisation des processus autothermiques comme une préétape permettant l'hygiénisation de la boue avant sa digestion anaérobie (Appleton et Venosa, 1986; Hamer et Zwiefelhofer, 1986; Messenger et al., 1990). Ce procédé se fait essentiellement en deux étapes. Premièrement, la boue est mise sous conditions autothermiques, ce qui provoque l'inactivation des pathogènes, mais toutefois sans digérer la boue, ce qui ne diminue pas le rendement de la production ultérieure de méthane (Messenger et al., 1990). La boue est ensuite transférée dans le réacteur anaérobie mésophile pour subir la stabilisation. Le biogaz dégagé lors de la deuxième étape peut être utilisé à d'autres fins que le chauffage du réacteur anaérobie, puisque la boue qui y entre est déjà chaude. Le gaz peut servir comme carburant pour le compresseur responsable de l'aération (Appleton et Venosa, 1986). Le temps de rétention hydraulique à la première étape est compris entre 0,7 et 3 jours et entre 8 et 20 jours pour la deuxième étape.

Pour ce qui est de la séparation solide-liquide des boues produites, la digestion thermophile offre un rendement médiocre si aucun agent flocculant n'est ajouté. Cependant, il fut démontré que la déshydratation des boues de digestion thermophile est nettement améliorée si le pH est abaissé à 1,5 (Jewell, 1991). L'acidification des boues, soit un pH inférieur à 4,0, pour améliorer la séparation solide-liquide a également fait l'objet d'un brevet (Kovacs, 1992).

Pour ce qui est de la destruction des éléments pathogènes, Kabrick et Jewell (1982) n'ont trouvé que quelques œufs viables d'*Ascaris* dans l'effluent des boues traitées en autothermie (45 °C), ce qui est un rendement supérieur à celui de la digestion anaérobie (35 °C) de ces mêmes boues. Lee et al. (1989) ont démontré qu'après dix jours de digestion en conditions anaérobies à 53 °C, les comptes des coliformes fécaux, *Escherichia coli*, streptocoques fécaux, entérovirus et *Ascaris* sont réduits sous le seuil de détection. Une boue

chauffée à 51°C pendant cinq minutes permet une réduction de 5 à 7 log de la concentration en poliovirus (Ward et al., 1976).

On a démontré que la flore microbienne responsable de l'oxydation de la matière organique en conditions aérobies thermophiles est composée majoritairement par le genre *Bacillus* (Sonnleitner et Fiechter, 1983b; Demharter et Hensel, 1989; Hensel et al., 1989; Scholz et al., 1987; Demharter et al., 1989). D'autres espèces furent isolées, mais en quantité relative beaucoup plus faible, soit *Sphaerobacter thermophilus* et *Thermus ruber*. Les espèces isolées à partir des boues d'usines d'épuration municipales traitées en conditions autothermiques, ainsi que leurs caractéristiques, sont présentées au tableau 6 (page 90). Contrairement au compostage conventionnel, aucune moisissure ni de levure ne furent isolées lors d'une digestion autothermique des boues.

Une expérience du type «pulse» suggère que la source principale de carbone pour ces microorganismes serait les protéines (Bomio et al., 1989). Une autre étude démontre que les lipides seraient plutôt la source de carbone et d'énergie, et que les protéines joueraient le rôle de source d'azote (Burth et al., 1990). Le genre *Bacillus* retrouvé, possède une croissance très rapide en conditions de faible aération, même si *Bacillus* est un aérobie strict (Sonnleitner et Fiechter, 1983b). D'ailleurs, il fut démontré que c'est la source de carbone, et non l'oxygène, qui est l'élément limitant en conditions aérobies (Bomio et al., 1989).

En ce qui a trait aux considérations plus techniques, la viabilité de la population microbienne responsable de la digestion thermophile n'est pas affectée par les fluctuations de température usuelle d'un tel processus (15 °C à 60 °C) et une perte de la population est peu probable, en raison de la spontanéité de la croissance et de l'ubiquité des organismes en question. En effet, le genre *Bacillus* se retrouve dans la plupart des habitats terrestres du fait de sa capacité à produire des spores (Slepecky et Hemphill, 1992). C'est pour cela qu'il n'est pas nécessaire de trouver ou d'enrichir une microbiota particulière pour traiter les boues en conditions autothermiques. De plus, la capacité à dégrader les polymères naturellement présents dans la boue est peu influencée par les fluctuations de température, d'aération et de temps de résidence (Sonnleitner et Fiechter, 1983a). Certains auteurs proposent que les processus thermophiles pourraient servir de source d'enzymes thermostables, comme la production d' $\alpha$ -amylases par *Bacillus* (Grueninger et al., 1984).

Le genre *Bacillus* possède d'autres espèces hétérotrophes thermophiles comme *B. thermodenitrificans*, *B. caldotenax* et *B. thermoleovorans*. Il existe aussi des souches

hétérotrophes thermophiles acidophiles comme *B. coagulans* et *B. acidocaldarius* (Slepecky et Hemphill, 1992). De plus, il y a deux espèces thermophiles capables de chimiolithotrophie en l'absence de matières organiques, soit par oxydation de l'hydrogène moléculaire. *B. schlegelii*, organisme neutrophile, a été isolé à partir de sédiments lacustres (Schenk et Aragno, 1979) et aurait également la capacité d'oxyder le soufre élémentaire si l'on en croit Aragno (1992). En effet, *B. schlegelii* peut utiliser le thiosulfate comme source d'énergie (Hudson et al., 1988), tout comme la majorité des microorganismes aérobies oxydant le sulfite. D'autres souches de *B. schlegelii* ont été isolées à partir d'un étang d'épuration d'une usine de confiseries (Kruger et Meyer, 1984). La deuxième espèce est *B. tusciae*, qui a été isolée d'une source géothermique (Bonjour et Aragno, 1984). Cette dernière est acidophile et possède aussi la capacité d'utiliser le thiosulfate comme source d'énergie.

### Microorganismes thermophiles capables d'oxyder le soufre élémentaire

Il est bien connu qu'il existe des bactéries capables de provoquer la mise en solution des métaux dans les résidus miniers (Torma et Bosecker, 1982; Rossi, 1990). Mis à part quelques cas très isolés, les organismes responsables d'une telle activité sont tous mésophiles (10 °C à 45 °C). Le genre le plus connu est *Thiobacillus*. Il existe également des microorganismes thermophiles (45° à 95°C) possédant de telles capacités, soit produire de l'acide sulfurique par oxydation du soufre élémentaire ou de ses composés. Voici une liste de ces microorganismes isolés jusqu'à ce jour. Il est à noter que cette liste ne mentionne que les organismes qui ont été suffisamment caractérisés pour être discriminés sans ambiguïté des autres espèces.

#### Archaeobacteria

<i>Acidianus brierleyi</i>	(Segeer et Stetter, 1992)
<i>Acidianus infernus</i>	(Segeer et al., 1986)
<i>Desulfurolobus ambivalens</i>	(Zillig et al., 1986)
<i>Metallosphaera sedula</i>	(Huber et al., 1989)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	(Segeer et Stetter, 1992)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	(Segeer et Stetter, 1992)
<i>Stygiolobus azoricus</i>	(Segeer et al., 1991)

#### Eubacteria

<i>Thermotrix thiopara</i>	(Caldwell et al., 1976)
<i>Thiobacillus aquaesulis</i>	(Wood et Kelly, 1988)
<i>Thiobacillus tepidarius</i>	(Wood et Kelly, 1985)
thiobacille thermophile	(Williams et Hoare, 1972)

Ces microorganismes thermophiles ont tous été isolés à partir de sources d'eau chaude. Il existe une mention d'une espèce apparentée au genre *Sulfolobus* isolée à partir du drainage acide d'un tas de charbon (Marsh et Nottis, 1983). Jusqu'à présent, aucune tentative

d'isolement de microorganismes thermophiles modérés oxydant le soufre élémentaire à partir des boues d'usines d'épuration n'a été réalisée.

### **Le genre *Thiobacillus*: considérations taxonomiques**

Selon le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Kelly et Harrison, 1989), le seul critère qui permet de regrouper toutes les espèces de *Thiobacillus* en un seul et unique genre est que l'isolat doit être une eubactérie en forme de bâtonnet et qu'il doit tirer son énergie de l'oxydation autotrophique des composés soufrés inorganiques. En conséquence, ce genre comprend des espèces avec des besoins très différents en termes de pH et de température de croissance ainsi qu'en termes de besoins nutritionnels. Par exemple, *T. acidophilus* est une espèce acidophile (croissance possible à pH 1,5) autotrophe facultative, contrairement à *T. neapolitanus* qui peut croître à pH 8,5 et qui est un autotrophe strict. Même si presque tous les *Thiobacillus* sont des aérobies, certaines espèces, comme *T. thioparus* et *T. delicatus*, sont capables de croître en conditions anaérobies. Le genre contient aussi deux espèces (excluant l'espèce faisant l'objet de cette thèse) qui sont thermophiles modérées, c'est-à-dire ayant une température optimale de croissance avoisinant les 45 °C, soit *T. aquaesulis*, *T. tepidarius*. (Wood et Kelly, 1985; 1986; 1988) et *T. caldus* (information disponible seulement à partir de GenBank. #Z29975)

L'hétérogénéité du genre *Thiobacillus* fut mise en évidence à plusieurs reprises. Dès la première tentative de classification (Hutchinson et al., 1969), l'hétérogénéité du genre apparut de façon évidente. Cette classification numérique était basée sur des critères physiologiques facilement mesurables, soit le pH final après croissance en milieu liquide, la capacité de croître sur gélose nutritive (hétérotrophie), le pourcentage de substrat inorganique utilisé durant la croissance, l'inhibition de la croissance par des sels, la formation de dépôt de soufre lors de la croissance sur gélose et la capacité d'oxyder le fer. L'utilisation de ces critères a permis de classer les thiobacilles sous neuf groupes différents. Avec l'avènement des méthodes de chromatographie à haute pression, une classification du genre basée sur la teneur en acides gras, la nature des quinones (composantes de la chaîne respiratoire), le mode nutritionnel et le contenu en guanine + cytosine fut proposée (Katayama-Fujimura et al., 1984). De cette façon, les thiobacilles pouvaient être classés sous six groupes distincts. Même après ces deux tentatives de classification, il n'était toujours pas possible de trouver une certaine homogénéité phénotypique, au sein du genre, autre que les critères de base délimitant le genre (énoncé dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, mentionné précédemment).

Parce que le genre *Thiobacillus* ne montrait pas de constance phénotypique et aussi à cause de l'avènement des techniques moléculaire de caractérisation de l'évolution et de nouveaux marqueurs, les études sur la phylogénie du genre ont débuté au milieu des années 1980. La première phylogénie fut réalisée à l'aide de la séquence de l'ARN ribosomal 5S provenant de neuf espèces (Lane et al., 1985). Même si l'étude n'était pas très précise, à cause du faible nombre de nucléotides utilisés pour les comparaisons (121 nucléotides seulement), il était déjà possible de constater l'hétérogénéité de la provenance des espèces. En effet, certaines souches, comme *T. versutus* et *T. acidophilus*, ont divergé tôt dans l'évolution du genre et sont davantage associées à des organismes qui ne possèdent pas la capacité d'oxyder le soufre élémentaire, comme *Acidiphilium cryptum*, qu'à tous les autres thiobacilles. En 1992, Lane et al. (1992) refirent la phylogénie du genre, mais cette fois-ci en utilisant la séquence de l'ARN 16S comme marqueur. Parce que le nombre de nucléotides utilisés était supérieur à mille, davantage de précision fut obtenue. Tout en confirmant les résultats de l'étude réalisée avec l'ARN 5S, l'étude avec l'ARN 16S démontrait que le genre *Thiobacillus* se retrouvait dans trois des quatre subdivisions des *Proteobacteria*, soit bêta, gamma et alpha. En fait, la reclassification de *T. thyasiris* et *T. versutus* comme étant respectivement *Thiomicrospira thyasirae* (Wood et Kelly, 1993) et *Paracoccus versutus* (Katayama et al., 1995), porte à croire que le genre *Thiobacillus* serait plutôt confiné à la subdivision bêta des *Proteobacteria*.

Le genre *Thiobacillus* est le seul genre connu avec autant d'hétérogénéité, les espèces d'un même genre étant étroitement regroupées sous une seule subdivision (Stackebrandt et al., 1988). À la lumière de ces révélations, il devient évident que ce genre ne forme pas un groupe naturel, mais qu'il est plutôt le résultat d'une évolution convergente (Lane et al., 1992). Ainsi, plusieurs microorganismes d'origines différentes auraient adopté, au fil de l'évolution, l'oxydation du soufre élémentaire comme moyen énergétique. Ces observations phylogénétiques viennent confirmer les conclusions tirées à partir des études phénotypiques (Kelly et Harisson, 1984), à savoir que le genre *Thiobacillus* est très hétérogène et qu'il est inutile de vouloir classer les thiobacilles selon la taxonomie traditionnelle basée uniquement sur les caractères phénotypiques. Seule l'approche dite «polyphasique», qui tient compte à la fois des études phénotypiques et génotypiques, permettra de mieux étayer le classement du genre (Stackebrandt et Goebel, 1994).

## Hypothèse de travail

À la lumière de la revue de la littérature, une hypothèse est posée:

Les boues d'usines d'épuration des eaux usées municipales possèdent une microbiota capable de provoquer une baisse de pH grâce à l'oxydation du soufre élémentaire en conditions thermophiles (50°C).

## Objectifs de recherche

Dans l'optique de trouver une solution aux problèmes occasionnés par la volonté de valoriser les boues d'usines d'épuration municipales et de continuer la recherche et le développement dans ce domaine, ce projet doctoral propose l'exploration d'une nouvelle avenue, soit la biolixiviation au soufre en conditions thermophiles. Pour confirmer l'hypothèse émise, trois objectifs majeurs ont dû être atteints.

1) Démontrer la présence de microorganismes indigènes des boues d'usines d'épuration étant capables de provoquer une baisse de pH à 50 °C grâce à l'oxydation du soufre élémentaire. Isoler et caractériser ces mêmes microorganismes.

2) Démontrer l'effet de la baisse du pH sur la solubilisation de métaux et sur les différentes populations microbiennes impliquées lors de la biolixiviation thermophile. Décrire sommairement la microbiota hétérotrophe présente.

3) Évaluer les impacts de la biolixiviation thermophile sur la minéralisation de la matière organique et sur la séparation solide-liquide des boues.

## Méthodologie

Par souci de synthèse et de clarté, les paragraphes suivants présentent l'essentiel de la méthodologie utilisée pour atteindre les trois objectifs. Pour plus de détails, se référer à la section «matériel et méthode» de chacun des articles scientifiques.

## Objectif 1

Pour démontrer la présence d'une microbiota indigène capable d'oxyder le soufre élémentaire, onze échantillons de boues provenant de huit stations d'épuration du Delaware et du Maryland (États-Unis), de l'Ontario et du Québec furent amendés avec du soufre en poudre tyndalisé et placés sous agitation à 50 °C dans des erlenmeyers stériles. À titre de contrôle, les échantillons furent placés aussi sous agitation sans soufre et avec soufre, mais en présence de nitrure de sodium (inhibiteur bactérien). À intervalles réguliers, une aliquote était prélevé de façon stérile pour déterminer le pH et mesurer la concentration de sulfate en solution.

Afin d'augmenter la concentration du ou des microorganismes responsables de l'oxydation du soufre, plusieurs transferts successifs furent réalisés avec les échantillons de boue. Une fois que la vitesse d'acidification avait atteint son maximum, une aliquote de la boue était transférée dans un milieu liquide minimal pour organisme autotrophe (source d'azote, de phosphore, de calcium et de magnésium seulement) auquel était ajouté du soufre en poudre. Cette procédure permettait de débarrasser l'échantillon des matières indésirables provenant de la boue tout en conservant la microbiota responsable de l'abaissement du pH par la production d'acide sulfurique. Après quelques transferts successifs en milieu synthétique contenant du soufre, celui-ci fut remplacé par du thiosulfate de sodium (substrat soluble permettant la croissance sur gélose). Toujours après quelques transferts, l'échantillon dilué fut étalé sur gélose minimale contenant du thiosulfate et à laquelle était ajouté un indicateur de pH permettant de visualiser les colonies productrices d'acide.

Les bactéries formant les colonies ayant montré la capacité de décolorer la gélose (du bleu au jaune) furent repiquées cinquante fois sur gélose avant d'être soumises à la caractérisation. Durant l'étape du repiquage des colonies, la pureté de celles-ci fut vérifiée par étalement sur gélose hétérotrophe (extrait de levure, tryptone et glucose) ce qui a permis de constater la disparition progressive des bactéries sporulées contaminant les colonies.

Parce que toutes les colonies isolées de chacun des onze échantillons de boue étaient identiques morphologiquement, que les bactéries qui les composaient étaient également morphologiquement identiques et que les vitesses d'abaissement du pH (donc la production d'acide sulfurique par l'oxydation du soufre) étaient les mêmes pour chaque colonie de chacun des échantillons, une seule colonie fut totalement caractérisée. Le choix fut arbitraire.

La caractérisation de l'isolat fut faite sur le plan phénotypique et génotypique. Le pH et la température (minimale, optimale et maximale) de croissance furent déterminés sous des conditions contrôlées. La capacité de croître sur différents substrats inorganiques (autotrophie) et organiques (hétérotrophie) fut vérifiée. Lors de la croissance en présence de substrats inorganiques, la formation de composés intermédiaires fut mesurée. La possibilité de croître en anaérobiose et d'utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons fut évaluée en milieux autotrophe et hétérotrophe. La nature des ubiquinones et le contenu en guanine + cytosine furent déterminés. Pour observer la formation de glycocalyx et les structures extracellulaires et intracellulaires, des sessions de microscopie électronique à balayage et à transmission furent réalisées.

L'étude génotypique fut réalisée à partir de la séquence complète du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S. Pour obtenir cette séquence, l'ADN total de l'isolat fut isolé et le gène amplifié à l'aide de l'enzyme polymérase *Taq* et de quatre amorces universelles (communément appelé PCR, ou Polymerase Chain Reaction). Un nombre suffisant de copies du gène en question ayant été obtenu, le séquençage fut réalisé directement à l'aide d'un séquenceur automatique utilisant le principe PCR. La séquence ainsi obtenue fut alignée avec 31 autres séquences déjà connues, incluant 19 *Thiobacillus*. Le lien évolutif entre le présent isolat et les 19 autres thiobacilles fut mis en évidence par la construction d'arbres phylogénétiques à l'aide de deux méthodes, soit par parcimonie et par «neighbor-joining».

Suite aux évidences phénotypiques et génotypiques l'isolat fut proposé comme étant une nouvelle espèce, soit *Thiobacillus thermosulfatus*.

## Objectif 2

La mise en solution des métaux, à la suite de la bioproduction d'acide sulfurique, fut mesurée pour cinq boues provenant de la province de Québec et amendées avec du soufre en poudre. Afin de s'assurer de la qualité des inoculum (enrichissement suffisant de la microbiota indigène) de façon à obtenir une vitesse d'acidification maximale, deux transferts successifs furent réalisés avant le début de la prise d'échantillons. Pour chacune des cinq boues, trois répliques amendées avec du soufre plus une boue sans soufre furent placés sous agitation à 50 °C (température optimale pour la croissance de *T. thermosulfatus*). À intervalles réguliers, un échantillon fut prélevé pour la mesure du pH, du potentiel d'oxydoréduction (Eh), du sulfate et de la concentration des métaux passés en solution. La concentration en Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, P, Pb, Zn et S (mathématiquement transformé en  $\text{SO}_4^{2-}$ ) fut déterminée par spectroscopie de masse (ou ICP: Coupled Plasma Atomic Emission

Spectroscopy). Le contenu total en métaux des boues fut également déterminé par spectroscopie de masse après une digestion totale de la matière organique. L'effet de l'ajout de chlorure ferrique (augmente le potentiel rédox) sur la mise en solution fut également mesuré. Le  $\text{FeCl}_3$  fut rajouté aux échantillons en utilisant une petite quantité d'une solution concentrée.

Les fluctuations des populations microbiennes impliquées et touchées par la bioproduction d'acide sulfurique furent mesurées pour une boue soumise au traitement, soit l'une des cinq mentionnées précédemment. Trois types de populations furent suivies (sur gélose) tout au long du processus d'acidification à 50 °C: l'organisme producteur d'acide sulfurique, *T. thermosulfatus*, la population des bactéries hétérotrophes thermophiles dites «acidophile» (gélose pH 4,0) et «neutrophile» (gélose pH 7,0), les indicateurs bactériens usuels de pollution fécale, soit les coliformes fécaux, les coliformes totaux, les streptocoques fécaux, les hétérotrophes totaux (mésophiles) et les coliphages comme indicateur de l'inactivation virale.

Lors du suivie des populations hétérotrophes thermophiles acidophiles et neutrophiles, différentes colonies furent discriminées sur la base de leurs différences morphologiques, pour être ensuite isolées et caractérisées sommairement. La morphologie cellulaire, la présence de spores, leurs formes et leurs positions dans la cellule et la mobilité furent observées au microscope optique. Le pH et la température optimale de croissance furent estimés. La possibilité de production d'une activité protéolytique par les isolats hétérotrophes thermophiles a été mesurée à l'aide d'un substrat chromogénique. L'effet de cette activité sur la viabilité des cellules de *T. thermosulfatus* a également été mesuré. De plus, chacun des isolats fut testé individuellement pour sa capacité à minéraliser la matière organique de la boue. Des boues aux pH de 4,0 et de 7,0, préalablement stérilisées furent inoculées avec les isolats. La microbiota hétérotrophe thermophile indigène (consortium naturel regroupant toutes les espèces, incluant les isolats) fut utilisée comme témoin. Après une période d'incubation à 50 °C, les solides volatiles en suspension restants furent mesurés. Le compte cellulaire de chaque isolat fut réalisé au début et à la fin de la période d'incubation.

### **Objectif 3**

Pour vérifier s'il est possible d'obtenir simultanément une minéralisation de la matière organique et la bioproduction d'acide sulfurique par *T. thermosulfatus*, deux bioréacteurs de six litres contenant du soufre immobilisé (soufre solidifié sur les parois internes des réacteurs) furent utilisés pour réaliser la biolixiviation thermophile d'une boue. L'utilisation de soufre immobilisé fut rendue nécessaire afin de simplifier la mesure des indicateurs de

minéralisation. Le volume de boue utilisé, soit trois litres, a permis de prélever suffisamment d'échantillons pour suivre dans le temps l'évolution de la minéralisation. Deux réacteurs furent inoculés (ceux contenant le soufre immobilisé) et un troisième sans soufre fut utilisé comme témoin, tous étant maintenus à une température de 50 °C. À intervalles réguliers, le pH, le potentiel rédox ainsi que des échantillons pour la mesure des métaux en solution, du sulfate produit, des solides totaux, des solides totaux volatils, des solides en suspension et des solides volatils en suspension furent pris.

L'effet de la bioproduction d'acide sulfurique sur la séparation solide-liquide de la boue fut mesuré en fonction de la teneur finale en solides totaux, soit 1,2, 2,2 et 3,0 % (poids/volume). Afin de s'assurer que les échantillons testés soient de même nature, une seule boue fut utilisée. Cette boue fut centrifugée et la teneur en solide fut réajustée par l'ajout de liquide de surnageant afin d'obtenir les trois concentrations en solides totaux. Pour chacune des trois concentrations de solide, cinq échantillons de 150 ml chacun furent soumis à la bioproduction d'acide. Le contenu final en solides totaux fut mesuré après la période d'incubation. Un indice de filtrabilité, qui tenait compte des vitesses d'écoulement, obtenues à l'aide d'un dispositif de filtration sous pression constante, et de la teneur final en solide, fut calculé. L'effet de l'ajout de chlorure ferrique fut également mesuré.

## Résultats

### Ubiquité de l'activité

À la suite de l'ajout de soufre élémentaire, les onze boues testées ont montré une baisse de pH substantielle par rapport aux mêmes boues sans soufre ou avec soufre mais additionnées de nitrure de sodium (figure 1, page 87). En effet, dans les échantillons additionnés de nitrure de sodium, aucune fluctuation du pH ne fut observée pendant les 10 premiers jours. Une augmentation de pH fut observée pour toutes les boues n'ayant pas été amendées soit avec du soufre ou soit avec du nitrure de sodium. Dans quelques cas de boues additionnées de S° seulement (boue #5, boue #10, boue #11; figure 1, page 87), la diminution du pH fut précédée par une augmentation. La bioproduction d'acide sulfurique par oxydation du soufre élémentaire à 50°C fut également observée dans un échantillon de sol et dans un échantillon de boue provenant d'une usine de production de pâtes et papiers (voir annexe page 100).

### Isolement et caractérisation de *T.thermosulfatus*

À la suite des manipulations pour déterminer les conditions optimales de croissance de *Thiobacillus thermosulfatus*, il fut démontré qu'il y avait une perte de viabilité, selon le décompte sur gélose, après cinq heures d'incubation à des pH inférieurs à 3,6. Aux pH 4,4, 5,0, 6,8 et 7,8, une faible croissance a été observée seulement par un décompte sur gélose, aucune croissance n'ayant été observée en milieu liquide. Aux pH 5,8 et 6,5, la croissance fut observée à la fois sur gélose et par augmentation de densité optique en milieu liquide. Le taux de croissance le plus élevé (à pH et température contrôlés) fut obtenu aux pH 5,2 et 5,6. et aux températures de 50,0 °C et 52,5 °C.

La croissance fut observée avec le thiosulfate, le tétrathionate et le soufre élémentaire. Aucune croissance ne fut observée lorsque le thiocyanate fut employé comme source d'énergie. Entre la 15<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> heure d'incubation (figure 1, page 54), un arrêt de la croissance fut observé. Étant donné que cet arrêt se produit au moment où la concentration en tétrathionate est maximale, il est fort probable que cet arrêt soit attribuable à un changement métabolique causé par le passage de l'utilisation du thiosulfate à l'utilisation du tétrathionate, soit un phénomène de diauxie. Ce phénomène fut observé une seconde fois lors de la répétition de cette expérience qui, d'ailleurs, a également donné le même patron de distribution des intermédiaires. Aucun intermédiaire ne fut observé lors de la croissance en présence de soufre élémentaire.

La capacité d'utiliser la matière organique comme source de carbone et d'énergie (hétérotrophie) au lieu du CO<sub>2</sub> et des produits inorganiques soufrés (autotrophie) fut démontrée par la croissance sur l'extrait de levure, le glutamate et le succinate. Cette croissance ne peut être attribuée à la présence d'une réserve intracellulaire puisqu'en absence des substrats organiques (contrôle), une diminution du compte cellulaire fut observée. Également, aucune croissance sur gélose nutritive ni aucun bâtonnet sporulé ne furent observés, ce qui élimine ainsi la possibilité que la croissance observée soit imputable à une contamination par un organisme hétérotrophe. *T. thermosulfatus* est un organisme hétérotrophe facultatif.

En l'absence d'oxygène, aucune croissance en condition d'autotrophie et d'hétérotrophie (extrait de levure) ne fut observée. De plus, aucune formation de nitrite résultant de la réduction des nitrates ne fut détectée, ni d'ailleurs aucune formation d'intermédiaires ni aucun changement de pH. *T. thermosulfatus* est donc un organisme aérobic strict et ne peut effectuer la dénitrification.

Le contenu en guanine + cytosine de l'ADN fut déterminé comme étant  $61 \pm 1$  mol %, après trois déterminations indépendantes les unes des autres. L'ubiquinone présente dans la chaîne de respiration cellulaire est Q8 selon les résultats de migration de la chromatographie en couche mince.

La microscopie électronique à transmission montre la présence d'un flagelle unique, de structures hexagonales (carboxysomes; lieu probable de la fixation du CO<sub>2</sub>) et d'inclusions de polyphosphate (figure 2, page 55). La microscopie électronique à balayage (figure 3, page 56) révèle une production considérable de glycocalyx lors de la croissance sur le soufre. Il est à noter que l'apparence filamenteuse du glycocalyx est causée par la déshydratation de celui-ci lors de la préparation de l'échantillon.

L'étude phylogénétique, faite à partir du gène de l'ARN ribosomal 16S, a permis de situer sans aucune ambiguïté le nouvel isolat *T. thermosulfatus* par rapport aux autres espèces du genre *Thiobacillus*. En effet, la séquence du gène de l'ARNr 16S de *T. thermosulfatus* est suffisamment différente des autres séquences pour ne pas être associée à une espèce déjà connue. Le présent isolat est phylogénétiquement relié à *T. perometabolis* (95,4 % d'homologie, tableau 1, page 53) avec lequel il forme un groupe et ce groupe est phylogénétiquement relié à *T. thioparus*. *T. thermosulfatus* appartient donc à la subdivision bêta des *Proteobacteria*. L'étude a permis également de mettre à jour la phylogénie du genre

en incluant les toutes dernières séquences de gènes de l'ARNr 16S de nouveaux isolats désignés comme *Thiobacillus*, soit *T. caldus*, *T. hydrothermalis*, *T. thyasiris* (reclassé comme étant *Thiomicrospira thyasirae*) et *T. thiooxidans* B-S3. Il est important de noter que les deux méthodes d'analyse, utilisées pour construire l'arbre phylogénétique, ont donné essentiellement la même topologie, ce qui est un indice de la fiabilité du résultat obtenu. De plus, les valeurs des «bootstrap» (nombre de fois sur 100 où les deux branches d'un embranchement se retrouvent ensemble) des embranchements distinguant des groupes ou des espèces reconnues différentes sont élevées. L'arbre présenté à la figure 4 (page 57) est donc statistiquement très fiable.

### **Possibilité de la biolixiviation thermophile des boues**

La figure 1 (page 69) montre l'effet moyen de la baisse du pH causée par la bioproduction d'acide à 50 °C sur la solubilité des métaux de cinq boues. Pour tous les métaux, sauf le Cu, il y a une augmentation significative de la concentration en solution lorsque le soufre est ajouté et qu'il y a bioproduction d'acide sulfurique, comparativement aux contrôles qui ne contiennent pas de soufre. Le pourcentage de mise en solution augmente lorsque du chlorure ferrique est ajouté pour élever la valeur du potentiel rédox, ce qui cause également un abaissement du pH. Cependant, cette augmentation n'est significative que pour le Cr, le Cu et le Ni. En comparant le pourcentage de solubilisation avant et après l'ajout de chlorure ferrique pour chaque boue prise individuellement, on remarque que les boues de Black Lake, St-George et Valcartier ne suivent pas la tendance (annexe, page 99). Avec les boues de Black Lake et St-George l'augmentation de la solubilisation du Ni après ajout de  $\text{FeCl}_3$  n'est pas significative. Pour Valcartier, en plus du Ni, l'augmentation de la solubilisation du Cr n'est pas significative.

Pour ce qui est de la mise en solution du potassium et du phosphore (figure 1, page 69), la biolixiviation thermophile augmente significativement la solubilité du phosphore par rapport au contrôle. Lorsqu'il y a ajout de chlorure ferrique, le phosphore précipite et sa concentration en solution n'est plus significativement différente de celle du contrôle. Le tableau 3 (page 67) montre les valeurs finales de pH et du potentiel rédox avant et après l'ajout de  $\text{FeCl}_3$  (pour les valeurs initiales de pH, voir le tableau 1, page 66). Les concentrations finales en sulfate sont également donnés dans ce tableau. Les figures 2 et 3 (pages 69 et 70) montrent un exemple de la cinétique du pH, de l'évolution du potentiel rédox, de la production de sulfate et de la mise en solution des métaux.

## Fluctuation des populations bactériennes lors du processus

Lors de la bioproduction d'acide, où le pH passe de 5,2 à 2,6 en 9 jours, le compte cellulaire de *T. thermosulfatus* (producteur d'acide sulfurique) augmente au premier jour d'incubation pour ensuite diminuer (figure 2, page 95). Le compte final est inférieur au compte initial après neuf jours d'incubation. En l'absence de soufre, le compte cellulaire diminue sans cesse pour ne plus être détectable et une augmentation de pH est observée (5,2 à 8,1).

Durant la bioproduction d'acide, le compte bactérien des populations hétérotrophes thermophiles acidophiles (sur gélose pH 4,0) et neutrophiles (sur gélose pH 7,0) augmente durant les trois premiers jours pour ensuite décliner et se stabiliser à un compte final supérieur au compte initial (figure 2, page 95). Cela s'explique par le fait que ces deux populations sont composées de bactéries sporulées dont les cellules végétatives sont tuées par les conditions acides. Seuls les spores résistent. De plus, la population acidophile atteint un compte cellulaire supérieur à la population neutrophile, probablement à cause des conditions acides qui prévalent.

Durant la digestion thermophile (sans soufre), les deux populations hétérotrophes thermophiles augmentent, mais contrairement à la biolixiviation, le compte de la population neutrophile surpasse celui de la population acidophile, car il n'y a pas de conditions acides qui prévalent. Dans le cas présent, il peut sembler surprenant que la population acidophile augmente de 6 log malgré l'absence de conditions acides. En fait, cette population inclut une espèce neutrophile mais capable de croître à pH 4 (limite inférieure), ce qui augmente le compte total.

Durant les deux processus, soit la biolixiviation et la digestion thermophile conventionnelle, les comptes des organismes indicateurs sont réduits en deçà des limites de détection après douze heures d'incubation seulement (tableau 2, page 88). L'inactivation par la température (expérience réalisée à 50 °C) en est la cause. Le pH acide atteint lors de la bioproduction d'acide sulfurique pourrait avoir un effet germicide (démonstré en conditions mésophiles par Shooner et al., 1992), mais étant donné que ces conditions sont atteintes bien après les températures élevées, celles-ci inactivent en tout premier lieu les organismes indicateurs. La population hétérotrophe mésophile est diminuée lors des deux traitements et cette diminution est plus importante lors de la biolixiviation que pendant la digestion thermophile, probablement à cause des conditions acides qui prévalent. À la fin des neuf jours d'incubation à 50 °C, la population hétérotrophe mésophile n'est composée que de

bactéries sporulées, ce qui démontre bien l'effet négatif de la température sur les cellules végétatives.

### **Caractérisation partielle de la microbiota hétérotrophe thermophile**

Lors du décompte de la microbiota hétérotrophe thermophile sur gélose aux pH 4,0 et 7,0, six types de colonies différentes furent isolées. Le tableau 3 (page 89) montre les résultats obtenus lors de la caractérisation partielle de ces isolats. Parce que leur température optimale de croissance est entre 40 °C et 60 °C, les six isolats furent classés comme étant des organismes thermophiles modérés. Une seule souche s'est montrée acidophile, ou du moins capable de croître en conditions acides. D'ailleurs, cette souche fut isolée sur les géloses à pH 4,0. À l'exception d'un isolat, tous sont des bâtonnets sporulés. Aucun isolats n'a montré une mobilité. Deux souches ont montré une activité protéolytique substantielle (figure 3, page 96). Aucune de ces deux activités protéolytiques n'a montré un effet négatif sur la perte de viabilité sur les cellules de *T. thermosulfatus* (table 4, page 90). Également, aucune activité protéolytique significative ne fut mesurée dans les boues subissant une biolixiviation thermophile.

À l'exception d'un isolat, soit le numéro 71, tous ont démontré une capacité analogue à minéraliser la matière organique de la boue comparativement au consortium naturellement présent dans les boues (tableau 5, page 91). Pour les isolats testés à pH 4.5, les pourcentages d'enlèvement des VSS sont de 4.5% et 7.9%, comparativement à 6.4% pour le contrôle qui représente la microflore totale d'une boue. À pH 7.0, les pourcentages sont de 24.2% à 37.9%, comparativement à la microflore totale qui est de 32.2%. Pour les deux conditions de pH testés, le compte cellulaire final des souches atteint approximativement la même concentration que le compte obtenu avec les consortiums naturels. En d'autres mots la croissance individuelle de chacune des souches dans une boue donne le même niveau de minéralisation, soit d'enlèvement de VSS, que l'ensemble des espèces retrouvées normalement dans les mêmes conditions.

### **Simultanéité de la minéralisation et de la bioproduction d'acide sulfurique et effet sur la séparation solide-liquide de la boue**

Lors de la bioproduction d'acide sulfurique par *T. thermosulfatus*, une minéralisation de la matière organique s'effectue simultanément. En effet, lors d'expériences en réacteurs, une réduction des solides volatils et des solides volatils en suspension fut observée pendant la

bioproduction d'acide sulfurique (figure 4, page 72). La réduction des solides volatils dans les deux réacteurs contenant du soufre fut moindre que celle observée dans le réacteur contrôle (simple digestion thermophile, sans soufre). En fait, si la quantité d'acide sulfurique produite dans les réacteurs avec soufre est mathématiquement déduite, la réduction des solides volatils observée devient comparable à celle du réacteur contrôle. Pour ce qui est de la réduction des solides volatils en suspension, des résultats similaires sont obtenus entre les deux réacteurs avec soufre et celui sans soufre (contrôle).

Pour ce qui est de la facilité avec laquelle l'eau peut être séparée de la phase solide, le tableau 4 (page 68) démontre bien que les boues sujettes à la biolixiviation thermophile se «déshydratent» beaucoup plus facilement que les boues ayant subi seulement une digestion thermophile (contrôle). De plus, l'ajout de chlorure ferrique pour augmenter le potentiel rédox (utilisé pour augmenter la solubilisation des métaux) permet également d'améliorer la séparation solide-liquide des boues biolixiviées et des boues traitées pour une simple digestion thermophile. D'ailleurs, l'amélioration de la séparation est très marquée pour les boues seulement digérées. Lors de l'ajout de  $\text{FeCl}_3$ , peu de différences dans l'amélioration de la filtration sont observées entre les boues à 1,2 %, 2,2 % et 3,0 % de solides totaux, ayant subies la biolixiviation thermophile. En conséquence de la bonne qualité de la séparation solide-liquide, les filtrats recueillis sont clairs et non turbides (les dépôts sur les filtres sont donc plus consistants et réguliers) comme ceux observés pour les boues digérées seulement.

## Discussion

### Ubiquité de l'activité.

L'effet de l'inhibiteur bactérien (nitrate de sodium) démontre bien la nature biologique de la production d'acide sulfurique (figure 1, page 94). L'augmentation du pH dans les boues sans additifs est sans doute causée par la production d'ammoniaque, ce qui est typique de la digestion thermophile des boues. Au début, le pH des boues additionnées de soufre et de nitrate de sodium est constant, mais celui-ci augmente après une certaine période de temps. Cela est probablement causé par la disparition de l'effet du nitrate de sodium qui est décomposé en sodium et en azote gazeux. Ainsi, les spores de la microbiota thermophile ayant résistées (les bactéries responsables de la minéralisation de la boue en conditions thermophiles sont presque toutes sporulées), elles peuvent germer et les cellules végétatives peuvent produire de l'ammoniaque. Également, l'augmentation du pH observée pour quelques boues additionnées de soufre seulement (boue #5, boue #10, boue #11; figure 1, page 94) pourrait s'expliquer par le fait que durant les premiers jours d'oxydation du soufre, la quantité d'acide sulfurique produite (donc la croissance de *T. thermosulfatus*) n'est pas suffisante pour supplanter la production d'ammoniaque.

À la suite des résultats obtenus démontrant la bioproduction d'acide sulfurique dans toutes les boues ayant été amendées avec du soufre élémentaire, il est fort probable que *T. thermosulfatus*, ou des organismes similaires, soit ubiquiste. La bioproduction d'acide fut également mesurée dans un échantillon de sol et de boue d'usine de pâtes et papiers additionné de soufre, ce qui appuie davantage cette affirmation (annexe, page 100).

### Isolement et caractérisation de *T. thermosulfatus*

Au début du processus de purification des colonies productrices d'acide (soit celles de *T. thermosulfatus*), celles-ci étaient composées de deux types de bactéries, soit un bâtonnet mobile et un bâtonnet sporulé. Il y avait également croissance sur gélose nutritive (également incubée à 50 °C) lorsque les colonies productrices d'acide y étaient étalées. Les colonies obtenues sur la gélose nutritive étaient composées exclusivement de bâtonnets sporulés non mobiles. Par contre, ces mêmes colonies n'étaient plus capables de se développer sur la gélose minimale utilisée pour observer la production d'acide. Après dix repiquages successifs des colonies sur gélose minimale, les bâtonnets sporulés disparurent et plus aucune croissance sur gélose nutritive ne fut observée, même après quinze jours d'incubation. Ainsi, les bactéries sporulées contaminaient les colonies productrices d'acide. Ces bactéries furent

identifiées comme appartenant au genre *Bacillus* et provenaient du milieu initial, soit les boues.

Le nouvel isolat, soit *T. thermosulfatus*, est phénotypiquement différent des autres thiobacilles isolés jusqu'à présent. Une seule mention dans la littérature fait état de l'isolement d'un thiobacille ayant le même mode trophique, abaissant le pH du milieu (production d'acide sulfurique) et ayant des températures et des pH de croissance semblables à ceux de *T. thermosulfatus* (Williams et Hoare, 1972). Parce que la caractérisation fut incomplète et que la souche ne fut jamais rendue disponible à la communauté, une comparaison plus poussée est malheureusement impossible.

À l'exclusion du présent isolat, seulement deux thiobacilles sont thermophiles modérés, soit *T. tepidarius* et *T. aquaesulis*. Leurs températures optimales de croissance sont inférieures à celle de *T. thermosulfatus* et leurs pH optimaux de croissance sont supérieurs (Wood et Kelly, 1985;1988). Les contenus en guanine + cytosine sont également différents. Contrairement à *T. tepidarius*, le nouvel isolat est autotrophe facultatif. De plus, il produit une grande quantité d'acide sulfurique (ce qui abaisse considérablement le pH du milieu), ce qui ne fut jamais observé pour les deux autres thiobacilles (Wood et Kelly, 1985;1988). Parce que *T. thermosulfatus* produit une grande quantité de glycocalyx lors de sa croissance sur le soufre élémentaire, il fut suspecté que celui-ci puisse être une espèce du genre *Thermotrix*. Du point de vue taxonomique, la seule caractéristique qui distingue le genre *Thermotrix* des thiobacilles est la capacité de transformer les nitrites en nitrates en mode hétérotrophe et en l'absence d'oxygène (Caldwell et al., 1976). *T. thermosulfatus* ne possède pas cette capacité.

Pendant la croissance de *T. thermosulfatus* avec le thiosulfate comme source d'énergie, celui-ci est successivement transformé en tétrathionate, en trithionate et finalement en sulfate (figure 1, page 54). La production de tétrathionate cause l'augmentation du pH du milieu jusqu'à 7,4. La disparition progressive de cet intermédiaire et l'apparition du sulfate entraînent une chute du pH jusqu'à une valeur de 2,4. À la fin de la période d'incubation, le thiosulfate est totalement transformé. Probablement à cause de l'inhibition de la croissance causée par les conditions acides (pH inférieur à 3,6), le tétrathionate et le trithionate n'ont pu être totalement transformés en sulfate. Il est à noter que des 100 % d'atome de soufre du départ (contenu dans le thiosulfate), approximativement 30% sont manquants (tétrathionate 33 % + trithionate 7 % + sulfate 30 % = 70 %). La formation d'un précipité blanc dans les dernières heures d'incubation laisse supposer qu'une portion des

intermédiaires produits fut (chimiquement ou physiologiquement) transformée en soufre. D'ailleurs, la formation de soufre élémentaire à partir des thionates fut observée chez presque tous les thiobacilles capables de produire des intermédiaires soufrés (Kelly et Harrison, 1984)

Selon l'étude phylogénétique, *T. thermosulfatus* ne peut être associé à aucune autre espèce du genre *Thiobacillus* connue jusqu'à présent (figure 4, page 57). Les espèces les plus apparentées du point de vue évolutif sont *T. perometabolis* (95,4 % d'homologie) et *T. thioparus* (85,7 % d'homologie). Phénotypiquement, les différences entre ces deux espèces et *T. thermosulfatus* sont bien évidentes. Même si le pourcentage d'homologie entre *T. thermosulfatus* et *T. perometabolis* est de 95,4%, soit 1,6 % sous la limite arbitraire de 97%, il n'était pas pertinent de déterminer le pourcentage d'homologie entre les génomes totaux des deux organismes puisque selon Geobel et Stackebrandt (1994), à une homologie de 16S de 97% correspond une homologie génomiale de 9 à 20%. Il faut savoir que la limite arbitraire d'homologie génomiale pour suspecter deux organismes d'appartenir à la même espèce est de 80% (Geobel et Stackebrandt, 1994). Il faut rappeler aussi que l'ARNr est une molécule très conservée chez les êtres vivants et qu'une différence qui peut sembler bien mince à l'idée humaine est considérable à l'échelle évolutive. Aussi, la systématique bactérienne se base sur certains critères qui prennent force de loi lorsqu'ils sont suggérés dans l'organe de communication officiel des associations de microbiologistes, soit la revue *International Journal of Systematic Bacteriology*.

Ainsi, parce que l'organisme isolé est une eubactérie en forme de bâtonnet qui obtient son énergie par oxydation du soufre élémentaire et en raison de ses relations phénotypiques et génotypiques évidentes avec les autres thiobacilles, le présent isolat est proposé comme étant une nouvelle espèce du genre *Thiobacillus*.

### **Caractérisation partielle de la microbiota thermophile hétérotrophe**

À la suite des résultats obtenus, cinq des six organismes hétérotrophes thermophiles isolés appartiennent au genre *Bacillus*, selon la présence de spores qui est la principale caractéristique du genre (tableau 3, page 89). En raison de sa capacité de croître à un pH de 2,5, l'un des cinq isolats pourrait être *B. acidocaldarius*. Cet organisme ne fut jamais rapporté comme étant présent dans les boues traitées de façon thermophile, probablement parce que les milieux acidophiles ne sont jamais utilisés pour les procédures de décompte et

d'isolement. Les quatre autres isolats pourraient être associés à *B. stearotherophilus*. Cependant, il est important de mentionner que cette espèce regroupe probablement plusieurs espèces de bacilles thermophiles à en juger par la grande variabilité des contenus en guanine-cytosine (de 43 à 52 %) et des températures optimales de croissance (40 °C à 65 °C).

Le seul isolat n'ayant pas montré une production de spores pourrait être associé au genre *Thermus*, soit l'un des deux seuls genres (l'autre est *Sphaerobacter*) ne produisant pas de spores et ayant été isolé de la boue en traitement thermique (Hensel et al., 1989; Demharter et al., 1989; Loginova et al., 1984). En plus de la ressemblance sur le plan morphologique et physiologique, l'isolat en question produit un pigment brun, qui est également observé chez trois souches de *Thermus ruber*.

Même si les hétérotrophes isolés ne furent que partiellement caractérisés, il est quand même possible d'affirmer que la microbiota hétérotrophe impliquée lors de la biolixiviation thermophile est essentiellement la même que celle observée lors d'une digestion thermophile conventionnelle. *Bacillus* est le genre prédominant dans les deux cas.

L'observation que tous les isolats, à l'exception d'un, aient montré la même capacité de minéralisation de la boue reflète certainement le fait que ces organismes furent isolés sur le même milieu gélosé; ils ont donc une capacité physiologique similaire. Ce milieu étant très riche, il y a probablement sélection des organismes capables de croître dans de fortes concentrations de nutriments solubles. La diversité de la microbiota hétérotrophe thermophile impliquée lors de la biolixiviation thermophile n'est probablement pas représentée par les six isolats. En effet, Hensel et al. (1989) furent capables d'isoler seulement 50% à 60% de la microbiota physiologiquement active. La portion restante étant probablement composée d'organismes incapables de croître sur gélose pour différentes raisons: facteur de croissance absent, nécessité de conditions anaérobies, ou tout simplement pas présent en assez grand nombre pour être isolées sur gélose, sachant que les espèces les plus abondantes couvrent rapidement les géloses de faible dilution.

### **Possibilité de biolixiviation et digestion simultanée thermophile des boues.**

À la suite de comparaisons des solubilités obtenues avec les autres méthodes de lixiviation déjà connues (figure 5, page 73), il est statistiquement démontré que la biolixiviation thermophile suivie de l'ajout de chlorure ferrique offre le même rendement de solubilisation que les autres méthodes, à l'exception du Cd et du Mn pour lesquels le pourcentage de solubilisation est inférieur. Il aurait été souhaitable que la biolixiviation thermophile augmente la solubilisation du Cd, Cr et du Pb par rapport aux autres méthodes. À l'exception du Cd où la biolixiviation thermophile est statistiquement moins efficace, aucune amélioration significative ne fut observée. Pourtant le potentiel rédox et le pH obtenu lors de la biolixiviation thermophile sont théoriquement plus favorables à la mise en solution que ceux obtenus lors du même type de biolixiviation, soit l'oxydation du S°, mais en conditions mésophile.

Même si les conditions de pH et de potentiel rédox sont favorables lors de la biolixiviation thermophile, il est curieux de constater que la moyenne du rendement de solubilisation du Cd et du Mn soit inférieure. Pour ce qui est du Mn, cette différence est significative mais demeure quant même proche des autres procédés. Quant au Cd, la différence de solubilisation est marquée. Ceci reflète probablement les différents modes de préparation des échantillons pour le dosage des métaux en solution. Par exemple lors de la présente étude, les échantillons ont dû être filtrés sur 2 $\mu$ m avant le dosage à l'ICP. Cette étape fut nécessaire à cause de problème de colmatage de la tuyauterie de l'appareil d'analyse. Après la filtration, il y avait un dépôt sur le filtre. À ce dépôt pouvait être associé des métaux, comme le Cd et le Mn, qui n'aurait donc pas été dosés. Pour ce qui est de la méthode de dosage de la biolixiviation en conditions mésophiles, aucune filtration ne fut effectuée. On peut supposer que ces échantillons contenaient davantage de matière en suspension, donc de métaux mesurables par ICP. Au sujet de la mise en solution des métaux, il est important de faire une précision. Les métaux qui sont dits en "solution" sont les métaux qui demeurent dans le surnageant de l'échantillon une fois que celui-ci a subi une centrifugation et une filtration. Ceci ne signifie pas que les métaux sont tous sous la forme physique dite "dissoute". En fait toutes matières en suspension inférieure à 2 $\mu$ m entre dans l'ICP pour le dosage des métaux.

La différence dans l'efficacité de solubilisation observée entre la biolixiviation thermophile et les autres processus soulève également la question des limites sous-jacentes à une telle comparaison. Étant donné que les résultats utilisés pour la comparaison proviennent d'expérimentation réalisées avec une grande variété de boue en terme d'origine et de

composition, que les méthodes de préparation et de dosage des échantillons sont différentes, et que les pH et les potentiels rédox finaux ne sont pas tous exactement les mêmes, il n'existe pas de méthode statistique pour comparer un ensemble de résultats aussi hétérogènes. Les considérations économiques (évaluation de l'efficacité d'un procédé pour l'obtention d'un brevet par exemple) exigent une comparaison entre les processus ayant le même but. Si le présent procédé avait montré suffisamment d'intérêt économique, il aurait fallu le démontré d'une façon plus poussée en reprenant les expériences des autres équipes de recherche, histoire de replacer les résultats sur une même base de comparaison (en autant que cela soit possible). En somme, cette comparaison fut jugée nécessaire pour des considérations économiques et non scientifique.

L'ajout de chlorure ferrique (tableau 3, page 67) fut rendu essentiel parce que le potentiel rédox final obtenu à la suite de l'action de *T. thermosulfatus* était insuffisant. *T. thermosulfatus* ne semble pas avoir la capacité d'oxyder l'ion ferreux pour le transformer en ion ferrique puisque le potentiel d'oxydoréduction à la fin du processus, bien que plus élevé que celui du témoin, est plus faible que celui observé lors de la biolixiviation mésophile au soufre. En effet, les *Thiobacillus* impliqués dans la biolixiviation mésophile sont capables d'oxyder l'ion ferreux en plus du soufre élémentaire, ce qui augmente davantage le potentiel rédox (Blais et al., 1992b). L'augmentation du potentiel rédox observé lors de la biolixiviation thermophile n'est probablement causée que par la seule apparition des conditions acides. Le  $\text{FeCl}_3$  fut ajouté de façon à obtenir une valeur de potentiel rédox d'environ 450 mV. Tout comme le pH, c'est la valeur finale du potentiel rédox qui importe et non la quantité de  $\text{FeCl}_3$  qui est ajoutée dans chaque boues (Sreekrishnan et al., 1993). Malheureusement, il est difficile d'ajuster le potentiel rédox d'une boue à une valeur bien précise. Les boues étant un milieu très complexe, l'équilibre entre la diffusion de l'oxygène, l'activité microbienne, les réactions chimiques engendrées, etc. ne peut être atteint rapidement.

Lors de cette étude en flacon, plus d'une vingtaine de jours furent nécessaires pour atteindre le pH minimal, ce qui est lent par rapport au processus basé également sur l'oxydation du soufre mais en conditions mésophiles. Typiquement, la biolixiviation mésophile se produit en cinq ou six jours. Plusieurs raisons peuvent expliquer la lenteur de la biolixiviation thermophile. Premièrement, dans plusieurs cas, le potentiel rédox descendit en deçà de 0 mV durant les premiers jours d'incubation, ce qui suggéra un manque en oxygène dissous. L'explosion de la population hétérotrophe lors des premiers jours expliquerait la forte demande en oxygène. L'oxydation microbienne du soufre élémentaire étant un processus aérobie, une carence en oxygène pourrait certainement ralentir le taux de croissance

des cellules et, par le fait même, la production d'acide. Aussi, la quantité de cellules de *T. thermosulfatus* dans l'inoculum est probablement insuffisante pour obtenir une diminution rapide du pH, du moins jusqu'à 4. En effet, parce que la vitesse maximale d'acidification lors de la préparation de l'inoculum est atteinte après deux transferts seulement, il est à suspecter que les conditions dans lesquelles se déroule l'enrichissement ne tiennent pas compte de certaines limites de *T. thermosulfatus*. Ultérieurement, lors de la caractérisation de l'isolat, il fut démontré que les cellules de *T. thermosulfatus* sont inactivées à des pH inférieurs à 3,6. Ainsi les pH inférieurs à 3,6 lors de la préparation des inoculum auraient dû être évités afin d'obtenir un maximum de cellules actives. Également, l'absence d'une microbiota acidophile capable de prendre la relève de l'oxydation du soufre lorsque *T. thermosulfatus* est inactivé ralentit considérablement le processus et est probablement la raison pour laquelle la biolixiviation thermophile n'atteint pas des pH avoisinant 2. La succession de deux microbiota oxydant du soufre, l'une neutrophile et l'autre acidophile, est la raison pour laquelle le processus en conditions mésophiles atteint rapidement des pH aussi bas que 1,9. Plusieurs tentatives pour enrichir la boue en organismes acidophiles capables d'oxyder le soufre à 50 °C furent réalisées, mais sans succès.

Pour ce qui est de la possibilité d'effectuer une minéralisation simultanément à la biolixiviation (figure 4, page 72), l'expérience réalisée en réacteur de 3 litres fut stoppée après 15 jours de traitement parce que les résultats étaient concluants. Une expérience préliminaire (lors de la mise au point des bioréacteurs à soufre immobilisé) suggérait que le temps requis pour atteindre un pH aux alentours de 3 était de plus de 30 jours. Il ne fut pas jugé pertinent d'attendre aussi longtemps puisqu'une conclusion pouvait être tirée bien avant. Pour ce qui est des résultats potentiels sur la mise en solution, si l'expérience avait été continuée jusqu'à l'obtention d'un pH de 3 on peut supposer que la matière organique biodégradable aurait été complètement minéralisée, et ce peut être avant l'obtention du pH 3. Pour ce qui est de la solubilisation des métaux, il n'y a pas de raison de croire qu'elle aurait été supérieure ou inférieure à celle obtenue en erlenmeyer avec la même boue (CUQ).

### **Séparation solide-liquide.**

Les résultats obtenus au sujet de la séparation solide-liquide des boues montrent que la biolixiviation thermophile améliore de beaucoup cette séparation comparativement à la digestion thermophile conventionnelle. La diminution du pH suite à la bioproduction d'acide sulfurique est sans doute la raison. Tout comme dans la présente étude, Jewell et al. (1982) ont également observé une nette amélioration de la séparation solide-liquide suite à l'acidification à des fins de lixiviation de boues ayant subi une digestion thermophile. Ainsi,

la biolixiviation thermophile à un autre effet positif, soit l'amélioration de la déshydratation des boues. Sachant qu'une bonne partie des budgets pour le fonctionnement des stations d'épuration sont alloués pour la disposition des boues, il est essentielle de pouvoir produire une boues qui se déshydrate bien afin d'augmenter la quantité de solide par unité de volume transporté en diminuant la quantité d'eau dans ce même volume. Même si la boue ne contient pas de concentration en métaux au dessus des normes, la bioproduction d'acide sulfurique pourrait être utilisée pour améliorer la déshydratation des boues traitées en conditions thermophiles.

## Conclusion

La découverte de *Thiobacillus thermosulfatus*, plus certaines précisions taxonomiques au sujet d'espèces déjà connues, permet de croire que le genre *Thiobacillus* montre une diversité phylogénétique plus restreinte qu'on ne le croyait. Suite à ces précisions, il serait pertinent de pousser davantage l'investigation phylogénétique du genre *Thiobacillus* de façon à proposer de nouveaux critères distinctifs qui tiendraient compte à la fois des critères phénotypiques et des critères génotypiques. Actuellement les études phylogénétiques ne sont utilisées qu'à titre confirmatif, ces informations ne faisant pas parti de la description officielle des genres et des espèces bactériens.

Cette étude a mis en évidence une activité biologique qui n'avait jamais été observée jusqu'à présent, soit l'oxydation microbienne du soufre élémentaire à 50 °C, dans les boues d'usines d'épuration municipales. Comme il fut démontré, cette activité cause la production d'acide sulfurique qui est ensuite utilisé pour la mise en solution des métaux contaminant les boues d'usines d'épuration. Pour des raisons techniques, les essais de biolixiviation thermophile furent effectués en mode "thermique", c'est à dire qu'il y avait une source externe de chaleur. Le processus de minéralisation en conditions thermophiles n'étant rentable qu'en mode "autothermique", il serait intéressant de voir s'il est possible de jumeler la biolixiviation thermophile à des installations spécialement conçues pour effectuer la digestion thermophile autothermique. Dans les cas où les boues traitées en thermophilie ne nécessiteraient pas une décontamination en métaux, la bioproduction d'acide sulfurique pourrait être utilisée pour le contrôle de l'augmentation du pH qui tend à augmenter lors de la digestion thermophile, la récupération de l'azote gazeux qui s'échappe des réacteurs en conditions alcalines ou l'amélioration de la séparation solide-liquide.

Également lors de la bioproduction d'acide sulfurique en conditions thermophiles, il a été démontré qu'il y a un développement d'organismes hétérotrophes causant une minéralisation de la matière organique suivi d'une amélioration de la capacité de séparation solide-liquide. À cause des limites intrinsèques de la technique d'isolement sur gélose, seule une portion des organismes hétérotrophes impliqués lors du processus de minéralisation furent isolés. L'utilisation de sondes génétiques jumelées aux techniques récentes d'amplification de l'ADN permettrait sans doute une meilleure connaissance de la microbiota totale.

En somme, le but de cette recherche était de démontrer la possibilité d'utiliser la microbiota indigène thermophile des boues d'usines d'épuration municipale pour solubiliser les métaux présents grâce à l'oxydation du soufre élémentaire. Suite aux résultats démontrant cette possibilité, il fut jugé pertinent d'investiger davantage le processus afin de connaître l'écologie microbienne qui était associée à ce phénomène. Également, quelques expériences plus pratiques furent réalisées pour étayer davantage la possibilité d'amener cette biotechnologie de l'état de recherche à l'état de développement. Malheureusement ces expériences n'ont pas été suffisamment convaincantes, particulièrement au sujet de l'amélioration de la mise en solution des métaux, pour espérer faire fructifier son développement. De plus cette biotechnologie fut expérimentée dans les conditions typiques d'un mode de traitement des boues municipales qui est presque inconnu au Canada et aux États-Unis. Par contre ce mode de traitement, soit la digestion thermophile autothermique, est bien connu en Europe ce qui laisse croire que les informations contenues dans les trois articles scientifiques pourraient avoir des retombées possibles pour l'industrie européenne.

Ainsi, cette première recherche sur la biolixiviation thermophile des boues d'épuration offre une vision globale du nouveau processus car autant l'aspect microbien que technologique furent explorés. Suite aux travaux qui ont permis de rencontrer les trois objectifs de recherche, l'hypothèse sur laquelle repose l'ensemble de cet ouvrage a été démontrée.

## Articles scientifiques présentés

Isolation, phenotypic characterization, and phylogenetic position of a novel, facultatively autotrophic, moderately thermophilic bacterium, *Thiobacillus thermosulfatus*, sp.nov.

F. Shooner, J. Bousquet et R.D. Tyagi

International Journal of Systematic Bacteriology. Volume 46, 1995, pp. 409-415

Thermophilic microbial leaching of heavy metals from municipal sludge using indigenous sulfur-oxidizing microbiota.

F. Shooner et R.D. Tyagi

Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 44. 1996

Microbial ecology of simultaneous thermophilic microbial leaching and digestion of sewage sludge.

F. Shooner et R.D. Tyagi

Canadian Journal of Microbiology. Volume 41. 1995, pp. 1071-1080

L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article. Vous pouvez le consulter à l'adresse suivante :

Shooner, F., Bousquer, J. et Tyagi, R.D. (1996). Isolation, phenotypic characterization, and phylogenetic position of a novel, facultatively autotrophic, moderately thermophilic bacterium, *Thiobacillus thermosulfatus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(2): 409-415.

<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-46-2-409>

**Thermophilic microbial leaching of heavy metals  
from municipal sludge using  
indigenous sulfur-oxidizing microbiota.**

Frédéric Shooner and Rajeshwar D. Tyagi

Institut National de la Recherche Scientifique (INRS-Eau), Université du Québec,  
2700 rue Einstein, case postale 7500, Ste-Foy, Canada, G1V 4C7.

**Résumé**

Il est démontré qu'il est possible d'enrichir la microbiota thermophile indigène des boues d'épuration et oxydant le soufre élémentaire pour la production d'acide sulfurique. L'abaissement du pH provoque la mise en solution des métaux contenus dans ces mêmes boues. Après 30 jours d'incubation à 53°C, les valeurs moyennes de pH, de potentiel rédox et  $\text{SO}_4^{2-}$  furent de 2,8, 237 mV et 5668 mg/L respectivement. Du chlorure ferrique fut ajouté à la fin de la période d'incubation pour augmenter le potentiel rédox et réduire davantage le pH, pour une valeur finale moyenne de pH et de potentiel rédox de 1,86 et 409 mV respectivement. Après l'ajout de chlorure ferrique, les valeurs moyennes suivantes de pourcentage de solubilisation furent obtenues: 35,6±20,6% (Cd), 65,9±15,1% (Cu), 28,5±13,5% (Cr), 74,0±10,0% (Mn), 60,3±13,1% (Ni), 33,7±27,6% (Pb), 83,9±6,2% (Zn), 39,0±16,6% (K) et 18,2±15,8% (P). Durant la bioproduction d'acide sulfurique, les pourcentages de minéralisation des solides volatiles et les solides volatiles en suspensions sont identiques à ceux obtenus lors d'une digestion thermophile conventionnelle. La séparation solide-liquide est grandement améliorée suite à la bioproduction d'acide sulfurique, comparativement à la digestion thermophile conventionnelle.

**Abstract**

It was demonstrated in shake flask experiments that the sulfur-oxidizing microbiota of municipal sludges can be used at 53°C for heavy metal leaching. Five sludges were tested and the average final pH, oxidation/reduction potential and  $\text{SO}_4^{2-}$  concentration after 30 days were 2.8, 237 mV and 5668 mg/l respectively. Ferric chloride was added to enhance the redox potential and to lower pH, which resulted in average value of 409 mV and 1.86 respectively. The average solubilisation of Cd, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Zn, K and P after ferric chloride addition was: 35.6±20.6%, 65.9±15.1%, 28.5±13.5%, 74.0±10.0%, 60.3±13.1%, 33.7±27.6%, 83.9±6.2%, 39.0±16.6% and 18.2±15.8% respectively. The

present process enhanced the sludge dewaterability compared to the conventional thermophilic digestion. During the leaching batch process, the volatile and volatile suspended solids were degraded to the same level as observed using the conventional thermophilic digestion was used as control.

## Introduction

The sludge produced at municipal wastewater treatment plants can contain numerous contaminants like heavy metals, organic compounds or pathogenic organisms. In the last decade, increasing production of municipal sludge from wastewater treatment plants has raised questions about their safe disposal. Because of the high contents of nitrogen, phosphorus, potassium and economical constraints, sludge use as fertilizer has been the most suitable solution (Davis, 1987; Environnement Canada, 1985).

However, before use, contaminant elements in sludge should be reduced to a minimum to minimize eventual trophic-chain contamination. Also, sludge should be odourless and well mineralized to reduce further development of odour. It is now recognized that aerobic thermophilic digestion is the most efficient process for the elimination of sludge pathogens (Appleton and Venosa, 1986; Burth et al., 1990; Hamer and Zwiefelhofer, 1986; Kabrick and Jewell, 1982; Mason et al., 1992). Like pasteurization in the food industry, this process can be considered as a complete barrier against human and cattle infection (Pike and Davis, 1984). Aerobic thermophilic digestion produces well-stabilized sludge without unpleasant odour.

Heavy metals in municipal sludges can be efficiently removed by microbial leaching based on the oxidation of ferrous sulfate or elemental sulfur (Couillard and Mercier, 1991; Blais et al., 1992 a,b,c; Tyagi and Couillard, 1989; Tyagi et al., 1990). It was shown that the oxidation of elemental sulfur ( $S^0$ ) by two sludge-indigenous thiobacilli gives better solubilization than the process using ferrous sulfate (Blais et al., 1992a, b). Also, because microbial leaching using  $S^0$  can be initiated at neutral pH, microbial mineralization of the organic matter can take place simultaneously. The resulting removal of organic matter is almost equivalent to conventional aerobic stabilisation process. Thus, heavy metal removal and stabilization of municipal sludges can be conducted simultaneously in the same bioreactor. Chemical leaching using acid was also attempted on sludge digested with thermophilic process (Jewell, 1991).

Therefore, it was pertinent to investigate the possibility of developing a metal-leaching process based on microbial sulfur oxidation which could be coupled to sludge digestion under thermophilic conditions.

## Materials and methods

**Sludge sampling.** Sludge samples (Table 1) from five different municipal wastewater treatment plants (located in the province of Québec, Canada) were collected in sterile jars and kept at 4°C until use. Total solids, total suspended solids, volatile solids and volatile suspended solids, were determined according to APHA (1992).

**Preparation of the inoculum.** A 50-ml of each sludge was amended with 0.5% (w/v) tyndallized S<sup>0</sup> powder and placed in 500-ml sterile flask. The flasks were incubated in a covered shaking water-bath at 53°C and 120 rpm. The pH was monitored each day. After few days when the pH stopped decreasing, sulfate concentration (precipitation with barium chloride) in the supernatant was estimated by turbidity measurement (APHA, 1992). A 10-ml sample of each of the acidified sludge thus obtained was transferred in 50 ml of fresh sludge amended with S<sup>0</sup> and incubated under similar conditions. When the pH decreased to a value around 3, a second transfer was done under similar conditions. Further transfer did not increase the sulfuric acid production rate.

**Thermophilic microbial leaching experiments.** Three replicates of 200 ml of each sludge were placed in 500-ml flasks, inoculated with 10% (v/v) of the corresponding inoculum, amended with 0.5% (w/v) S<sup>0</sup> and incubated as described previously. A fourth flask was incubated without S<sup>0</sup> as control. This control also represents a conventional thermophilic digestion. The pH and redox potential were monitored each day. Samples of sludge were withdrawn at regular intervals to determine the proportion of the total content of selected metals solubilised in the aqueous phase. Concentration of metals in supernatant was determined as follows: 20 ml of sludge sample was centrifuged (12 000 g, 20 min) and the supernatant passed through 2 µm-pore filters. Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, P, Pb, Zn and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (expressed in terms of total S) concentrations were determined using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP: Thermo Jarrell Ash Corporation). The total metal content was determined after complete digestion of the sludge with nitric acid, hydrofluoric acid and hydrogen peroxide according to APHA (1992).

Statistical analysis was carried out with the non-parametric Mann-Whitney U test, using confidence interval of 95% ( $P < 0.05$ ).

**Mineralization of the organic matter during the leaching process.** The possibility of simultaneous digestion of sludge organic matter and microbial production of sulfuric acid (or metal leaching) was investigated using two 6 l cylindrical jars. A heating coil connected to a temperature-control probe was wound on outer walls of the jars. The heating coil and the temperature probe were connected to a digital temperature controller. Air was sparged at a rate of 0.5 vvm (volume of air/volume of sludge·min<sup>-1</sup>) from the bottom of jars, to ensure good aeration and constant mixing of the sludge. The vapours in the exit air were passed through a condenser to prevent water loss. Instead of using sulfur powder, S<sup>0</sup> was immobilized on the inner wall of jars by the following procedure: a quantity of S<sup>0</sup> was melted at 108°C and poured into the jar. The jar was rolled so as to solidify the sulfur on the inner walls. The working volume was 3 l. The control jar was without S<sup>0</sup>. The sludge from Communauté Urbaine de Québec treatment plant was arbitrarily chosen for this experiment and maintained at 52°C. A 300-ml sample of sludge previously enriched with thermophilic sulfur-oxidizing microbiota by two subsequent transfers was used to inoculate both jars. Samples were withdrawn regularly to determine pH, redox potential and sulfate concentration by ICP. Volatile and volatile suspended solids were determined in triplicates (APHA, 1992).

**Dewaterability after the microbial thermophilic leaching.** Dewaterability of the sludge treated was evaluated by calculating the sludge filtrability index ( $r_{0.5}$ ) according to Degrémont (1978). First, the final total solids content of the sludge was determined as previously described. Then, a volume of 100 ml of sludge was rapidly poured onto a Whatman filter No.90 placed in a Buchner funnel under 0.5 atm pressure. The volume of filtrate ( $V$ ) was noted at regular intervals ( $T$ ). At the end of the filtration the amount of cake accumulated on the filter and the turbidity of the filtrate were visually evaluated. A graph of ( $T_x/V_x$ ) versus  $V_x$  was plotted and the slope of the linear part of the curve was determined. The dewaterability index was calculated with the following formula:  $r_{0.5} = 2 a P S^2/n C$ , where  $a$  is the slope previously determined (s/m<sup>6</sup>),  $P$  is the pressure (0.5 atm =  $5.07 \times 10^4$  Pa),  $S^2$  is the filter surface ( $81 \times 10^{-4}$  m<sup>2</sup>),  $n$  is the filter specific viscosity ( $1.1 \times 10^{-3}$  Pa.s) and  $C$  the total solids (kg/m<sup>3</sup>). The effect of ferric chloride addition on sludge dewaterability was also determined.

## Results

Total initial metal content of each sludge is shown in Table 2. Figure 1 presents the final metal solubilisation obtained for the five sludges tested. The solubilisation was increased by the addition of  $\text{FeCl}_3$  (which increased the redox potential and lowered the final pH) (Table 3). The control, which represents the conventional thermophilic digestion, showed low metal solubilisation principally because of the high pH values at the end of each experiment. Statistical analysis showed significantly increased ( $P < 0.05$ ) solubilisation of Cr, Cu and Ni when  $\text{FeCl}_3$  was used. The solubilisation efficiency was in the following order:  $\text{Zn} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{Cr}$ .

Phosphorus was significantly solubilized ( $P < 0.05$ ) during thermophilic microbial leaching compared to the conventional thermophilic digestion (Figure 1). The addition of  $\text{FeCl}_3$  resulted in phosphorus precipitation and the amount remaining in solution was almost equal to the conventional thermophilic digestion. There was no significant difference in the potassium solubilisation between both processes, even if ferric chloride was added.

In all sludges subjected to the thermophilic leaching, the final sulfate concentrations were between 4452 and 6830 mg/l which resulted in a final pH values between 2.3 and 3.3 before the addition of  $\text{FeCl}_3$  (Table 3). Figures 2 and 3 give a typical example of pH progression, redox potential, sulfate concentration and metal solubilisation during the thermophilic leaching. The decrease of redox potential observed in both processes during the first 4 days was probably due to oxygen depletion caused by an extensive growth of thermophilic heterotrophic microbiota. At the 35<sup>th</sup> day,  $\text{FeCl}_3$  was added resulting in an increased metal solubilisation through increasing in the redox potential (Fig. 3).

Reduction of sludge solids as a result of mineralisation of the organic matter during the production of sulfuric acid is presented in Figure 4. The degradation of volatile solids during thermophilic microbial leaching reached between 24% and 26 % after 15 days. During the same time, conventional thermophilic digestion removed about 42 % of volatile solids. This significant difference could be explained by the production of sulfate during the leaching process. This artificially increased the inorganic proportion of the sludge. In fact, if the amount of sulfate produced was subtracted, the reduction in volatile solids during the thermophilic leaching was almost the same as that brought about by conventional thermophilic digestion. The final removal of volatile suspended solids during the thermophilic microbial leaching was higher in both reactors (53 % and 58 %) than conventional

thermophilic digestion (45 %) after 15 days. It is therefore suggested that the sulfuric acid production created more favourable conditions for the microbial activities, resulting in increased sludge mineralisation. In the two reactors containing immobilized  $S^0$ , 2290 mg/l and 2642 mg/l of sulfate was produced, resulting in a final pH of 5.6 and 4.7, respectively. A small amount of sulfate (267 mg/l) was produced in the control reactor without  $S^0$ , resulting in a final pH of 7.7.

Dewaterability of the sludge exposed to the microbial thermophilic leaching was improved, as compared to the sludge subjected to the conventional thermophilic digestion (Table 4). The dewaterability, determined as filtrability index  $r_{0.5}$ , of all the sludges leached (A-O) is less than  $3.98 \times 10^{13}$  m/kg compared to the control (P, Q, R, S) which is over  $5.84 \times 10^{13}$  m/kg. If we compare the control sludge (P, Q, R, S) to the leached sludge with the same total solids content (A,B,C,D, E) it clearly demonstrates a substantial increase in the dewaterability. In fact, when ferric chloride was not added, the index  $r_{0.5}$  was over  $192 \times 10^{13}$  m/kg for the control sludges (R, S) as compared to less than  $1.23 \times 10^{13}$  m/kg for the leached sludges (D, E). Even when ferric chloride was added into control sludges (P, Q), the index  $r_{0.5}$  remained over  $5.84 \times 10^{13}$  m/kg as compared to less than  $1.29 \times 10^{13}$  m/kg for leached sludges (A,B, C). Also, the addition of ferric chloride improved the clarity of the filtrate and quality of the cake in all cases. This improvement was particularly remarkable for sludges exposed to conventional thermophilic digestion (P, Q). The increased amount of final total solids (ranged from 12.3 to 30.8 g/L) did not have much effect on the index  $r_{0.5}$  of leached sludge when ferric chloride was added.

## Discussion

Figure 5 shows a comparison of metal solubilisation obtained in the present thermophilic process with those using microbial oxidation of ferrous sulfate and elemental sulfur in mesophilic temperature range as well as chemical leaching using sulfuric and hydrochloric acids. Except for Cd and Mn, metal solubilisation is significantly lower ( $P < 0.05$ ). The present thermophilic leaching process gives at least the same metal efficiency removal as other processes. It was demonstrated that pH was the most important factor for metal leaching in municipal sludges (Sreekrishnan et al., 1993; Tyagi et al., 1993) and all processes considered here are able to attain the pH conditions required for metal solubilisation.

The thermophilic indigenous sulfur-oxidizing microbiota did not produce enough sulfuric acid to lower the pH to 2. Moreover, this thermophilic microbiota did not increase the redox

potential sufficiently to solubilize metals, as was observed in mesophilic microbiota used during mesophilic leaching based on elemental sulfur or ferrous sulfate (Blais et al., 1992b). Ferric chloride was necessary to enhance the metal solubilisation by increasing the redox potential. The addition of  $\text{FeCl}_3$  also improved the filterability index of sludge to a large extent.

At the present time, the thermophilic microbial leaching of municipal sludges needs improvement, since it takes at least 20 days to achieve the required metal solubilization in all sludges tested. One way to reduce the time is to improve the aeration system. In this research, the experiments were conducted in shake flasks with the redox potential falling below 0 mV for few days, suggesting an oxygen deficiency. On a pilot scale, conventional thermophilic digestion uses high efficiency Venturi aeration system (Bruce et al., 1989) that could be suitable for thermophilic microbial leaching.

Increase in the amount of thermophilic sulfur-oxidizing microbiota in the inoculum could also decrease the time needed to achieve a pH around 4. Moreover, acidophilic sulfur-oxidizing microbiota which can produce sulfuric acid (to reduce the pH to 2.0) must be developed. In fact, the rate of sulfate production by the thermophilic microbiota is very slow when the pH drops under 4 to 3.5. Efforts to find thermophilic acidophilic sulfur-oxidizing microbiota in municipal sludges have been without success. It was previously shown in municipal wastewater that sludge solids impart a buffering action (Sreerishnan et al., 1993). Thus, the speed of acidification depends also on sludge concentration plus the factors mentioned above. During these experiments, the fastest and slowest acidification was observed with sludge from St-George (4.4 g/l TS) and Beauceville plants (33.24 g/l TS), respectively.

It is recognized that the dewaterability of the sludge treated under thermophilic aerobic conditions is not improved. Most of the time, the solid/liquid separation greatly deteriorates compared to the initial dewaterability before the treatment (Jewell et al., 1982). This phenomenon was also observed during these experiments. However, the dewaterability index of conventional thermophilic digestion (control flasks) was almost 150 times greater than the index calculated for the same sludge exposed to the leaching process. Thus, sludge acidification greatly enhanced the dewaterability. Similar conclusions were noted by Jewell (1991), when the sludge treated under aerobic thermophilic condition was followed by acidification to solubilize contaminant metals.

The thermophilic leaching process presented here could support growth of heterotrophic organisms as indicated by the reduction of volatile suspended solids and volatile solids under acidic conditions. The reduction of solids was in the same range as encountered during conventional thermophilic digestion (Fig. 4). In both processes, unpleasant odour was removed in less than 4 days of treatment. The fate of pathogen indicators was not monitored during the leaching but it was assumed that these organisms would be eliminated, since conventional thermophilic digestion at 50-60°C is well known to reduce indicator organisms below the detection limit (Hamer and Zwiefelhofer, 1986; Kabrick and Jewell, 1982; Lee et al., 1989).

Thermophilic microbial leaching of municipal sludges using indigenous sulfur-oxidizing microbiota is a promising biotechnology, since, in addition to removing contaminant metals it offers all the other advantages of conventional thermophilic digestion, i.e. high stabilisation efficiency, pathogen removal plus improvement of sludge dewaterability.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grants A9484 and STR 149770) for supporting this research.

### **References**

Les articles et autres documents consultés lors de cette étude sont regroupés dans la section "Ouvrages consultés".

Table 1. Characteristics of sludges used for the microbial thermophilic leaching.

sludges from	TS	TSS	VS	VSS	pH
	(g/L)				
Beauceville (sec) <sup>a</sup>	33.24	25.42	18.12	14.29	6.6
Black Lake (sec)	24.72	18.38	15.88	11.86	5.6
CUQ <sup>b</sup> (prim+sec)	19.06	18.56	11.84	11.70	6.4
St-George (sec)	4.40	3.15	2.86	2.22	6.5
Valcartier (sec)	21.26	15.73	18.64	13.98	5.2

<sup>a</sup> prim+ sec- primary sludge; sec- secondary sludge.

<sup>b</sup> Communauté Urbaine de Québec

Table 2. Metal content of sludges used.

	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	K	P
	(mg/kg of dry sludge)								
Beauceville	4	91	225	1799	36	52	385	9440	23675
Black Lake	6	141	1638	290	151	147	642	7330	13632
CUQ <sup>a</sup>	5	66	189	207	23	78	303	7427	8587
St-George	4	70	564	270	36	55	302	9929	27929
Valcartier	5	36	626	109	16	102	418	3048	11320
recommended level <sup>b</sup>	10	500	600	1500	100	300	1750	-	-

<sup>a</sup> Communauté Urbaine de Québec.

<sup>b</sup> Gouvernement du Québec

Table 3. Final characteristics after thermophilic microbial leaching

sludge from		pH		ORP (mV)		SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> <sup>b</sup> (mg/L)	FeCl <sub>3</sub> <sup>c</sup> (mg/L)
		final	with FeCl <sub>3</sub>	final	with FeCl <sub>3</sub>		
Beauceville	with S°	2.8±0.0	2.2±0.1	233±6	317±8	6060±17	-
	without S°	8.1	-	118	-	287	
Black Lake	with S°	3.3±0.4	1.8±0.0	217±15	399±22	6830±983	642±21
	without S°	8.3	-	58	-	227	
CUQ <sup>a</sup>	with S°	2.3±0.1	1.6±0.0	271±16	468±4	5960±2	852±152
	without S°	7.7	-	155	-	207	
St-George	with S°	2.5±0.0	1.9±0.1	287±23	446±5	4452±396	276±32
	without S°	7.3	-	157	-	243	
Valcartier	with S°	3.2±1.2	1.8±2.0	175±33	415±5	5038±1414	559±60
	without S°	8.5	-	143	-	252	

<sup>a</sup> Communauté Urbaine de Québec

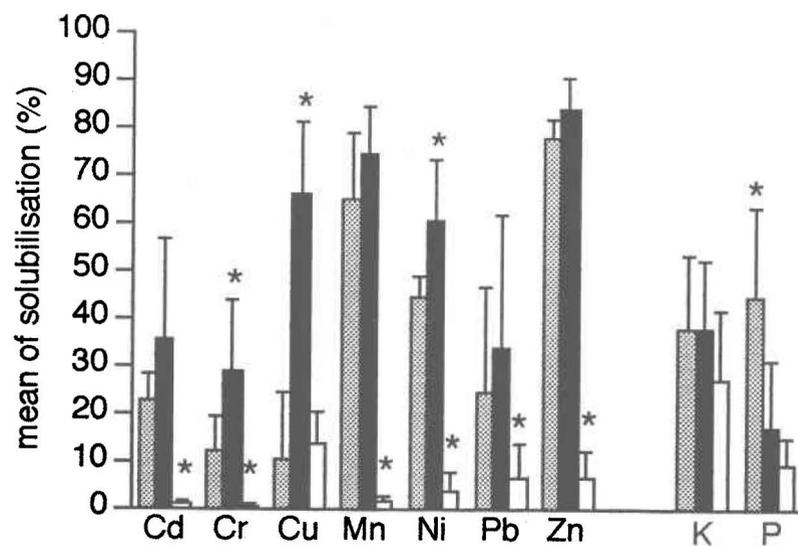
<sup>b</sup> sulfuric acid produced microbiologically

<sup>c</sup> final concentration of ferrous chloride added

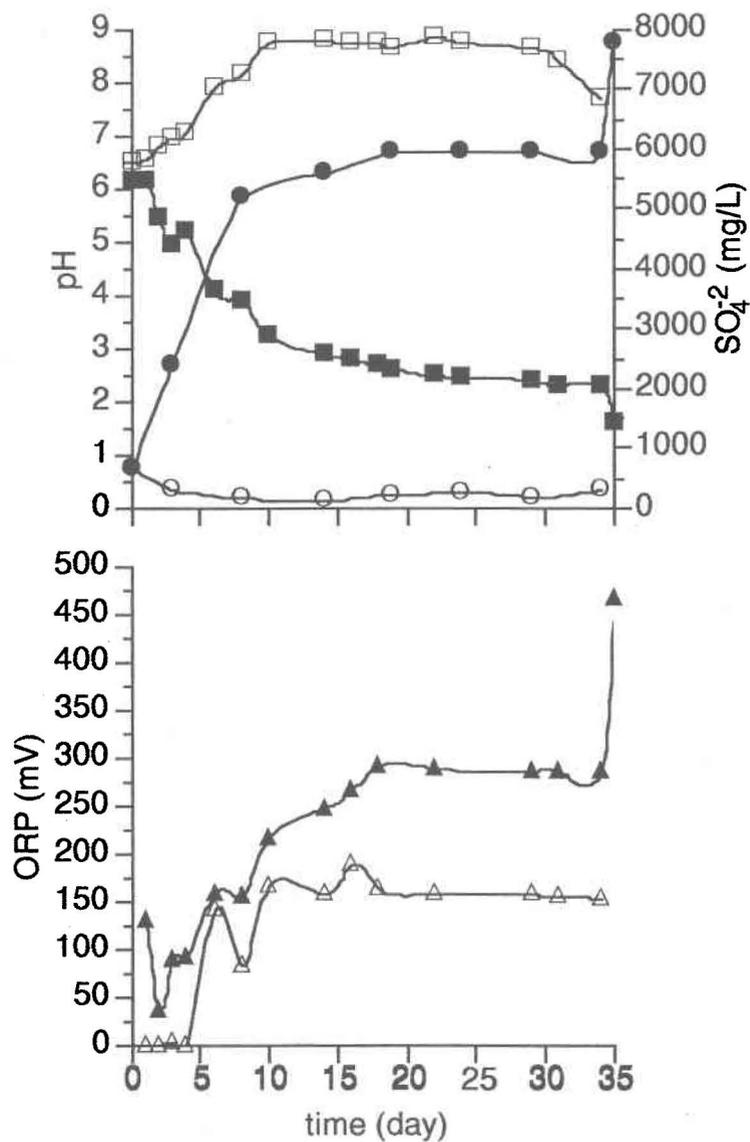
Table 4. Dewaterability index of microbially leached sludges under thermophilic conditions.

sample	total solids (%)	FeCl <sub>3</sub> added (mg/L)	pH	ORP (mV)	I <sub>0.5</sub> (x10 <sup>13</sup> m/kg)	filtrate	cake on filter
	final		final	final			
A	1.26	1131	2.1	553	1.29	clear	good
B	1.23	1293	2.1	547	.482	clear	good
C	1.23	1200	2.2	560	.567	clear	good
D	1.27	-	3.4	241	1.23	clear	good
E	1.19	-	3.3	178	.695	clear	good
F	2.21	1812	1.9	560	1.17	clear	good
G	2.18	1258	2.0	553	1.57	clear	good
H	2.20	1326	2.1	550	1.76	clear	good
I	2.25	-	3.4	176	2.29	clear	good
J	2.23	-	3.4	256	1.90	clear	good
K	3.08	2180	1.9	555	1.52	clear	good
L	3.05	2721	1.9	559	1.84	clear	good
M	2.94	2563	2.0	601	1.56	clear	good
N	3.03	-	3.8	189	3.56	clear	good
O	3.05	-	3.5	150	3.98	turbid	good
<i>control</i>							
p <sup>a</sup>	1.11	1523	5.6	445	5.84	clear	good
Q	1.12	1236	5.7	523	6.12	clear	good
R	1.27	-	8.4	47	203.1	turbid	light
S	1.13	-	8.2	120	192.3	turbid	light

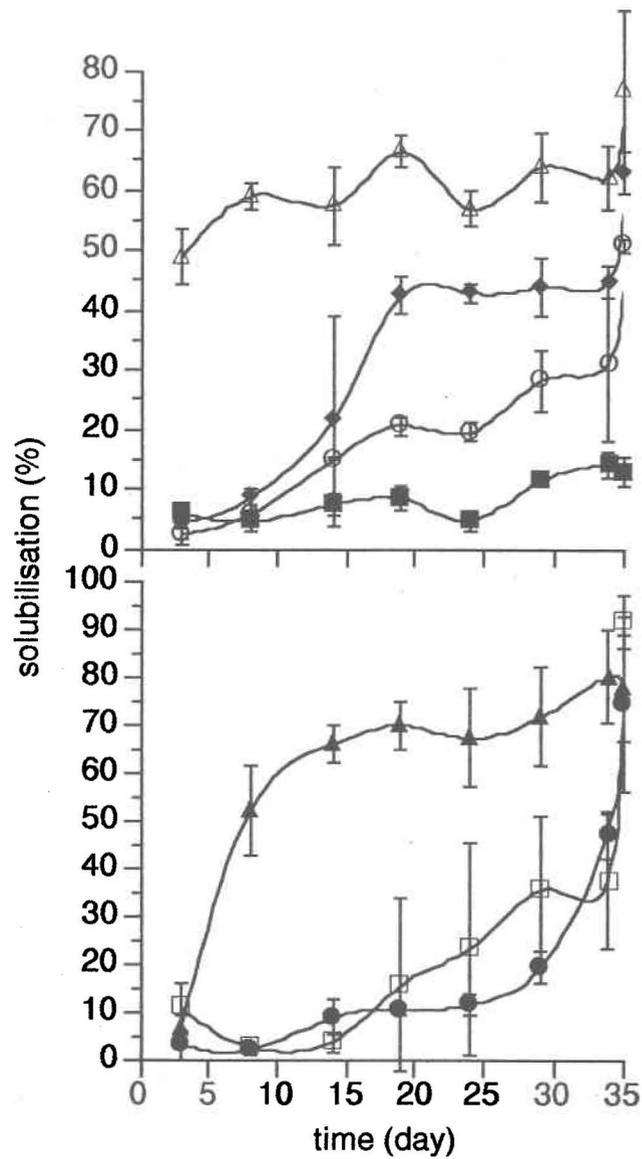
<sup>a</sup> represents conventional thermophilic digestion



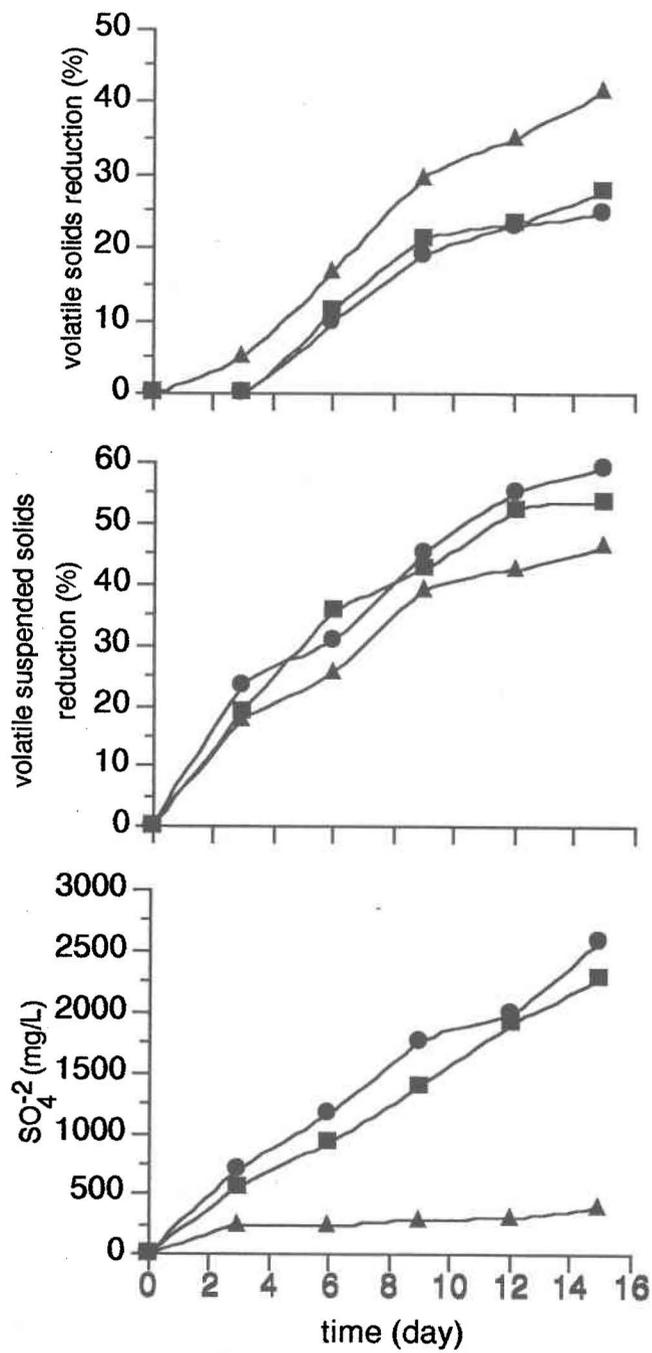
**Figure 1.** Metal solubilisation obtained after thermophilic microbial leaching. The values are the mean with standard deviation: ▨, solubilisation after 28 days at 53°C; ■, solubilisation after addition of ferric chloride; □, solubilisation obtained during conventional thermophilic digestion. \* indicates significant differences ( $P < 0.05$ )



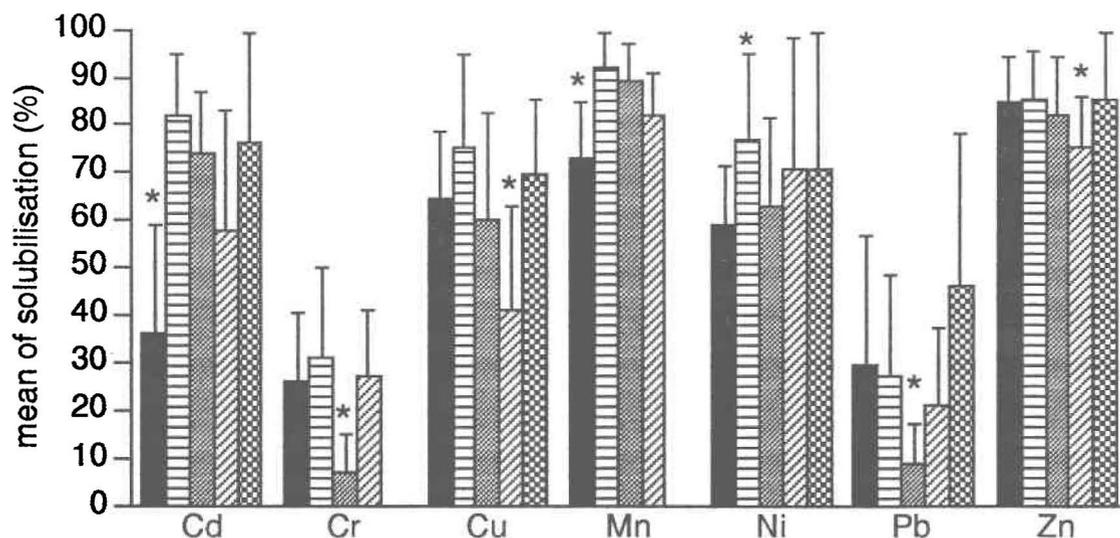
**Figure 2.** Typical changes in pH, oxidation/reduction potential ( $V_{\text{ox/red}}$ ) and sulfate production during thermophilic microbial leaching of sludge from Communauté Urbaine de Québec. Values are the mean of three replicates. Conventional thermophilic digestion: □, pH; ○, sulfate; △, oxidation/reduction potential. Thermophilic microbial leaching: ■, pH; ●, sulfate; ▲, oxidation/reduction potential.



**Figure 3.** Example of metal solubilisation during thermophilic microbial leaching of sludge from Communauté Urbaine de Québec. Values are the mean of three replicates.  $\Delta$ , Mn;  $\blacklozenge$ , Ni;  $\circ$ , Cr;  $\blacksquare$ , Cd;  $\blacktriangle$ , Zn;  $\square$ , Cu;  $\bullet$  Pb.



**Figure 4.** Mineralisation of organic matter during thermophilic microbial leaching in 3-1 batch reactor. Thermophilic microbial leaching: ■ reactor #1; ● reactor #2. Conventional thermophilic digestion: ▲.



**Figure 5.** Comparison of metal solubilisation efficiency for different leaching processes available. ■, thermophilic microbial leaching at 53°C after addition of ferric chloride: pH 1.8,  $V_{ox/red}$  409, mean of 12 samples (present study). ▨, microbial leaching based on  $S^{\circ}$  oxidation at 28°C: pH 1.9,  $V_{ox/red}$  371, mean of 23 samples (Blais et al., 1992c). ▩, leaching based on sulfuric acid addition plus microbial oxidation of ferrous sulfate at 21°C: pH 2.9,  $V_{ox/red}$  503, mean of 23 samples (Blais et al., 1992c). ▤, leaching based on sulfuric acid addition at 21°C: pH 1.5,  $V_{ox/red}$  392, mean of 23 samples (Blais et al., 1992c). ▦, thermophilic digestion followed by metal solubilisation with hydrochloric acid: pH 1.5,  $V_{ox/red}$  > 100, mean of 4 samples (Jewell, 1991). \* Indicates significant difference ( $P < 0.05$ )

## Microbial Ecology of Simultaneous Thermophilic Microbial Leaching and Digestion of Sewage Sludge

Frédéric Shooner and Rajeshwar D. Tyagi

Institut National de la Recherche Scientifique (INRS-Eau), Université du Québec,  
rue Einstein, case postal 7500, Ste-Foy, Canada, G1V 4C7.

### Résumé

Les différentes populations microbiennes rencontrées lors d'un processus simultané de biolixiviation et de digestion thermophile des boues d'épuration, basé sur l'oxydation microbienne du soufre élémentaire à 50°C, furent investiguées. Lors du processus, l'organisme responsable de la production d'acide sulfurique, *Thiobacillus thermosulfatus*, augmente pour ensuite décroître. Par contre, lors de la digestion thermophile conventionnelle utilisée comme contrôle, cette population décroît sous la limite de détection. Durant le processus combiné de biolixiviation et digestion thermophile il y a un enrichissement des populations hétérotrophes thermophiles acidophiles et neutrophiles. Le compte final de la population acidophile est supérieure à celle neutrophile. Dans le cas du contrôle, la population hétérotrophe thermophile acidophile demeure inférieure à la population neutrophile. Six bactéries hétérotrophes furent isolées et partiellement caractérisées. *Bacillus* est le genre prédominant. La microbiota hétérotrophe thermophile impliquée dans le processus combiné de lixiviation et digestion est la même que celle impliquée durant la digestion thermophile conventionnelle. Seules leurs concentrations relatives changes. Durant les deux traitements, les indicateurs bactériens sont éliminés après 12 h. La population hétérotrophe mésophile est plus affectée par le processus combiné de biolixiviation et digestion thermophile que par la digestion thermophile conventionnelle. La quantité de biomasse totale semble plus influente sur la minéralisation de la matière organique que la présence spécifique des espèces.

### Abstract

The microbial population encountered during a simultaneous thermophilic microbial leaching and digestion process at 50°C, based on microbial sulfur oxidation, was investigated. The cell count of sulfuric acid producer, *Thiobacillus thermosulfatus*, increased followed by a decrease. In the absence of sulfur (control: conventional thermophilic digestion), *Thiobacillus thermosulfatus* population decreased under the detection limit. Acidophilic and neutrophilic

heterotrophic populations increased during the leaching process, and the final acidophilic population count was higher than the neutrophilic population. During the thermophilic digestion (control) the final neutrophilic population count was higher than the acidophilic. Six heterotrophic bacterial strains were isolated and partially characterized. *Bacillus* was the most predominant genus. The type of bacterial populations in thermophilic microbial leaching and digestion as well as the thermophilic digestion process (control) were the same, while only the relative concentrations changed. In both processes, the bacterial indicators decreased under the detection limit after 12 h. Mesophilic heterotrophic population was more affected by thermophilic microbial leaching process than by thermophilic digestion. Sludge mineralization was probably more influenced by the final cell concentration rather than the presence of an individual species or mixed population.

## Introduction

During the last decade, an increasing production of sludge from municipal wastewater treatment plants has raised questions about its disposal. Because of high nitrogen, phosphorus, and potassium contents, sludge use as fertilizer is a more economically suitable solution (Davis, 1987; Environment Canada, 1985). Unfortunately, because of its origin, municipal sludge contains considerable amount of potential pathogenic organisms, as well as most of the time contaminants heavy metals and organic chemicals (St-Yves and Beaulieu, 1988; Wong and Henry, 1984; Wozniak and Huang, 1982). Hence, to eliminate risks of disease transmission and possibilities of trophic chain contamination, the undesirable elements must be removed prior to using sludge as fertilizer.

Thermophilic aerobic digestion at around 55°C has been shown to eliminate pathogenic organisms as well as achieve sludge digestion (Burth et al., 1990; Vismara, 1985; Kabrick et al., 1979). The thermophilic process, prior to anaerobic mesophilic digestion, has also been demonstrated to make a more hygienic sludge (Appleton and Venosa, 1986; Hamer and Zwiefelhofer, 1986). The heavy metals content of sludge can be reduced by microbial leaching. It was demonstrated that two sludge-indigenous thiobacilli; *T. thioparus* and *T. thiooxidans*, sequentially oxidized elemental sulfur to produce considerable amount of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, thereby lowering the sludge pH from neutrality to around 2.0 and hence creating favorable metal solubilisation conditions (Blais et al., 1992a). It was stated that during the same event, heterotrophic microorganisms carried out the mineralization of sludge organic matter (Blais et al., 1992b). Bacterial and viral indicators were inactivated during the process mainly because of the resulting acidic conditions. However, the eggs of parasites like *Ascaris*

are not affected by the mesophilic microbial leaching because of their legendary resistance against such acidic conditions (Rudolfs et al., 1950).

Therefore, it became pertinent to investigate the possibility of developing a process based on microbial sulfur-oxidation for metal leaching which could be coupled with sludge digestion in thermophilic conditions. Preliminary results obtained showed that a sludge-indigenous thiobacilli oxidized elemental sulfur in sludge to create sufficient acidic conditions capable of solubilizing metals. This new moderate thermophilic organism, *Thiobacillus thermosulfatus*, was isolated, characterized and deposited at American Type Culture Collection (ATCC 51520; Shooner et al., 1995). It was also shown, that the sludge organic content could be mineralized by the heterotrophic microorganisms during the production of sulfuric acid by *T. thermosulfatus*.

The purpose of this report is to present an overall view of the microbial ecology associated with the simultaneous thermophilic microbial metal leaching and sludge digestion process. It includes the effect on pathogen indicator microorganisms, evolution of the heterotrophic and *T. thermosulfatus* populations, and partial characterization of the isolated heterotrophic microflora.

## Materials and methods

**Ubiquity of the microbial sulfur-oxidation activity at 50°C.** Sludge samples from eight wastewater treatment plants were collected in sterile jars and kept at 4°C. The samples were analyzed to determine bacterial counts as well as different solid concentrations according to APHA (1992): total solids (TS), total suspended solids (TSS), volatile solids (VS), and volatile suspended solids (VSS) (Table 1).

To ascertain if the sulfuric acid production in presence of S<sup>0</sup> at 50°C was widespread in sludge irrespective of its origin or type, the acidic potential was evaluated as follows. Fifty ml of each sludge sample was amended with 0.5% (w/v) tyndallized S<sup>0</sup> powder (<125 mesh) and placed in 500-ml sterile shake flasks. The flasks were incubated in a covered shaking water-bath at 53°C under constant agitation (120 rpm). Control flasks (without and with S<sup>0</sup> plus 0.04% w/v sodium azide) were also included. Samples were withdrawn aseptically to determine pH and SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> concentration. Sulfate concentration was determined using Inductive Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP; model Atom Scan 25 of Thermo

Jarrell Ash Corporation). The samples used to determine pH were discarded in order to avoid bacterial cross-contamination among the eleven different sludges.

**Evolution of the microbial population.** The sludge from CUQ (Communauté Urbaine du Québec) wastewater treatment plant was arbitrarily chosen for this experiment. Fifty ml of sludge in a 500-ml sterile flask was amended with 0.5% S° powder and placed in a covered shaking water-bath at 50°C under constant agitation (120 rpm). The flask was inoculated with 10% v/v of a sludge previously incubated under similar conditions. Preliminary results showed that only one transfer was required to obtain inoculum. Further transfers did not increase the sulfuric acid production rate. The experiment was done in duplicate. Control was incubated under similar conditions but without S°.

Samples were drawn daily to measure pH and microbial population. The *T. thermosulfatus* population was evaluated by spreading 100 µl of serial dilutions on solid chemolithotrophic medium (per liter: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.04g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.77g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5g; 0.5% sodium thiosulfate, bromophenol blue 0.02g, phytigel 6.0) with pH adjusted to 6.0 with NaOH. Phytigel was sterilized separately. Plates were incubated for 48 h at 50°C. To confirm that the cells were that of *T. thermosulfatus*, the plates after colony count were left in the incubator for further growth until a yellow color appeared, indicating acid production (pH<3.8). This is the phenotypical characteristic of *T. thermosulfatus* on plates used to isolate (Shooner et al., 1995).

The thermophilic heterotrophic population was evaluated by spreading serial dilutions on solid heterotrophic medium H (per liter: glucose 1.0g; tryptone, 5.0g; yeast extract, 2.5g; Gelrite, 6.0; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.57g) adjusted to pH 4.0 (arbitrarily named acidophilic heterotrophs, AH) and 7.0 (arbitrarily named neutrophilic heterotrophs, NH) with 5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or 5N NaOH. The plates were then incubated for 24 h at 50°C.

Destruction of fecal coliforms, fecal streptococci, total coliforms and total heterotrophs were evaluated on m-FC agar (Difco), m-Enterococcus agar (Difco), m-Endo agar LES (Difco), nutrient agar, respectively. Mesophilic heterotrophic population (MH) in thermophilic leaching and digestion process was also measured by spreading the samples on plates containing heterotrophic medium H at pH 7.0 and incubating the plates at 30°C.

Lysis of *Escherichia coli* by sludge-indigenous coliphages was used to evaluate the fate of virus according to Shooner et al. (1992). The IAWPRC Study Group on Health Related

Water Microbiology (1991) has proposed the use of bacteriophages as an indicator of viral inactivation during wastewater treatment processes. The method used is described as follows: Two ml of sterile 30% w/v beef extract (Difco) stock solution was added to duplicate samples (20 ml) of sludge. The pH was adjusted to 6.0 with 5N HCl. The mixture was sonicated for 15 s and then centrifuged for 15 min at 4000 x g. To each ml of supernatant, 0.35 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was gradually added and dissolved. After 30 min, the mixture was centrifuged for 15 min at 4000 x g. The precipitate was dissolved in 2 ml of 0.85% NaCl solution. Precipitation with ammonium sulfate eliminates unknown substances which can occasionally inhibit the growth of the host cells. The samples of precipitated virus were diluted using 0.85% NaCl solution. Each dilution was made in duplicate. A volume of 0.9 ml of each dilution was added to 2.5 ml of a 4-h-old *Escherichia coli* C culture (ATCC 13706) previously grown in liquid medium M (per liter: 10g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 1g dextrose, pH 7.3) and 4 mL of sterile soft EC agar medium (Difco) at 45°C (37 g/L of EC medium supplemented with 0.8% agar). The mixture was poured onto petri plates and incubated overnight at 30°C. The results were expressed as colony forming unit (CFU) per millilitre.

**Isolation and characterization of the heterotrophic microflora.** Colonies on heterotrophic medium at pH 4.0 (AH population) and pH 7.0 (NH population) as previously described were isolated according to their overall shapes. Single colonies were replicated at least 10 times before starting the partial characterization. Morphology of cells, the shape and position of spores, and cell motility were determined by optical microscopy.

Temperature range and optimal growth pH were evaluated by comparing the number of cells produced after a certain time period. The experiments were conducted in liquid heterotrophic medium H (without Gelrite, previously described). The best pH range was determined as follows: In 50-mL flasks, 10 ml of liquid medium adjusted at pHs 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0 was inoculated with overnight-grown inoculum of each isolate. The flasks were incubated at 50°C in a shaking water bath at 120 rpm. Samples, 1 mL each, at regular intervals were withdrawn aseptically to measure optical density at 600 nm until it reached about 1.0. Growth at the above-mentioned five different pHs were compared by designating an arbitrary value of 100 to the highest optical density obtained. The best temperature range was evaluated by conducting experiments at 30°C, 40°C, 50°C and 60°C in shaking water bath. The experiment was conducted in 10 mL of liquid heterotrophic medium adjusted to pH 5.0 or 7.0, depending on the optimal pH range previously determined, and inoculated with an

overnight-grown culture of each isolate. The amount of growth obtained at different temperatures were compared in the same manner as mentioned for the pH range study.

**Activity of heterotrophic isolates.** Production of protease activity by the heterotrophic isolates at different pH values was optically assayed using a chromogenic substrate according to Bomio et al. (1989) with the following modifications: 0.5 mL of an overnight-grown culture in liquid heterotrophic medium of each isolate was added to 2.5 mL of 70 mM phosphate buffer at pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 or 8.0, containing 0.5% w/v azocasein (Sigma) and 1mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. After 4h incubation at 50°C, 1 mL of 10% v/v trichloroacetic acid (TCA) was added and the mixture was centrifuged for 10 min at 5000 x g to remove any precipitate. Optical density (OD) of the supernatant was read at 376 nm. For comparisons purposes, the specific protease activity of each isolate was calculated by dividing the protease activity (OD at 376 nm) by the value of OD obtained at 600 nm (indirect cell concentration measurement). Blanks for each pH were made by replacing 0.5 mL of cell culture by phosphate buffer. Proteinase K (Sigma) was used as standard activity in concentration of 5 mU/mL. To determine if the protease activity measured was exocellular or associated with the biomass, the experiment was repeated by using supernatant of the cell culture obtained after centrifugation (10 min, 10 000 x g). Protease activity in sludge during thermophilic leaching was also assayed using the same method.

The effect of protease activity on the viability of *T. thermosulfatus* was evaluated by exposing the cells to a culture of heterotrophic isolates possessing protease activity. Five mL of overnight-grown culture of a selected heterotrophic isolate (Table 4) was mixed with 10 mL of 0.1M phosphate buffer at pH 4.5 or 7.0 followed by an addition of a few drops of *T. thermosulfatus* suspension. The thiobacilli suspension used was made by suspending colonies of *T. thermosulfatus* in 2 mL of 0.8% NaCl. The mixture was incubated in a shaking water bath at 50°C. Samples were withdrawn every hour and serial dilutions were spread on solid chemolithotrophic medium to determine *T. thermosulfatus* counts as described previously.

**Sludge mineralization potential of different isolates.** Mineralization of the sludge organic content by the isolated heterotrophic organisms was assayed as follows. Sludge from Communauté Urbaine de Québec wastewater treatment plant was adjusted to pH 4.5 and 7.0 by adding concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or 10N NaOH until the pH remained stable for at least 12 h. It is essential to wait for the pH to stabilize because pH of sludge tends to change. Fifty mL of sludge samples in 500-ml flasks were sterilized (60 min, 123°C, 20 kPa) and inoculated with

0.5 mL each of overnight-grown isolate in heterotrophic liquid medium followed by incubation in a shaking water bath at 50°C under constant agitation (120 rpm). Samples were removed aseptically each day to measure pH and the latter was kept constant by the addition of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. For comparison, sterile sludge at pH 4.5 and 7.0 was inoculated with 0.5 ml of previously nonsterilized sludge incubated at 50°C for 3 days, with pH kept constant at 5.0 or 7.0. It was assumed that this procedure furnished a source of indigenous heterotrophic microorganisms (mixed microflora) adapted to those pH ranges. To ensure the efficiency of the sterilization procedure, noninoculated sterile sludges at pH 4.5 and 7.0 were used as control. At the start (0 h) and after 9 days (223 h), the VSS content was determined as recommended by APHA (1992). The six heterotrophic bacterial strains isolated were tested separately.

## Results

**Ubiquity of the microbial sulfur-oxidation activity at 50°C.** All the 11 sludges (Table 1), experienced a decrease in pH when incubated at 50°C in presence of elemental sulfur, compared with the samples without sulfur (Fig 1). Addition of growth inhibitor sodium azide to the sludges amended with S<sup>0</sup>, inhibits the pH evolution for at least the first 10 days. This means that the sulfuric acid production resulted from the oxidation of elemental sulfur by the indigenous sludge thermophilic microflora. At the beginning, pH increased for most of the samples amended with S<sup>0</sup>, while it decreased later on. This could be due to the production of ammonia which is a characteristic of the thermophilic sludge digestion process (Bomio et al., 1989). In fact, the microflora involved in thermophilic digestion shows proteolytic activity which tends to increase the pH. When the sulfuric acid production overcomes the initial buffering capacity of sludge as well as the neutralization of ammonia produced, the pH begins to drop. According to other work on sludge metal bioleaching, the time needed to acidify sludge depends on its buffering capacity and the initial sulfur-oxidizer count (Sreerishnan et al., 1993; Tyagi et al., 1993).

**Evolution of the microbial populations.** During the 1st day of thermophilic leaching process (with S<sup>0</sup>), *T. thermosulfatus* population increased by 2 log cycles (Fig. 2), followed by a decrease. The pH during the 1st day increased from 5.2 to 5.6 and decreased to 2.6 during the next 8 days. In the absence of elemental sulfur, (i.e. conventional thermophilic digestion), the pH increased from 5.2 to 8.1 in 9 days. During the same time, *T. thermosulfatus* population decreased until no colony was observed on plates after 4 days.

During the thermophilic leaching process, the thermophilic heterotrophic bacterial count increased with time (Fig.2) on agar plates at pHs 4.0 (AH population) and 7.0 (NH population). The AH and NH populations increased sharply during the first 3 days, followed by a decline until the 5th day after which both the populations stayed almost constant.

During the conventional thermophilic digestion (without S<sup>o</sup>), the NH population count increased by 5 log cycle. Surprisingly, the AH population also increased from nearly 0 to 5.5 log cycle (Fig. 2).

Total heterotrophic population measured on agar plates at pH 7 and 30°C, represents the MH microflora of sludge. This population was affected the most when the sludge was incubated in presence of sulfur (decreased by 3.7 log cycles) than for the control i.e. digestion only without sulfur (decreased by 2.8 log cycles) (Fig.2). This was due to both high temperature and low pH conditions prevailing at the end of the thermophilic leaching process. After 9 days, colonies on MH plates were composed only of sporulated bacteria.

For both thermophilic digestion (without S<sup>o</sup>) and thermophilic simultaneous leaching and digestion (with S<sup>o</sup>), pathogen indicator counts were below the detection limits after the first 12 h at 50°C (Table 2).

**Isolation and characterization of the heterotrophic microflora.** During the isolation of the heterotrophic population, two bacterial strains were isolated on solid medium pH 4 (isolates 42 and 43) and four on solid medium pH 7 (isolates 71, 72, 73 and 74). According to the optimal temperature range for growth, which was between 40°C and 60°C (Table 3), all isolates could be considered as moderate thermophilic organisms. Such thermophiles have minimum, optimum and maximum growth temperatures between 45°C and 65°C (Farrell and Campbell, 1969).

Isolate 42 was initially isolated on agar plate at pH 4, but the optimal pH range was found between 6 and 7, i.e. this strain was classified as neutrophilic even if growth at pH 4 was possible. This isolate was also observed on plate at pH 7. Isolate 43 was the most acidophilic organism isolated with optimum pH range between 4 and 5. This isolate could also grow at a pH lower than 3. In fact, growth of isolate 43 was observed after 48 h on solid heterotrophic medium at pH 2.5 (results not shown). Isolates 71, 72, 73 and 74 were classified as NH organisms since their optimal pHs for growth are between 7 and 8 (Table 3). All isolated bacterial strains were rod shaped and nonmotile (Table 3). Only the isolate 73 did not show

sporulation. The spore position in isolate 74 was not determined because spores were never observed inside the cells. Assays to identify of the heterotrophic isolates using API 20E and API 50CHB strips (Logan and Berkeley, 1984) were assayed twice but without success. All of the isolates positively confirmed 0 to 2 out of 61 possible reactions, which was not enough to conclude or at least correspond to the description of any known *Bacillus*.

**Production of protease activity by the heterotrophic isolates.** Isolates 42 and 73 showed a significant protease activity at 50°C (Fig.3). The highest activity of the isolate 73 was observed at pH 7-8 which decreased with pH in the range studied (8 to 4). The protease activity of the isolate 42 decreased with increasing pH and was maximum at pH 4.0 (in the range of pH studied). At pH 4.0 the protease activity of isolate 73 (pH 8.0 optimum for growth) was almost equal to the isolate 42 (pH 6.0 optimum for growth) (Fig. 3). According to the activity calibration at pH 7.0, protease activity from isolates 73 (at pH 7.0) and 42 (at pH 4.0) were estimated to be 6 and 2 mU/mL of culture, respectively, using 5mU/mL of protease K.

Protease activity measurement in the culture supernatant after centrifugation showed that 84% of the initial activity for isolate 42 and only 10% for isolate 73 remained. Protease activity was also assayed in sludge during thermophilic leaching at 50°C. A very low activity was found (OD at 376 nm < 0.04) at pHs 4.0 and 7.0. After centrifugation, the remaining activity in supernatant was almost nil.

**Effect of protease activity on the viability of *T. thermosulfatus*.** As it was previously observed, *T. thermosulfatus* cells progressively died during the thermophilic leaching as well as conventional thermophilic digestion (Fig.2). Since it was shown that gram-negative *Eshcerichia coli* (grown at 45°C) could be lysed by protease from *Bacillus* sp. (Dean and Ward, 1991), it was suspected that proteolysis could be one reason for the death of *T. thermosulfatus*. Cultures of isolates 42 and 73 possessing proteolytic activity were tested on the thiobacilli (Table 4). Since the reductions of *T. thermosulfatus* cells count in control at pH 4.5 and 7 (92% and 36%) were higher than those obtained with cultures of isolate 42 and 73 (48% and 10%), it was concluded that the proteolytic activity was not lytic for the thiobacilli. However, the reduction of population observed in presence of isolate 42 culture (48%) was higher than any other cultures tested (43, 73 and 74). This may be due to the presence of some lytic activity. This isolate may produce some organic acids having negative effect on the viability of *T. thermosulfatus*. Since *T. thermosulfatus* is a facultative heterotrophic bacteria (Shooner et al., 1995), the presence of organic matter in small

quantities (in assays containing supernatant of cultures 42, 43, 73, and 74) might give some relative protection against the viability loss. The fact that the controls did not contain organics could be a possible reason for substantial viability loss in these samples.

#### **Mineralization of the sludge organic contents by the heterotrophic microflora.**

All acidophilic and neutrophilic heterotrophic isolates degraded VSS after 9 days of incubation at 50°C (Table 5). Mineralization by the mixed microflora (MB) at pH 4.5 and 7.0, which represented the indigenous microbial consortium, was in the same order as that was obtained with the corresponding isolates, except for isolate 71. Final microbial count reached about  $10^8$  CFU/mL for each isolate and mixed microflora tested at pH 7.0, except isolate 71 where the final microbial count was around  $10^5$  CFU/mL. For the sludge tested at pH 4.5, all the isolates and mixed microflora reached about  $10^6$  CFU/mL.

### **Discussion**

The increase in AH microflora during the thermophilic leaching process was due to the acidic conditions created. Since no such condition existed during conventional thermophilic digestion (control), it was surprising that AH population increased (Fig. 2). In fact, this population observed at pH 4.0 was arbitrarily called "acidophilic" and composed of two bacterial strains and one of these (isolate no. 42) could grow under neutrophilic conditions (Table 3).

According to our results, *Bacillus* was the major heterotrophic genus which prevailed during thermophilic leaching. In fact, the majority of the isolates were sporulated rods; the main characteristic of this genus (Sneath, 1986). As isolate 73 was nonsporulated, it could be related to *Sphaerobacter* or *Thermus* genus. These are the only non sporulated heterotrophic genus isolated from thermophilic treatment of sludge until today (Table 6). According to the optimum temperature (50-60°C), optimum pH range (pH 8), and cellular dimension (2 - 4.4  $\mu\text{m}$ ), isolate 73 could be related to *Thermus ruber*. Moreover, isolate 73 produced colored pigment (brown) which was also reported for three strains of *T. ruber* isolated from digesting sludge under thermophilic conditions (Hensel et al., 1989). A red pigmented colony was also observed on heterotrophic agar, but we were not able to transfer it on the synthetic medium for purification.

Among the sporeformers isolated, strain 43 could be associated to *Bacillus acidocaldarius*, based on its pH and temperature range for growth (Table 6). One particular characteristic of

*B. acidocaldarius* is a low pH limit for growth at around 2 - 3 (Sneath, 1984), and isolate 43 could grow at this pH. The strains related to *B. acidocaldarius* were never reported in conventional thermophilic sludge digestion until today. This could be due to the fact that acidic condition which prevailed during thermophilic leaching was never encountered in conventional thermophilic digestion. Consequently various research reports presented in the literature did not try to isolate these organisms on acid agar plates. However, further evidence is necessary to conclude decisively that strain 43 is *B. acidocaldarius*.

The remaining sporeformers (isolates 42, 71, 72 and 74) could be associated to *B. stearothermophilus*. But, it seems that this species is a general appellation used to identify any thermophilic strains of *Bacillus* genus. In fact, this species has been characterized by a wide range of growth temperature and %G+C content (Table 6), which demonstrates the heterogeneity of this species. The characterization of microflora involved during thermophilic digestion of sludges revealed that almost 95% of the isolates were phenotypically identified as strains of *B. stearothermophilus* (Sonnleitner and Fiechter, 1983b). Few years later, Hensel et al. (1989), showed that *B. stearothermophilus* played a subordinated role in thermophilic sludge digestion. Less than 0.3% of physiologically active bacterial strains were associated with this species according to their DNA homology with standard strains.

Even if the heterotrophic isolates were not formally identified, the characterization summary suggested that the microflora isolated from thermophilic bioleaching and sludge digestion process was similar to that from thermophilic sludge digestion as described by Hensel et al. (1989) and Sonnleitner and Fiechter (1983 a,b). The most predominant genus was *Bacillus* species.

Exocellular enzymes were probably responsible for both protease activities encountered with isolates 42 and 73. However, the activity of isolate 73 was more associated with the biomass than that of 42, since the removal of cells from the suspension resulted in 90% activity loss. Low protease activity was also observed in sludge during thermophilic leaching and digestion process. After centrifugation, the remaining activity in the sludge supernatant was almost nil. This indicated that the activity was associated with sludge solids fraction as suggested by Bomio et al. (1989). In conventional thermophilic digestion, optimal protease activity was obtained at pH around 9 and at 80°C (Bomio et al., 1989; Häner et al., 1994). Protease activity over 50°C was not assayed since the optimal temperature for the thermophilic sludge leaching was between 50°C and 52°C. This range represents the optimal growth temperature for *T.*

*thermosulfatus* (Shoener et al., 1995). The possibility of lytic activity from lysozyme was not tested because it was shown that lysozyme activity was not measurable during thermophilic sludge digestion (Bomio et al. 1989). Even if these researchers isolated a bacterial strain capable of producing lysozyme from thermophilic digested sludge, the presence of this activity under these digestion conditions was never significant and remains to be demonstrated.

The results on organic matter mineralization by different isolates (tested individually and compared with the results obtained using the mixed microflora) suggested that the amount of biomass was probably the predominant factor for sludge mineralization than the presence of the diversity of microorganisms. In fact, the VSS reduction by the individual isolates and their final microbial counts were in the same order as that obtained with mixed microflora (indigenous microbial consortium). Moreover, the mixed microflora count was carried out on the same medium which was used for six different heterotrophic isolates. Therefore, the observed mixed microflora included, at least, the six heterotrophic isolates that represent the most abundant culturable strains of the thermophilic species contained in the sludge.

The diversity of the indigenous heterotrophic microflora in thermophilically treated sludge is probably not represented by the six isolates. In fact, the heterotrophic isolates were isolated on medium with high assimilable organic contents. Therefore, it is possible that specific selection of microorganisms that were able to grow with high carbon source concentrations are isolated. Thus microorganisms isolated probably represent only a fraction of the total microflora involved during thermophilic treatment of municipal sludges. Hansel et al. (1989) were able to isolate approximately 50% to 60% of the total physiologically active population during thermophilic sludge digestion. The remaining portion was probably composed of bacteria incapable of growing on solid agar plates for many reasons: unavailability of growth factors, anaerobiosis, or just not enough concentrated to be isolated during serial dilution (abundant species cover the lower dilution plates rapidly).

Thermophilic microbial oxidation of elemental sulfur in sewage sludge is brought about by the sludge indigenous sulfur oxidizing microorganism. The samples used covered sludge diversity in terms of total solids content (3.8 to 33.24 g/L), pH (5.23 to 8.04), type (primary, secondary, aerobically, and anaerobically digested) and origin (different provinces/states of Canada and USA). Since the presence of *T. thermosulfatus* was detected by plate count (up to  $10^3$  CFU/mL) in all sludges tested, we assumed that it belonged to the general thermophilic microflora of municipal sludges. Other thiobacilli which are found in sludge includes, *T.*

*thiooxidans* and *T. thioparus* (Blais et al, 1992a). In sewer pipe or concrete tanks for potable water *T. neapolitanus*, *T. intermedius* and *T. novelus* have been noticed (Milde et al., 1983; Coleman and Gaudet, 1993). Table 7 and 8 give a typical example of metal solubilisation caused by the production of sulfuric acid from *T. thermosulfatus* during the thermophilic sludge leaching. A considerable amount of sulfate was produced, resulting in a substantial pH decrease. The latter was not observed during the thermophilic digestion (without S°).

One objective of thermophilic sludge treatment is the elimination of pathogenic organisms. As it was shown, the bacterial and viral indicators counts were below the detection limit for thermophilic leaching and conventional thermophilic digestion tested in this study. During thermophilic treatment of municipal sludges, the elimination of indicator organisms (representing pathogenic organisms) results from high temperatures (Mason et al., 1992, Kabrick et al., 1979; Ward et al, 1976). The prevailing acidic condition during mesophilic sludge leaching has also been recognized to destroy the indicator fecal microorganisms and coliphages (Shooner et al, 1992, Blais et al, 1992b). Elevated temperatures (50°C), however, destroys the indicator microorganisms more rapidly, despite of the fact that the pH did not begin to change as it was noticed during our experiments. Effect of thermophilic leaching on human parasites like *Ascaris*, *Cryptosporium* or *Giardia*, was not assayed. However, earlier reports showed a reduction in *Ascaris* eggs during thermophilic sludge treatment at 45°C and 53°C (Kabrick and Jewell, 1982; Lee et al., 1989). Combination of thermophilic and acidic conditions may increase the inactivation of parasites.

## Acknowledgements

The authors thank the Natural Sciences and Engineering research Council of Canada (grants A9484 and STR 149770) for supporting this research. Thanks are also due to V. Sachdeva and T.R.Sreekrishnan for reading the manuscript.

## References

Les articles et autres documents consultés lors de cette étude sont regroupés dans la section "Ouvrages consultés".

Table 1. Characteristic of sludges used for evaluation of acidogenic potential in presence of S<sup>o</sup>, at 50°C.

sludge origin	sludge type <sup>a</sup>		characteristics <sup>b</sup>				initial pH	<i>T. thermosulfatus</i>	sulfate <sup>c</sup>
			TS (g/L)	TSS (g/L)	VS (g/L)	VSS (g/L)		initial count (CFU/ml)	
<i>Canada</i>									
Beauceville (Québec)	1 <sup>e</sup>	sec	33.24	25.42	18.12	14.29	6.6	2.5 x 10 <sup>2</sup>	6.06 (0.29) <sup>d</sup>
Black Lake (Québec)	2	sec	24.72	18.38	15.88	11.86	5.6	3.7 x 10 <sup>3</sup>	6.83 (0.98)
CUQ <sup>b</sup> (Québec)	3	prim+sec	19.06	18.56	11.84	11.70	6.4	1.1 x 10 <sup>3</sup>	5.96 (0.21)
St-George (Québec)	4	sec	4.40	3.15	2.86	2.22	6.5	7.5 x 10 <sup>2</sup>	4.45 (0.24)
Toronto (Ontario)	5	prim	25.0	-	-	-	7.4	7.2 x 10 <sup>2</sup>	-
Toronto (Ontario)	6	sec ana d	27.5	-	-	-	6.7	5.7 x 10 <sup>1</sup>	-
Valcartier (Québec)	7	sec	21.26	15.73	18.64	13.98	5.2	4.4 x 10 <sup>3</sup>	5.04 (0.25)
<i>U.S.A.</i>									
Cecil County (Maryland)	8	sec	3.80	-	-	-	7.2	4.2 x 10 <sup>2</sup>	-
Cecil County (Maryland)	9	aer d	9.23	-	-	-	7.0	6.3 x 10 <sup>1</sup>	-
Wilmington (Delaware)	10	sec	18.56	-	-	-	7.4	5.2 x 10 <sup>1</sup>	-
Wilmington (Delaware)	11	sec ana d	27.37	-	-	-	8.0	1.9 x 10 <sup>2</sup>	-

<sup>a</sup> aer d.- aerobically digested; prim.- primary sludge; sec.- secondary sludge; sec ana d- secondary sludge anaerobically digested.

<sup>b</sup> Communauté Urbaine de Québec.

<sup>c</sup> final sulfate concentration in the sludge with S<sup>o</sup> (see Fig. 1)

<sup>d</sup> final sulfate concentration in the sludge without S<sup>o</sup> (see Fig. 1)

<sup>e</sup> reference numbers used to identify slopes on Figure 1.

Table 2. Destruction of indicator organisms during thermophilic microbial leaching at 50°C

time	0 h		12 h	
	CFU /mL		CFU /mL	
	with S°	without S°	with S°	without S°
coliphages	3.87x10 <sup>2</sup>	1.99x10 <sup>2</sup>	- <sup>a</sup>	-
fecal coliforms	2.81x10 <sup>4</sup>	3.63x10 <sup>4</sup>	-	-
fecal streptococci	1.04x10 <sup>5</sup>	1.58x10 <sup>5</sup>	-	-
total coliforms	7.10x10 <sup>3</sup>	7.94x10 <sup>3</sup>	-	-

<sup>a</sup> under detection limits

Table 3. Partial characterisation of the heterotrophic isolates.

isolate	morphology	spore <sup>a</sup>	optimal pH (at 50°C)							optimal temperature (after 6h incubation)					protease activity
			3	4	5	6	7	8	growth time (h)	30°C	40°C	50°C	60°C	assayed at pH	
			(growth,%)							(growth,%)					
42	rod 4-6x1 µm chain > 3 cells	e,sub,ss	-	<i>b</i>	79	100	97	-	4	-	100	67	-	5	yes
43	curved rod 2.3-5x1µm chain > 3 cells	e,t	53	93	100	6	-	-	24	-	-	81	100	5	
71	rod 3-4x0.8µm chain > 2 cells	e,t	-	-	-	84	100	5	10	8	52	100	96	7	
72	rod 3-4.5x0.9µm chain > 3 cells	e,c/t	-	-	5	65	74	100	6	15	100	87	-	7	
73	rod 2-4.4x0.8µm chain < 3 cells	no	-	-	-	-	28	100	20	13	80	100	99	7	yes
74	rod 3.5-5x0.9µm chain < 3 cells	e	-	-	5	91	100	85	4	16	42	100	-	7	

note: no motility observed for any isolates

<sup>a</sup> c-central; e-ellipsoidal; ss-sporangia swollen; s-subterminal; t-terminal.

<sup>b</sup> growth was observed on solid medium after 24 h incubation.

Table 4. Effect of protease activity of some isolated heterotrophic microorganisms on the viability of *T. thermosulfatus* cells.

culture from isolate	tested at pH	proteolytic activity <sup>a</sup>	<i>T.thermosulfatus</i> viable count		reduction %
			CFU/ml ( $\times 10^6$ )		
			initial	final <sup>b</sup>	
42	4.5	yes	7.2 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 0.6	48
43	4.5	no	5.2 $\pm$ 1.1	4.7 $\pm$ 0.9	10
73	7.0	yes	7.4 $\pm$ 1.4	7.3 $\pm$ 0.9	2
74	7.0	no	7.6 $\pm$ 0.6	6.9 $\pm$ 0.7	9
control <sup>c</sup>	4.5	no	8.4 $\pm$ 1.9	0.6 $\pm$ 0.2	92
control	7.0	no	4.2 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.4	36

<sup>a</sup> see figure 3 for confirmation of the presence of protease activity

<sup>b</sup> after 5h of incubation

<sup>c</sup> *T. thermosulfatus* suspension in phosphate buffer without protease activity

Table 5. Mineralization of sludge organic contents at pH 4.5 and 7 by the isolated heterotrophic organisms, at 50°C.

time		0h	223 h	removal		cell count	
isolat		VSS (g/L)	VSS (g/L)	VSS (g/L)	(%)	initial	final
pH 4.5	42	12.79 ±0.33	11.78 ±0.14	1.010 ±0.47	7.9	2.3 x10 <sup>3</sup>	1.5 x10 <sup>6</sup>
	43	12.80 ±0.30	12.26 ±0.23	0.538 ±0.53	4.5	7.6 x10 <sup>2</sup>	3.3 x10 <sup>6</sup>
	MB	12.63 ±0.26	11.83 ±0.27	0.805 ±0.54	6.4	7.3 x10 <sup>4</sup>	2.3 x10 <sup>6</sup>
	control <sup>b</sup>	12.67 ±0.26	12.83 ±0.40	-0.152 ±0.65	-1.2	<sup>a</sup>	3
pH 7.0	71	12.45 ±0.19	11.20 ±0.21	1.244 ±0.40	9.9	1.6 x10 <sup>4</sup>	2.3 x10 <sup>5</sup>
	72	10.06 ±0.35	7.63 ±0.14	2.43 ±0.49	24.2	8.5 x10 <sup>3</sup>	8.9 x10 <sup>7</sup>
	73	11.60 ±0.19	7.20 ±0.49	4.40 ±0.68	37.9	3.3 x10 <sup>2</sup>	4.7 x10 <sup>8</sup>
	74	11.01 ±0.22	7.80 ±0.20	3.21 ±0.42	29.1	7.9 x10 <sup>3</sup>	5.0 x10 <sup>8</sup>
	MB	11.77 ±0.10	7.99 ±0.21	3.79 ±0.31	32.2	1.0 x10 <sup>5</sup>	7.2 x10 <sup>8</sup>
	control	11.19 ±0.38	11.20 ±0.21	-0.01 ±0.58	0.8	-	<100

MB- Mixed microbiota; inoculated with aliquot of sludge previously incubated at pH 5 or 7.

<sup>a</sup> no growth observed

<sup>b</sup> no inoculation

Table 6. Bacterial strains isolated from sewage sludge digested under aerobic thermophilic conditions.

strain	morphology	motility	spore <sup>a</sup>	temperature (min-op-max)	pH (min-op-max)	G+C %	reference
<i>Bacillus thermocloaceae</i> DSM 5250	rod 0.5-0.8x3-8µm	no	e, sub/t, ss	37-(55-60)-70	optimal 8-9 no growth at 7	42- 44	Demharter and Hensel, 1989 Hensel et al., 1989
<i>Bacillus pallidus</i> DSM 3670	rod 0.8-0.9x2-5µm	yes	e/c, c/t, ss	30-(60-65)-70	optimal 8-8.5	39-41	Scholz et al, 1987 Hensel et al, 1989
<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745	coccoid rod 1-1.5x1.5-3µm	no	no	optimal 55	optimal 8.5	66	Demharter et al, 1989 Hensel et al, 1989
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 14577	rod 0.6-1x2.5-5.8µm	?	s, t, ss	10 to 30° possible at 40	growth at 6.7	34-40	Sneath, 1986 Hensel et al, 1989
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	rod 0.6-1x2-3.5 µm	?	e, t, ss	40 to 65	growth at 6.8 no at 5 or 5.7	43-52	Sneath, 1986 Hensel et al, 1989 Sonnleitner and Fiechter, 1983a,b
<i>Thermus ruber</i> AUCM <sup>b</sup> 1258	rod 0.5-0.8x3-6µm	no	no	35-60-70	growth at 8.	66	Hensel et al, 1989 Loginova et al, 1984
<i>Bacillus acidocaldarius</i> <sup>c</sup> ATCC 27009	rod 0.9-1.1x2-3µm	?	e,t,ss	50 to 65	2 to 5.6 no at 6.8	60-62	Sneath, 1986

<sup>a</sup> c: central; e: ellipsoidal; ss: sporangia swollen; s: subterminal; t: terminal.

<sup>b</sup> AUCM: All-Union Collection of Microorganisms, Moscow.

<sup>c</sup> never mentioned as indigenous bacteria of wastewater sludge.

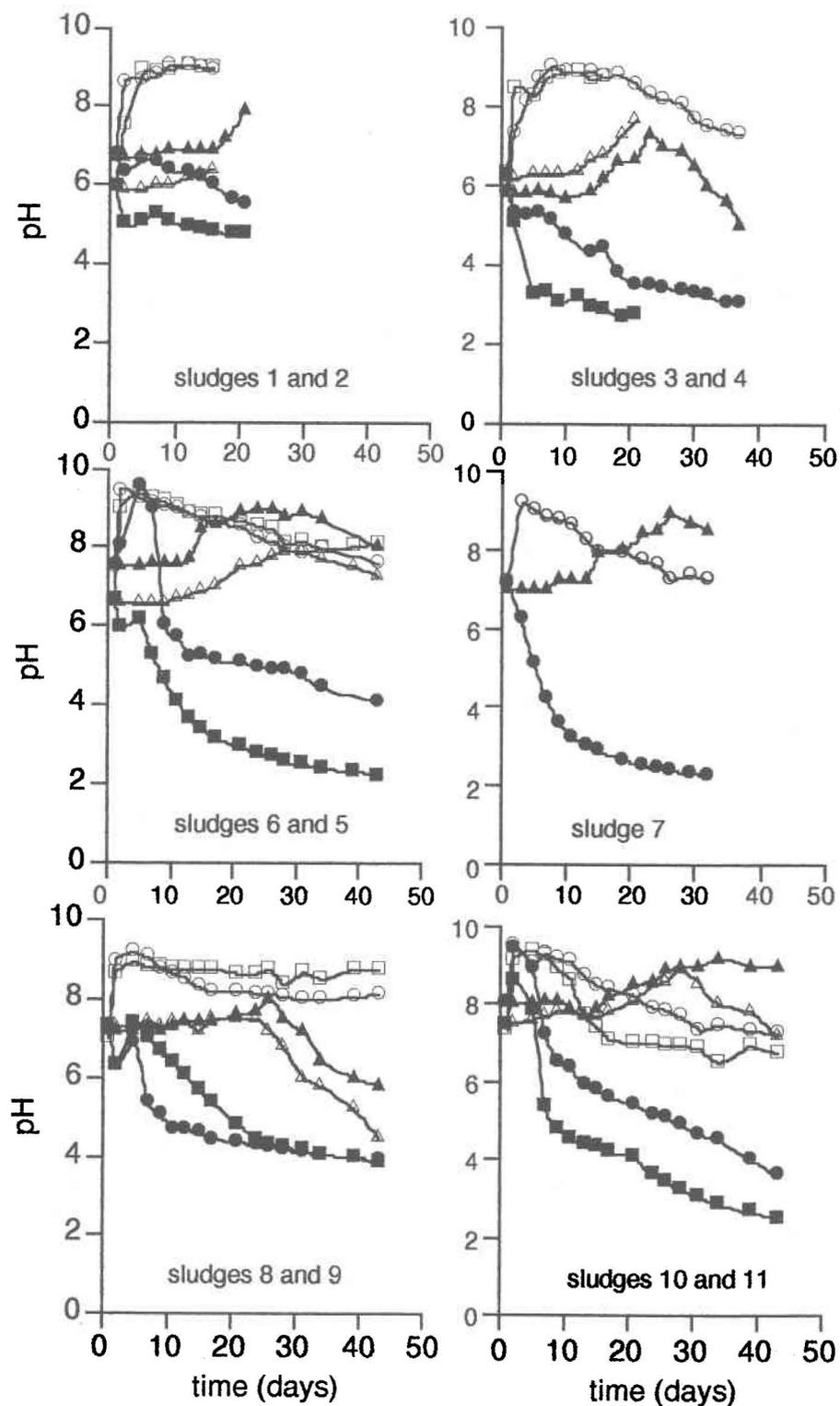
Table 7. Example of microbial leaching of municipal sludge at 50°C

	metal concentration	solubilisation (% of initial)	
	(mg/kg) <sup>a</sup>	with S <sup>o</sup>	without S <sup>o</sup>
Cd	5	14.1	0
Cr	66	52.0	0
Cu	189	93.7	8.1
Mn	207	77.2	0.5
Ni	23	63.7	0
Pb	78	74.5	3.9
Zn	303	80.4	1.7

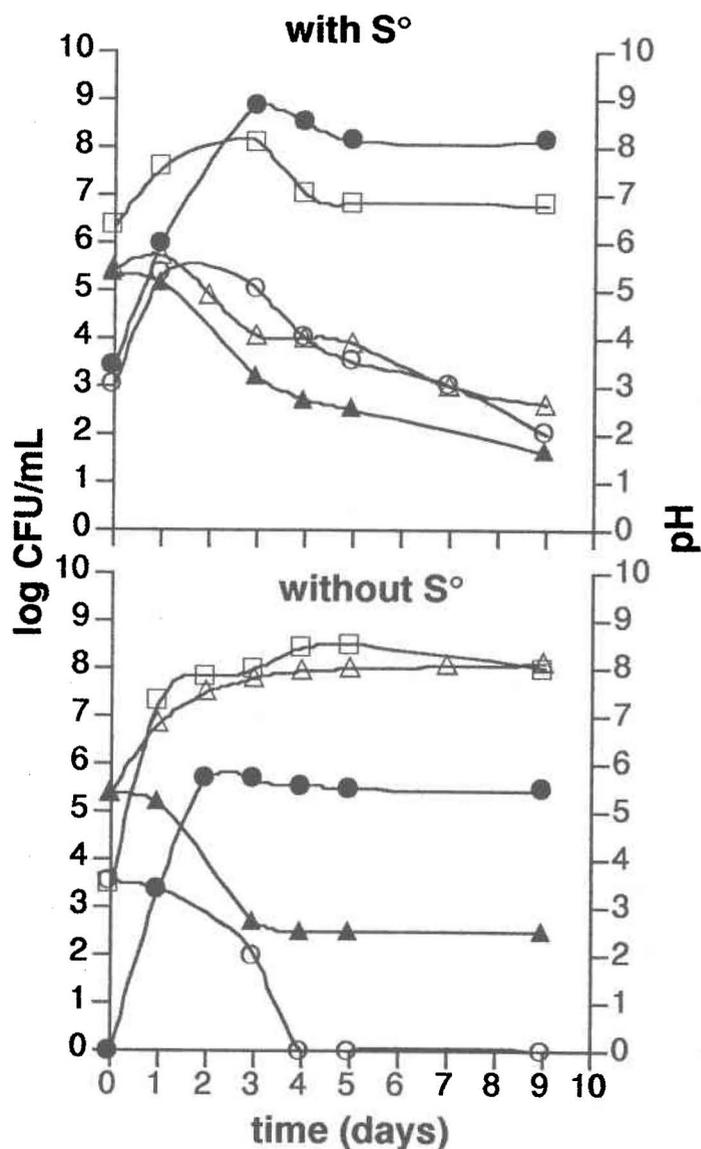
<sup>a</sup> of dry matter

Table 8. Change of values of pH, ORP, and sulfate during microbial leaching of municipal sludge at 50°C.

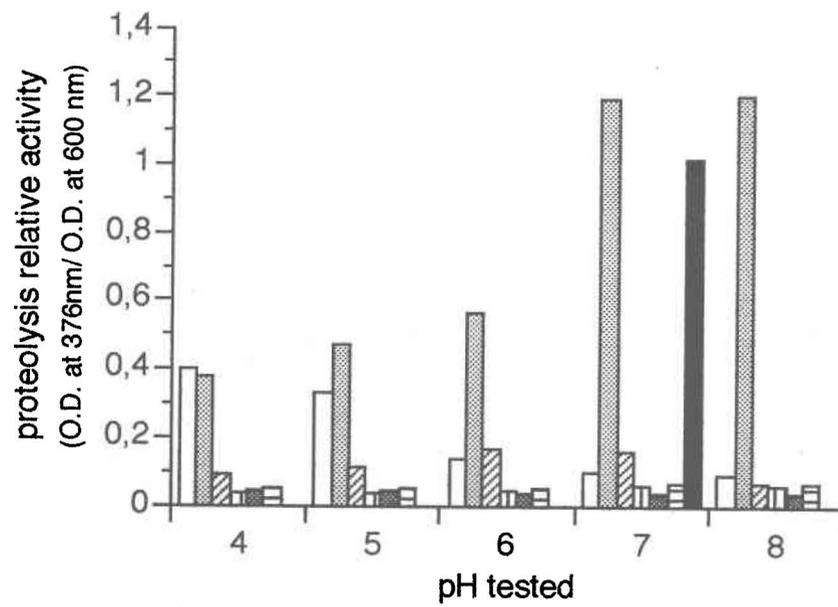
	without S <sup>o</sup>		with S <sup>o</sup>	
	<i>initial</i>	<i>final</i>	<i>initial</i>	<i>final</i>
pH	6.6	7.7	6.4	1.6
POR	85	155	95	468
sulfate (g/L)	0.41	0.42	0.42	7.08



**Figure 1:** Ubiquity of the microbial sulfur-oxidation activity at 50°C in sludges from 11 municipal wastewater treatment plants. Sludges 1, 3, 5, 7, 9 and 11: ●) with  $S^{\circ}$ ; ▲) with  $S^{\circ}$  and sodium azide; ○) without  $S^{\circ}$ . Sludges 2, 4, 6, 8 and 10: ■) with  $S^{\circ}$ ; △) with  $S^{\circ}$  and sodium azide; □) without  $S^{\circ}$ . See Table 1 for sludge number reference and final sulfate concentration.



**Figure 2:** Evolution of the microbial populations involved in thermophilic microbial leaching of municipal sludge. O) *Thiobacillus thermosulfatus* population; ●) acidophilic heterotrophic population-AH (on agar pH 4); □) neutrophilic heterotrophic population-NH (on agar pH 7); ▲) mesophilic heterotrophic population-MH; △) pH.



**Figure 3** : Proteolytic activity of heterotrophic isolates . □ , 42; ■ , 43; ▨ , 71;  
 ▩ 72; ▤ , 73; ▧ , 74; ■ , protease K (5 mU/mL).

## Annexe 1

### **Calcul de la concentration en $\text{SO}_4^{2-}$ suite à la mesure du S total par ICP.**

Pour obtenir la concentration en  $\text{SO}_4^{2-}$  il suffit de d'effectuer l'opération suivante:

$$x \cdot 96.062 / 32.066 \quad \text{où } x \text{ est la conc. totale en S}$$

Ceci suppose que la totalité du soufre dans le surnageant est sous forme de sulfate provenant de l'oxydation microbienne du  $\text{S}^0$  solide. Il y a certes d'autres composés sulfurés (protéines par exemple) mais leur concentration est faible puisque qu'il y a une très bonne corrélation entre les concentrations déterminées à l'aide de l'ICP et celles déterminées par turbidité (précipitation acide avec le chlorure de barium) qui est spécifique au sulfate.

## Annexe 2

### Démonstration mathématique que la bioproduction de $\text{SO}_4^{2-}$ influence négativement l'apparence de la diminution de solides volatiles.

La production d'acide sulfurique augmente la proportion de matière inorganique non volatile à 550°C. Donc, les pertes en matière volatile totale (minéralisation) sont camouflées, ou compensées, par une production de sulfate. Voici un calcul qui démontre ce fait. (calcul réel pour le réacteur #1)

	A	B	C	D	E
jour	SV restants, g/L	$\text{SO}_4^{2-}$ produit, g/L	A-B, g/L	$- [(Cx100)/11.84] + 100, \%$	%
0	11.84	0 - 0=0	0	0	0
3	11.84	0.556 - 0.240=0.316	11.52	2.70	5.0
6	10.54	0.915 - 0.250=0.665	9.87	16.64	16.72
9	9.32	1.374 - 0.288=1.086	8.23	30.49	29.67
12	9.06	1.905 - 0.312=1.593	7.47	34.63	35.04
15	8.56	2.277 - 0.399=1.878	6.68	43.58	41.58

A: SV restants dans le bioréacteur #1

B: quantité de sulfate produit dans le réacteur #1 moins celle produite dans le réacteur témoin

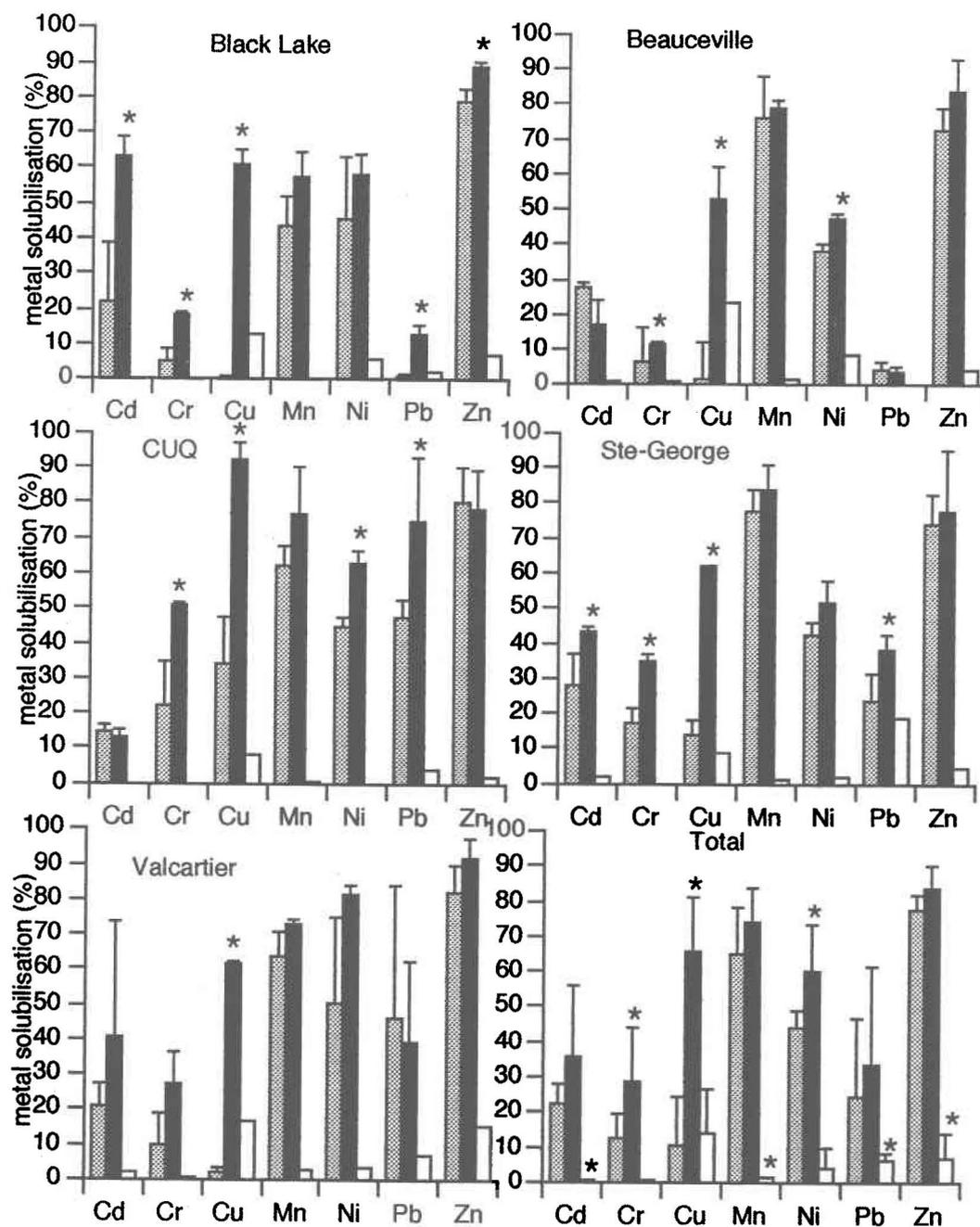
C: quantité de sulfate soustraite de la quantité de SV restants

D: calcul et transformation mathématique pour déduire le % de réduction des SV

E: % de réduction des SV dans le réacteur témoin

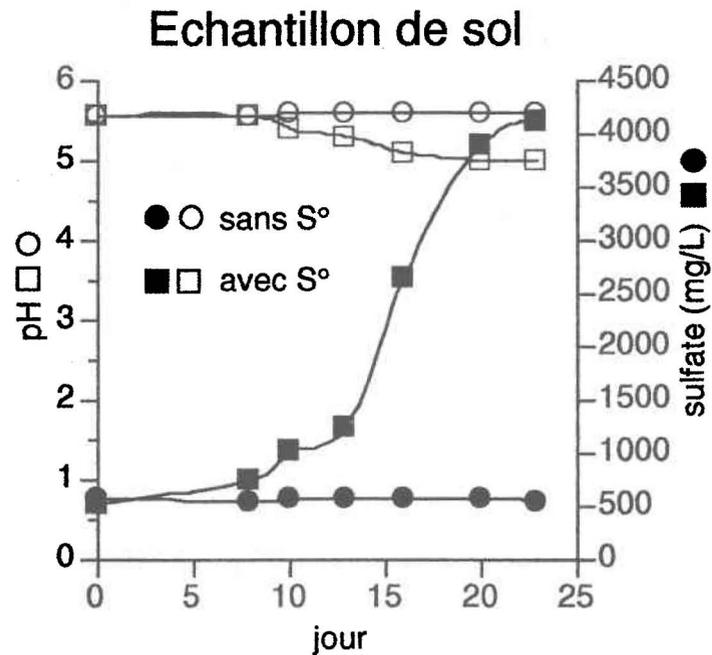
Une fois que la quantité de sulfate produit (colone B) est soustraite des VS mesués (colone C), le pourcentage calculé de réduction des VS dans le réacteur 1 (colone D) est dans le même ordre de grandeur que la réduction des VS dans le réacteur témoin (colone E).

## Annexe 3



**Figure 1.** Metal solubilisation obtained after thermophilic microbial leaching. The values are the mean with standard deviation: ▨, solubilisation after 28 days at 53°C; ■, solubilisation after addition of ferric chloride; □, solubilisation obtained during conventional thermophilic digestion. \* indicates significant differences ( $P < 0.05$ )

## Annexe 4



## Echantillon de boue de pâte et papier

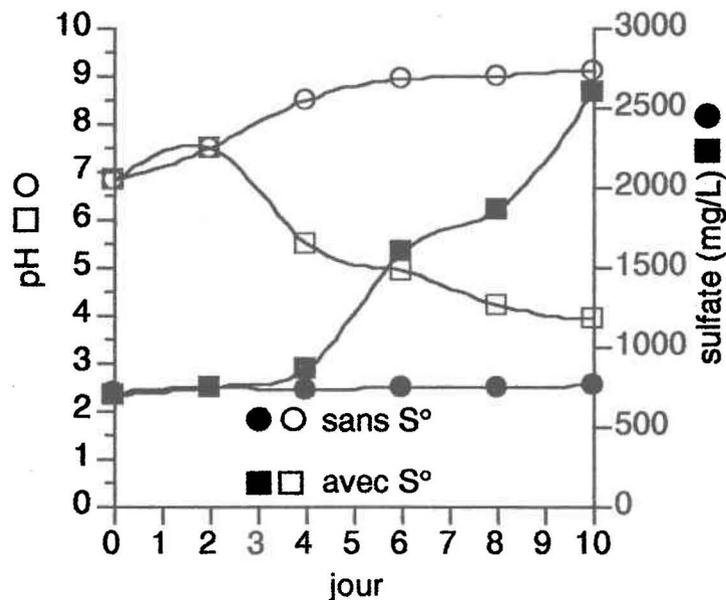


Figure 1. Essais d'oxydation microbienne du soufre élémentaire en conditions thermophiles avec un échantillon de sol et un échantillon de boue d'usine de pâtes et papier. Une source stérile d'azote et de phosphore furent rajoutés aux deux échantillons. Pour l'essai avec le sol, un volume de saline stérile fut ajouté pour liquéfier l'échantillon. Le soufre utilisé fut stérilisé par tyndallisation. Les échantillons furent placés sous agitation à 50°C.

## Appendice

### Research Note Coliphage inactivation during bacterial leaching of aerobic sewage sludge

#### Abstract

Acidic conditions (pH<5.0) during metal leaching of sewage sludge using sulphur-oxidizing bacteria, reduce the coliphage count which can be used as an indicator of virus levels during wastewater treatment. After ten days of leaching, the inactivation constant was found to be 0.85 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> as compared to 0.43 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for control sludge.

#### Introduction

The metal content of sewage sludge can be reduced to recommended levels for agricultural use by bacterial leaching processes using either *Thiobacillus ferrooxidans* with ferrous sulfate as a substrate (Wong and Henry, 1983; Tyagi et al. 1989, 1992) or indigenous sulphur-oxidizing sludge bacteria *Thiobacillus thioautotrophicus* and *Thiobacillus thiooxidans* with elemental sulphur as a substrate (Balis et al. 1991, 1992; Jain and Tyagi, 1992). It has been shown that leaching using sulphur-oxidizing bacteria reduced total coliforms, faecal coliforms and faecal streptococci by at least 3 log cycle (Blais et al. 1992a).

No information is available on the effect of metal leaching using sulphur-oxidizing bacteria on the virus population of sludge. Since hundreds of serotypes of viruses can be found in domestic wastewater (Gerba et al. 1975), the IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology (IAWPRC, 1991) has proposed the use of bacterial phages as indicators of viral inactivation during wastewater treatment processes.

#### Methodology

##### *Bacterial leaching*

The sludge used was a mixture of primary and secondary aerobic sludges in unknown proportions and having a total solid concentration of 2.75% (W/V). The sludge was obtained from the wastewater treatment plant of the Communauté Urbaine de Québec (Québec, Canada). Bacterial leaching was carried out in 74 cm high column with a 16 cm diameter (14.9 litres). 6 litres of sludge and 1.5 litres of leaching bacteria inoculum were added to the column containing 3.4 kg of sulphur spheres (2.5 cm diam). The leaching bacteria inoculum was obtained from the one used by Blais et al (1992b). Aeration was provided by an air sparger with a flow rate of 10 litres per minute. The column was equipped with a recirculation pump. An uninoculated control column was run under the same conditions but without sulphur spheres. Each column was supplemented with a 0.5 litre volume of a coliphage culture to increase the final coliphage concentration to 10<sup>12</sup> plaque forming units(PFU)/ml of sludge.

##### *Isolation and culture of coliphages*

The coliphages used were isolated on EC medium agar (Difco, Detroit, Michigan) at 30°C from a sample of the sludge in which *Escherichia coli* C (ATCC 13706) was used as the host cell. Lysis plaques approximately 1.5 mm in diameter of unidentified phages were replicated in liquid medium A (10g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 1g dextrose per litre, pH 7.3) containing 5% of a 16 h-old culture of *E. coli* C in the same medium at 30°C. After a 48 h incubation period, the phage culture was centrifuged for 10 minutes at 4000 x g.

The supernatant was kept at 4°C and served as the coliphage stock solution. The culture of coliphage used to inoculate the columns was prepared by mixing a 50 ml solution of phage stock and 50 ml of a 4 h-old culture of *E. coli* C in 1 litre of liquid medium A. After a 48 h incubation period at 30°C, the medium was divided into two equal volumes. One half was added to the test column and the other half to the control column.

#### *Extraction of coliphage from sludge*

2 mL of sterile 30% (w/v) beef extract (Difco, Detroit, Michigan) stock solution was added to two duplicate volumes (20 ml) of sludge. The pH was adjusted to 6.0 with 5N HCl or 5N NaOH. The mixture was sonicated for 15 seconds and then centrifuged for 15 minutes at 4000 X g. For each ml of supernatant, 0.35 g of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was gradually added and dissolved. After 30 minutes, the mixture was centrifuged for 15 minutes at 4000 x g. The precipitate was dissolved in 2 ml of 0.85% NaCl solution. Precipitation with ammonium sulphate eliminates unknown substances which can occasionally inhibit the growth of host cells.

#### *Coliphage count*

The samples of precipitated virus were diluted using 0.85% NaCl solution. Each dilution was made in duplicate. A volume of 0.9 ml of each dilution was added to 2.5 ml of a 4 h old culture of *E. coli* C in liquid medium A and 4 ml of sterile soft EC agar medium at 45°C (37 g litre<sup>-1</sup> supplemented with 0.8% agar). The mixture was poured into Petri plates and incubated overnight at 30°C. All plaques were counted when the number was between 26 and 301 plaques per plate. The results were expressed in log PFU/ml of sludge. The inactivation constant was  $k = -\log(C_t/C_o) t^{-1}$ , where  $C_t$  and  $C_o$  are the virus concentration at times  $t$  and zero respectively and  $t$  is the time in days.

### **Results and Discussions**

The pH variations and coliphage inactivation during microbial leaching are presented respectively in Figure 1. During the first 3 days of leaching, the coliphage inactivation constant was 0.48 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and was similar to that of the control (0.45 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). Between days 3 and 5, the constant was 0.19 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and 0.04 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for test and control columns. From day 5 to day 10, the inactivation constant of the test column leaching was increased to 1.34 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, but that of the control stayed low (0.58 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). During the same period the pH dropped under 5.0 (Fig.1) suggesting that acidic conditions (pH <5) during microbial leaching favours coliphage inactivation. After 10 days of bacterial leaching, all detectable coliphages were inactivated (no plaque lysis on any dilution plate). The global inactivation constant after 10 days was 0.85 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and 0.43 log PFU ml<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for the test and control columns respectively.

The increase in H<sup>+</sup> ion concentration during microbial leaching was probably the principal reason for this inactivation, since pHs lower than 5 inactivate most bacteriophages (Ackerman and Dubon, 1987) as well as type 1 poliovirus (Salo and Cliver, 1976). The presence of solubilized metals during leaching could also have contributed to the anti-viral effect, as suggested by the inactivation of some coliphages by copper, mercury and silver (Babich and Stotzky, 1979).

The inactivation observed in the control column could be caused by ammonia since under alkaline conditions, pH >9, charged ammonium ions become neutral ammonia which anti-viral effect is recognized (Cramer et al. 1983; Ward and Ashley, 1977). Viral inactivation in sludge can also be caused by the presence of detergents (Ward and Ashley, 1978, 1980)

certain unidentified microorganisms (Ward, 1982) or their proteolytic enzymes (Knowlton and Ward, 1987), or other substances that may be present in domestic wastewater such as organic solvents, chlorine from potable water, etc.

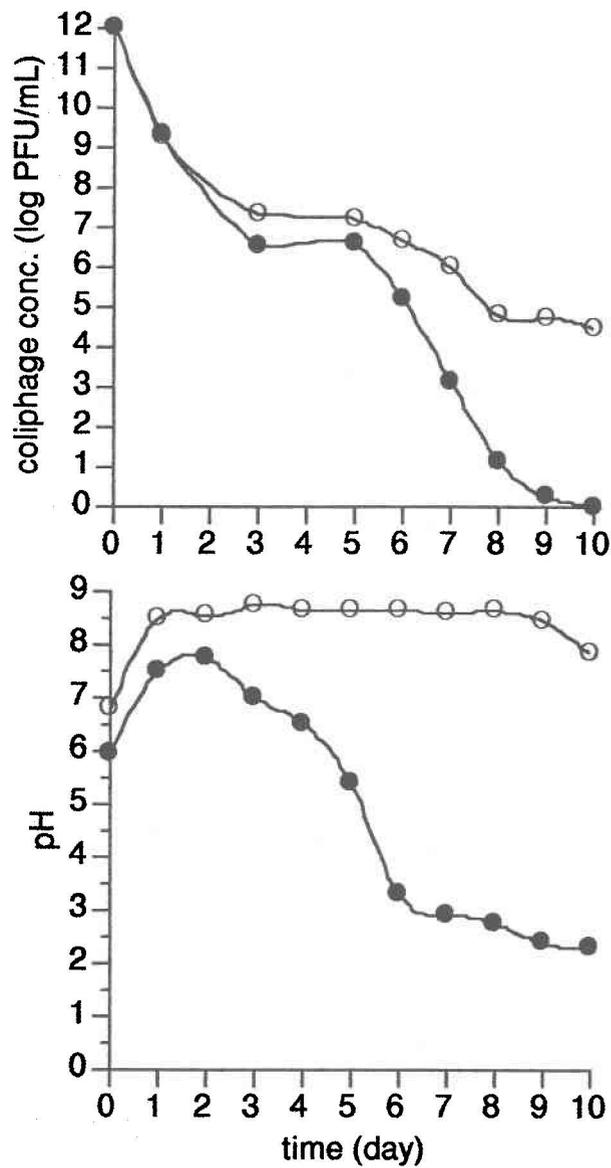
On the 5th day of leaching there was no further decrease in the coliphage count in the two columns (Fig 2). This plateau might reflect coliphage replication due to the increased population of coliforms. Although growth of the coliform population was not measured, the results obtained by Blais et al. (1992a) showed that the population of total coliforms can increase 10 times before any decrease in population is observed during the bacterial leaching process. Wiggins and Alexander (1985) suggested that a concentration of *E. coli* greater than  $7 \times 10^3$  CFU/ml can support coliphage replication.

Preliminary experiments showed that 50% of the coliphages were not adsorbed to the floc during ammonium sulfate precipitation. It is reasonable to think that not all coliphages are recovered from the sludge after the extraction. Therefore, the extraction method may only be useful in providing a relative rate of inactivation for test treatment and controls. The present results and those of Blais et al. (1992) indicate that the process of bioleaching significantly contributes to the elimination of disease causing microorganisms from wastewater.

## References

- Ackerman, H.-W., and M.S. Dubon. 1987. Viruses of prokaryotes. Natural groups of bacteriophages. Vol. 2. CRC Press. Boca Raton, Florida. p.28.
- Babich, H., and G. Stotzky. 1979. Differential toxicities of mercury to bacteria and bacteriophages in sea and in lake water. *Can. J. Microbiol.* 25:1252-1257.
- Blais, J.F., J.C. Auclair, and R.D. Tyagi. 1991. Cooperation between two *Thiobacillus* strains for heavy-metal removal from municipal sludge. *Can. J. Microbiol.* 38:181-187.
- Blais, J.F., R.D. Tyagi, J.C. Auclair, and M.C. Lavoie. 1992a. Indicator bacteria reduction in sewage sludge by a metal bioleaching process. *Wat. Res.* 26:487-495.
- Blais, J.F., R.D. Tyagi, J.C. Auclair, and C.P. Huang. 1992b. Comparison of acid and microbial leaching for metal removal from municipal sludge. *Wat. Sci. Tech.* 26:197-206.
- Cramer, W.N., W.D. Burge, and K. Kawata. 1983. Kinetics of virus inactivation by ammonia. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:760-765.
- Gerba, C.P., C. Wallis, and J.C. Melnick. 1975. Virus in water: the problem, some solutions. *Environ. Sci. Technol.* 9:1122-1126.
- IAWPRC, Study Group on Health Related Water Microbiology. 1991. *Wat Res.* 25:529-545.
- Jain, D.K., and R.D. Tyagi. 1992. Leaching of metals from anaerobic sewage sludge by sulphur-oxidizing bacteria. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14:376-383.
- Knowlton, D.R., and R.L. Ward. 1987. Characterization of virucidal agents in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:621-626.

- Salo, R.J., and D.O. Cliver. 1976. Effect of acid, pH, salts and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses. *Arch. Virol.* 52:269.
- Tyagi, R.D., and D. Couillard. 1989. Bacterial leaching of metals from sludge, p. 557-591. *In* Encyclopedia of Environmental Control Technology, Vol. 3: Wastewater Treatment Technology. Cheremisinoff P.E. (ed.). Library of Environmental Pollution Control Technology, Gulf Publishing Co., Texas.
- Tyagi, R.D., and F.T. Tran. 1991. Microbial leaching of metals from digested sewage sludge in continuous system. *Environ. Technol.* 12:303-312.
- Ward, R.L. 1982. Evidence that microorganisms cause inactivation of viruses in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1221-1224.
- Ward, R.L., and C.S. Ashley. 1978. Identification of detergents as components of wastewater sludge that modify the thermal stability of reovirus and enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:889-897.
- Ward, R.L., and C.S. Ashley. 1980. Effects of wastewater sludge and its detergents on the stability of rotavirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:1154-1158.
- Ward, R.L., and C.S. Ashley. 1977. Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:860-864.
- Wiggins, B.A., and M. Alexander. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implication for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:19-23.
- Wong, L., and J.G. Henry. 1983. Bacterial leaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 18:151-162.
- Yahya, M.T., T.M. Straub, and C.P. Gerba. 1992. Inactivation of coliphage MS-2 and poliovirus by copper, silver, and chlorine. *Can. J. Microbiol.* 38:430-435.



**Figure 1.** Variation of pH and inactivation of coliphages during the bacterial leaching of aerobic sewage sludge. Symbol: ●, bacterial leaching; ○, control.

## Bibliographie

- Adamu, C.A., P.F. Bell et C. Mulchi. 1989. Residual metal concentrations in soils and leaf accumulation in tobacco: a decade following farmland application of municipal sludge. *Environ. Pollut.* 56:113-126.
- APHA, American Public Health Association. 1992. Standard methods for examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Appleton, A.R. et A.D. Venosa. 1986. Technology evaluation of the dual digestion system. *J. Water Pollut. Control Fed.* 58:764-773.
- Aragno, M. 1992. Thermophilic, aerobic hydrogen-oxidizing (Knallgas) bacteria. *Dans The Prokaryotes*. Second edition. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (eds). Springer-Verlag, New York. pp3917-3933.
- Beji, A., D. Izard, F. Gavini, H. Leclerc, M. Leseine-Delstanche et J. Krembel. 1987. A rapid chemical procedure for isolation and purification of chromosomal DNA from Gram-negative bacilli. *Anal. Biochem.* 162:18-23.
- Biesinger, K.E. et G.N. Stokes. 1986. Effects of synthetic polyelectrolytes on selected aquatic organisms. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.* 58:207-213.
- Blais, J.-F., J.C. Auclair et R.D. Tyagi. 1992a. Cooperation between two *Thiobacillus* strains for heavy-metal removal from municipal sludge. *Can. J. Microbiol.* 38:181-187.
- Blais, J.-F., R.D. Tyagi, J.C. Auclair et C.P. Huang. 1992b. Comparison of acid and microbial leaching for metal removal from municipal sludge. *Wat. Sci. Tech.* 26:197-206.
- Blais, J.-F., R.D. Tyagi, J.C. Auclair et M.C. Lavoie. 1992c. Indicator bacteria reduction in sewage sludge by a metal bioleaching process. *Water Res.* 26: 487-495.

- Blais, J.-F., R.D. Tyagi, N. Meunier et J.C. Auclair. 1994. The production of extracellular appendages during bacterial colonization of elemental sulphur. *Process. Biochem.* 29:475-482
- Bloomfield, C. et G. Pruden. 1975. The effects of aerobic and anaerobic incubation on the extractabilities of heavy metals in digested sewage sludge. *Environ. Pollut.* 8:217-232.
- Bomio, M., B. Sonnleitner et A. Fiechter. 1989. Growth and biocatalytic activities of aerobic thermophilic populations in sewage sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:356-362.
- Bonjour, F. et M. Aragno. 1984. *Bacillus tusciae*, a new species of thermoacidophilic, facultatively chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing sporeformer from geothermal area. *Arch. Microbiol.* 139:397-401.
- Bousquet, J., L. Simon et M. Lalonde, 1990. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Can. J. Forest Res.* 20: 254-257.
- Brown, M.J. et J.N. Lester. 1979. Metal removal in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymers. *Water Res.* 13:817-837.
- Bruce, A.M., F. Colin et P.J. Newman. 1989. Treatment of sewage sludge: thermophilic aerobic digestion and processing requirements for landfilling. Elsevier Applied Science, New York.
- Bryant, R.D., J.W. Costerton et E.J. Laishley. 1984. The role of *Thiobacillus albertis* glycocalyx in the adhesion of cells to elemental sulfur. *Can. J. Microbiol.* 30:81-90.
- Burth, P., M.H. Littlewood, S.F. Morgan, B.N. Dancer et J.C. Fry. 1990. Venturi aeration and thermophilic aerobic sewage sludge digestion in small-scale reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:721-724.

- Caldwell, D.E., S.J. Caldwell et J.P. Laycock. 1976. *Thermothrix thioparus* gen. et sp. nov. a facultatively anaerobic facultative chemolithotroph living at neutral and high temperature. Can. J. Microbiol. 22:1509-1517.
- Cizinska, S., V. Matejo, C. Wase, Y. Klasson, J. Krejci et G. Dalhammar. 1992. Thickening of waste activated sludge by biological flotation. Wat. Res. 26:139-144.
- Clesceri, L.S., A.E. Greenberg et R.R. Trussell. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater, 17<sup>th</sup> edition. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Coleman, R.N. et I.D. Gaudet. 1993. *Thiobacillus neapolitanus* implicated in the degradation of concrete tanks used for potable water storage. Wat. Res. 27:413-418
- Colin, F. et S. Gazbar. 1995. Distribution of water in sludges in relation to their mechanical dewatering. Wat. Res. 29:2000-2005.
- Cornwell, D.A., G.P. Westernoff et G.C. Cline. 1980. Batch feasibility testing of heavy metals removal from wastewater sludge with liquid-ion exchange. Proc. Mid. Atlantic Waste Conf., 13-15 juillet, Bucknell Univ., Lewisburg, PA, USA, pp 111-119.
- Couillard, D. et G. Mercier. 1991. Optimum residence time (in CSTR and airlift reactor) for bacterial leaching of metals from sewage sludge. Water Res. 25:211-218.
- Davis, J.A. et J. Jacknow. 1975. Heavy metals in wastewater in three urban areas. J. Water Pollut. Control Fed. 47:2292-2297.
- Davis, R.D. 1987. Use of sewage sludge on land in the United Kingdom. Water Sci. Technol. 19:1-8.
- Davis, R.D. et C.H. Carlton-Smith. 1980. Crops as indicators of the significance of contamination of soil by heavy metals. Technical report 140, Water Research Centre. U.K. pp1-8.

- Dean, C.R. et O.P. Ward. 1991. Nature of *Escherichia coli* cell lysis by culture supernatants of *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1893-1898.
- Degrémont, G. 1978. *Mémento Technique de l'Eau*, 8th Edition, Rueil-Malmaison, France.
- Demharter, W. et R. Hensel. 1989. *Bacillus thermocloaceae* sp. nov, a new thermophilic species from sewage sludge. *System. Appl. Microbiol.* 11:272-276.
- Demharter, W., R. Hensel, J. Smida et E. Stackebrandt. 1989. *Sphaerobacter thermophilus* gen. nov., sp. nov. A deeply rooting member of the actinomycetes subdivision isolated from thermophilically treated sewage sludge. *System. Appl. Microbiol.* 11:261-266.
- Devereux, J.P., P. Haerberli et O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-395.
- Dispirito, A.A., W.H.-T. Lho et O.H. Tuovinen. 1983. A novel method for the isolation of bacterial quinones and its application to appraise the ubiquinone composition of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* 135:77-80.
- Distel, D.L. et A.P. Wood. 1992. Characterization of the grill symbiont of *Tyasira flexuosa* (Thyasiridae: bivalvia) by use of polymerase chain reaction and 16S rRNA sequence analysis. *J. Bacteriol.* 174: 6317-6320.
- Doyle, P.J., J.N. Lester et R. Perry. 1978. Survey of literature and experience on the disposal of sewage sludge on land. Final Report to the U.K., Department of the Environment, September.
- Environnement Canada. 1985. L'épandage des eaux usées traitées et des boues d'épuration d'origine urbaine. Rapport SPE 6-EP-84-1. 58 p.
- Farrell, J. et L.L. Campbell. 1969. Thermophilic bacteria and bacteriophages. *Dans* *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 3. A.H. Rose and J.F. Wilkinson (eds). Academic Press, London. pp. 83-109.

- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
- Förstner, U. et G.T.W. Wittmann. 1979. Toxic metals. *Dans Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne, pp 3-68.
- Goebel, B.M. et E. Stackebrandt. 1994. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial population found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1614-1621.
- Gouvernement du Québec. 1991. Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Guide de bonnes pratiques. Ministère de l'Environnement du Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation. Juillet 1991. 91p.
- Gouvernement du Québec. 1984. Rapport sur la qualité des boues de stations d'épuration et autres boues. Ministère de l'Environnement du Québec. 74 p.
- Grueninger, H., B. Sonnleitner et A. Fiechter. 1984. Bacterial diversity in thermophilic aerobic sewage sludge. III. A source of organisms producing heat-stable industrially useful enzymes, e.g.  $\alpha$ -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:414-421.
- Hamer, G. et H.P. Zwiefelhofer. 1986. Aerobic thermophilic hygienization: A supplement to anaerobic mesophilic waste sludge digestion. *Chem. Eng. Res. Des.* 64:417-424.
- Häner, H., C.A. Mason et G. Hamer. 1994. Death and lysis during aerobic thermophilic sludge treatment: characterization of recalcitrant products. *Water Res.* 28:863-869.
- Hattori, H. 1988. Microbial activities in soil amended with sewage sludges. *Soil Sci. Plant Nutr.* 34:221-232.
- Hays, B.D. 1977. Potentiel for parasitic disease transmission with land application of sewage plant effluents and sludges. *Water Res.* 11:583-595.

- Hensel, R., W. Demharter et R. Hilpert. 1989. The microflora involved in aerobic-thermophilic sludge stabilization. *System. Appl. Microbiol.* 11:312-319.
- Huber, G., C. Spinnler, A. Gambacorta et K.O. Stetter. 1989. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* 12:38-47.
- Hudson, J.A., R.M. Daniel et H.W. Morgan. 1988. Isolation of a strain of *Bacillus schlegelii* from geothermally heated antarctic soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 51:57-60.
- Hutchinson, M., K.I. Johnstone et D. Withe. 1969. Taxonomy of genus *Thiobacillus*: the outcome of numerical taxonomy applied to the group as a whole. *J. Gen. Microbiol.* 57:397-410.
- IAWPRC, Study Group on Health Related Water Microbiology. 1991. *Water Res.* 25:529-545.
- Jenkins, R.L., B.J. Scheybeler, M.L. Smith, R. Baird, M.P. Lo et R.T. Haug. 1981. Metals removal and recovery from municipal sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 53:25-32.
- Jewell, W.J. 1991. Detoxification of sludges: Autoheated aerobic digestion of raw and anaerobically digested sludges. *Dans Biological Processes. Vol. 3. Innovative Hazardous Waste Treatment Thechnology Series.* H.M. Freeman and P.R. Sferra (eds). Technomic Publishing Co., Lancaster, U.K. pp 79-90.
- Jewell, W.J. et R.M. Kabrick. 1980. Autoheated aerobic thermophilic digestion with aeration. *J. Water Pollut. Control Fed.* 52:512-523.
- Jewell, W.J., R.M. Kabrick et J.A. Spada. 1982. Autoheated aerobic thermophilic digestion of municipal sludge with air aeration. Municipal Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio 45268.

- Jukes, T.H. et C.R. Cantor. 1967. Evolution of protein molecules. *Dans* Mammalian Protein Metabolism, H.N. Munro (ed). Academic Press, New York, pp. 21-132
- Kabrick, R.M. et W.J. Jewell. 1982. Fate of pathogens in thermophilic aerobic sludge digestion. *Water Res.* 16:1051-1060.
- Kabrick, R.M., W.J. Jewell, B.V. Salotto et D. Berman. 1979. Inactivation of viruses, pathogenic bacteria and parasites in the autoheated aerobic thermophilic digestion of sewage sludges. *Dans* Proc. 34th Annual Purdue University Industrial Waste Conference, West Lafayette, IN, pp 771-789.
- Kadota, H. et Y. Ishida. 1972. Production of volatile sulphur compounds by microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 82:788-789.
- Katayama-Fujimura, Y. et H. Kuraishi. 1983. Emendation of *Thiobacillus perometabolis* London and Rittenberg 1967. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 650-651.
- Katayama-Fujimura, Y., I. Kawashima, N. Tsuzaki et H. Kuraishi. 1984. Physiological characteristics of the facultatively chemolithotrophic *Thiobacillus* species *Thiobacillus delicatus* nom. rev., emend., *Thiobacillus perometabolis*, and *Thiobacillus intermedius*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:139-144.
- Katayama, Y., A. Hiraishi et H. Kuraishi. 1995. *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology (UK)* 141:1469-1477.
- Kelly, D.P., L.A. Chambers et P.A. Trudinger. 1969. Cyanolysis and spectrophotometric estimation of trithionate in mixture with thiosulfate and tetrathionate. *Anal. Chem.* 41:898-901.
- Kelly, D.P. et A.P. Harrison. 1989. Genus *Thiobacillus*. *Dans* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3. J. T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, H. Holt (eds). The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 1842-1858.

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Klein, L.A., M. Lang, N. Nash et S.L. Kirschner. 1974. Sources of metals in New York city wastewater. *J. Water Pollut. Control Fed.* 12:2653-2662.
- Kovacs, G.L. 1992. Process for enhancing the dewaterability of waste sludge from microbiological digestion. U.S. Patent 5,087,378. 11 Février 1992.
- Kruger, M.L. et A.S. Meyer. 1984. Thermophilic bacilli growing with carbonic monoxide. *Arch. Microbiol.* 139:402-408.
- Kuenen, J. G., L.A. Robertson et O.H. Tuovinen. 1992. The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospora* and *Thiosphaera*. Dans *The Prokaryotes*, 2nd edition. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.S. Schleifer (eds). Springer-Verlag, New York.
- Kumar, S., K. Tamura et M. Nei. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Lane D.J., D.A. Stahl, G.J. Olsen, D.J. Heller and N.R. Pace. 1985. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J. Bact.* 163:75-81
- Lane D.J., A.P. Harisson, JR., D. Stahl, B. Pace, S.J. Giovannoni, G.J. Olsen, et N.R. Pace. 1992. Evolutionary relationships among sulfur-and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* 174:268-278.
- Lee, K.M., C.A. Brunner, J.B. Farrell et A.E. Erarp. 1989. Destruction of enteric bacteria and viruses during two-phase digestion. *J. Water Pollut. Control Fed.* 61:1421-1429.
- Levine, M.B., A.T. Hall, G.W. Barrett et D.H. Taylor. 1989. Heavy metal concentrations during ten years of sludge treatment to an old-field community. *J. Environ. Qual.* 18:411-418.

- Lin, C.C. et L.E. Casida, Jr. 1984. Gelrite as a gelling agent in media for growth of thermophilic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:427-429.
- Lo, K.S.L. et Y.H. Chen. 1990. Extracting heavy metals from municipal and industrial sludges. *Sci. Total Environ.* 90:99-116.
- Logan, T.J. et R.E. Feltz. 1985. Effect of aeration, cadmium concentration and solids content on acid extraction of cadmium from a municipal wastewater sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 57:406-412.
- Logan, N.A. et R.C.W. Berkeley. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* 130:1871-1882.
- Loginova, L.G., L.A. Egorova, R.S. Golovacheva et L.M. Seregina. 1984. *Thermus ruber* sp. nov., nom. rev. *Int. J. System. Bacteriol.* 34:498-49.
- Marsh, R.M. et P.R. Nottis. 1983. The isolation of some thermophilic, autotrophic, iron and sulphur oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 17:311-315.
- Mason, C.A., A. Haner et G. Hamer. 1992. Aerobic thermophilic waste sludge treatment. *Water Sci. Technol.* 25:113-118.
- McNulty, K.J., A.T. Malarkey, R.L. Goldsmith et M.A. Fremont. 1977. Development of new process for sludge conditioning. *Dans National Conference on Composting of Municipal Residue and Sludge. Proceedings, August 23-25, Rockville, MD.*
- Messenger, J.R., H.A. Villiers et G.A. Ekama. 1990. Oxygen utilization rate as a control parameter for the aerobic stage in dual digestion. *Water Sci. Technol.* 22:217-227.
- Milde, K., W. Sand, W. Wolff et E. Bock. 1983. Thiobacilli of the corroded concrete walls of the Hamburg sewer system. *J. Gen. Microbiol.* 129:1327-1333.
- Mininni, G. et M. Santori. 1987. Problems and perspectives of sludge utilization in agriculture. *Ecosystem. Environ.* 18:291-311.

- Oliver, J.W., W.C. Kreye et P.H. King. 1975. Heavy metal release by chlorine oxidation of sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 47:2490-2497.
- Pike, E.B. et R.D. Davis. 1984. Stabilization and disinfection- their relevance to agricultural utilisation of sludge. *Dans Sewage Sludge Stabilisation and Disinfection*. A.M. Bruce (ed). Ellis Horwood Limited, Chichester, pp 61-84.
- Pöpel, F. et C. Ohnmacht. 1972. Thermophilic bacterial oxidation of highly concentrated substrates. *Water Res.* 6:807-815.
- Rasmussen, H., J.H. Bruus, K. Keiding et P.H. Nielson. 1994. Observations on dewaterability and physical, chemical and microbiological changes in anaerobically stored activated sludge from a nutrient removal plant. *Wat. Res.* 28:417-425.
- Rossi, G. 1990. *Biohydrometallurgy*. McGraw-Hill, Hamburg. pp.80-93.
- Rudolfs, W., L.L. Falk et R.A. Rogotzke. 1950. Literature review on the occurrence and survival of enteric pathogenic and related organisms in soil, water, sewage and sludges, and on vegetation. *Sewage Ind. Wastes* 22:1417-1425.
- Saitou, N. et M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sand, W. 1987. Importance of hydrogen sulfide, thiosulfate and methylmercaptan for growth of thiobacilli during simulation of concrete corrosion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1645-1648.
- Schenk, A. et M. Aragno. 1979. *Bacillus schlegelii*, a new species of thermophilic facultatively chemolithoautotrophic bacterium oxidizing molecular hydrogen. *J. Gen. Microbiol.* 115:333-341.
- Schmidt, G.D. et L.S. Roberts. 1989. Order Ascaridata: large intestinal roundworms. *Dans Foundations of Parasitology*, Chap. 27. Times Mirror and Mosby College, St-Louis, MO. 478 p.

- Scholz, T., W. Demharter, R. Hensel et O. Kendler. 1987. *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage. *System. Appl. Microbiol.* 9:91-96.
- Schönborn, W. et H. Hartman. 1978. Bacterial leaching of metals from sewage sludge. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 5:305-313.
- Scott, D.S. et H. Horling. 1975. Removal of phosphates and metals from sewage sludges. *Environ. Sci. Technol.* 9:849-855.
- Segerer A.H. et K.O. Stetter. 1992. The order Sulfolobales. *Dans The Prokaryotes*, 2nd edition. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.S. Schleifer (eds). Springer-Verlag, New York.
- Segerer, A.H., A. Trincone, M. Gahrz et K.O. Stetter. 1991. *Stygiolobus azoricus* gen. nov., sp. nov. represents a novel genus of anaerobic, extremely thermoacidophilic archaeobacteria of the order *Sulfolobales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:495-501.
- Segerer, A., A. Neuner, J.K. Kristjansson et K.O. Stetter. 1986. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:559-564.
- Shooner, F., H. Benmoussa, J.F. Blais et R.D. Tyagi. 1992. Inactivation virale lors d'un processus de biolixiviation des boues d'usines d'épuration des eaux municipales. 8e Congrès de la Région de l'Est. Association Canadienne pour la Recherche sur la Pollution de l'Eau et sa Maîtrise, Québec, P.Q.
- Shooner F., J. Bousquet, et R.D. Tyagi. 1995. Isolation, phenotypic characterization and phylogenetic position of a novel facultative autotrophic moderately thermophilic, *Thiobacillus thermosulfatus*, sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:409-415.
- Shooner, F. et R.D. Tyagi. 1996. Thermophilic microbial leaching of heavy metals from municipal sludge using indigenous sulfur-oxidizing microbiota. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol.44. sous presse

- Shooner, F. et R.D. Tyagi. 1995. Microbial ecology of simultaneous thermophilic microbial leaching and digestion of sewage sludge. *Can. J. Microbiol.* 41:1071-1080.
- Slepecky, R.A. et H.E. Hemphill. 1992. The genus *Bacillus*-nonmedical. *Dans The Prokaryotes*, 2 nd edition. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (eds). Springer-Verlag, New York.
- Smith, J.E., K.W. Young et R.B. Dean. 1975. Biological oxidation and disinfection of sludge. *Water Res.* 9:17-24.
- Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. *Dans Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3. P.H.H. Sneath, N.S. Moir, S. Sharpe, J.G. Holt. Williams and Wilkins (eds). Baltimore, MO.
- Sonnleitner, B. et A. Fiechter. 1983a. Bacterial diversity in thermophilic aerobic sewage sludge I. Active biomass and its fluctuations. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18:47-51
- Sonnleitner, B. et A. Fiechter. 1983b. Bacterial diversity in thermophilic aerobic sewage sludge II. Types of organisms and their capacities. *Eur. J. Appl. Microbiol. Bioechnol.* 18:174-180.
- Spinosa, L., G. Mininni et A. Misiti. 1984. Sludge mechanical dewatering. *Ingen. Sanit.* 12:34-42.
- Sreekrishnan, T.R., R.D. Tyagi, J.F. Blais et P.G.C. Campbell. 1993. Kinetics of heavy metal bioleaching from sewage sludge -1. Effects of process parameters. *Water Res.* 27:1641-1651.
- Stackebrandt, E. et B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E., R.G.E. Murray et H.G. Trüper. 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:321-325.

- Stephenson, T. et J.N. Lester. 1987a. Heavy metal removal during the activated sludge process. I. Extent of soluble and insoluble metal removal mechanisms. *Sci. Total Environ.* 63:199-214.
- Stephenson, T. et J.N. Lester. 1987b. Heavy metal removal during the activated sludge process. II. Insoluble metal removal mechanisms. *Sci. Total Environ.* 63:215-230.
- Sterrit, R.M. et J.N. Lester. 1984. Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes. III. Speciations in waste waters and related complex matrices. *Sci. Total Environ.* 34:117-141.
- St-Yves, A. et R. Beaulieu. 1988. Caractérisation des boues de 34 stations d'épuration des eaux usées municipales. Ministère de l'Environnement du Québec, Dir. Gén. Assainissement Eaux, Direction de l'assainissement agricole, 11 pages.
- Sutherland, I.W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.* 8:143-213.
- Swofford, D.L. 1993. PAUP-phylogenetic analysis using parsimony. Version 3.1. Illinois. Natural History Survey, Champaign, IL.
- Tjell, J.C. 1986. Trace metal regulations for sludge utilization in agriculture: A critical review processing and use of organic sludge and liquid agricultural wastes. P. l'Hermite (ed). Commission of the European Communities, D. Reidel Publishing Co., Italie.
- Torma, A.E. et B. Bosecker. 1982. Bacterial leaching. *Prog. Ind. Microbiol.* 16:77- 118.
- Tyagi, R.D., T.R. Sreekrishnan, P.G.C. Campbell et J.F. Blais. 1993. Kinetics of heavy metal bioleaching from sewage sludge - 2. Mathematical model. *Water Res.* 27: 1653-1661.
- Tyagi, R.D., D. Couillard et F.T. Tran. 1990. Studies on microbial leaching of heavy metals from municipal sludge. *Water Sci. Technol.* 22:229-238.

- Tyagi, R.D. et D. Couillard. 1989. Bacterial leaching of metals from sludge. *Dans* Encyclopedia of Environmental Control Technology. Wastewater Treatment Technology. Vol. 3. P.N. Cheremisinoff (ed), Gulf Publishing Co., Houston Texas.
- Ulitzur, S. 1972. Rapid determination of DNA base composition by ultraviolet spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 272:1-11.
- Ursing, J.B., R.A. Rosselló-Mora, E. García-Valdés et J. Lalucat. 1995. Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:604.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1979a. Criteria for classification of solid waste disposal facilities and practices; final rule. *Fed. Regist.* 44:179.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1979b. Progress design manual. Sludge treatment and disposal. EPA 625/1-79-011.
- Vesilind, P.A. 1980. Treatment and Disposal of Wastewater Sludges. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI. 323 p.
- Vismara, R. 1985. A model for autothermic aerobic digestion: effects of scale depending on aeration efficiency and sludge concentration. *Water Res.* 19:441-447.
- Waara, K.-O. 1992. Effects of copper, cadmium, lead and zinc on nitrate reduction in a synthetic water medium and lake water from northern Sweden.
- Ward, R.L., C.S. Ashley et R.H. Moseley. 1976. Heat inactivation of poliovirus in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:339-346.
- Webber, M.D. 1986. Epannage des boues d'épuration sur les terres agricoles: une évaluation. Direction générale de la recherche, Agriculture Canada.
- Williams, R.A.D. et D.S. Hoare. 1972. Physiology of a new facultatively autotrophic thermophilic *Thiobacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 70:555-566.

- Wong, L. et J.G. Henry. 1984. Decontaminating biological sludge for agricultural use. *Water Sci. Technol.* 17:575-586.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1985. Physiological characteristics of a new thermophilic obligately chemolithotrophic *Thiobacillus* species, *Thiobacillus tepidarius*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:434-437.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1986. Chemolithotrophic metabolism of the newly-isolated moderately thermophilic, obligately autotrophic *Thiobacillus tepidarius*. *Arch. Microbiol.* 144:71-77.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1988. Isolation and physiological characterization of *Thiobacillus aquaesulis* sp. nov., a novel facultatively autotrophic moderate thermophile. *Arch. Microbiol.* 149:339-343.
- Wood, A.P., et D.P. Kelly. 1993. Reclassification of *Thiobacillus thyasiris* as *Thiomicrospora thyasirae* comb. nov., an organism exhibiting pleomorphism in response to environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 159: 45-47.
- Wozniak, D.J. et J.Y.C. Huang. 1982. Variables affecting metal removal from sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 54:1574-1580.
- Zillig, Z., S. Yeats, I. Holtz, A. Böck, M. Rettenberger, F. Gropp et G. Simon. 1986. *Desulfurolobus ambivalens*, gen. nov., sp. nov., an autotrophic archaeobacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur. *System. Appl. Microbiol.* 8:197-203.