

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CHARACTERIZATION AND REACTIVITY ASSESSMENT OF
NATURAL ORGANIC SUBSTRATES FOR SULPHATE-REDUCING
BACTERIA IN AMD TREATMENT

VIKTORS INDULIS KŪLNIEKS

DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE MINÉRAL)

DÉCEMBRE 2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-01345-1

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-01345-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would especially like to thank Prof. Gérald J. Zagury for his intelligent guidance and friendly demeanour throughout this project.

I would like to thank Manon Leduc for her helpful and dependable assistance in the laboratory. I also thank Lucie Jean for assisting me in the laboratory.

I thank the Canadian Water Network and la Fondation Polytechnique for the funding to pursue graduate studies.

I thank my parents Māra and Indulis and my brother Andrejs for helping me along for 27+ years and convincing me of the power of perseverance.

I thank Flo for being by my side, even when she was thousands of kilometres away.

RÉSUMÉ

Des travaux d'investigation ont été réalisés sur les sources de carbone organiques naturelles pour les bactéries sulfato-réductrices (BSR), qui peuvent être utilisées dans les murs réactifs sulfato-réducteur (MRSR) et d'autres systèmes passifs in situ appliqués au traitement du drainage minier acide (DMA) par sulfato-réduction. Les travaux ont été menés en deux étapes. La première étape consistait à caractériser les substances organiques naturelles à l'aide d'une série d'analyses permettant de mesurer les concentrations de différents indicateurs tels que le carbone organique dissous (COD), le carbone organique total (COT), le carbone inorganique total (CIT), les substances facilement disponibles (SFD) et l'azote total kjeldahl (NTK). Au total, six substrats naturels différents ont été testés : les copeaux de bois d'érable, la tourbe de sphagnum, le compost de feuilles, le compost de conifères, le fumier de volaille et le brin de scie de conifères. La seconde étape, réalisée lors d'une expérience en cuvette de 70 jours, a permis d'évaluer en duplicata, la réactivité en terme de réduction de sulfates, d'une part, de chacune de ces sources de carbone, d'autre part, d'un mélange obtenu à partir de trois de ces matières (copeaux d'érable, compost de feuilles et fumier de volaille) et enfin, de l'éthanol. En complément, l'inhibition de l'activité bactérienne causée par le formaldéhyde a également pu être testée sur le mélange de matières organiques naturelles.

Les résultats de la première étape (caractérisation) montrent les plus hauts pourcentages de COD, SFD, résines, lipides et NTK dans le fumier de volaille, soit respectivement 6,1, 17, 63, et 5,8 g/100 g de matière sèche. Les matières en bois (érable, conifère) contenaient les plus faibles teneurs en azote et les plus importantes teneurs en COT. Pendant la deuxième étape, les réacteurs les plus efficaces en terme de sulfato-réduction étaient ceux contenant les mélanges de matières organiques (avec et sans formaldéhyde), celui de l'éthanol et un des réplicats contenant des copeaux de bois d'érable. L'enlèvement de métaux était important en général, cependant le réacteur avec le fumier de volaille était le moins efficace et celui contenant de l'éthanol n'était pas efficace pour enlever le Mn et le Fe. Des sulfures et des BSR ont été trouvés dans tous les réacteurs, avec le plus grand nombre final de BSR dans le réacteur contenant uniquement des copeaux d'érable comme source de carbone et le plus petit dans celui contenant uniquement de l'éthanol. Une brève étude de la cinétique de la diminution des métaux a donné divers ordres de réaction et différentes constantes k , en fonction des métaux et des réacteurs.

La première conclusion est que la faible teneur initiale en BSR du sédiment de ruisseau, utilisé comme source unique de ces bactéries, a été partiellement responsable des temps importants d'acclimation et des faibles taux de réduction des sulfates (T_{0-70}) observés à la fois dans les réacteurs contenant des mélanges de matières organiques naturelles, et dans celui qui contenait de l'éthanol (ce réacteur ne contenait aucune bactérie indigène et montrait toujours le dénombrement de BSR le plus faible). De plus, les résultats

suggèrent que les taux de sulfato-réduction ont été sous-estimés à cause de la dissolution, pendant l'expérience, du sulfate présent dans le sédiment du ruisseau et co-précipité aux (oxy)hydroxydes ferriques du DMA synthétique.

Néanmoins, l'expérience a été réalisée sur une durée jugée adéquate pour comparer la performance d'une part d'un substrat organique simple tel que l'éthanol et d'autre part de substrats naturels plus complexes analysés individuellement ou sous forme de mélange. La durée de cette expérience est cependant insuffisante pour tirer des conclusions sur l'usage sur le terrain de ces substrats et sur leur efficacité à long-terme.

Parallèlement, bien que la caractérisation individuelle de chacun des substrats naturels organiques informe sur leur teneur en carbone et leur solubilité, elle ne permet pas de conclure sur leur capacité à favoriser la réduction du sulfate et la précipitation des métaux.

Les résultats obtenus suggèrent que les proportions de substrats naturels organiques utilisées dans le mélange testé sont efficaces pour leur usage dans des bioréacteurs in situ ou des MRSR. Les résultats laissent ainsi supposer que mélanger des substrats organiques permet de regrouper différentes souches de bactéries et différents composés de carbone dont la contribution mutuelle favorise la sulfato-réduction par des BSR.

Enfin, l'action inhibitrice sur l'activité des BSR du formaldéhyde, ajouté avec une concentration limitée à 0,015% (p/v), a été observée mais uniquement sur une courte durée. En effet, bien que les quantités de BSR étaient identiques dans les réacteurs contenant le mélange avec ou sans formaldéhyde, un court délai de déclenchement de la sulfato-réduction et de la précipitation des métaux a été observé dans le réacteur comprenant du formaldéhyde. Cependant aucun changement des propriétés physico-chimiques du milieu n'a été mis en évidence. Une plus forte dose doit et peut donc être utilisée pour arrêter l'activité bactérienne dans des conditions similaires. Contrairement au formaldéhyde, l'effet toxique/inhibitoire des substances présentes dans le bois coniférique n'a pas pu être confirmé. En effet, bien que les réacteurs qui en contenaient ont présenté des nombres finaux de BSR parmi les plus bas, aucune différence significative entre eux et les autres réacteurs n'a été mise en évidence.

En complément de ces conclusions, plusieurs recommandations et perspectives peuvent être formulées pour de futures expérimentations. Tout d'abord, identifier et quantifier les BSR relatives à chacune des sources naturelles de carbone organique permettrait de tester d'une part si les bactéries intrinsèques à l'une de ces sources sont plus aptes à proliférer en présence d'une autre source et des sous-produits de la dégradation anaérobie ou d'autre part si le fait de mélanger différentes souches de bactéries, en augmentant la diversité microbiologique, produit un effet positif.

Deuxièmement, les produits de la digestion anaérobie (l'acétate, le propionate, etc.), et des substances organiques prises individuellement ou combinées, devraient être identifiés et suivis afin de mieux comprendre les conditions créées par cette dégradation préliminaire. En effet, comme les BSR n'utilisent pas directement des sources de carbone complexes et que les autres microorganismes peuvent avoir un avantage métabolique pour les molécules plus simples, les molécules produites par la dégradation préliminaire devraient être investiguées.

Parallèlement, la réactivité en terme de réduction de sulfate des substances conifériques, devrait être testée en interaction avec d'autres sources de carbone. En effet, les résultats de cette étude ont montré que la performance individuelle de ces substrats, qui sont par ailleurs présents en forte quantité à proximité de plusieurs sites miniers, n'était pas significativement différente de celle d'autres substrats organiques naturels uniques. Ainsi l'analyse de performance de substrats organiques composés pour les BSR (mélange) pour lesquels les substances conifériques remplaceraient les copeaux d'érable, permettrait peut-être de mieux comprendre et quantifier les effets inhibants de ces substances.

Différentes études ayant montré d'une part qu'il existait une corrélation entre la lignine et la biodégradabilité, et d'autre part que la cellulose est le composé organique prédominant dans les substances naturelles organiques, il est recommandé que les teneurs en cellulose et en lignine des substrats naturels organiques soient quantifiés. De

la même manière, les contenus en phosphore et en azote pourraient également être suivis puisque ces nutriments sont également nécessaires pour la croissance des BSR.

Pour finir, les futurs essais en cuvette impliquant des substrats naturels organiques devront être planifiés sur un temps d'expérimentation plus long pour pouvoir mieux observer les différences de réactivité entre des substrats qui montrent une cinétique de réduction de sulfate lente. Dans le même temps, il est important que des essais dynamiques en colonne soient inclus dans les futurs travaux de recherche car les substances toxiques/inhibitrices qui s'accumulent dans les réacteurs en cuvette peuvent influencer les résultats et les études précédentes ont mis en évidence l'importance de la perméabilité des mélanges réactifs et du temps de rétention hydraulique (TRH), qui ne sont pas pris en compte dans la configuration des réacteurs en cuvette.

ABSTRACT

A study was made investigating natural organic carbon sources for sulfate reducing bacteria (SRB), that could be used in permeable reactive barriers (PRB) and in other in situ passive treatment systems for the treatment of acid mine drainage (AMD) by sulfate reduction. This study was made in two steps: The first step was to characterize the natural organic substances using several analyses, including dissolved organic carbon (DOC), total organic carbon (TOC), total inorganic carbon (TIC), easily available substances (EAS) and total kjeldahl nitrogen (TKN). The natural substrates were maple wood chips, sphagnum peat moss, leaf compost, conifer compost, poultry manure and conifer sawdust. The second step was to test, in duplicate, the reactivity (in terms of sulfate reduction) of these carbon sources, that of a mixture of them (maple wood chips, leaf compost, poultry manure), and that of ethanol in a 70-day batch experiment. The inhibition provided by formaldehyde was also tested on the substrate mixture.

The results of the first step (characterization) show the highest percentage of DOC, EAS, resins and lipids, and TKN in the poultry manure, that is 6.1, 17, 63, and 5.8 g/ 100 g, respectively. The wood materials (maple, conifer) contained the lowest nitrogen content and highest TOC. During the second step, the most effective reactors in terms of sulphate reduction were those containing a mixture of organic substrates (with and without formaldehyde), the one with ethanol and one of the maple wood chip replicates. Metal removal was high in general, but the poultry manure reactor was least effective

and the ethanol reactor was not effective in removing Mn and Fe. Sulphides were found in all reactors, as were SRB, with the highest final SRB count in the maple wood chip reactor and the lowest in the ethanol reactor. A brief modeling study of metal removal kinetics showed varying rate laws and constants, k , for the different metals in the different reactors.

It was concluded that the low amount of SRB in the creek sediment (the SRB source) was partially responsible for the long acclimation times and the low sulphate reduction rates ($T_{0.70}$) in the reactors containing a mixture of natural organic materials. It also explained the low rate of sulphate reduction in the reactor containing ethanol (containing no supplementary bacteria intrinsic to natural substrates), where SRB counts were always significantly lower. In addition, results suggest that rates of sulphate reduction were underestimated due to the dissolution of sulphate over the course of the experiment, present in the creek sediment and co-precipitated as ferric (oxy)hydroxides in the synthetic AMD.

Nevertheless, it was also concluded that the length of the experiment was adequate for comparing the performance of a simple organic substrate with more complex natural organic substrates and a mixture of those, but it was not sufficient in order to make conclusions on their use in the field or their long-term effectiveness.

Similarly, it was concluded that the characterization of natural organic substrates on an individual basis provided information on their carbon composition and solubility, but not on their capacity to support sulphate reduction and metal precipitation.

Finally, it was concluded that the natural organic substrate proportions in the mixture tested in the present study are effective for their use in in situ compost bioreactors or PRBs. It is suspected that the mixing of natural organic substrates brings together different strains of bacteria and carbon compounds whose combined effect favours sulphate reduction by SRB.

In addition, the formaldehyde concentration of 0.015% (w/v) appeared to inhibit SRB activity for only a short period of time by delaying sulphate reduction and metal precipitation, although SRB numbers were similar to that of the mixture with equal substrate proportions but not containing formaldehyde. However, it did not change the physicochemical properties of the medium. Therefore, a stronger dose can and must be used for stopping bacterial activity in similar conditions. Meanwhile, the toxic/inhibitory effect of substances present in conifer wood could not be confirmed. The reactors containing conifer wood as the single carbon source did not behave much differently in terms of sulphate reduction than other reactors containing a single natural organic carbon source, although the former reactors were among those with the lowest final SRB counts.

In addition to the conclusions, several recommendations and perspectives can be considered in future experiments. First, it was recommended that the SRB native to the natural organic carbon sources be identified and quantified with the goal of testing if bacteria present in one carbon source are more likely to proliferate in the presence of another carbon source (or its biodegradation bi-products), or if bringing together different bacterial strains and thus increasing microbiological diversity increases sulphate reduction effectiveness.

Likewise, the products of anaerobic digestion (acetate, propionate, etc.) of natural organic substances and their mixtures should be identified and monitored so that the conditions created by this preliminary degradation be better understood. Given that SRB do not directly use complex carbon compounds and that other microorganisms may have a metabolic advantage for the simpler molecules, the organic substances produced by the preliminary degradation should be explored.

Further, the conifer wood substances, present in abundance in the rural areas surrounding many mine sites, should be tested as electron donors for sulphate reduction in mixtures containing other carbon sources. As their performances as single substrates were not very different from those of other tested single natural organic substrates, further tests would allow for comparison of these substances to maple wood chips with respect to their performance as part of a reactive mixture for SRB and their supposed inhibitory effects could be better understood and quantified.

The cellulose and lignin content of the natural organic substrates should be quantified, given the correlation between lignin content and degradability shown in other studies and given that cellulose is the predominant compound in natural organic substances. Phosphorus and nitrogen content should also be monitored, given their necessity for SRB growth.

Finally, future batch tests should be designed to be longer in order to better observe reactivity differences between substrates showing slow sulphate reduction. Meanwhile, dynamic experiments using column reactors must be part of future research, as toxic/inhibitory substances, accumulable in batch reactors, are flushed out of column reactors. Likewise, previous studies stress the importance of permeability of reactive mixtures and that of hydraulic retention time (HRT), factors not taken into account in batch reactor configuration.

CONDENSÉ EN FRANÇAIS

Le contexte

Ce mémoire porte sur l'investigation des sources de carbone organiques naturelles pour les bactéries sulfato-réductrices (BSR), qui peuvent être utilisées dans les murs réactifs sulfato-réducteur (MRSR) et d'autres systèmes in situ passifs dans le cadre du traitement du drainage minier acide (DMA) par sulfato-réduction.

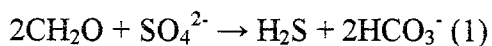
Le DMA est un problème sérieux qui menace les écosystèmes au voisinage des sites miniers présents au Canada et partout dans le monde. Caractérisé simultanément par des taux élevés en métaux dissous et en sulfates ainsi que par une acidité importante conjuguée à une alcalinité et un pH faible, le DMA est toxique pour les organismes qui habitent dans les ruisseaux et lacs où il s'écoule. Le processus de génération du DMA est activé lorsque des stockages conséquents de résidus miniers sont mis au contact d'eau et d'oxygène. L'oxydation des sulfures métalliques comme la pyrite (FeS), la production subséquente l'acide sulfurique et la dissolution des métaux peuvent se propager pendant des centaines d'années, longtemps après la fermeture d'un site minier.

Les méthodes de traitement dites « actives » telle que la neutralisation à l'aide de produits alcalins comme la calcite, sont coûteuses et de plus, produisent des boues fortement chargées en métaux toxiques. Ces boues notamment plus denses et instables que leurs contre parts passives doivent par conséquent faire elles-mêmes l'objet de

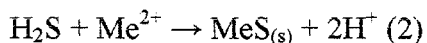
surveillances indéfinies et de traitements. Pour pallier ces difficultés, plusieurs méthodes dites « passives » peuvent être mises en œuvre pour traiter le DMA. Ces méthodes sont appliquées in situ et présentent l'avantage d'une longévité de plusieurs années en ne nécessitant qu'un minimum d'intervention de maintenance par l'homme.

Les méthodes passives désignent différents procédés tels que les marécages artificiels, les drains anoxiques, les bioréacteurs et les murs réactifs sulfato-réducteurs (MRSR). Une nouvelle méthode, qui fait l'objet de travaux de recherche en cours, consiste à stocker les résidus miniers en présence de sources de carbone organique adaptées au BSR. En favorisant le développement des BSR, la présence de ces sources de carbone permet de traiter par sulfato-réduction le DMA dès qu'il est produit et conduit ainsi instantanément à la précipitation des métaux.

Le principe de ces trois dernières méthodes repose donc sur l'activation de deux réactions. Au cours de la première réaction comme le montre l'équation 1, les BSR réduisent le sulfate en sulfure et produisent de l'alcalinité à partir d'une simple source de carbone :



La présence du sulfure d'hydrogène induite par la première réaction permet alors aux métaux (Me^{2+}) de se précipiter en sulfures métalliques (2):



Ainsi le traitement du DMA par sulfato-réduction permet d'éliminer à la fois le problème des métaux dissous, les sulfates, et l'acidité minérale.

Les objectifs visés

Plusieurs sources naturelles de carbone organique peuvent être envisagées pour le traitement du DMA par sulfato-réduction. Une caractérisation des sources naturelles de carbone et ensuite une expérimentation en cuvette devaient permettre d'atteindre deux objectifs.

Le premier objectif tout d'abord était de déterminer et quantifier la relation existant entre la composition chimique d'une source naturelle de carbone organique, sa capacité à se dégrader et son aptitude à promouvoir la réaction de sulfato-réduction et la précipitation des métaux. Le second objectif était de comparer la performance de différentes sources de carbone utilisées comme unique source de BSR ou mélangées entre elles.

Ainsi la première étape des travaux a été d'investiguer les caractéristiques intrinsèques de différentes sources de carbone pour les BSR qui peuvent être utilisées dans des systèmes passifs pour le traitement du DMA. Six différentes sources de carbone ont ainsi pu être analysées : copeaux de bois d'érable, tourbe de sphagnum, compost de feuilles, compost de conifère, fumier de volaille, brin de sciure de conifère.

Une fois chaque source caractérisée, leur réactivité a été étudiée dans différentes configurations afin de réaliser une analyse comparative. Tout d'abord, tous les substrats ont été successivement considérés comme une source unique de carbone pour les BSR. Ainsi six expériences en cuve (batch) ont été réalisées sous ces conditions (une expérience pour chaque substrat). Afin d'ajouter un nouvel élément comparatif, une septième expérience a été programmée en considérant une source de carbone organique, qui contrairement aux précédentes n'est pas naturelle : l'éthanol. Enfin en dernier lieu, deux expériences complémentaires ont été menées à partir d'un mélange de trois sources naturelles de carbone organique : le copeaux d'érable, le compost de feuilles et le fumier de volaille. Pour ces deux expériences, les proportions retenues pour le mélange des sources de carbone respectent celles suggérées par Cocos et al. (2002). Les deux expériences se distinguent uniquement par la présence ou non de formaldéhyde.

Les étapes de la recherche

Caractérisation des matières organiques

La première étape des travaux a donc été de caractériser les substances organiques naturelles. Cette caractérisation a été établie à travers plusieurs indicateurs : la concentration de Carbone Organique Dissous (COD), la concentration de Substances Facilement Disponibles (SFD), la concentration de Carbone Organique Total (COT), la concentration de Carbone Inorganique Total (CIT) et la concentration d'azote Kjeldahl total (NTK). La mesure de chacun de ces indicateurs a été réalisée indépendamment selon les protocoles décrits ci-dessous.

Pour la première mesure réalisée, qui était celle du COD, 20 g (poids humide) de chacune des six sources naturelles de carbone organique ont été mélangés individuellement à 200 ml d'eau déionisée. Chaque mélange a d'abord été agité pendant 2 heures à température ambiante avec un agitateur rotatif, puis centrifugé (13800 g) pendant 10 minutes et enfin filtré à travers des filtres (cellulose-nitrate membrane) de 0.45 μm . Le carbone organique total (COT) de l'extrait a été ensuite analysé par Standard Method 5310 C (Clesceri et al., 1998).

Dans un second temps, les SFD (Annexe I) ont été analysées par Forage Fibre Analysis (FFA) comme décrit dans Prasad et al. (1999). Le protocole détaillé se trouve dans l'Annexe I. Les échantillons ont d'abord été rincés à l'acétone pour enlever les résines et lipides, filtrés une première fois à travers des filtres frittés Gooch puis rincés à l'eau, ils ont été de nouveau filtrés, séchés, et pesés. La matière sèche a ensuite été digérée dans un bain bouillant de HCl (5%) pendant une heure. Après le rinçage à l'eau et la filtration, l'échantillon a été séché à 60°C et pesé une dernière fois. Cette analyse gravimétrique a été réalisée uniquement sur les copeaux de bois d'érable, la tourbe de sphaigne, le compost de feuilles et le fumier de volaille. Elle permet de quantifier la portion biodégradable d'un substrat particulier, notamment les sucres solubles, les amino acides, l'amidon, certaines protéines et l'hemicellulose.

Pour finaliser la caractérisation des sources de carbone, le COT des matières organiques solides a été analysé par la méthode ASTM D2974W-B (ASTM, 2003). Un traitement par de l'acide phosphorique, suivi par la détermination infrarouge du CO₂ en résultant, a été réalisé pour quantifier le carbone inorganique total (CIT) (Ministère de l'environnement et de la faune du Québec, 1996). L'azote total kjeldhal a également été analysé par Standard Method 4500-N_{org} (Clesceri et al., 1998).

L'expérience en cuvée

Suite à la caractérisation des sources de carbone, une expérimentation en cuvée de 70 jours a été menée, pour laquelle le protocole détaillé se trouve en Annexe I. Un DMA synthétique avec un pH de 5,5 et contenant des sulfates et des métaux (Cd, Ca, Fe, Mg, Mn, Ni, K, Na, Zn) a été préparé. Le tableau 3.2 du chapitre 3 montre les concentrations mesurées dans le DMA. À cause des contraintes du laboratoire, celui-ci a atteint un pH 4 avant d'être ajouté (800 ml) aux mélanges réactifs. La composition des mélanges (200 g) se trouve dans le tableau 3.1 du chapitre 3. Chaque mélange contenait une source de carbone (9 mélanges différents : 7 avec une source de carbone unique dont six naturelles plus l'azote, deux avec un mélange des copeaux d'érable, du compost de feuilles et du fumier de volaille dont un stérilisé avec de la formaldéhyde), de la chaux (pour augmenter le pH et la capacité du tampon), du sable (milieux poreux), de l'urée (source d'azote) et du sédiment de ruisseaux (source de BSR). Les mélanges et le DMA ont été placés dans des bocaux de verre de 2000 ml, en duplicata, scellés par des bouchons en

Teflon équipés des valves Mininert. L'échantillonnage du liquide pendant les essais a été réalisé au moyen d'un syringe dans un sac à gants (atmosphère d'azote).

Des analyses du pH, du potentiel d'oxydoréduction (POR), des sulfates, des métaux, du NH_4^+ , de l'alcalinité, du COD, du COT, des sulfures, et des décomptes bactériens ont été menées. Les échantillons pour l'analyse du sulfate, des métaux, du NH_4^+ , de l'alcalinité, du COD, et des sulfures ont été pré-filtrés à travers des filtres de papier cellulose-acetate de 0.45 μm . Les analyses du pH, POR, sulfate, COD, et métaux ont été réalisées à des intervalles de 5 à 9 jours; parallèlement celles du sulfure totale ont été faites tous les 5 à 12 jours. L'alcalinité et le décompte bactérien ont été testés 3 fois pendant l'expérience tandis que le NH_4^+ et le TOC ont été mesurés uniquement au début et à la fin de l'expérience (jours 0 et 70). Les analyses de sulfate, fer ferreux et sulfure ont été faites par spectrophotométrie selon le protocole énoncé dans le manuel d'instruction HACH (HACH, 1998), les COD et COT ont été mesurés selon la méthodologie écrite dans Standard Method 5310 C (Clesceri et al., 1998), la mesure d'alcalinité a respecté le Standard Method 2320 B (Clesceri et al., 1998) tandis que celle du NH_4^+ a respecté les instructions du Standard Method 4500-NH₃ G (Clesceri et al., 1998). L'analyse des métaux a été faite par « inductively coupled plasma atomic emission spectrometry » (ICP-AES). Pour le décompte bactérien, la méthode du nombre le plus probable (NPP) a été appliquée selon ASTM (1995).

Les résultats

Caractérisation des substances organiques naturels.

Les résultats de la caractérisation organique se trouvent dans le Tableau 3.3 du chapitre 3. Ils montrent premièrement que le fumier de volaille contient les pourcentages de COD, cires et résines, SFD, et TKN les plus importants parmi les substances testées, soit respectivement (en % p/p) 6, 17, 63, 6. Pourtant, il contient également le plus bas ratio carbone/azote (C/N), 3,3, ce qui avec sa faible teneur en COT (19%) aurait pu laisser penser qu'il était limité en carbone. Deuxièmement, les ratios excessifs du C/N des matières en bois suggèrent qu'elles sont limitées en azote. Parallèlement, le compost de feuilles a la plus basse teneur en COT et une très faible teneur en COD. Cependant son ratio C/N autour de 16 est peut être le plus adéquat pour les BSR, si l'on se réfère à Gerhart (1981) qui estime le ratio idéal pour les BSR à environ 16.7. Enfin la tourbe de sphaigne, avec un C/N de 58, a quant à elle, un ratio dans la gamme des 45-120 telle que suggérée par Okabe et al. (1992).

Les essais en cuvée

Les résultats des analyses de l'expérience en cuvée se trouvent dans le Tableau 3.4 et les Figures 3.2-3.6 du chapitre 3, ainsi que dans l'Annexe IV.

Tout d'abord, les résultats montrent que les pH obtenus sont tous cohérents avec les niveaux définis dans la littérature comme acceptables pour la sulfato-réduction (pH entre 5 et 9 selon Eger et Wagner (1995), 7.5 et 8 selon Hao et al., (1996)) et du POR (-300

mV selon Prasad et al. (1999)). Ces niveaux de pH ont été atteints assez rapidement dans tous les réacteurs sauf celui avec de l'éthanol et celui avec de la tourbe de sphaigne pour lesquels l'augmentation du pH est plus lente. Par ailleurs, le réacteur avec de l'éthanol n'a jamais atteint un pH supérieur à 6.5 alors que tous les autres réacteurs ont atteint un pH entre 7 et 8.5. De même, les réacteurs avec de l'éthanol et de la tourbe de sphaigne n'ont jamais atteint un POR plus bas que -200 mV tandis que les autres réacteurs, sauf celui des copeaux du bois d'érable, se sont stabilisés à un POR d'environ -300 mV.

Deuxièmement, l'analyse des teneurs en sulfate montre des divergences entre les différents substrats. Une diminution du sulfate a été observée de manière prononcée dans les réacteurs contenant le mélange de matières organiques : tout d'abord dans le réacteur ne contenant pas de formaldéhyde puis dans celui ayant été stérilisé. Parmi les réacteurs à source de carbone unique, seuls le réacteur avec de l'éthanol et un de ceux avec les copeaux d'érable ont également montré une diminution en sulfate. A l'opposé, le sédiment de ruisseaux et le fumier de volaille contenaient une teneur élevée en sulfate. Simultanément, le compost de feuilles et le fumier de volaille contenaient également une teneur élevée en soufre. De plus, quelle que soit la source de carbone organique utilisée, le sulfate mesuré dans le DMA synthétique présentait une diminution d'environ 2000 mg/l par rapport aux niveaux relevés lors de la préparation. Certains réacteurs (mélange de matières organiques, fumier de volaille, compost de feuilles) montrant une concentration de sulfate plus élevée que le DMA, il a été supposé que du sulfate était apparu suite à une probable dissolution des composants suivants : les substrats eux-

mêmes, le sédiment de ruisseaux et le sulfate qui a co-précipité avec les (oxy)hydroxides de fer produits pendant la préparation du DMA.

De plus, le réacteur avec le fumier de volaille qui présentait la concentration de sulfate mesuré la plus élevée, contenait également les concentrations les plus élevées de Cd, Ni, Zn, et COD. Le réacteur contenant de l'éthanol a, quant à lui, montré les taux les plus élevés en Mn et Fe, et la deuxième plus forte concentration en COD. En excluant le réacteur avec le fumier, les réacteurs avec les taux les plus élevés en COD étaient ceux montrant le plus fort taux de sulfato-réduction, c'est à dire les réacteurs avec le mélange des matières organiques, l'éthanol, et les copeaux d'érable. Par contre, plusieurs éléments permettent de penser que les taux de sulfato-réduction ont été sous-estimés par les mesures : tout d'abord parce que les conditions étaient favorables à la croissance des BSR, d'autre part parce que les mesures montrent qu'elles étaient effectivement en croissance, et enfin parce que des sulfures ont été détectés.

Une brève étude sur la cinétique de la diminution des métaux a donné divers ordres de réaction et différentes constantes k , pour des métaux variés et différents réacteurs (Annexe V).

Enfin, les résultats suggèrent que la concentration de formaldéhyde de 0,015% (p/v) a inhibé l'activité des BSR mais seulement pour une courte durée et n'a pas changé les propriétés physico-chimiques du milieu.

Conclusions

L'analyse des différents résultats expérimentaux conduit en tout premier lieu à conclure que la faible teneur en BSR du sédiment de ruisseaux (la source de BSR) a été partiellement responsable des longs temps d'acclimation et des faibles taux observés de réduction de sulfate (T_{0-70}) à la fois dans les réacteurs contenant des mélanges de matières organiques naturelles, mais également dans le réacteur qui contenait de l'éthanol. Allonger la durée des essais pourrait permettre d'observer un taux de sulfato-réduction dans le cas des réacteurs de substrats organiques naturels uniques, étant donné des recensements significatifs de BSR et le fait d'avoir sous-estimé les taux de sulfato-réduction (à cause de la dissolution pendant l'expérience du sulfate présent dans le sédiment du ruisseau et dans le co-précipité aux (oxy)hydroxydes ferriques du DMA synthétique).

Cependant pendant les essais en cuvée de 70 jours, malgré des conditions adéquates, tels qu'un pH proche de la neutralité, un POR bas et une abondance d'azote, aucun des substrats organiques naturels n'est significativement apparu comme une source unique de carbone fiable pour les BSR. En effet, parmi les sources de carbone organique uniques testées, seul l'éthanol et un des échantillons de copeaux de bois d'érable ont été efficaces dans le court-terme comme donneurs d'électrons pour la sulfato-réduction par les BSR. L'expérience a ainsi permis de comparer la performance d'une part d'un substrat organique simple tel que l'éthanol et d'autre part de substrats naturels plus

complexes voire de substrats composés (mélange de différentes sources organiques). La durée restreinte de l'expérience ne permet cependant pas d'extrapoler des conclusions sur l'usage de ces substrats sur le terrain et en particulier sur leur efficacité à long-terme.

En complément, la confrontation des résultats obtenus d'une part sur la caractérisation des substrats organiques naturels et d'autre part sur les essais en cuvette, permet de conclure que la caractérisation individuelle des substrats naturels organiques a informé sur leur composition carbonique et leur solubilité, mais n'a pas permis de conclure sur leur capacité à favoriser la réduction du sulfate et la précipitation des métaux. Bien que des taux élevés en carbone organique dissous et en substances facilement disponibles ainsi que des ratios C/N adéquats aient été trouvés dans les « déchets organiques » tels que la tourbe de sphaigne, le compost de feuilles et le fumier de volaille, aucun d'entre eux n'a montré, dans les essais en cuvette, une bonne réactivité en tant que source unique de carbone pour les BSR. Les « déchets cellulosiques » dont les copeaux compostés de conifère et le brin de scie de conifère, qui contenaient des ratios C/N excessifs, n'ont également pas montré une forte réactivité pendant les essais en cuvette.

Finalement, les résultats de l'expérience en cuvette suggèrent que les proportions des substrats naturels organiques dans les mélanges testés lors de cette étude sont efficaces pour un usage dans les bioréacteurs in situ ou MRSR. Le mélange de substrats naturels organiques contenant des copeaux de bois d'érable, du fumier de volaille et du compost de feuilles, a été efficace avec ou sans formaldéhyde, en tant que promoteur de la

réduction de sulfate et de l'enlèvement des métaux (94-99%). A l'opposé, les substrats organiques uniques ne sont généralement pas apparus efficaces à favoriser la sulfato-réduction. Ainsi parmi ces substrats, seuls les réacteurs contenant de l'éthanol et un des réacteurs contenant des copeaux de bois d'érable ont montré de la sulfato-réduction tandis que le réacteur qui contenait le fumier de volaille composté s'est révélé, en général, le moins efficace pour l'enlèvement des métaux. En conclusion, ces résultats laissent supposer que le fait de mélanger des substrats permet de regrouper différentes souches de bactéries ainsi que des composés de carbone différents, la contribution combinée de ces éléments favorisant les réactions de sulfato-réduction par les BSR.

Enfin, la concentration de formaldéhyde limitée à 0,015% (p/v) a inhibé l'activité des BSR uniquement pour une courte durée et n'a pas changé les propriétés physico-chimiques du milieu. Une plus forte dose doit et peut être utilisée pour arrêter l'activité bactérienne. Parallèlement, l'effet toxique/inhibitoire des substances présentes dans le bois coniférique n'a pas pu être confirmé. En effet, bien que les réacteurs qui en contenaient ont présenté des taux finaux de BSR parmi les plus bas, aucune différence significative entre eux et les autres réacteurs contenant une seule source de carbone n'a été mise en évidence.

Recommandations

L'expérience acquise au cours de cette expérimentation permet de formuler les recommandations suivantes.

Tout d'abord, les BSR indigènes dans chaque source de carbone devraient être identifiées et quantifiées en préambule de toute nouvelle expérience. En effet, étant donné la réactivité observée au cours de cette expérience pour le mélange de substrat, il semble intéressant de tester si les bactéries intrinsèques à une source de carbone sont plus aptes à proliférer en présence d'une autre souche de bactéries et de ses sous-produits de la dégradation anaérobie, ou si le fait de mélanger différentes souches de bactéries en augmentant la diversité microbiologique produit un effet positif.

D'autre part, les produits de la digestion anaérobie des substances organiques et leurs mélanges devraient être identifiés et suivis pour que les conditions créées par cette dégradation préliminaire soient mieux comprises. En effet, comme les BSR n'utilisent pas directement de sources de carbone complexes et que les autres microorganismes peuvent présenter un avantage métabolique pour les molécules plus simples (l'acétate, le propionate, etc.), les molécules produites par la dégradation préliminaire devrait être investiguées.

Troisièmement, les substances conifériques, présentes en forte quantité à la proximité de plusieurs sites miniers, devraient également être testées en réduction de sulfate dans des mélanges contenant d'autres sources de carbone, car leurs performances en tant que substrat unique n'ont pas été significativement différentes de celles des autres substrats organiques naturels. Les performances de ces substances en tant que partie d'un mélange

de substrats organiques pour les BSR pourraient donc être comparées à celle des copeaux d'érable et leurs effets inhibiteurs potentiels pourraient être mieux compris et quantifiés.

De plus, d'autres études ayant montré d'une part, une corrélation entre le contenu en lignin et la biodégradabilité et d'autre part, que la cellulose est le composé organique prédominant dans les substances naturelles organiques, les contenus en cellulose et en lignin des substrats naturels organiques devraient eux aussi être quantifiés. De la même manière, les contenus en phosphore et en azote pourraient également être suivis puisque ces nutriments sont également nécessaires pour la croissance des BSR.

Enfin, les futurs essais en cuvette avec des substrats naturels organiques devraient être programmés avec une durée d'expérimentation plus longue pour pouvoir mieux observer les différences en réactivité entre des substrats qui montrent une cinétique lente de réduction de sulfate. Simultanément, des essais dynamiques en colonne devraient être inclus dans les recherches futures, car les substances toxiques/inhibitrices qui s'accumulent dans les réacteurs en cuvette sont vidées des réacteurs en colonne et des études précédentes ont mis en évidence l'importance à la fois de la perméabilité des mélanges réactifs et du temps de rétention hydraulique (TRH).

TABLE OF CONTENTS

DEDICATION.....	iv
ACKNOWLEDGEMENTS.....	v
RESUMÉ.....	vi
ABSTRACT.....	xii
CONSENSÉ EN FRANÇAIS.....	xvii
TABLE OF CONTENTS.....	xxxii
LIST OF TABLES.....	xxxvi
LIST OF FIGURES.....	xxxvii
LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS.....	xxxviii
LIST OF APPENDICES.....	xi
 1. INTRODUCTION.....	 1
1.1 Context.....	1
1.2 Research Hypothesis.....	3
1.3 Objectives and Content of Thesis.....	3
 2. LITTERATURE REVIEW.....	 6
2.1 Acid Mine Drainage.....	6
2.1.1 Formation.....	6
2.1.2 Neutralization.....	7

2.1.3 Treatment.....	8
2.1.3.1 Active treatment.....	8
2.1.3.2 Passive treatment.....	8
2.2 Sulphate-reducing Bacteria.....	10
2.21 Sulphate-reducing Bacteria and metal sulphide precipitation.....	10
2.22 Ideal Conditions for SRB.....	11
2.23 Sulphide and metal sulphide inhibition of SRB.....	14
2.24 Metal toxicity to SRB.....	14
2.25 Carbon sources for SRB.....	15
2.3 Carbon sources for passive bioreactors or PRBs for AMD treatment.....	16
2.4 Supplementary parameters and relations between laboratory and full scale passive bioreactors.....	23
2.5 Sterilization of media.....	26
 3. CHARACTERIZATION AND REACTIVITY ASSESSMENT OF ORGANIC SUBSTRATES FOR SULPHATE-REDUCING BACTERIA IN ACID MINE DRAINAGE TREATMENT.....	 29
3.1 Abstract.....	29
3.2 Introduction.....	31
3.3 Materials and Methods.....	34

3.3.1 Organic Substrates.....	34
3.3.2 Chemical characterization of natural organic substrates.....	34
3.3.3 Analysis of reactivity of substrates in AMD batch experiments....	35
3.3.3.1 Experimental set-up.....	35
3.3.3.2 Sampling and Analyses.....	39
3.4 Results and Discussion.....	42
3.4.1 Chemical characterization of organic substrates.....	42
3.4.2 Batch experiments.....	44
3.4.2.1 Ph and ORP.....	44
3.4.2.2 Sulphate reduction.....	46
3.4.2.3 Enumeration of SRB.....	51
3.4.2.4 Dissolved Organic Carbon (DOC).....	52
3.4.2.5 Metals.....	53
3.4.2.5.1 Metal Removal Rates.....	58
3.4.2.6 Alkalinity and NH_4^+	59
3.4.2.7 Sulphides.....	61
3.4.3 Overall Substrate Performance.....	61
3.5 Conclusions.....	64
3.6 Acknowledgements.....	65
3.7 References.....	65

4.CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....	74
4.1 Conclusions.....	74
4.2 Recommendations.....	78
 5. REFERENCES.....	 81

LIST OF TABLES

Table 3.1: Composition of the 9 organic reactive mixtures assessed in sulphate reduction batch reactors.....	37
Table 3.2: Synthetic AMD concentrations measured in 9 organic substrate batch reactors.....	38
Table 3.3: Chemical characterization of organic carbon sources.....	44
Table 3.4: Calculated sulphate reduction rates for the 7 reactor replicates demonstrating sulphate reduction (mg/l/day) in batch experiments.....	50

LIST OF FIGURES

Figure 3.1 Glove bag with batch reactors.....	40
Figure 3.2 Variation of pH and ORP in 9 organic substrate batch reactors.....	45
Figure 3.3 Variation of sulphate and dissolved organic carbon (DOC) concentration in 9 organic substrate batch reactors.....	47
Figure 3.4 Cd and Ni concentration in 9 organic substrate batch reactors.....	54
Figure 3.5 Mn and Zn concentration in 9 organic substrate batch reactors.....	55
Figure 3.6 Fe concentration in 9 organic substrate batch reactors.....	56

LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

SYMBOLS

Eh electrical potential

h hour

l litre

mg milligrams

mV millivolts

ABBREVIATIONS

AMD acid mine drainage

BOD biochemical oxygen demand

C/N carbon/nitrogen ratio

COD chemical oxygen demand

DOC dissolved organic carbon

EAS easily available substances

FFA forage fibre analysis

MPN most probable number

ORP oxidation reduction potential

PRB permeable reactive barrier

SRB sulphate-reducing bacteria

TIC total inorganic carbon

TKN total kjeldahl nitrogen

TOC total organic carbon

BSR bactéries sulfato-réductrices

DMA drainage minier acide

CIT carbone inorganique total

COD carbone organique dissous

COT carbone organique total

C/N ratio carbone/azote

MRSR mur réactif sulfato-réducteur

NPP nombre le plus probable

NTK azote kjeldahl total

POR potentiel d'oxydoréduction

SFD substances facilement disponibles

LIST OF APPENDICES

Appendix I: Protocole P62-B: Analyse des sources de carbone qui seront utilisées pour le traitement du drainage minier acide au moyen d'un mur réactif sulfato-réducteur (MRSR) and Protocole P-54D: Détermination des substances facilement disponibles d'un matériel organique (SFD)	93
Appendix II: Protocole P-36A: Choix d'un mélange réactif optimal qui sera utilisé pour le traitement du drainage minier acide au moyen d'un mur réactif sulfato-réducteur (MRSR).....	110
Appendix III: Protocole P28-A: Dénombrement total des bactéries sulfato-réductrices (BSR) par la méthode des NPP en tube.....	119
Appendix IV: Supplementary graphs and tables from batch experiment not included in chapter 3.....	128
Appendix V: Metal removal kinetic modelling.....	175

1. INTRODUCTION

1.1 Context

Mining operations can be the source of a serious environmental problem known as acid mine drainage, or AMD. The problem begins when metal sulfide-containing waste rock and ore tailings are exposed to the elements. In a series of bacterially catalyzed reactions launched upon exposure to oxygen and water, sulphur is oxidized to sulphate, which, along with metal ions, becomes dissolved in the draining water. Acidity is produced via free hydrogen and metal ions. The toxic combination of low pH and high concentrations of dissolved metals and sulphate threatens the adjacent ecosystem. In addition, as pH decreases, more metals are dissolved in this self-perpetuating, bacterially mediated process. The current environmental protection focus lies in AMD prevention at the source. Nevertheless, AMD propagates from the very numerous mine sites, open and closed, that exist throughout Canada and the world (Aubertin et al., 2002).

Sulphate-reducing bacteria (SRB) show promise in the treatment of acid mine drainage (AMD) through their use in in situ permeable reactive barriers (PRB) or in on-site passive systems (Gazea et al., 1996; Benner et al., 1999; 2002; Neculita et al., 2004). PRBs are installed in the path of the contaminated groundwater plume, and are designed to have physical characteristics similar to those of the aquifer. They contain a carbon source for the SRB, a porous support such as sand and gravel, and a neutralizing agent such as limestone. Another method is the channelling of AMD into on-site anaerobic cells (bioreactors) filled with compost (Johnson and Hallberg, 2004b), where the

sulphate reduction process treats the drainage prior to discharge into the surrounding ecosystem. Hulshof et al. (2003) proposed to treat AMD at the source; a natural organic substrate is mixed with mine tailings upon disposal to stimulate sulphate reduction conditions, thus treating AMD in situ as it is produced. Such “passive” treatment systems have an advantage over more conventional “active” systems that include neutralization with alkaline substances such as limestone, in that they require less maintenance. Further, the sulphate reduction process promotes the precipitation of metals as insoluble sulphides and also increases the water alkalinity. A variety of inexpensive natural organic substrates for SRB, such as wood chips and various livestock manures, are widely available.

Few studies in the literature characterize the carbon sources for SRB and fewer studies attempt to quantify the degradability of organic carbon present in different natural organic substrates. However, careful selection of a suitable carbon source is of paramount importance to ensure performance and longevity in biological AMD treatment.

Recently, Gibert et al. (2004) studied the degradability of compost, sheep and poultry manures and oak leaf, concluding that the lower the lignin content of a substrate, the greater the degradability. There is growing evidence that sulphate reduction effectiveness can be augmented by the use of natural organic substrate mixtures versus single substrates (Waybrant et al., 1998; Cocos et al., 2002). Unfortunately, the

effectiveness of mixtures of the natural organic substrates themselves was not assessed in the Gibert et al. (2004) study. Further, no metals were added in the study and thus the sulphate reduction process was not representative of true AMD treatment, not having taken into account metal toxicity to SRB. A novel mixture of various substrates has been proposed by Cocos et al. (2002), citing poultry manure as a key constituent and leaf compost and maple wood chips as additional components.

SRB carbon sources include volatile fatty acids (acetate, propionate, butyrate), short-chain fatty acids (lactate, pyruvate, malate), other fermentative products such as ethanol, and occasionally long-chain fatty acids and certain aromatic compounds. Polymers are generally not accessible to SRB, who depend on the processes of other heterotrophic bacteria to supply them with degradation and fermentation end-products such as compounds of low molecular weight (lactate, pyruvate, formate, etc.). Thus, the preparation of a substrate mixture to be used for biological passive treatment of AMD requires knowledge of its chemical make-up, notably in terms of organic carbon content.

1.2 Research Hypothesis

The major hypothesis of the research performed was that chemical characterization of natural organic substrates could lead to predicting their ability to promote sulphate reduction and metal removal.

1.3 Objectives and Content of Thesis

The objective of the current study was to quantify the relationship between chemical composition of a given natural organic carbon source and its degradability and ability to promote sulphate reduction and metal removal. This was to be achieved through the chemical characterization of different natural organic substrates (maple wood chips, sphagnum peat moss, leaf compost, composted conifer chips, poultry manure, conifer sawdust) and the subsequent testing of their reactivity as carbon sources for SRB in a batch experiment. The characterization analyses consisted of quantifying the water-dissolvable organic carbon (DOC), total organic carbon (TOC), nitrogen (total kjeldahl nitrogen, TKN) and easily available or bioaccessible fraction (easily available substances, EAS) of the substrates.

Another objective was to compare the performance of the various natural organic substrates as single carbon sources for SRB in reactive mixtures, and to compare their performance with that of a mixture containing several substrates, notably maple wood chips, poultry manure and leaf compost. Metal removal under abiotic conditions was also to be assessed by sterilizing an additional several-substrate mixture with formaldehyde.

The thesis begins with a brief literature review in chapter 2, followed by a detailed description of the procedures and results of the characterization and batch experiments and a pertinent discussion with conclusions in chapter 3. The thesis closes with overall

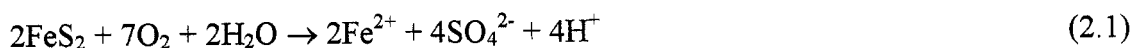
conclusions and recommendations in chapter 4, with detailed experimental protocols and lengthy tables and figures included in the appendices.

2. LITTERATURE REVIEW

2.1 Acid Mine Drainage

2.1.1 Formation

Acid mine drainage (AMD) is formed by natural oxidation of sulphide-containing ore, especially pyrite, when exposed to air and water. AMD is characterized by a pH less than 6, elevated acidity, high dissolved metal and sulphate concentrations and it also usually has high solids and low organic carbon content (Aubertin et al., 2002). The oxidation of metal sulphide can be considered to be either direct or indirect (Kuyucak and St-Germain, 1993; Christensen et al., 1996; Stumm and Morgan: Aubertin et al., 2002), where direct oxidation entails solid pyrite coming into contact with air and water:



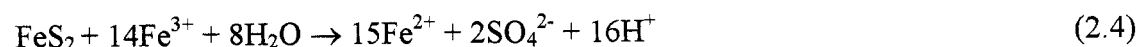
and indirect oxidation results when an oxidizing ion such as Fe^{3+} is formed via Fe^{2+} :



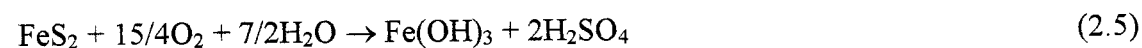
Ferric iron can precipitate as ferrihydrite at higher pH:



However, at pH below about 3, Fe^{3+} can oxidize pyrite:



The global equation for ferric hydroxide and sulphuric acid formation results from the combination of equations 2.1 through 2.3:

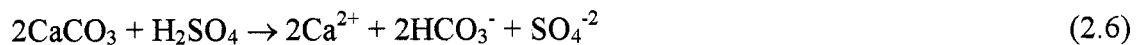


Evidently, indirect oxidation produces far more protons than the direct mechanism, that is to say 16 moles of H^+ per mole of FeS_2 as opposed to 4. The direct mechanism occurs

mainly between pH 4 and 7 and the direct oxidation step is considered to be slower than the indirect one, although both mechanisms (reactions 2.1 and 2.2) are bacterially catalyzed by various bacteria such as *Acidithiobacillus ferrooxydans* (Aubertin et al., 2002). Aubertin et al. (2002) note that the acceleration of the indirect mechanism (up to 10^6 times) is attributed to the heightened activity of the acidophilic bacteria at low pH, however the relative importance of these bacteria and the importance of the pH in oxidation remains to be fully clarified.

2.1.2 Neutralization

The three major mineral groups having a potential to neutralize AMD by neutralizing sulphuric acid are the carbonates, hydroxides and silicates (Stumm and Morgan; Aubertin et al., 2002). Of the most effective are the carbonates dolomite and calcite, where two moles of calcite (2.6) or one mole of dolomite (2.7) are required to neutralize one mole of sulphuric acid:



and as the reactions proceed, various secondary minerals may precipitate, such as gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), bassanite ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$), anhydrite (CaSO_4), epsomite ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and hexahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). The dissolution of calcite is relatively rapid and can keep conditions in quasi-equilibrium by buffering pH in the range of 6 and 7.5, whereas other carbonates dissolve more slowly and equilibrium conditions are not always met. Ferrous iron and bicarbonate ion can react to form siderite (2.8), whose

precipitation can keep the concentration of dissolved iron low, although proton acidity is generated.



2.1.3 Treatment

2.1.3.1 Active treatment

The conventional chemical treatment of acid mine drainage focuses on neutralizing the water and precipitating the dissolved metals. Alkaline materials, such as hydroxides or carbonates are added to acidic water, but such processes generate sludges that need to be disposed of, and are generally costly as a considerable amount of neutralizing mineral is necessary and needs to be reapplied periodically (Gazea et al., 1996; Aubertin et al., 2002). Sludges generated in chemical treatment are characteristically less dense and less stable than their “passive” treatment counterparts. Alkaline materials augment the pH, and acceleration of the chemical oxidation rate of ferrous iron causes many of the metals to precipitate as hydroxides and carbonates (Johnson and Hallberg, 2004a). Neutralising agents, varying in cost and effectiveness, include lime (calcium oxide), hydrated slaked lime, calcium carbonate, sodium carbonate, sodium hydroxide, and magnesium oxide and hydroxide.

2.1.3.2 Passive treatment

Various passive remediation techniques are now used in order to maximize effluent treatment and minimize cost. One method consists of using anoxic limestone drains

(ALD) which add alkali to AMD, meanwhile keeping iron in its reduced (ferrous) form (Gazea et al., 1996; Johnson and Hallberg, 2004a). This prevents “armouring” of the drain surface with ferric hydroxide and a consequent reduction in its effectiveness. The partial pressure of carbon dioxide is increased within the drain, and limestone dissolution is accelerated, thereby increasing the alkalinity (Johnson and Hallberg, 2004a). Such drains are not suitable for AMD waters high in iron or aluminum, as aluminum hydroxides plug the drain flow path, leading to decreased permeability (Gazea et al., 1996).

Another passive method is artificial wetlands (Gazea et al., 1996; Webb et al., 1998; Aubertin et al., 2002; Johnson and Hallberg, 2004). Aerobic wetlands, intended for net-alkaline waters and constructed in the path of AMD, are designed to take metals out of the water via plant uptake and hydroxide precipitation. The alkalinity buffers acidity produced by the hydrolysis of Fe^{3+} . Anaerobic wetlands are intended for net-alkaline waters and are often called compost wetlands or compost bioreactors (Gazea et al., 1996; Johnson and Hallberg, 2004a). Compost bioreactors generate alkalinity through bacterial sulphate reduction and limestone dissolution. One method channels AMD into on-site anaerobic polyethylene-encased anaerobic cells (bioreactors) filled with compost (Johnson and Hallberg, 2004b), where the sulphate reduction process treats the drainage prior to discharge into the surrounding ecosystem. The anaerobic reactors can be coupled with aerobic oxidizing systems to precipitate metals such as aluminum.

A technology that is currently receiving a lot of attention for AMD treatment is organic carbon containing permeable reactive barriers (PRB). In a PRB, an organic carbon source is combined with a porous support like silica sand or quartz (and possibly zero-valent iron to additionally promote reducing conditions) and placed in the path of underground AMD (Benner et al., 1999; 2002). Hulshof et al. (2003) propose another method of treating AMD at the source; a natural organic substrate is mixed with mine tailings upon disposal to stimulate sulphate reduction conditions, thus treating AMD in situ layers as it is produced. PRBs and treatment cells are also used to treat mine and otherwise contaminated waters containing various other contaminants, like As and U (Gu et al., 2002; Morrison et al., 2002).

2.2 Sulphate reducing Bacteria

2.2.1 Sulphate reduction and metal sulphide precipitation

Sulphate is one of the most common anions in natural water, and, because of its physico-chemical properties, it cannot be reduced chemically in the natural environment (Postgate, 1984). Hence, sulphate reducing bacteria (SRB) play a considerable role in the biological sulphur cycle, producing H_2S via dissimilatory sulphate reduction (Postgate, 1984).

Sulphate reducing bacteria are strict anaerobes with various morphologies using sulphate as the terminal electron acceptor during oxidation of organic material. Sulphate is thus reduced to sulphide (H_2S) from a simple carbon source (CH_2O), additionally producing

alkalinity, via the following simplified reaction (Gibson, 1990; Gazea et al., 1996; Waybrant et al., 1998):



H_2S is toxic and corrosive. The H_2S can be toxic to aerobic microorganisms and noxious to other animals, as well as being prone to damaging pipelines, pumping equipment, reservoirs, and sewage networks (Beaulieu, 2001).

SRB are present in anoxic zones such as marine and lake sediments, wetlands, sewers, anaerobic digesters and certain contaminated sites (Widell, 1998). They exist in animal and human intestines and also in extreme environments such as the ocean floor and hot springs and the most abundant and well-known species of SRB are the *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* *genii* (Postgate, 1984).

In the presence of dissolved metals (Me^{2+}), like in acid mine drainage, the sulphide species are precipitated via the mechanisms:



Thus, SRB have a several functions in AMD treatment: They reduce sulphate, precipitate metals, and generate alkalinity (reaction 2.9).

2.22 Ideal Conditions for SRB and competition with other microorganisms

As obligate anaerobes SRB require an anoxic environment, a near-neutral pH, and an organic carbon and sulphate source (Postgate, 1984). Eh values for sulphate reduction reported in the literature differ somewhat, but typically fall between -200 mV (Gibert et al., 2003) and -500 mV (Prasad et al., 1999). Meanwhile, ideal pH values for SRB proliferation vary as well, with an optimum range between 5 and 9 (Eger and Wagner, 1995) or between 7.5 and 8.0 (Hao et al., 1996), although an optimum of 6.7 has been reported in a sulphate reduction experiment using lactate as the substrate (Reis et al., 1992). Sulphate reduction has been observed at pH values as low as 3 and 4 (Hao et al., 1996; Tsukamoto et al., 2004).

SRB require nutrients such as nitrogen and phosphorus for growth, with proportions depending on the species and conditions. Reported carbon/nitrogen (C/N) and carbon/nitrogen/phosphorous (C/N/P) ratios are also variable, being as specific as (C/N/P) 110/7/1 (Gerhart, 1981), or having a C/N range as large as 45 to 120 (Okabe et al., 1992).

SRB can tolerate a wide range of temperatures and can adapt to changing conditions, but optimum temperature for SRB growth in sediments is 30°C (Postgate, 1984). Nevertheless, known SRB cannot tolerate overly extreme temperatures, such as under -5°C or over 100°C (Hao et al., 1996). It has been reported that the efficiency of sulphate reduction did not decrease when temperature was decreased to 6°C after allowing the

bacteria to acclimate at higher temperature (Kuyucak and St-Germain, 1994; Tsukamoto et al., 2004).

Equation 2.9 demonstrates that the theoretical value of the COD/SO₄ ratio is 0.67, but the true optimum depends on the physicochemical characteristics of each particular wastewater, and whether or not the maximum degradation of the organic matter, or the reduction of sulphate or both are the key goals (Kosinska and Miskiewicz, 1999). Results from a test using *Desulfovibrio desulfuricans*, suggested that the COD/SO₄ ratio of a particular wastewater should be determined and thus adjusted to the proportion desired (Kosinska and Miskiewicz, 1999). Prasad et al. (1999) suggested an optimum of 1.6 or below when using simple substrates, but as the substrates become more complex, a higher ratio is necessary because all the carbon is not available to SRB.

It has been reported that if the COD/SO₄ ratio is lower than 0.67, sulphate reducers predominate (Omil et al., 1998). However, other studies have shown that for a ratio below 0.43, SRB dominate over methanogens (Uberoi and Bhattacharya, 1995). Between ratios 0.43 and 1.01, both methanogens and SRB proliferated, whereas above 1.01, methanogens were dominant (Uberoi and Bhattacharya, 1995).

In an anaerobic environment, SRB coexist with other anaerobic organisms, namely acetogens, acidogens and methanogens (Tuttle et al., 1969; Kuyucak and St-Germain, 1994; Hulshoff Pol et al., 1998). In terms of free energy change, SRB have a

thermodynamic advantage over these other microorganisms. The SRB Gibbs free energy (ΔG°) under standard conditions is -151.9 kJ/reaction compared to -135.6 kJ/reaction for methanogens and -104.6 kJ/reaction for homoacetogens (Mizuno et al., 1998). That is to say that at a given temperature, SRB would out-compete the other two species.

2.23 Sulphide and metal sulphide inhibition of SRB

Metal sulphides provide physical inhibition of SRB activity during AMD treatment by coating the bacterial cell and blocking SRB access to sulphate and organic substrate (Utgikar et al., 2002). However, formation of metal sulphides inhibits SRB activity in a well mixed system, but not in a quiescent system such as most probable number (MPN) tubes because in the latter system, gravity allows for the settling of the heavier metal sulphides away from the bacterial cells. That is to say that in an on site flow-through bioreactor, geometry and flow conditions become very important. Further, the product of sulphate reduction, free sulphide ion, S^{2-} , is toxic to SRB and most anaerobic bacteria (Postgate, 1984; Reis et al., 1992). As sulphide is distributed in aqueous environments as S^{2-} , HS^- and H_2S depending on the pH, the toxicity of sulphide is also dependent on the pH. At 25°C , 1 atm and a low pH, H_2S is the dominant species, with increasing HS^- as pH increases until at pH just less than 7, there are equal amounts of H_2S and HS^- . By a pH of about 8, mostly HS^- is found and S^{2-} very low throughout.

2.24 Metal toxicity to SRB

Various metals are toxic to SRB at higher concentrations (Hao et al., 1994; Poulson et al., 1997; Utgikar et al., 2001; 2003). SRB inhibition was found at 20 mg/l Cd, 20 mg/l Cu, 25 mg/l Zn, 20 mg/l Ni, 60 mg/l Cr in batch tests and metal mixtures had a synergistic effect (Hao et al., 1994). 10 mg/l and 13 mg/l of Ni and Zn, respectively were toxic to *D. desulfuricans*, and a combined ($\text{Ni}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$) aqueous concentration of 2.5×10^{-5} molal was toxic to the same SRB species (Poulson et al., 1997). EC100 values of 12 mg/l for copper and 20 mg/l for zinc and 7-d EC50 values of 10.5 mg/l for copper and 16.5 mg/l for zinc were reported, whereas 16 mg/l of Zn^{2+} or Cu^{2+} effectively stopped bacterial sulphate reduction (Utgikar et al., 2001). Although these studies are often limited to pure cultures and controlled, uniform conditions, metal concentrations must be taken into account when implementing biological passive treatments.

2.25 Carbon sources for SRB

As outlined in section 1.1, Volatile fatty acids (acetate, propionate, butyrate) and short-chain fatty acids (lactate, pyruvate, malate) are among the main sources of SRB carbon, and long-chain fatty acids and certain aromatic compounds are occasional substrates (Postgate, 1984; Widell, 1988; Hao et al., 1996; Beaulieu et al., 2000). Fermentative products such as ethanol (along with lactate and acetate) are additional sources and polymers such as cellulose and hemicellulose are excluded, as cellulose is not degraded by known SRB (Chang et al., 2000). Chang et al. (2000) maintain that the polysaccharide must be degraded by hydrolytic fermentative anaerobes into sulphidogen-supporting fatty acids and alcohols and those fermentative organisms grow

faster on the easily digestible substances early on; once these substances are depleted, hydrolytic fermentation is rate limiting because the products of fermentation are completely used up. Similarly, Prasad et al. (1999) report that proteins, carbohydrates and lipids (polymers) or even simple sugars are generally not accessible to SRB, who depend on the processes of other heterotrophic bacteria to supply them with degradation and fermentation end-products such as compounds of low molecular weight (lactate, pyruvate, formate, etc.).

The bacteria have access to organic carbon contained in dissolved organic matter, consisting of an easily degradable fraction of simple organic compounds, a more slowly degradable fraction consisting of say, polysaccharides, and a recalcitrant fraction that can remain in solution for as long as 180 days (Marschner and Kalbitz, 2003). Tests have shown that lactate is a better electron donor than ethanol, acetic acid, propionate, or acetate (Nagpal et al., 2000).

2.3 Carbon sources for passive bioreactors or PRBs for AMD treatment

Many experiments have been carried out to assess the reactivity of available natural organic substrates for SRB for use in permeable reactive barriers (PRB) or other in situ bioreactors. These are usually batch experiments (Waybrant et al., 1998; Prasad et al., 1999; Cocos et al., 2002; Amos and Younger, 2003; Gibert et al., 2004) or column flow-through experiments (Elliot et al., 1998; Chang et al., 2000; Waybrant et al., 2002, Gibert et al., 2003, 2004; Tsukamoto et al., 2004). Batch studies usually focus on the

reactivity of the different substrates in promoting sulphate reduction, whereas column studies often stress the importance of hydraulic retention time (HRT).

Some studies have analyzed the chemical and microbiological components of AMD PRBs in use (Zaluski et al., 2003) and others on the chemical make-up of the substrates (Prasad et al., 1999; Chang et al., 2000; Gibert et al., 2004). The substrates can be divided into the categories of cellulosic waste such as hay, alfalfa, sawdust, and wood chips and organic waste such as manures, peat, sewage sludge, molasses, and compost (Kuyucak and St-Germain, 1994). It is difficult to compare results of different studies testing the reactivity of these natural organic carbon sources, because the conditions (temperature, pH, ORP), length (hours, weeks, months, years), bacterial source (cattle manure, creek sediment, pure culture, mixed culture, no inoculum), proportions of substrate and inorganic constituents, and type (batch or column, full-scale) of each study are different. Effects of ageing/exhaustion of the organic material, clogging of the matrix and stabilization of bioreactor performance are not assessed in short-term studies as they are in long-term ones (Jong and Parry, 2003). In addition, studies using similar substrates often obtain differing or even conflicting results.

Cellulosic wastes and/or municipal compost have been investigated with varying results. In 60-day batch tests, activated sludge was an excellent substrate, followed by digested sludge and rabbit pellets (Prasad et al., 1999). A 35-week column experiment showed that spent oak from shitake farms, spent mushroom compost and sludge from a

wastepaper recycling plant were better electron donors than organic rich soil and oak chips for SRB (Chang et al., 2000). Waybrant et al. (1998) found that, when combined with inorganic constituents, pure cellulose was a poor electron donor in 125-day batch tests (Waybrant et al., 1998). In studies testing municipal compost, the compost was too low in organic carbon to support SRB growth (Gibert et al., 2004) and was a poor carbon source for SRB under high flow rates (Gibert et al., 2003).

In addition, manure and/or wood mixtures are typical combinations of organic substrates. A cow manure and sawdust (lodgepole pine and Douglas fir) mixture with and without whey addition was tested in a 23-month continuous flow study, demonstrating that whey addition increased performance for pH neutralization, alkalinity production, sulphate, Fe, Zn, Mn removal (Drury, 1999). Iron removal was nearly absent without whey, which had been added to stimulate SRB activity in one of the two reactors, as it contains fermentable water-soluble proteins, lactose and lactic acid. In a 6-month batch experiment followed by a 5-month column experiment (using creek sediment as the bacterial source), where organic single substrates (15% v/v) were accompanied by inorganic components quartz (40% v/v) and limestone (30% v/v), sheep manure was the best substrate for SRB, followed by poultry manure and oak leaf (Gibert et al., 2004). Conversely, in batch tests over 125 days, sheep manure (73% w/w) with calcite and sand was not an effective carbon source, although mixtures of several substrates (sewage sludge, leaf mulch, wood chips, sheep manure and sawdust) were very effective (Waybrant et al., 1998). Unfortunately no metals were used in the Gibert

et al. (2004) study and thus the sulphate reduction was not true AMD treatment, not having taken into account the toxicity of metals to SRB. Zaluski et al. (2003) tested cow manure and cut straw and achieved successful sulphate-reduction at proportions of 80% and 20%, respectively. Wildeman and Updergraff (1997) found that proportions of 75% and 25% of composted cow manure and planter soil, respectively, effectively removed copper and zinc, but sulphate reduction ceased after one month. In a 14-month study, mixtures of composted leaf mulch, wood chips and/or sawdust effectively removed sulphate and metals from AMD in column experiments (Waybrant et al., 2002). Also included in their mixtures were sewage sludge and/or creek sediment (bacterial source), agricultural limestone (buffer capacity and pH augments) and silica sand (porous support).

Reactivity and nutrient findings from experiments studying the suitability of in situ deposition of tailings combined with organic material to enhance sulphate reduction, as opposed to flow-through bioreactors or PRBs, also shed light on the effectiveness of the chosen carbon sources (electron donors) for SRB (Hulshof et al., 2003). The reactivity and nutrient content of two mixtures were assessed in a column experiment over 121 and 126 days, respectively. Each mixture contained more than 95% (by weight and by volume) tailings and the rest about 50% creek sediment (bacterial source) and 50% organic carbon source. The two organic carbon sources tested were wood chips (from a nearby forest product mill) and pulp waste (pulp and paper plant). Alkalinity and pH increases, sulphate reduction and metals removal were attributed to sulphate reduction

by SRB, as microbial investigations showed high SRB counts. Pulp waste performed better than wood chips, and the difference was attributed to a possible deficiency in labile organic carbon or nutrients in the wood chips. Tests had shown significantly higher P and N content in the pulp waste (0.68 and 2.96 wt % vs. 0.016 and 0.1 wt %, respectively). Thus, nutrient content appeared to exhibit its importance. Tailings were 10-20% pyrite and 75-85% non-sulphide minerals including 8% carbonates, and the two mixture proportions (tailings aside) were about 3:2 (by weight) wood chips/creek sediment and 1:1 pulp waste/creek sediment. The volume ratio (tailings/reactive material/creek sediment) was 39/10/1.

Tree barks (for use as substrates) have been compared with respect to their age and softwood/hardwood content (Tassé et al., 2002). All barks were either conifers or mixtures of conifers and hardwoods. It had been hypothesized that the younger the bark, the more reactive it would be. However, this was not the case, although the oldest and driest barks tested were also the least reactive. The most reactive bark was a mixture of hard and softwood of an age between the youngest and oldest tested. Hardwoods are considered more appropriate for sulphate reduction and barks stored in humid environments are also considered more effective because the aerobic degradation is minimized. It was further suggested that the amount of sawdust should be minimized, although it has been reported that mixtures highest in sawdust reduced sulphate with highest efficiency over the long term (Reisman et al., 2003).

The literature suggests that the efficiency of sulphate reduction using natural organic substrates as electron donors is increased when a mixture of two or more of these substrates is used (Waybrant et al., 1998, Cocos et al., 2002). As noted in section 1.1, a novel mixture of various substrates has been chosen by Cocos et al. (2002). Using synthetic AMD (including metals), a 41-day study using a multiple factor design and the modelling of the sulphate reduction rate assessed reactivity of 17 mixtures of maple wood chips, leaf compost and poultry manure (and inorganic porous supports) in batch experiments. A statistical model was developed, which, keeping the most critical parameters, is:

$$Y = 79.045 - 9.34Z_1Z_2 \quad (2.12)$$

Where

Y is the sulphate reduction rate;

$$Z_1 = X_1/X_3;$$

$$Z_2 = X_2/X_3;$$

X_1, X_2, X_3 , = weight percent wood chips, leaf compost, poultry manure, respectively.

Substituting,

$$Z_1Z_2 = X_1X_2/X_3^2 \quad (2.13)$$

A higher sulphate reduction rate would require this term to be a minimum, thus X_1X_2 would be minimized or X_3 (poultry manure) maximized. Furthermore, the squared X_3 term demonstrates further the significance of the poultry manure concentration. Poultry manure was thus an effective carbon source for SRB mediated sulphate reduction, but more importantly, the study showed the importance of mixing it with a variety of other

natural organic substrates. The best mixture in terms of sulphate reduction was composed of 3% wood chips, 30% leaf compost, 20% poultry manure (maximum proportion used in study), and 5% silica sand (wt%). Also included at constant proportions were a bacterial source (37%, creek sediment), calcium carbonate (2%), and urea (3%).

Some studies have attempted to specify certain analyses or chemical parameters intrinsic to substrates for identifying the best organic substrates for sulphate reduction (Prasad et al., 1999; Chang et al., 2000; Gibert et al., 2004). Prasad et al. (1999) used various tests, namely 1) forage fibre analysis (FFA - a method to identify the easily available substrates), 2) the biochemical oxygen demand/chemical oxygen demand (BOD/COD) ratio, 3) protein and carbohydrate contents and 4) the C/N ratio, to predict the biodegradability of substances such as digested and activated sludge and rabbit pellets. However, none of the tests alone was sufficient. Although activated sludge was predicted by all methods to be the best substrate in batch experiments (and did perform best in terms of sulphate reduction over the 60-day study, followed by digested sludge and then rabbit pellets), the FFA method and BOD/COD ratio had suggested that rabbit pellets would be the second most suitable material, whereas the protein and carbohydrate contents and C/N tests indicated digested sludge. In a 35-week column experiment, measuring the change in the cellulose, hemi-cellulose, lignin, solvent extractable and hot water extractable portions of spent oak from shitake farms, spent mushroom compost and sludge from a wastepaper recycling plant, cellulose polysaccharides were the main

components consumed (Chang et al., 2000). Very recently, Gibert et al. (2004) studied the lignin content of substrates, concluding that the lower the lignin content of a substrate, the greater its degradability.

2.4 Supplementary parameters and relations between laboratory and full scale passive bioreactors

Bacterial sulphate reduction is not the sole sink for metals, as pH increases can cause significant metal precipitation as hydroxides and carbonates or metal (oxy)hydroxides (Gibert et al., 2002; 2003) and metals can be removed by sorption to organic matter (Gibert et al., 2003). Acclimation time and AMD loading is also important. A 10-month shutdown of an anaerobic compost flow-through bioreactor allowed acclimation of a strong SRB community, capable of reducing sulphate and precipitating metals, when compared to bioreactors receiving continuous flow of AMD (Johnson and Hallberg, 2004b). The bioreactors contained 95% softwood and 5% hay as organic substrates.

Permeability of reactive mixtures has also been assessed, as well as the effect of adding alkaline agents such as limestone and that of excluding a bacterial source (Amos and Younger, 2003). Cow manure and mixtures of green waste compost, cattle slurry screenings (a fine, solid by-product of mechanical screening of cattle slurry), limestone chips and pea gravel were assessed for permeability and reactivity. Cattle manure and slurry were used as a source of sulphate reducing bacteria, as these organisms are found

in large numbers in the intestines of cattle. They found that cow manure alone was not a suitable PRB material due to low permeability and inhomogeneity, and excluded it from further studies. Their different mixtures were: 1) 50% limestone chips, 25% slurry screenings, 25% compost; 2) 75% limestone chips, 12.5% slurry screenings, 12.5% compost; 3) 50% pea gravel, 25% slurry screenings, 25% compost; 4) 50% limestone chips, 50% compost. The first mixture was expected to work better than the last two and the second was included in case the permeability of the first was too low. Based on the results of Benner et al. (1997), who concluded that the permeability of the reactive media should be one order of magnitude greater than that of the aquifer in which the reactive barrier is constructed, the second mixture was expected to have best results. The third was chosen in order to identify the effect of adding limestone and the fourth for identifying the result of excluding a rich source of SRB. To the surprise of the authors, and in contrast to the results of Benner et al. (1997), it was found that in fact the porosity (and permeability) of the mixtures increased as the organic fraction increased. That is to say, they found that mixture 1 had a permeability of one order of magnitude greater than mixture 2. This was attributed to the possible tendency of angular limestone chips to pack closely when no organic material is present. The first batch test was 36 days and mixture 2 was excluded from further study due to poor reactivity. The next phase was a 72 h batch test and in fact, the first run was meant to acclimatize the bacteria. Mixture 1 was found to be exhibiting sulphate reduction as iron sulphide was found, but mixture 3 also had a black precipitate after the first run. In mixture 4, however, metal and sulphate removal was attributed to other mechanisms. Mixture 1

added greater alkalinity and removed acidity and metals better than mixture 3, but treatment effectiveness by both mixtures decreased with time.

Column experiments are closer to field flow-through conditions than batch experiments. Likewise, caution must be used when applying laboratory results to the design of full-scale field treatment systems, because the conditions are seldom alike. Even field conditions recreated in a laboratory will exclude various physical, chemical and microbiological details because in a laboratory, conditions are controlled and systems often closed. In the field, systems are subject to natural variations such as rainfall and temperature fluctuations. These field conditions change from season to season and from year to year. Laboratory experiments are rarely longer than 1, 2 or 3 years in controlled conditions, whereas field bioreactors are required to last for several years in only semi-predictable conditions. Since bacterial sulphate reduction appears to be reaction rate limited and thus residence time is of paramount importance, it is difficult to extrapolate batch experiments to continuous flow PRB's (Gibert et al., 2002). Residence time in the Nickel Rim barrier (having dimensions of 3.6 m deep, 15 m perpendicular to flow and 4 m in the flow direction) is about 90 days (Benner et al., 1997; 2002).

The effectiveness of the full-scale PRB at the Nickel Rim site near Sudbury, Ontario, installed in 1995 and monitored over a 38-month period, has been described (Benner et al., 2002). Sulphate reduction had decreased by 30% and Fe removal by 50%, but despite this decrease in effectiveness over time, the PRB demonstrated that such a field

application was a viable remediation option. The sulphate reduction rate decreased sharply in the first three months, but more gradually over the remaining 35. A decline in labile carbon in preferential flow areas, caused by hydraulic gradients within the barrier, was found to be mainly responsible for the decrease in effectiveness. Mineral precipitations and dissolutions were also highly prevalent. Data showed that SRB populations were highest in those zones where the residence times were lowest, but Fe and SO_4^{2-} concentrations were highest. This suggested that bacteria were responding to observed vertical variations in water chemistry, as opposed to controlling them. A related study noted that calculations based on column studies indicate that the barrier could potentially be used for more than 15 years, however such direct transfer of results neglected possible field effects such as preferential flow, preferential mass flux, and low temperatures that inhibit microbial activity (Benner et al., 1999).

Modeling of the sulphate reduction rate has been successfully performed. In a 424-day column experiment, under the hypothesis that the sulphate reduction rate was only dependent on the sulphate concentration when it was low, Amos et al. (2004) showed good modeling of the sulphate reduction rate and indicated that the reactivity of the carbon sources present (leaf mulch, wood chips, sawdust, sewage sludge) did not decrease significantly over time. Nevertheless, the rate of iron removal decreased substantially as the column experiment progressed.

2.5 Sterilization of media

In the proposed experiment (Chapter 3), several natural organic carbon sources are investigated for their suitability in sulphate reducing PRBs and on-site bioreactors using chemical analyses and an anaerobic batch experiment. Because a mixture of substrates incorporating proportions proposed by Cocos et al. (2002) is investigated in the batch experiment, it was decided that a control of the same mixture would be sterilized to show chemical evolution in the reactor in the absence of microbial activity.

Various sterilization techniques were considered. Trevors (1996) provides a good summary of various soil and sediment sterilization methods tested by various researchers. These include autoclaving, dry heat, gamma radiation, microwaves, gaseous chemicals (chloroform, ethylene oxide, propylene oxide, methyl bromide), and chemicals (mercuric chloride, sodium or potassium azide, formaldehyde). Another study investigated sterilization of silt loams with dry heat, cobalt-60 irradiation, propylene oxide, mercuric chloride, autoclaving, sodium azide, microwave, chloroform and antibodies (Wolf et al., 1989). Cobalt-60 irradiation, propylene oxide, mercuric chloride and autoclaving 2x or 3x were effective in eliminating the microbial populations in the soils studied, although the physical and chemical properties of the soils were altered by all of these techniques, except mercuric chloride. Propylene oxide reduced soil surface area, soil pH increased with use of propylene oxide and sodium azide, and all methods except mercuric chloride increased the extractable levels of Mn in the soils. Cation exchange capacity was not significantly affected by any of the effective methods. Mercuric chloride was thus most effective without changing physicochemical

properties, but care must be taken when using mercuric chloride or disposing of mercuric chloride-contaminated soils due to its high toxicity to humans. Other studies warn against mercuric chloride use as a microbial inhibitor in anaerobic studies, due to the potential formation of highly toxic methylated mercury forms (Wolf and Skipper, 1994). Formaldehyde was chosen for its capability of sterilizing at low concentrations (Tuominen et al., 1994; von Rege and Sand, 1998) without altering the physicochemical properties of the medium [a low dilute solution between 0.01 and 0.04 % did not change the pH significantly (Tuominen et al., 1994)].

3. CHARACTERIZATION AND REACTIVITY ASSESSMENT OF ORGANIC SUBSTRATES FOR SULPHATE-REDUCING BACTERIA IN ACID MINE DRAINAGE TREATMENT

The following chapter is a reproduction of the content of an article that was submitted on December 16, 2004 to the journal, "Chemosphere". After a brief introduction of the article title and the author and coauthor, and the abstract, an introduction of the various passive in situ acid mine drainage techniques using sulphate reduction is presented. This section is meant to present the main ideas retained from previous research and to justify the steps taken. The second section of the article presents the substrates tested and the methods of analysis for quantifying their chemical characteristics. The study was done in two parts, the first being the aforementioned chemical characterization and the second the testing of these substrates in a sulphate reduction batch experiment. The protocols used are found in the Appendices, but are only available in French. The third section of the article presents the results and the discussion followed by conclusions on the utility of the characterization and the reactivity of the substrates. Recommendations are also made for future research.

3.1 Abstract

Acid mine drainage (AMD), which contains high concentrations of sulphate and dissolved metals, is a serious environmental problem. It can be treated in situ by sulphate reducing bacteria (SRB), but effectiveness of the treatment process depends on

the organic substrate chosen to supply the carbon source for the bacteria. Analyses were carried out to characterize six natural organic materials and to investigate how well these promote sulphate reduction and metal precipitation by SRB. Maple wood chips, sphagnum peat moss, leaf compost, conifer compost, composted poultry manure and conifer sawdust were investigated in terms of their carbon (TOC, TIC, DOC) and nitrogen (TKN) content, as well as their theoretically easily bioavailable substances. Single substrates, ethanol, a mixture of leaf compost (30% w/w), composted poultry manure (18% w/w), and maple wood chips (2% w/w), and the same mixture spiked with formaldehyde were then tested in a 70-day batch experiment to evaluate their performance in sulphate reduction and metal removal from synthetic AMD.

Formaldehyde (0.015% (w/v)) provided only temporary bacterial inhibition. Metal removal efficiency in batch reactors was as high as 99% for Cd, 100% for Fe, 99% for Mn, 99% for Ni and 94% for Zn depending on reactive mixtures. The lowest metal removal efficiency was found in the reactor containing composted poultry manure as the single carbon source. The mixture of organic materials was most effective in promoting sulphate reduction, followed by ethanol and maple wood chips, and single natural organic substrates generally showed low reactivity. Although characterization of substrates on an individual basis provided insight on their carbon content and availability, it did not give a clear indication of their ability to promote sulphate reduction and metal removal.

Keywords: AMD; sulphate reduction; passive biological treatment; permeable reactive barriers; organic matter characterization.

3.2 Introduction

Sulphate-reducing bacteria (SRB) show promise in the treatment of acid mine drainage (AMD) through their use in in situ permeable reactive barriers (PRB) or in on-site passive systems (Gazea et al., 1996; Benner et al., 1997; Neculita et al., 2004). PRBs are installed in the path of the contaminated groundwater plume, and are designed to have physical characteristics similar to those of the aquifer. They contain a carbon source for the SRB, a porous support such as sand and gravel, and possibly a neutralizing agent such as limestone. Another method is the channelling of AMD into on-site anaerobic cells (bioreactors) filled with compost (Johnson and Hallberg, 2004), where the sulphate reduction process treats the drainage prior to discharge into the surrounding ecosystem. Alternatively, Hulshof et al. (2003) propose to treat AMD at the source; a natural organic substrate is mixed with mine tailings upon disposal to stimulate sulphate reduction conditions, thus treating AMD in situ as it is produced.

There are a few articles in the literature where the carbon sources for SRB have been characterized (Waybrant et al., 1998; Prasad et al., 1999; Chang et al., 2000; Cocos et al., 2002) and even fewer studies aim at quantifying the degradability of organic carbon present in different natural organic substrates (Prasad et al., 1999; Chang et al., 2000; Gibert et al., 2004). However, careful selection of a suitable carbon source is of

paramount importance to ensure performance and longevity in biological AMD treatment.

Volatile fatty acids (acetate, propionate, butyrate) and short-chain fatty acids (lactate, pyruvate, malate) are among the main sources of carbon for SRB, and long-chain fatty acids and certain aromatic compounds are occasional substrates (Postgate, 1984; Widell, 1988; Hao et al., 1996; Beaulieu et al., 2000). Fermentative products such as ethanol (along with lactate and acetate) are additional sources and polymers such as cellulose and hemicellulose are excluded, as cellulose is not degraded by known SRB (Chang et al., 2000). Chang et al. (2000) maintain that the polysaccharide must be degraded by hydrolytic fermentative anaerobes into sulphidogen-supporting fatty acids and alcohols and those fermentative organisms grow faster on the easily digestible substances early on; once these substances are depleted, hydrolytic fermentation is rate limiting because the products of fermentation are completely used up. Similarly, Prasad et al. (1999) report that proteins, carbohydrates and lipids (polymers) or even simple sugars are generally not accessible to SRB, who depend on the processes of other heterotrophic bacteria to supply degradation and fermentation end-products such as compounds of low molecular weight (lactate, pyruvate, formate, etc.).

Recently, Gibert et al. (2004) studied the degradability of compost, sheep and poultry manures, and oak leaf, concluding that sheep manure was the best substrate for SRB, followed by poultry manure and oak leaf. These authors also concluded that the lower

the lignin content of a substrate, the greater the degradability. Mixture proportions (v/v) were 15% organic substrate, 15% bacterial source (creek sediment), 30% calcite, and 40% quartz. Unfortunately, the effectiveness of mixtures of the natural organic substrates themselves was not assessed. Further, no metals were used in the study and thus the sulphate reduction process was not representative of true AMD treatment, not having taken into account metal toxicity to SRB. There is growing evidence that sulphate reduction effectiveness can be augmented by the use of natural organic substrate mixtures versus single substrates (Waybrant et al., 1998; Cocos et al., 2002). Recently, a novel mixture of various substrates has been proposed by Cocos et al. (2002). In a 41-day study using a multiple factor design and the modelling of the sulphate reduction rate, reactivity of 17 mixtures of maple wood chips, leaf compost and composted poultry manure (and inorganic porous supports) was assessed in batch experiments using synthetic AMD. The best mixture in terms of sulphate reduction was composed of 3% wood chips, 30% leaf compost, 20% composted poultry manure (maximum proportion used in study), and 5% silica sand (wt%). The components at constant proportions were 37% bacterial source (creek sediment), 2% calcium carbonate, and 3% urea.

In the preparation of a substrate mixture to be used for biological passive treatment of AMD, it is essential to assess its potential effectiveness by knowing its chemical make-up, notably in terms of organic carbon content. Therefore, the objective of the current study was to characterize a few natural organic carbon materials previously reported as

appropriate electron donors (composted poultry manure, maple wood chips, leaf compost) as well as other potentially suitable organic substrates (sphagnum peat moss, conifer compost, conifer sawdust and ethanol) in terms of their degradability as carbon sources for SRB and also in promoting sulphate reduction and metal removal. The natural organic substrates were tested as single substrates or in mixtures, in batch experiments.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Organic substrates

Maple wood chips (Bergeron et fils, QC) of dimensions of less than 2 x 3 x 0.5 cm were selected from a stock of larger pieces. Leaf compost (City of Montreal) was sieved to less than 2 mm, as were composted poultry manure (Ecolo-Nature, QC) and sphagnum peat moss (Jardinière, QC). Composted spruce chips (Northern Ontario) and conifer sawdust (Manitoba) were received from the Earth Sciences Department of the University of Waterloo (Canada). Ethanol (100%, Alcools de commerce, QC) was also used as a substrate.

3.3.2 Chemical characterization of natural organic substrates

Dissolved organic carbon (DOC) was analyzed after mixing (shaking for 2 h at room temperature with a customized rotary agitator) 20 g (wet weight) of a particular natural organic substrate with 200 ml of deionised water (18.8 MΩ cm). The extracts were then centrifuged (13800g) for 10 minutes and filtered (0.45 µm). Total organic carbon of

filtered extract was determined after acidification of samples with H_3PO_4 , according to Standard Method 5310 C (Clesceri et al., 1998). Easily available substances (EAS) and waxes and resins were analyzed by a modified forage fibre analysis (FFA) as per Prasad et al. (1999). A detailed protocol, in French, is found in Appendix I. Briefly, the samples were rinsed with acetone, to remove any resins or fats, filtered through Gooch fritted glass crucibles, rinsed with water, filtered, dried and weighed. The dried matter was then digested in boiling 5% HCl for an hour. After water rinsing and filtration, the sample was again dried and weighed. Prasad et al. (1999) recommend a 40° C drying temperature; however, this proved to be insufficient for our current analysis and the temperature was adjusted to 60°C. The gravimetric analysis seeks to quantify the biodegradable portion in a particular substrate, notably soluble sugars, amino acids, starch, certain proteins and hemicellulose. EAS analysis was not performed on ethanol and on composted spruce chips and conifer sawdust. Total organic carbon (TOC) was analyzed by ASTM method D2974W-B (ASTM, 2003). A phosphoric acid treatment followed by an infrared determination of CO_2 evolved was performed to determine total inorganic carbon (TIC) (Ministere de l'Environnement et de la Faune du Quebec, 1996). Total kjeldahl nitrogen (TKN) was determined by Standard Method 4500- N_{org} (Clesceri et al., 1998).

3.3.3 Analysis of reactivity of substrates in AMD batch experiments

3.3.3.1 Experimental set-up

A detailed protocol, in French, of the experimental procedure can be found in Appendix I. Batch experiments tested 9 reactive mixtures (Table 3.1) in duplicate using 2000 ml glass reaction flasks at room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Synthetic AMD (Table 3.2) was prepared over 3 days to ensure minimal oxygen and heightened reducing conditions. First, CaCO_3 (Calcium Carbonate Light, ACS reagent grade, Anachemia, Canada) was added in excess to deionised water and the solution sparged with anaerobic grade $\text{CO}_{2(g)}$. In the meantime, 0.1 N H_2SO_4 was sparged with environmental grade $\text{Ar}_{(g)}$. On the second day, the CaCO_3 -saturated water was allowed to equilibrate with the atmosphere and then required quantities of sulphate salts (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , and Na^+) were added and the solution stirred for 24 h. Care was taken to avoid the toxic levels (to SRB) of zinc, nickel and cadmium reported in the literature (Hao et al., 1994; Poulson et al., 1997; Utgikar et al., 2001; 2003). The required quantity of Fe^{2+} was added to the H_2SO_4 and the solution sparged with a gas mixture (97 % N_2 / 3 % H_2) for 24 h to reduce the redox potential. Finally, on the third day, the metal mixture was transferred to the glove box (under N_2 atmosphere), sparged with $\text{Ar}_{(g)}$ for 60 minutes, and the Fe^{2+} - H_2SO_4 solution subsequently added. The pH of the solution was adjusted to 5.5 ± 0.2 with sodium hydroxide and the solution topped off to 2 l with deionised water. Synthetic AMD was left in sealed glass containers at 4°C for 24 h before addition to reactors prepared with organic and inorganic constituents. In this time, AMD acidified to an average pH of 4.0 and some bottles showed an orange ferric hydroxide precipitate at the bottom. AMD was siphoned off to minimize solid precipitate addition to the reactors.

Table 3.1: Composition of the 9 organic reactive mixtures assessed in sulphate reduction batch reactors

	Mixture percentage (%w/w)								
Reactor	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7 ^a	#8	#9 ^b
Carbon Sources									
Maple wood chips	50	0	0	0	0	0	0	2	2
Sphagnum peat moss	0	50	0	0	0	0	0	0	0
Leaf compost	0	0	50	0	0	0	0	30	30
Conifer compost	0	0	0	50	0	0	0	0	0
Poultry manure	0	0	0	0	50	0	0	18	18
Conifer sawdust	0	0	0	0	0	50	0	0	0
Ethanol	0	0	0	0	0	0	10 ml	0	0
Nutrient									
Urea	3								
Porous support									
Sand	30								
Bacterial source									
Creek sediment	15								
pH Buffer									
Calcium carbonate	2								

^a: Reactor 7 contained twice the % of non-substrate materials plus 10 ml ethanol

^b: Reactor 9 was spiked with 0.33 ml of a 12.3 M solution of formaldehyde

Reactors 8 and 9 contained organic substrate amounts within proportions statistically specified by Cocos et al. (2002).

Table 3.2: Chemical concentrations in synthetic AMD prepared for 9 organic substrate batch reactors

Component	Concentration (mg l ⁻¹) ^a	Source
Fe ²⁺	1683 ± 35	FeSO ₄ ·7H ₂ O
Ca ²⁺	330 ± 20	CaSO ₄ ·2H ₂ O
Mg ²⁺	99 ± 1	MgSO ₄
Ni ²⁺	15 ± 1	NiSO ₄ ·6H ₂ O
Zn ²⁺	15 ± 3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
Na ⁺	220 ± 30	Na ₂ SO ₄
K ⁺	55 ± 1	K ₂ SO ₄
Mn ²⁺	14 ± 1	MnSO ₄ ·H ₂ O
Cd ²⁺	8.3 ± 2.0 ^b	CdSO ₄ ·8/3H ₂ O
SO ₄ ²⁻	4244 ± 239	
pH	4.01 ± 0.09	

^a: mean ± standard deviation (n=9)

^b: Some reactors received very little initial cadmium, notably R7 with 3.6 mg l⁻¹ and R8 with 6.0 mg l⁻¹.

Reactive mixtures consisted of constant proportions (w/w) of bacterial source (creek sediment, Cupra mine site, QC), pH neutralizer (calcium carbonate), nitrogen source (urea), porous medium (sieved sand between 0.5 and 2 mm) and carbon source (maple wood chips, composted poultry manure, leaf compost, peat moss, composted spruce chips, spruce sawdust, ethanol). Total dry weight was 200 g except for the ethanol reactor (100 g solids and 10 ml ethanol). 800 ml (from same respective synthetic AMD mixture) was added to each reactor duplicate and the reactors were sealed and thoroughly shaken. Reaction flasks contained sampling ports fitted with Teflon-lined septa. Two reactors contained a mixture of three organic substrates (maple wood chips,

leaf compost and poultry manure) and one of these was sterilized with formaldehyde (0.015% w/v) to inhibit bacterial activity. Formaldehyde was used for its capability of sterilizing at low concentrations without altering the physicochemical properties of the medium (Tuominen et al., 1994; von Rege and Sand, 1998). Required wet weights were determined using water content determination on separate samples. Enumeration of SRB in the creek sediment was performed immediately following inoculation by using the Most Probable Number technique as per ASTM (1990), and results showed a very low concentration of 25 cells 100 ml⁻¹.

3.3.3.2 Sampling and analyses

All sampling was performed under anaerobic conditions (N_{2(g)} atmosphere) in a glove bag (Fig. 3.1). Once all reactors were prepared (day 0), sampling and analyses of pH, alkalinity, NH₄⁺, TOC, DOC, sulphate, ferrous iron, total sulphides, metals (Cd, Ca, Fe, Mg, Mn, Ni, K, Na, Zn) and SRB enumeration were carried out. Samples were taken over 70 days. Measurements of pH (ORION ROSS 8175 BN electrode) and redox potential (ACCUMET electrode, Ag/AgCl, 4.00 M KCl) were determined immediately after collection, as were total dissolved sulphide (Hach DR/2010 spectrophotometer), sulphate and ferrous iron (Cary 100 spectrophotometer) according to the Hach DR/2010 procedure manual (HACH Procedure Manual, 1998). TOC and DOC were determined by Standard Method 5310 C, alkalinity by Standard Method 2320 B and NH₄⁺ by Standard Method 4500-NH₃ G (Clesceri et al., 1998). Metal content was determined using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES), where

method detection limits for Ca, Cd, Fe, Ni, Mg, Mn, K, Na, Zn were, respectively, 0.1, 0.005, 0.1, 0.01, 0.1, 0.005, 1, 0.5, and 0.05 mg l⁻¹. Manufacturer's specifications indicate that the potential developed by the ORP electrode is 199 mV at 25°C relative to standard hydrogen electrode. Analysis of pH and ORP took place directly in designated samples whereas DOC, sulphides, Fe²⁺, SO₄²⁻, metals, NH₄⁺ and alkalinity were determined on separate 0.45 µm filtered samples.



Figure 3.1 Glove bag with batch reactors.

Determination of pH, DOC, Fe²⁺, SO₄²⁻, metals, and ORP were determined every 5-9 days, whereas total sulphides were analyzed every 2 weeks. TOC and NH₄⁺ were analyzed on day 0 and day 70, and alkalinity on days 0, 33 and 70. Samples for SRB enumeration were taken on day 0, 24 and 70. Tubes were inoculated and incubated at 30°C for 21 days under anaerobic conditions. A black FeS precipitate indicated growth

of SRB (Postgate, 1984) and questionable samples were verified using ferric chloride/HCl and p-aminodimethylaniline dihydrochloride/ HCl (ASTM, 1990).

A brief study of the metal removal data was performed to see if removal followed, zero, first or second order kinetics. A zero order rate law has the form:

$$dC/dt = -k \quad (3.1)$$

where

C is the metal concentration in mg/l;

t is the time in days;

k is the rate constant in mg/l/day.

Integration and substitution of the initial concentration leads to:

$$C_0 - C = kt \quad (3.2)$$

Where C_0 is the initial concentration.

Thus, a plot of either $C_0 - C$ vs t or C vs t would give a straight line of slope k. A first order rate law has the form:

$$dC/dt = -kC \quad (3.3)$$

Integration and substitution of the initial concentration leads to:

$$-\ln(C/C_0) = kt \quad (3.4)$$

Thus, a plot of $-\ln(C/C_0)$ vs t would give a straight line, through [0,0] of slope k [day^{-1}].

Finally, a second order rate law has the form:

$$dC/dt = -kC^2 \quad (3.5)$$

Integration and substitution of the initial concentration leads to:

$$1/C - 1/C_0 = kt \quad (3.6)$$

Thus, a plot of $1/C - 1/C_0$ vs t would give a straight line through $[0,0]$ of slope k [$1/\text{mg/day}$].

The metal decreases, if any, were modeled with respect to these laws and plots are and constants, k , found in Appendix V. Not all reactors had enough points or adequate curves to be modelled and with few exceptions, only the plots of the two most accurate models are shown. The R^2 value closest to 1 indicates the most likely rate law, with the regressed slope (coefficient of x) being the constant, k . All points, up until the point where concentration no longer decreased, were included in modeling studies. Where initial data was not available (reactor 2) or when metal decrease started after day 0, the point preceding metal decrease was taken as day 0. In addition, some reactors lacked sufficient data for some metals (less than 3 points) for even an estimate of kinetic behaviour, whereas others only had 3 or 4 points, which is generally not sufficient. Nevertheless, plotting even with 3 or 4 points and adding the aforementioned time modifications (“modified time” on plots) add error, but nevertheless give a picture of kinetic behaviour where otherwise there would be none.

3.4 Results and Discussion

3.4.1 Chemical characterization of organic substrates

Table 3.3 shows the results of the characterization of substrates used in the batch experiments. As poultry manure had the highest DOC, TKN, and EAS, it would be

expected to perform well as a single substrate in the batch experiment because nitrogen was not limiting and the organic carbon was easily accessible (63% of soluble sugars, hemicellulose, amino acids, and proteins). Leaf compost would also be expected to perform well, given a C/N ratio close to 15.7 as specified by Gerhart (1981). Okabe et al. (1992) suggested a C/N ratio between 45 and 120, which would also suggest reasonable performance from sphagnum peat moss. The wood materials (maple wood chips, conifer compost and conifer sawdust), having extremely low nitrogen content, would not be expected to perform very well compared with the other substrates, although, added urea supplied some supplemental nitrogen in the batch experiments. The C/N ratio of the organic substrate mixture (prior to urea addition), considering proportions of maple wood chips, leaf compost and composted poultry manure, was 6.3.

Waybrant et al. (1998) note that lability of C, N, and P and rates of C degradation do not necessarily correspond to total solid phase C, N, P content. Nevertheless, given the poor performance of lone organic substrates (discussed later), C/N ratio alone is not a good indicator of the potential carbon degradability by the sulphate reducing microflora.

Table 3.3: Chemical characterization of natural organic carbon sources

Organic carbon source	DOC ^a (g 100 g ⁻¹) n=3	Waxes, Resins (g 100 g ⁻¹) n=2	EAS ^b (g 100 g ⁻¹) n=2	TKN ^c (g 100 g ⁻¹) n=2	TOC ^d (g 100 g ⁻¹) n=2	TIC ^e (g 100 g ⁻¹) n=2	C/N ^f
maple wood chips	0.75 ± 0.10	0.00	28.34 ± 0.81	0.09 ± 0.01	51.00 ± 0.00	1.90	567
sphagnum peat moss	0.12 ± 0.00	0.46 ± 0.23	34.46 ± 0.51	0.75 ± 0.01	43.50 ± 0.50	0.35 ± 0.05	58
leaf compost	0.06 ± 0.00	0.43 ± .11	47.07 ± 0.05	0.70 ± 0.01	11.5 ± 0.50	3.50 ± 0.40	16.4
conifer compost	0.05 ± 0.00	g	g	0.10 ± 0.01	46.00 ± 2.00	0.80 ± 0.60	460
poultry manure	6.13 ± 0.05	17.04 ± 1.04	63.09 ± 0.56	5.80 ± 0.30	19.00 ± 0.00	4.80 ± 0.70	3.3
conifer sawdust	0.16 ± 0.01	g	g	0.06 ± 0.00	46.00 ± 0.00	1.55 ± 0.65	767

^a: dissolved organic carbon

^b: easily available substances: soluble sugars, hemicellulose, amino acids, some proteins

^c: total kjeldahl nitrogen

^d: total organic carbon

^e: total inorganic carbon

^f: carbon/nitrogen ratio = TOC/TKN

^g: not analyzed

3.4.2 Batch experiments

3.4.2.1 pH and ORP

pH in all reactors rose significantly immediately (Fig. 3.1), due to CaCO₃ in mixtures, and there was generally little difference between duplicates throughout the experiment.

After the initial sharp increase on day 0, the pH rose steadily in R1 (maple wood chips), R3 (leaf compost), R4 (composted spruce chips), and R6 (conifer sawdust) with the latter 3 reaching pH of 8.5 and the former a pH of 8. Meanwhile, the pH in the manure-containing reactors (R5, poultry manure; R8 and R9, mixtures) continued to rise sharply until day 5, and eventually steadied to pH 8 (R8 and R9) and pH 7.5 (R5). R2 (peat

moss) took longer to reach its final pH of about 7.5 and R7 (ethanol) toggled throughout the experiment between pH of 6 and 6.5.

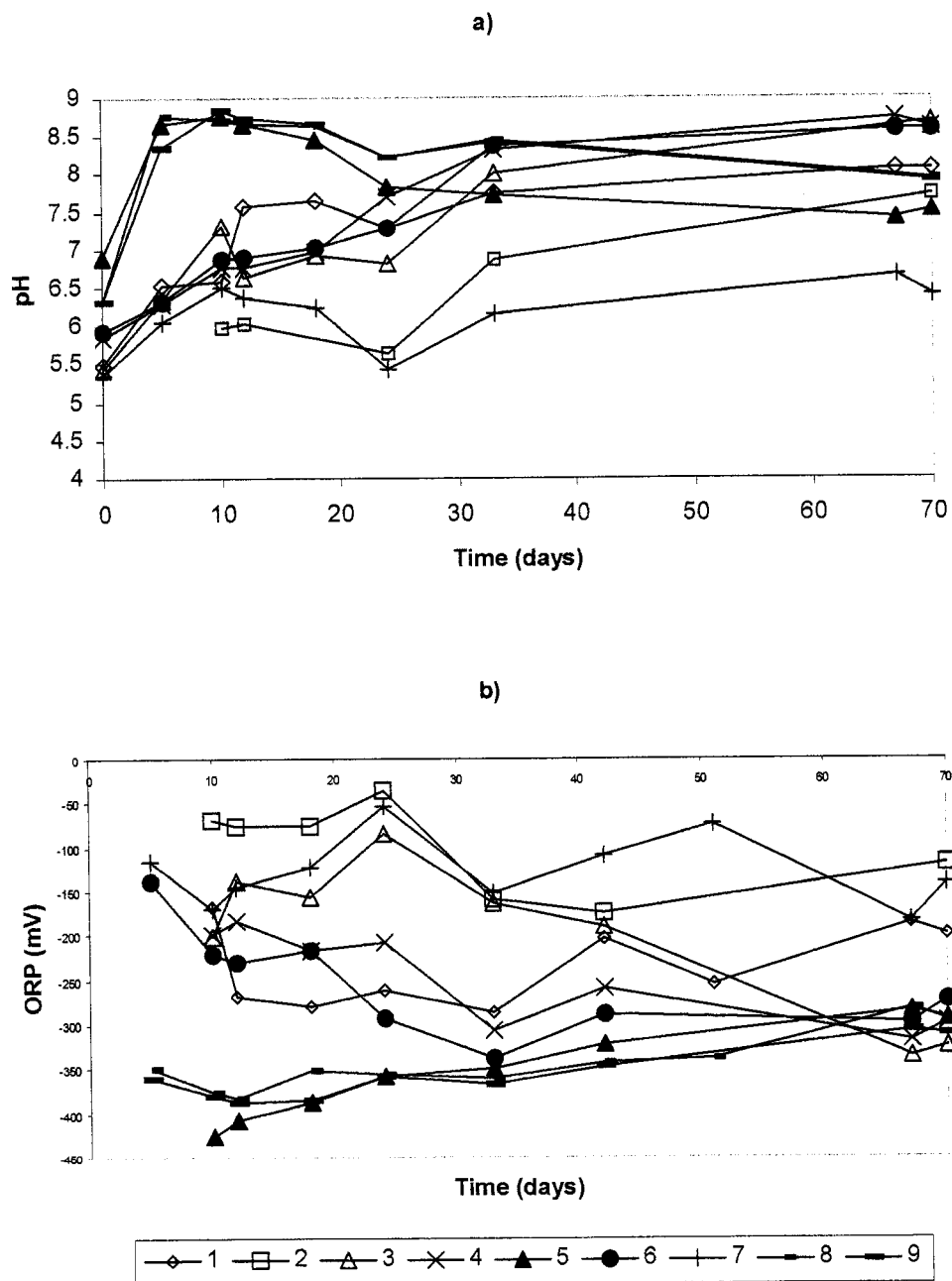


Figure 3.2: Variation of pH (a) and ORP (b) in 9 organic substrate batch reactors (see Table 3.1 for identification). AMD (initial) pH is 4.01

A suitable ORP of -300 mV (Prasad et al., 1999) was reached by day 30 in all reactors except R1 (maple wood chips), R2 (peat moss) and R7 (ethanol) (Fig. 3.2). The pH in reactors quickly reached the optimum range of 5-9 for SRB (Postgate, 1984; Eger and Wagner, 1995), but well exceeded the optimum reported by Reis et al. (1992) of 6.7 (in an experiment with lactate as the substrate). Only R7 (ethanol), stayed below this value. Nevertheless, ORP and pH conditions were favourable for SRB in the reactors, although ORP never dropped much below -200 mV in R2 and R7, and pH in R7 never rose above 6.5. In the absence of measurable sulphate reduction, the high pH is likely due to carbonate ions from CaCO_3 (2% w/w) used in reactive mixture preparation.

3.4.2.2 Sulphate reduction

Measurable sulphate reduction (Fig. 3.3) occurred only in R1 (maple wood chips, only one of the replicates), R7 (ethanol), R8 (mixture of substrates) and R9 (mixture plus formaldehyde). Sulphate reduction in the presence of ethanol was expected as its suitability as a carbon source for SRB is well documented in the literature (Nagpal et al., 2000a, 2000b; Kolmert and Johnson, 2001; Kaksonen et al., 2003, 2004; Tsukamoto et al., 2004). Initial reactor sulphate concentrations were generally lower than AMD concentrations, ranging from 2944 to 4608 mg l^{-1} in R3 (leaf compost) and R5 (poultry manure), respectively. Final concentrations ranged from 163 to 5575 mg l^{-1} in R8 and R5, respectively. The results of Cocos et al. (2002) showed that a high proportion of poultry manure was critical for a high sulphate reduction rate when used in combination with more complex carbon sources. Our batch experiments showed no measurable

sulphate reduction within the poultry manure reactor when used as a single substrate. Neither sphagnum peat moss, nor leaf compost alone were found to be good substrates in the batch experiment.

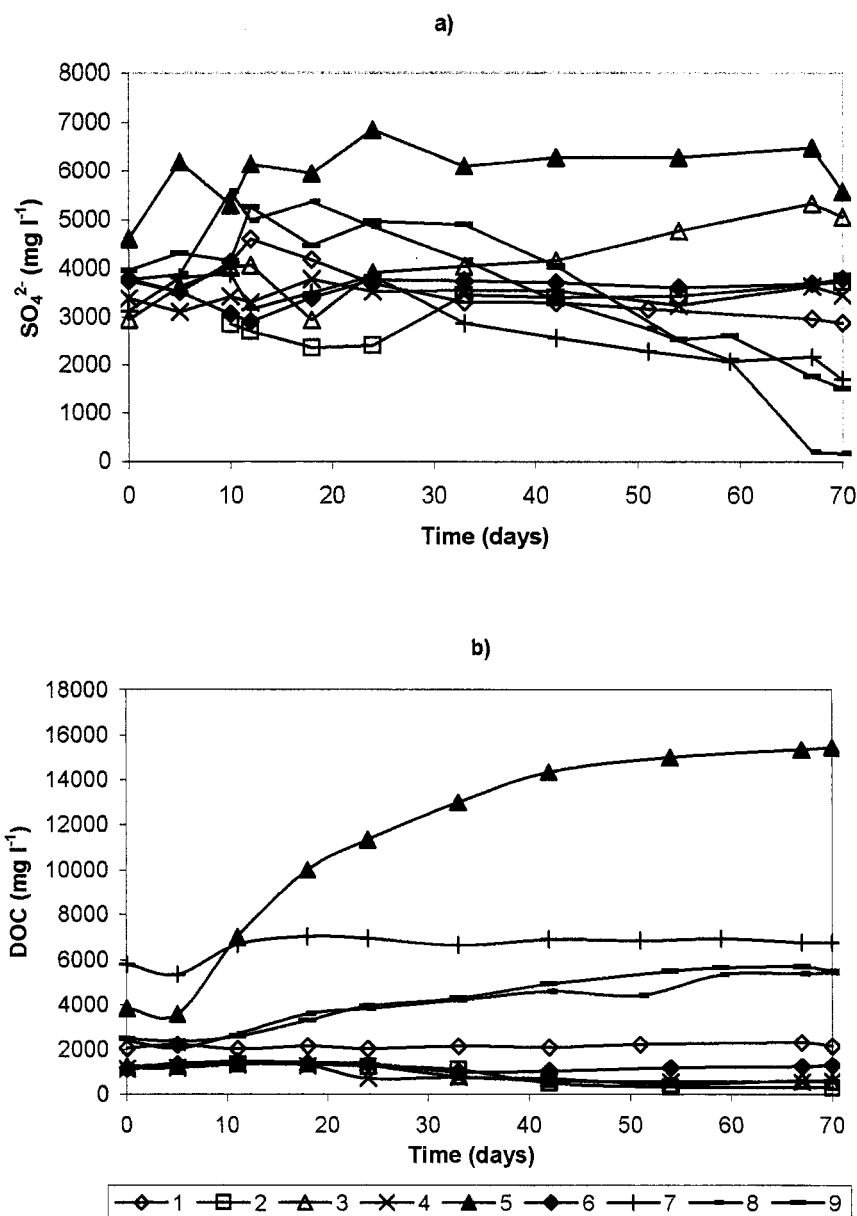


Figure 3.3: Variation of sulphate (a) and dissolved organic carbon (b) in 9 organic substrate batch reactors (see Table 3.1 for identification)

In the case of the wood materials, it was true that these substrates alone were poor sources of SRB carbon in the batch experiment (although one replicate containing only maple wood chips did show sulphate reduction). Thus, the initial characterization (DOC, EAS, C/N) could not predict sulphate reduction, especially in R5 where measured sulphate reduction was the lowest despite predicted efficacy. Sulphate in some reactors rose to above initial concentrations (R3, R5, R8, and R9) and some remained relatively constant for the duration of the experiment (R4 and R6). Some of the reactors, notably R3 (leaf compost), R5 (poultry manure), R8 (mixture) and R9 (mixture plus formaldehyde), showed higher concentrations of sulphate than measured in initial AMD. An analysis of the sulphate and sulphur content was performed on composted poultry manure and leaf compost, as well as on the sediment. The sediment showed a soluble sulphate concentration of 6200 mg kg^{-1} and the poultry manure 7000 mg kg^{-1} . Leaf compost, sediment and poultry manure contained similar total sulphur proportions of 0.25, 0.22, and 0.23%, respectively. Thus, some of the extra sulphate measured in reactors containing leaf compost and poultry manure (3, 5, 8, and 9) originated in the substrates and sediment. Christensen et al. (1996) and Waybrant et al. (1998) reported increasing sulphate concentrations over time and attributed these to likely co-precipitation of ferric (oxy)hydroxides and sulphate, occurring during set-up and subsequent dissolution of these precipitates as reducing conditions evolved. Nevertheless, they concluded that bacterial sulphate reduction had occurred. In our study, co-precipitated sulphate that later came into solution was probably present in the

AMD due to delay in its addition to reactors, as about 2000 mg l⁻¹ additional sulphate was used in AMD preparation than was measured in AMD. The rates of sulphate reduction measured for R1D (duplicate of R1), R7, R8, R9, and even all reactors where SRB were found are therefore likely underestimated. Evidently, properties of the substrates caused the co-precipitated AMD sulphate and dissolvable sulphate in the various reactors to come into solution at different times (immediately for reactors containing manure, later for peat moss and leaf compost).

Generally there was little variation between reactor replicates except for R1, where sulphate decreased in one replicate and remained stable in the other. Sulphate reduction rates (Table 3.4) were calculated for those reactors demonstrating measurable sulphate reduction: R1D, R7, R8 and R9. The substrate mixtures (R8, R9) had greatest sulphate reduction rates. Least squares regression was used for the calculation of a sulphate reduction rate (mg l⁻¹ day⁻¹) over the whole experiment (T₀₋₇₀) and another calculated disregarding early and late time data (T_{MODIFIED}), as performed by Cocos et al. (2002). Sulphate reduction rates were less than the average 70.7 mg l⁻¹ day⁻¹ (maximum 87.6 mg l⁻¹ day⁻¹) reported by Cocos et al. (2002) for T₀₋₄₁ and 103.7 mg l⁻¹ day⁻¹ for T_{MODIFIED}. The maximum sulphate reduction rate observed in this study was that for T_{MODIFIED} of one R9 replicate, 94.8 mg l⁻¹ day⁻¹, which is considerably lower than the maximum 156.3 mg l⁻¹ day⁻¹ for T_{MODIFIED} in the Cocos et al. (2002) study. Ethanol (R7) had a higher sulphate reduction rate for T_{MODIFIED} than the other single substrate showing sulphate reduction (R1D, maple wood chips), although the opposite is true for T₀₋₇₀.

Table 3.4: Calculated sulphate reduction rates for the 7 reactor replicates demonstrating sulphate reduction ($\text{mg l}^{-1} \text{ day}^{-1}$) in batch experiments

Reactor	T_{0-70}			T_{MODIFIED}			
	Replicate 1	Replicate 2	Range	Interval	Replicate 1	Replicate 2	Range
1	- ^a	39.5	-	Day 24-70	-	19.3	-
7	23.1	31.1	8	Day 24-70	38.6	36.8	1.8
8	59.8	60.7	0.9	Day 18-67	85.9	73.4	12.5
9	38.5	47.4	8.9	Day 33-70	94.8	87.4	7.4

^a: no sulphate reduction was measured

It can be seen that the formaldehyde in R9 temporarily inhibited the bacteria (longer lag phase), but once recovered, the bacterial population appears to have been more active, as indicated by a greater sulphate reduction rate for T_{MODIFIED} . All other measured parameters (pH, ORP, DOC, TOC, SRB count, metals (except for Ni), NH_4^+ , alkalinity) were similar to those measured in R8. Lu and Hegemann (1998) report the lessening of the inhibitive effect over time when concentrations of formaldehyde are under a certain critical amount relative to the substrate. Methanogens, likely present in these reactors, degrade formaldehyde anaerobically (Lu and Hegemann, 1998; Omil et al., 1999).

The potential inhibitory/toxic effects of compounds found in conifers (reactors R4 and R6) have been reported in the literature. Phenolic compounds (as found in resins) and plant-derived tannins have shown to inhibit the activity of various enzymes, whereas compounds such as terpenoids, amino acids or hydrophilic base extracted fraction may exert toxic effects (Marschner and Kalbitz, 2003; Tassé and Germain, 2002). In the study of Chang et al. (2000) a solvent extracted fraction from a cellulosic waste inhibited

the growth of sulphidogens by supposed contained resins. The exact mechanisms responsible for the observed effects have not been clarified yet. Here, the two reactors containing conifers (R4 and R6) were among the five least reactive reactors tested. In addition, a possible contributor to the low performance of composted poultry manure (R5) is its high waxes/resins content, measured by the modified FFA procedure (Table 3.3).

3.4.2.3 Enumeration of SRB

The extremely low SRB population in the creek sediment explains the long lag phase and the low sulphate reduction rates observed in reactors 8 and 9 (SRB enumeration results are found in Appendix IV). It also explains the very low SRB counts in R7 (ethanol) throughout the experiment, and consequently the very low measured sulphate reduction rates. Initial (day 0) SRB numbers in the reactors ranged from less than 2 cells 100 ml⁻¹ (R7, ethanol) to 500 cells 100 ml⁻¹ (R9, mixture plus formaldehyde). Final (day 70) SRB ranged from 300 cells 100 ml⁻¹ (R7) to 2.8×10^5 cells 100 ml⁻¹ (R1, maple wood chips). SRB increased in all reactors despite the absence of measurable sulphate removal (underestimated due to dissolving sulphate) in some reactive mixtures. SRB should be present in the natural organic materials themselves (Beaulieu et al., 2000), and this helps explain why SRB were detected in significant concentrations in all reactors except in R7 (ethanol). Although sulphate concentrations favoured sulphate reduction, other conditions (C/N ratio, etc.) may have favoured the use of another electron acceptor

by SRB in the reactors containing a single natural carbon material. Hulshoff Pol et al. (1998) mention nitrate as a possible electron acceptor for certain SRB.

3.4.2.4 Dissolved Organic Carbon (DOC)

Initial DOC values (Fig. 3.3) ranged from 1145 to 5800 mg l⁻¹ in R4 (composted spruce chips) and R7 (ethanol), respectively, whereas final values were between 310 and 15450 mg l⁻¹ in R2 (peat moss) and R5 (poultry manure), respectively. At about day 18 the DOC in R3 (leaf compost) started to decrease with a corresponding increase in sulphate and a decrease in ORP. Increasingly reducing conditions, SRB enumeration and sulphide presence suggest SRB activity, and previously co-precipitated or sediment-bound sulphate could have been dissolving at a rate similar to sulphate reduction. A similar DOC trend may be seen in R2 (peat moss), R4 (composted spruce chips) and R6 (conifer sawdust) starting on day 10, although decreasing ORP stabilized in these reactors and DOC began to increase in R6 around day 33. DOC in R1 and R7 remained stable, despite decreasing sulphate in R7 and in one R1 replicate. Fermentative and other microorganisms activity is suspected for DOC increase through breakdown of bulky organic materials (Johnson and Hallberg, 2004).

R5 (poultry manure) showed a marked gradual increase in DOC beginning on day 5. R8 and R9 (mixtures) also increased in DOC at this time, suggesting that the dissolved carbon was coming from the poultry manure present in these reactors. Poultry manure had showed DOC values significantly higher than the other substrates during

preliminary characterization (Table 3.3). The consumption of DOC by SRB in R8 and R9 was probably outweighed by the solubilisation of carbon in the poultry manure.

3.4.2.5 Metals

Metal (Cd, Ni, Mn, Zn, and Fe) removal efficiencies were generally very high (Figures 3.4-3.6). Cd removal was 97-99% giving final concentrations of less than 0.1 mg l⁻¹ in all reactors except R5. Fe removal was 93-100% with final concentrations between 5 (R6) and 125 (R5) mg l⁻¹, except R7 (ethanol) with a final concentration of 1220 mg l⁻¹. Mn removal was 98-99% (final values between 0.1 and 0.4 mg l⁻¹) except for R7 (increase of 18 % to 13 mg l⁻¹), and Ni removal was 92-99%, giving final concentrations from below 0.2 to 1.2 mg l⁻¹ except for R5 where removal was 54% (final concentration of 7.4 mg l⁻¹). Zn removal was between 92 and 94%, giving final concentrations below 1.0 mg l⁻¹, except in R5 where it was 87% (final concentration of 2.1 mg l⁻¹). The limits permissible according to Directive 019 of the Quebec Ministry of the Environment for Fe, Ni and Zn are 3.0, 0.5 and 0.5 mg l⁻¹, respectively (Aubertin et al., 2002). Therefore, although important metal removal efficiencies were achieved, maximum allowable concentrations were sometimes exceeded for these metals. The range between reactor duplicates for tested metals was 0% for Cd, Mn, Zn and Ni (2% in reactor 3, leaf compost) and between 0 and 6% (except for R7) for Fe. The ferrous iron trends were similar to those for total iron (Appendix IV).

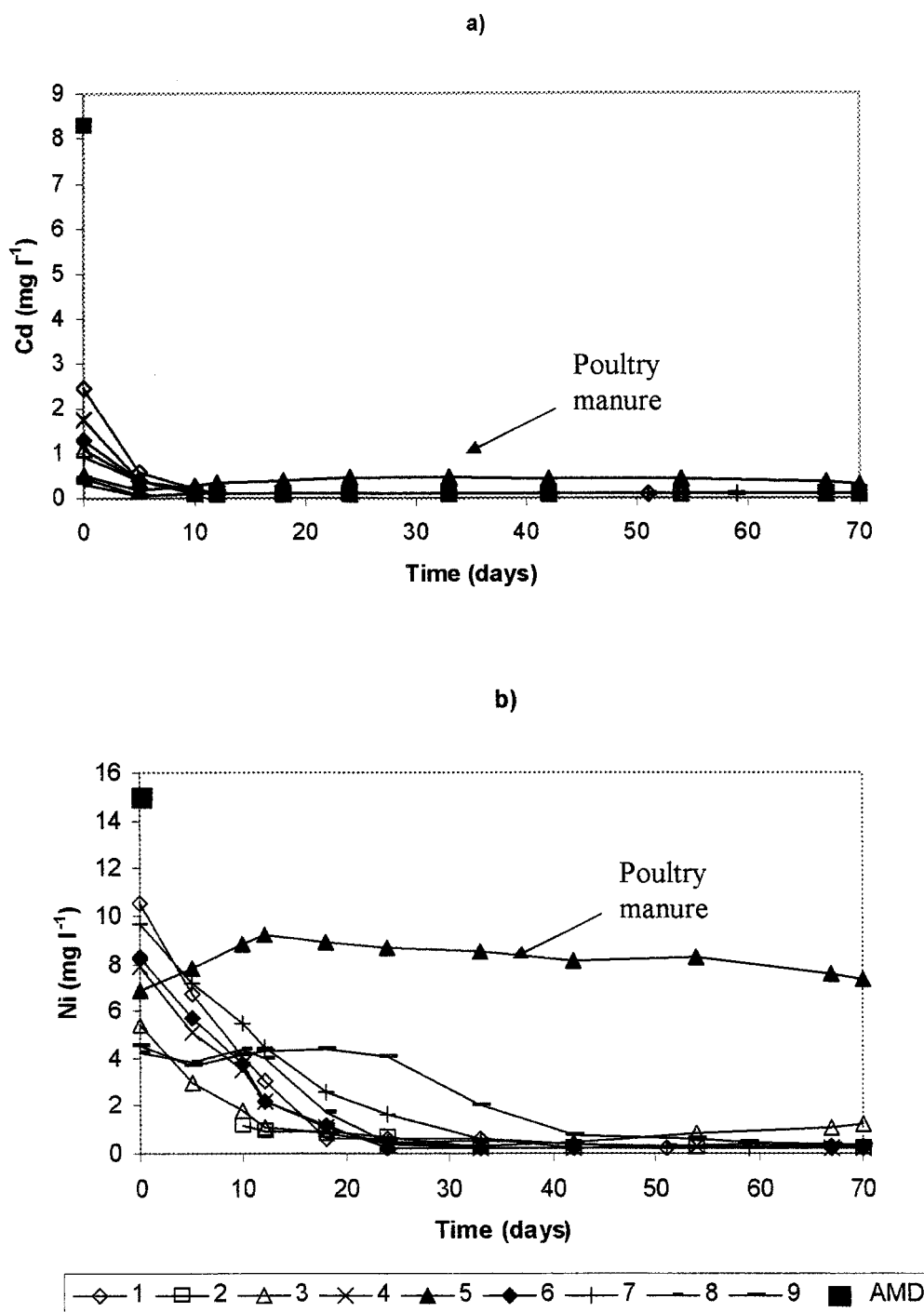


Figure 3.4: Cd (a) and Ni (b) concentration in 9 organic substrate batch reactors. Mean initial AMD value is taken from Table 3.2

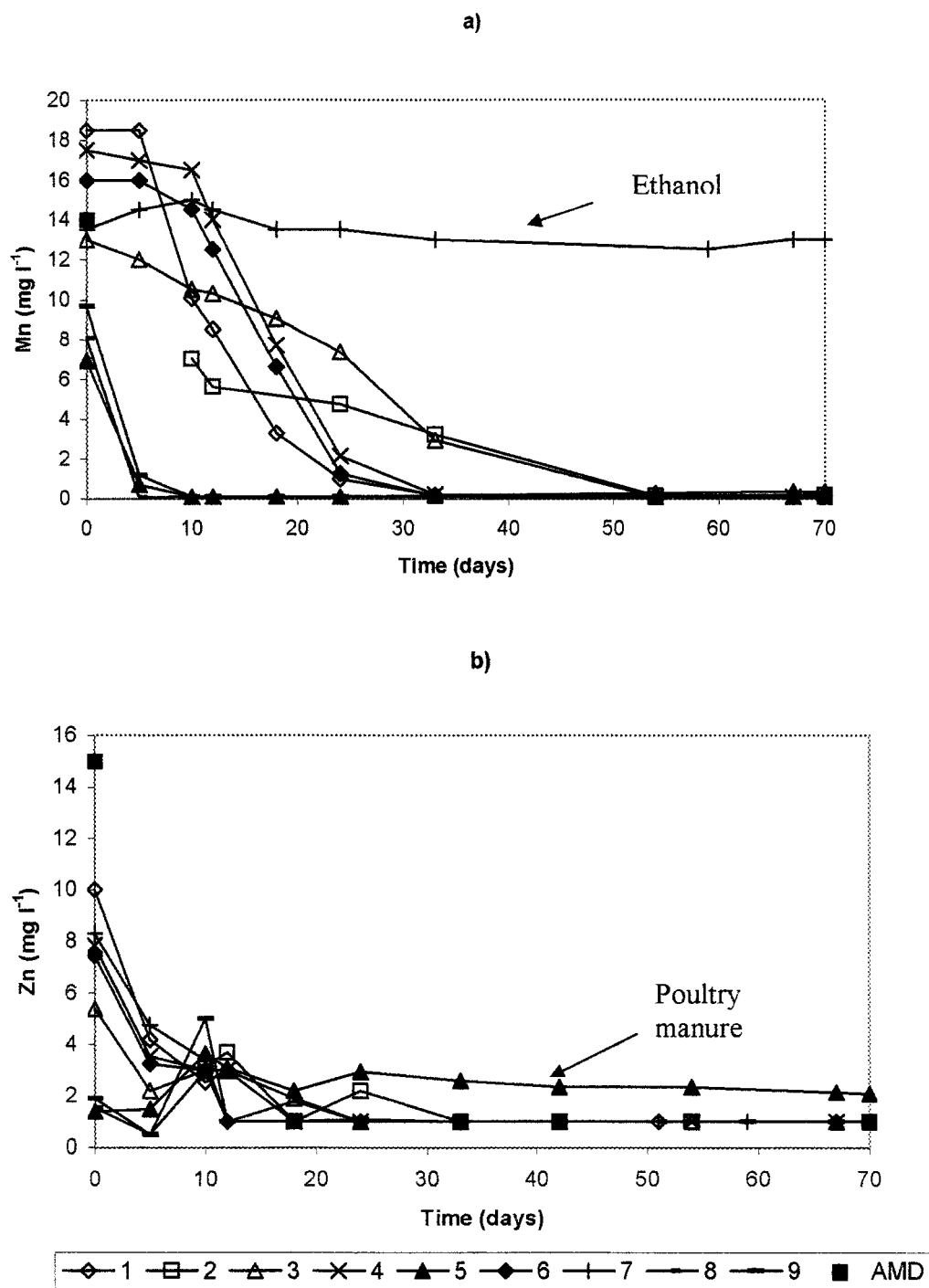


Figure 3.5: Mn (a) and Zn (b) concentration in 9 organic substrate batch reactors. Mean initial AMD value is taken from Table 3.2

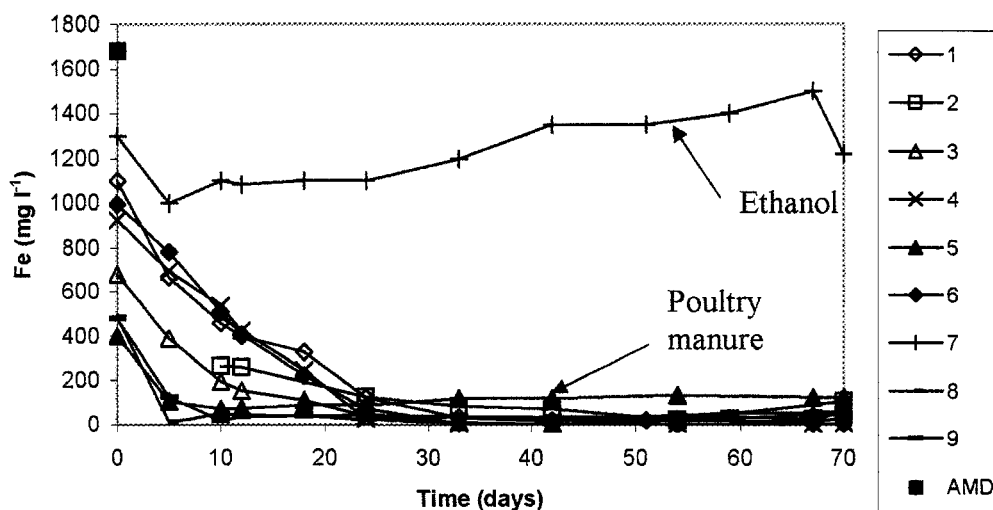


Figure 3.6: Fe concentration in 9 organic substrate batch reactors. Mean initial AMD value is taken from Table 3.2

In general, most of the Cd, Fe, Ni (except R5 and R9), and Zn were removed within the first 25 days. Some removal is likely due to the pH at this time being between 7 and 8.5, except in R2 (peat moss) and R7 (ethanol), a pH of low solubility for these metals (Drury, 1999; Cocos et al., 2002). Thus, precipitation as hydroxides and carbonates is likely the source of the rapid metal decrease. Solubility curves for carbonates, hydroxides and sulphides of these metals are found in Appendix IV. The variability in metals concentrations on day 0 in the different reactors can be attributed to the pH differences in those same reactors.

It should be noted that rapid removal of Mn occurred in R5 (poultry manure), R8 (mixture) and R9 (mixture plus formaldehyde). These are the reactors containing poultry manure. Similar trends between these reactors are seen for Cd, Fe, Ca, and K

(data not shown), although unlike R8 and R9, Cd, Ca, and Fe all increased in R5 after an immediate decrease. The high metals content in the poultry manure reactor is likely due to metal-organic complexes related to the high, steadily increasing DOC concentration. Mg and Ca decreased gradually over the course of the experiment in all reactors except R7, where it increased gradually. Waybrant et al. (1998), attribute a similar trend to calcite precipitation as alkalinity increased. Also, Mn is more likely removed by precipitation as rhodochrosite, MnCO_3 , rather than as sulphide (Waybrant et al., 1998; Amos and Younger, 2003; Amos et al., 2004). Amos et al. (2004) reported Fe precipitation as siderite (FeCO_3) while calcite was present and significantly as mackinawite (FeS) only once calcite was depleted.

Ni removal in R8 and R9 corresponded with sulphate removal, suggesting metal sulphide precipitation. The delay in sulphate reduction due to the inhibition provided by formaldehyde was similar to the delay in Ni removal in this reactor. Creek sediment analysis on duplicate samples showed Cu, Fe, Mn and Zn content of 400, 510 000, 530, and 4100 mg kg^{-1} of sediment, respectively. Sediment-associated metals could have come into solution. Cu, Ni, and Zn toxicity to SRB is noted by several authors (Hao et al, 1994; Poulson et al., 1997; Utgikar et al., 2001, 2003). These metals could have had inhibitory effects contributing to the lack of sulphate reduction in some of the reactors, although measured concentrations were less than the toxic levels reported, which generally fall between 10 and 25 mg l^{-1} . In addition, these toxicity studies often used pure cultures and uniform/controlled conditions. Sulphate reduction could have been,

however, inhibited by non-dissolved metal forms or by synergistic toxic effects of metal mixtures (Hao et al., 1994; Utgikar et al., 2004).

The early metal removal experienced in the reactors of this experiment, especially prior to acclimation of sulphate reducing bacteria, can be related to the “honeymoon period” described by Amos and Younger (2003), where early metal removal is attributed to metal sorption to fresh organic material. Metals are subsequently released into solution. Furthermore, the unexpected gradual iron increase (Fig. 3.6) and ferrous iron increase (Appendix IV) in R7 (ethanol) as ORP decreased, in the absence of binding sites in organic matter, may be attributed to colloidal and precipitated ferric iron in the form of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (likely added to our reactors) that may come into solution in reducing conditions via the following equation (Johnson and Hallberg, 2004):



3.4.2.5.1 Metal Removal Rates

Metal decrease rate (Appendix V) generally followed first order kinetics for iron and cadmium, with varying constants (k), although data was often limited and the order thus speculative. That is to say that for these metals, decrease generally varied directly with the concentration of the metal. For iron, metal decrease fits a first order kinetic model better than a zero or second order model, although few data points are available for reactors 5, 8 and 9. As initial data is not available for reactor 2, a modified time starting at day 10 was necessary. A modified time, starting at day 10 was used for reactor 8 (3-

substrate mixture), where an initial decrease from 485 (day 0) to 11.5 (day 5) mg/l was followed by a rapid increase to 50 mg/l (day 10) and a subsequent gradual decrease in concentration. In this reactor, a zero model fits a bit better, but the fluctuation of iron concentration limits any speculation. Cadmium decreases in reactors 1, 3, 4, 6 and 7 also follow first order kinetics, with varying constants, better than zero or second order, although reactors 4 and 6 only provided 3 points for modeling, and the others only 4 points. Reactors 2, 5, 8 and 9 did not provide enough points for modeling.

Manganese and nickel decrease did not appear to follow any particular trend in terms of reaction order. Few models fit the data very well. For magnesium, zero and first order kinetics were observed, whereas for nickel, zero, first and second order kinetics were seen in the different reactors. Constants were variable. Zinc data was insufficient for metal removal kinetic modeling.

3.4.2.6 Alkalinity and NH_4^+

Initial alkalinity values ranged from below 2 mg l⁻¹ (R7, ethanol) to 320 mg l⁻¹ as CaCO₃ (poultry manure). The alkalinity (Appendix IV) had increased significantly in all reactors by day 33 (to between 1300 mg l⁻¹ as CaCO₃ in R7 and 24000 mg l⁻¹ as CaCO₃ in R5) and continued to increase, though less markedly, until the end of the experiment on day 70 except in R5, where it decreased by about 25% between day 33 and day 70. The minimum and maximum alkalinity on day 70 was 2100 and 19450 mg l⁻¹ as CaCO₃ in R7 and R5, respectively. The strong alkalinity increase in all reactors given the

presence of sulphide and SRB can be attributed to sulphate reduction through the production of bicarbonate ions:



where CH_2O represents a generic organic carbon compound (Postgate, 1984).

Alkalinity levels were considerably higher than in Cocos et al. (2002), who reported a final average value of 187.2 mg l^{-1} as CaCO_3 . The maximum alkalinity produced, via equation 3.2, by the potential $6200 \text{ mg l}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ in the AMD (sulphate added via sulphate salts and sulphuric acid in AMD preparation) is 12920 mg l^{-1} as CaCO_3 . R5 had a considerably higher alkalinity than this value and R9 was slightly greater (just above R8). Thus, manure likely contributed to alkalinity. Also, since sulphate was scarcely reduced in the reactors containing single carbon sources, the elevated alkalinity must have originated in initially added CaCO_3 used in AMD preparation. Waybrant et al. (1998) report that DOC contributes to alkalinity as propionate. Indeed, the reactors with the highest DOC values (5, 8, 9) also had the highest alkalinity. Waybrant et al. (2002) hypothesized that some of the alkalinity could be the result of methanogenesis.

NH_4^+ -N on day 0 ranged from 1 to 390 mg l^{-1} in R7 and R5, respectively (Appendix IV). On day 70, values were between 315 and 6400 mg l^{-1} (same reactors, respectively). Alkalinity and NH_4^+ were always highest in R5 and lowest in R7. The nitrogen in the urea and reducing conditions are likely the source of the excessive NH_4^+ . The high solubility of composted poultry manure and its high nitrogen content (Table 3.3) may

explain the elevated levels of NH_4^+ in R5, R8 (mixture) and R9 (mixture plus formaldehyde).

3.4.2.7 Sulphides

Final sulphide concentrations were a maximum of 1.65 mg l^{-1} in R5 (poultry manure) on day 70. Sulphide in reactor 1D (maple wood chips), the replicate showing sulphate reduction, was 0.25 mg l^{-1} whereas the other replicate showed no sulphide. The marked increase in sulphide in R5 can possibly be attributed to sulphides in poultry manure. These final concentrations were lower than the average 4.5 mg l^{-1} of Cocos et al. (2002), although Waybrant et al. (2002) detected no sulphide formation in sulphate reduction column reactors containing a mixture of organic substrates..

Significant sulphide increase occurs only once metals are depleted (Waybrant et al., 1998), which is why a significant increase in sulphide can be seen in all reactors after day 33, when most heavy metals, notably iron, nickel and zinc, were already depleted. It is worth noting that, except for R5, the highest sulphide was measured in the reactors showing measurable sulphate reduction, notably R1D, R7, R8 and R9.

3.4.3 Overall Substrate Performance

The higher performance of the reactors containing a mixture (wt%) of leaf compost (30%), poultry manure (18%), and maple wood chips (2%) (R8 and R9), when compared with single organic substrates (50%), validates the present trend in AMD

treatment. As our results show, the optimum mixture proportions statistically found by Cocos et al. (2002) are accurate for short-term experiments. The authors reported poultry manure as a reasonable substrate for sulphate reduction when mixed at a high proportion with other organic substrates. Waybrant et al. (1998) also reported that sheep manure plus calcite and sand showed no sulphate reduction until it was mixed with other organic constituents. Amos et al. (2003) excluded cattle manure as the sole mixture component due to poor permeability and heterogeneity, but found that sulphate reduction occurred when the manure was mixed with other organic and inorganic substances, likely the result of permeability and microbial fixation site availability. The least effective reactors in this experiment were those containing only leaf compost or poultry manure, the substrates with the least amount of TOC (Table 3.3). Likewise, Waybrant et al. (1998) note that the two reactors with the lowest C contents also had the two lowest sulphate reduction rates, whereas the four reactors with the highest C contents had the four highest sulphate reduction rates. However, the most effective reactors in our study (R8 and R9) were predominantly composed of these substrates. Likewise, Chang et al. (2000) reported that spent mushroom compost (SMC), considered the best substrate due to nutrient content, slow degradation and its bulk form, showed no sulphate reduction for 10 weeks (the length of our experiment) when no inoculum was used. Similarly, our reactors had very low SRB counts to begin with, as shown by enumeration in reactor and sediment samples on day 0. R1D (maple wood chips) exhibited sulphate reduction, as did R8 and R9, also containing maple wood chips. However, these reactors also contained, and predominantly, the substrates with the most

easily available carbon, poultry manure and leaf compost (Table 3.3). These are substrates that, as the sole carbon source, showed no significant sulphate reduction. As a result, perhaps it is the amount or strains of bacteria present on the maple wood chips themselves that proliferate in the presence of substrates containing a high amount of easily available substances (EAS) like poultry manure and leaf compost.

Sphagnum peat moss would not be practical for large-scale operations because of its low density. More importantly, however, given the lack of measurable sulphate reduction and the sub-optimum ORP reached in the reactor with peat moss, there is little evidence supporting its use for sulphate reduction promotion.

Conifer sawdust and composted spruce chips are deficient in nitrogen and showed no measurable sulphate reduction. However, in light of the SRB enumeration, comparable to the other substrates, SRB may be able to reduce sulphate with these substrates, if no inhibition occurs. Research at the University of Waterloo suggests that some sulphate reduction does occur with these substrates and their abundance in logging areas near mine sites could be an asset (Jeff Bain, personal communication). Tassé and Germain (2002) also reported sulphate reduction with conifer barks, especially when mixed with leaf-bearing tree barks. Indeed, a mixture of these conifer substrates and composted poultry manure and/or leaf compost may be effective. The results of this experiment did not provide conclusive evidence on the usefulness of maple wood chips as a lone source for SRB carbon, as evidenced by the moderate performance in only one of the replicates.

3.5 Conclusions

The low counts of SRB in the creek sediment (bacterial inoculum) are partly responsible for the long acclimation times and the low sulphate reduction rates (T_{0-70}) measured in the reactors containing mixtures of natural organic materials. It also explains the low sulphate reduction rate measured in the reactor containing ethanol. The duration of the experiment (70 days) was sufficient to compare natural single substrates with natural substrate mixtures or a simple substrate such as ethanol, but did not allow for conclusions on their use in the field or their long-term effectiveness. Similarly, although characterization of substrates on an individual basis provided insight on their organic carbon composition and solubility, it did not give a good idea of their ability to promote sulphate reduction and metal removal. It would be, however, interesting to quantify the lignin content of the organic materials, as this characteristic was successfully correlated to their degradability (Gibert et al., 2004). Flow-through column experiments would also allow for more accurate speculation on field use.

The natural organic substrate mixtures (with and without formaldehyde) were successful in promoting sulphate reduction and metal removal (94-99%) but the lowest metal removal efficiency was observed in the reactor containing composted poultry manure as a single carbon source. Ethanol reactors and one maple wood chip reactor also showed sulphate reduction but in general, the single natural organic substrates were not effective in promoting sulphate reduction over the length of the batch tests. Given the moderate

reactivity (in terms of sulphate reduction) of maple wood chips and the obvious reactivity of the maple wood chips-leaf compost-poultry manure mixtures, it is suspected that the mixing of substrates brings together different strains of bacteria in addition to different carbon compounds whose combined contribution favours sulphate reduction.

3.6 Acknowledgements

This work was partially funded by the Canadian Water Network (CWN) and by La Fondation de Polytechnique. The authors would like to thank M. Lindsay and the research group of Drs Blowes and Ptacek (University of Waterloo, Canada) for discussions with regard to synthetic AMD preparation and also for provision of some of the natural organic materials. The authors would also like to express gratitude to C. Neculita for helpful comments and suggestions.

3.7 References

Amos, P.W., Younger, P.L., 2003. Substrate characterization for a subsurface reactive barrier to treat colliery spoil leachate. *Water Res.* 37, 108-120.

Amos, R.T., Mayer, U.M., Blowes, D.W., Ptacek, C.J., 2004. Reactive transport modeling of column experiments for the remediation of acid mine drainage. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3131-3138.

ASTM Standard methods for sulphate reducing bacteria in water and water-formed deposits, 1990. D4412-84. Washington, DC: American Public Health Association.

ASTM Standard test methods for moisture, ash, and organic matter of peat and other organic soils, 2003. D2974W-B. ASTM International.

Aubertin, M., Bussiere, B., Bernier, L., 2002. Environnement et gestion des rejets miniers. Manuel sur cederom. Presses Internationales Polytechnique.

Beaulieu, S., Zagury, G.J., Deschenes, L., Samson, R., 2000. Bioactivation and bioaugmentation of a passive reactor for acid mine drainage treatment. In: Sinhal, R.K., Mehrotra, A.K., (Eds.), Environmental Issues and Management of Waste in Energy and Mineral Production, A.A. Balkama Publishers, VT, USA, pp. 533-537.

Chang, I. S., Shin, P. K., Kim, B. H., 2000. Biological treatment of acid mine drainage under sulphate-reducing conditions with solid waste materials as substrate. Water Res. 34, 1269-1277.

Christensen, B., Laake, M., Lien, T., 1996. Treatment of acid mine water by sulphate-reducing bacteria; Results from a bench scale experiment. Water Res. 30, 1617-1624.

Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. (Eds.), 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.

Cocos, I.A., Zagury, G.J., Clement, B., Samson, R., 2002. Multiple factor design for reactive mixture selection for use in reactive walls in acid mine drainage treatment. *Water Res.* 32, 167-177.

Drury, W.J., 1999. Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid-substrate reactors. *Wat. Environ. Res.* 71, 1244-1250.

Eger, P., Wagner, J., 1995. Sulphate reduction for the treatment of acid mine drainage: Long term solution or short term fix? In: Sudbury '95: Mining and the Environment: Conference Proceedings Volume II: Acid Mine Drainage Prevention and Control, Ground and Surface Water. Sudbury, Canada, pp. 515-524. .

Gazea, B., Adam, K., Kontopoulos, A., 1996. A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage. *Min. Engin.* 9, 23-42.

Gerhart, P., 1981. Manual of methods for general microbiology. Washington, DC: ASM Publication.

Gibert, O., de Pablo, J., Cortina, J.L., Ayora, C., 2004. Chemical characterization of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage. *Water Res.* 38, 4186-4196.

HACH Procedure Manual, 1998. DR/2010 Spectrophotometer Handbook, 4ed., HACH Company, USA.

Hao, O.J., Huang, L., Chen, J.M., 1994. Effects of metal additions on sulphate reduction activity in wastewaters. *Environ. Toxicol. Chem.* 46, 197-212.

Hulshof, A.H.M., Blowes, D.W., Ptacek, C.J., Gould, W.D., 2003. Microbial and nutrient investigations into the use of in situ layers for treatment of tailings effluent. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5027-5033.

Hulshoff Pol, L.W., Lens, P.N.L., Stams, A.J.M., Lettinga, G., 1998. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* 9: 213-224.

Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2004. Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Sci. Tot. Environ.*, Article in Press.

Kaksonen, A.H., Franzman, P.D., Puhakka, J.A., 2003. Performance of ethanol and oxidation kinetics of a sulfate-reducing fluidized bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation* 14, 207-217.

Kaksonen, A.H., Plumb, J.J., Franzman, P.D., Puhakka, J.A., 2004. Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 279-289.

Kolmert, A., Johnson, D.B., 2001. Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 836-843.

Lu, Z., Hegemann, W., 1998. Anaerobic toxicity and biodegradation of formaldehyde in batch cultures. *Water Res.* 32, 209-215.

Marschner, B., Kalbitz, K., 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113, 211-235.

Ministère de l'Environnement et de la faune du Québec, 1996. Solides-Détermination du carbone inorganique total, dosage par spectrophotométrie IR. Méthode MA.410C 1.0. Ministère de l'Environnement et de la faune du Québec, Québec, QC, Canada.

Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Peeva, L., Livingston, A., 2000a. Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 370-380.

Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A., Peeva, L., 2000b. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 533-543.

Neculita, C.M., Zagury, G.J., Bussiere, B., 2004. Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria – a critical review. *Environ. Pollut.* (submitted).

Okabe, S., Nielsen, P.H., Characklils, W.G., 1992. Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 725-734.

Omil, F., Mendez, D., Vidal, G., Mendez, R., Lema, J.M., 1999. Biodegradation of formaldehyde under anaerobic conditions. *Enz. Microb. Technol.* 24, 255-262.

Postgate, J.R., 1984. The sulphate reducing bacteria 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Poulson, S.R., Colberg, P.J.S., Drever, J.I., 1997. Toxicity of heavy metals (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans*. Geomicrobiol. J. 14, 41-49.

Prasad, D., Wai, M., Berube, P., Henry, J. G., 1999. Evaluating substrates in the treatment of acid mine drainage. Environ. Technol. 20, 449-459.

Reis, M.A.M., Lemos, P.C., Almeida, J.S., Arrando, M.J.T., 1998. Influence of produced acetic acid on growth of sulphate reducing bacteria. Biotechnol. Let. 12, 145-146.

Tassé, N., Germain, D., 2002. Évaluation de la performance de divers types de résidus forestiers pour le traitement du drainage minier acide. Symposium 2002 sur l'environnement et les mines, Rouyn-Noranda, QC, Canada, 3-5 November.

Tsukamoto, T.K., Killion, H.A., Miller, G.C., 2004. Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. Water Res. 38, 1405-1418.

Tuominen, L., Kairesalo, T., and Hartikainen, H., 1994. Comparison of methods for inhibiting bacterial activity in sediment. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3454-3457.

Utgikar, V.P., Chen, B., Chaudhary, N., Tabak, H.H., Haines, J.R., Govind, R., 2001.

Acute toxicity of heavy metals due to acetate-utilizing mixed cultures of reducing-reducing bacteria : EC100 AND EC50. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2662-2669.

Utgikar, V.P., Tabak, H.H., Haines, J.R., Govind, R., 2003. Quantification of toxic and inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of reducing-reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 306-312.

Utgikar, V.P., Chaudhary, N., Koeniger, A., Tabak, H.H., Haines, J.R., Govind, R., 2004. Toxicity of metals and metal mixtures: Analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Res.* 38, 3651-3658.

Von Rege, H., Sand, W., 1998. Evaluation of biocide efficacy by microcalimetric determination of microbial activity in biofilms. *J. Microbiol. Met.* 33, 227-235.

Waybrant, K.R., Blowes, D.W., Ptacek, C.J., 1998. Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1972-1979.

Waybrant, K.R., Ptacek, C.J., Blowes, D.W., 2002. Treatment of mine drainage using permeable reactive barriers: column experiments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1349-1356.

Widell, F., 1998. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*, John Wiley & Sons, pp. 459-584.

4. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

4.1 Conclusions

The first objective of the current study was to quantify the relation between chemical composition of a given natural organic carbon source and its degradability and ability to promote sulphate reduction and metal removal. The second objective was to compare the performance of the various substrates as single carbon sources for SRB in reactive mixtures, and to compare their performance with that of a mixture containing several substrates.

The investigation was carried out by first characterizing the substrates (maple wood chips, sphagnum peat moss, leaf compost, composted conifer chips, poultry manure, conifer sawdust) via analyses quantifying the water-dissolvable organic carbon (DOC), total organic carbon (TOC), nitrogen (total kjeldahl nitrogen, TKN) and easily available or bioaccessible fraction (easily available substances, EAS) of the substrates. Next, their reactivity as single carbon sources and in a mixture of maple wood chips, poultry manure and leaf compost was tested in a batch experiment.

Chemical characterization (Table 3.3) showed that the poultry manure used in the study had the highest DOC, EAS, waxes and resins, TKN and TIC with 6.1, 17, 63, 5.8, and 4.8 percent (by weight), respectively. The wood materials, maple wood chips, composted conifer chips and conifer sawdust had the most TOC and the least TKN with 51, 46, 46 and 0.09, 0.1, 0.01 percent (by weight), respectively. In the batch experiment,

Final pH (Fig. 3.2) was highest (8.5) in reactors containing leaf compost (R3), composted spruce chips (R4), and conifer sawdust (R6). Lowest final pH (6.3) was found in the ethanol reactor (R7). The most significant sulphate reduction (Fig. 3.3) was observed in the reactors containing a variety of organic carbon sources (maple wood chips, leaf compost, poultry manure) with and without formaldehyde, with overall rates of 60 and 43 mg/l/day, respectively (Table 3.4). Final SRB counts were highest in the maple wood chip (as sole carbon source) reactor with 2.8×10^5 cells/ 100 ml (Appendix IV). DOC values (Fig. 3.3) were consistently highest in the poultry manure reactor, as were alkalinity and NH_4^+ (Appendix IV). For metals (Fig. 3.4-3.6; Appendix IV), Cd removal was 97-99% except R5 (poultry manure). Fe removal was 93-100% except R7 (ethanol). Mn removal was 98-99% (except for R7), and Ni removal was 92-99% (except R5). Zn removal was between 92 and 94%, (except in R5). Rate laws (orders of reaction) and rate constants for metal removal were variable between metals and between reactors and, where available, are found in Appendix V.

It is concluded that the low SRB count in the creek sediment, used as the bacterial source, was responsible in part for the long acclimation times and the low sulphate reduction rates ($T_{0.70}$) in the reactors containing mixtures of natural organic materials. It also helps explain the low sulphate reduction rate in the reactor containing ethanol (containing no supplementary bacteria intrinsic to natural substrates), where SRB counts were always significantly lower. A longer experiment may allow observation of sulphate-reduction for the single organic substrates, as significant numbers of SRB were

enumerated in all the reactors (low numbers in ethanol reactor) during the course of the experiment and sulphate reduction rates were underestimated due to sulphate, found in the creek sediment and co-precipitated to ferric (oxy)hydroxides in the synthetic AMD, dissolving in the reactors during the course of the experiment.

Over the 70-day batch experiment, despite adequate conditions, such as near-neutral pH, low ORP and nitrogen abundance, none of the single natural organic substrates presented itself definitively as a reliable single carbon source for SRB. Of the single substrates tested, only ethanol and maple wood chips were found to be effective in the short term as electron donors for bacterially-mediated sulphate reduction, although only one replicate reactor containing maple wood chips as the single carbon source effectively removed sulphate. Thus, it is concluded that the length of the experiment was adequate for comparing the performance of a simple organic substrate such as ethanol with more complex single natural organic substrates and a mixture of those, but it did not allow for conclusions on their use in the field or their long-term effectiveness.

Given the findings in the natural organic substrate characterization study, coupled with the batch experiment, it is concluded that the characterization of natural organic substrates on an individual basis provided insight on their carbon composition and solubility, but not on their ability to promote sulphate removal and metal reduction. Although the “organic wastes” sphagnum peat moss, leaf compost and poultry manure were found to contain high percentages of dissolved organic carbon and easily available

substances, as well as suitable C/N ratios, neither promoted measurable sulphate reduction in the batch experiment. The “cellulosic wastes” (maple wood chips, composted conifer chips and conifer sawdust), containing excessive C/N ratios, also showed no measurable reactivity (aside from one maple wood chips reactor) over the course of the batch test.

Based on the results of the batch experiment, it is concluded that the natural organic substrate mixture proportions used in this study could be effective for use in on-site compost bioreactors or PRB's, although important factors such as hydraulic conductivity were not assessed and this should be done in parallel to column flow-through studies. The natural organic substrate mixtures containing maple wood chips, poultry manure and leaf compost, with and without formaldehyde, were successful in promoting sulphate reduction and metal removal (94-99%), however the lowest metal removal efficiency was observed in the reactor containing composted poultry manure as the single carbon source. Ethanol reactors and one maple wood chips reactor also showed sulphate reduction, but in general, the single natural organic substrates were not successful in promoting sulphate reduction. Thus, the combination of substrates contributed to the overall reactivity. The mixing of substrates is suspected to bring together different strains of bacteria and different carbon compounds whose combined contribution favours sulphate reduction by SRB.

A formaldehyde concentration of 0.015% (w/v) appeared to inhibit SRB activity for only a short period of time by delaying sulphate reduction and metal precipitation, although SRB numbers were similar to that of the mixture with equal substrate proportions but not containing formaldehyde. However, it did not change the physicochemical properties in the medium. Thus, a stronger dose should be used to stop SRB activity. The toxic/inhibitory effect of substances found in conifer wood could not be confirmed by the batch experiment results, given that the behaviour of reactors containing it did not perform much differently than those containing any other single substrate, although they were among the reactors with the lowest final SRB counts.

4.2 Recommendations

Given the reactivity of one of the reactors containing only maple wood chips as organic substrate and also the reactivity of the mixture containing maple wood chips along with poultry manure and leaf compost, it is recommended that the SRB native to the carbon sources be identified and quantified to test whether the bacteria indigenous to one substrate are more apt to proliferate in the presence of another and its biodegraded by-products, or whether the mixing of strains of bacteria and thus an increased microbial diversity provides a positive effect.

The products of anaerobic digestion of the organic substances and their mixtures should be identified and monitored so that the conditions created by this preliminary degradation is better understood. As SRB cannot use complex organic substrates and

may be out-competed by other organisms for the simpler ones early on, the broken down molecules (acetate, propionate, etc.) available to SRB should be investigated.

Conifer wood materials, found in abundance near many mine sites, should be tested for sulphate reduction in reactive mixtures containing other carbon sources, as their performance as single substrates was not very different from that of other single natural organic substrates. These substances could thus be compared with maple wood chips in their performance as part of an organic substrate mixture for SRB, and their inhibitive effects (if any) could be better understood and quantified.

The cellulose and lignin content of natural organic substrates should be quantified as previous studies have correlated lignin content to biodegradability and as cellulose is the predominant carbon component in natural organic substances. Phosphorus and nitrogen content could likewise be evaluated and monitored as phosphorus is also an essential nutrient for microbial growth.

Future batch tests with natural organic substrates should be designed to be longer in order to better observe reactivity differences between substrates showing slow sulphate reduction. In addition, the bacterial source used, if any, should be verified by the MPN technique and/or allowed to acclimate before addition of highly acidic and metal-laden AMD. Meanwhile, dynamic experiments using column reactors should be an essential component of future research, as toxic/inhibitory substances that accumulate in batch

reactors are flushed out of column reactors and previous studies stress the importance of permeability of reactive mixtures and that of hydraulic retention time (HRT). Column experiments are more representative of field conditions in flow-through reactors.

5. REFERENCES

AMOS, P.W., YOUNGER, P.L. (2003). Substrate characterization for a subsurface reactive barrier to treat colliery spoil leachate. *Water Research* 37: 108-120.

AMOS, R.T., MAYER, U.M., BLOWES, D.W., PTACEK, C.J. (2004). Reactive transport modeling of column experiments for the remediation of acid mine drainage. *Environmental Science and Technology* 38: 3131-3138.

ASTM (1990). *Standard Methods for sulphate reducing bacteria in water and water-formed deposit*. D4412-84. Washington, DC: American Public Health Association.

ASTM (2003). *Standard Test Methods for Moisture, Ash, and Organic Matter of Peat and Other Organic Soils*. D2974W-B. ASTM International.

AUBERTIN, M., BUSSIÈRE, B., BERNIER, L. (2002). *Environnement et gestion des rejets miniers*. Manuel sur cederom. Presses Internationales Polytechnique.

BEAULIEU, S. (2001). Application des techniques de bioactivation et de bioaugmentation pour le traitement en conditions sulfato-réductrices des eaux de drainage minier acide. *Masters thesis, Ecole Polytechnique de Montreal*.

BEAULIEU, S., ZAGURY, G.J., DESCHENES, L., SAMSON, R. (2000). Bioactivation and bioaugmentation of a passive reactor for acid mine drainage treatment. In: Sinhal, R.K., Mehrotra, A.K., (Eds.), *Environmental Issues and Management of Waste in Energy and Mineral Production*, A.A. Balkama Publishers, VT, USA, pp. 533-537.

BENNER, S.G., BLOWES, D.W., GOULD, W.D., HERBERT JR., R.B., PTACEK, C.J. (1999). Geochemistry of a permeable reactive barrier for metals and acid mine drainage. *Environmental Science and Technology* 33: 2793-2799.

BENNER, S.G., BLOWES, D.W., PTACEK, C.J. (1997). A full-scale porous reactive wall for prevention of acid mine drainage. *Ground Water Monitoring and Remediation* 17: 99-107.

BENNER, S.G., BLOWES, D.W., PTACEK, C.J., MAYER, K.U. (2002). Rates of sulphate reduction and metal sulfide precipitation in a permeable reactive barrier. *Applied Geochemistry* 17: 301-320.

CHANG, I. S., SHIN, P. K., KIM, B. H. (2000). Biological treatment of acid mine drainage under sulphate-reducing conditions with solid waste materials as substrate. *Water Research* 34: 1269-1277.

CLESCERI L.S., GREENBERG A.E., EATON A.D., Ed's (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC: American Public Health Association.

COCOS, I.A., ZAGURY, G.J., CLEMENT, B., SAMSON, R. (2002). Multiple factor design for reactive mixture selection for use in reactive walls in acid mine drainage treatment. *Water Research* 32: 167-177.

DOBRAN, S. *Protocole Expérimental pour la détermination des substances facilement disponibles*. Département du génie chimique, École Polytechnique de Montréal, 2001.

DRURY, W.J. (1999). Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid-substrate reactors. *Water Environment Research* 71, 6: 12444-1250.

EGER, P., WAGNER, J. (1995). Sulphate reduction fro the treatment of acid mine drainage: Long term solution or short term fix? In: *Sudbury '95: Mining and the Environment: Conference Proceedings Volume II: Acid Mine Drainage Prevention and Control*, Ground and Surface Water. Pages 515-524. Sudbury, Canada.

GAZEA, B., ADAM, K., KONTOPOULOS, A. (1996). A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage. *Min. Engin.* 9, 23-42.

GERHART, P. (1981). Manual of methods for general microbiology. Washington, DC: ASM Publication.

GIBERT, O., DE PABLO, J., CORTINA, J.L., AYORA, C. (2002). Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using permeable reactive barriers: A review from laboratory to full-scale experiments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1: 327-333.

GIBERT, O., DE PABLO, J., CORTINA, J.L., AYORA, C. (2003). Evaluation of municipal compost/limestone/iron mixtures as filling material for permeable reactive barriers for in-situ acid mine drainage treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78: 489-496.

GIBERT, O., DE PABLO, J., CORTINA, J.L., AYORA, C. (2004). Chemical characterization of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage. *Water Research* 38: 4186-4196.

GIBSON, G.R. (1990). Physiology and ecology of sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 69: 769-797.

GU, B., WATSON, D.B., WU, L., PHILIPPS, D.H., WHITE, D.C., ZHOU, J. (2002). Microbial characteristics in a zero-valent iron reactive barrier. *Environmental Monitoring and Assessment* 77: 293-309.

HACH (1998). *Procedure Manual: DR/2010 Spectrophotometer Handbook, 4ed.*, HACH Company, USA.

HAO, O.J., HUANG, L., CHEN, J.M., BUGLASS, R.L. (1994). Effects of metal additions on sulphate reduction activity in wastewaters. *Toxicological and Environmental Chemistry* 46: 197-212.

HAO, O.J., CHEN, J.M., HUANG, L., BUGLASS, R.L. (1996) Sulfate-reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26, 1: 155-187.

HULSHOF, A.H.M., BLOWES, D.W., PTACEK, C.J., GOULD, W.D. (2003). Microbial and nutrient investigations into the use of in situ layers for treatment of tailings effluent. *Environmental Science and Technology* 37, 21: 5027-5033.

HULSHOFF POL, L.W., LENS, P.N.L., STAMS, A.J.M., LETTINGA, G., (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* 9: 213-224.

JOHNSON, D.B., HALLBERG, K.B. (2004a). Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of the Total Environment*: Article in Press.

JOHNSON, D.B., HALLBERG, K.B. (2004b). Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Science of the Total Environment*: Article in Press.

JONG, T., PARRY, D.L. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research* 37: 3379-3389.

KOSINSKA, K., MISKIEWICZ, T. (1999). Upgrading the efficiency of dissimilatory sulphate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* via adjustment of the COD/SO₄ ratio. *Biotechnology Letters* 21: 299-302.

KUYUCAK, N., ST-GERMAIN, P. (1994). In situ treatment of acid mine drainage by sulphate reducing bacteria in open pits: scale-up experiences. Paper presented at the International Land Reclamation and Mine Drainage Conference and the Third International Conference on the Abatement of Acidic Drainage, Pittsburgh, PA, April 24-29.

MARSCHNER, B., KALBITZ, K. (2003). Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113 : 211-235.

Ministère de l'Environnement et de la faune du Québec (1996). Solides-Détermination du carbone inorganique total, dosage par spectrophotométrie IR. Méthode MA.410C 1.0. Ministère de l'Environnement et de la faune du Québec, Québec, QC, Canada.

MIZUNO, O., LI, Y.Y., NOIKE, T. (1998). The behaviour of sulphate reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. *Water Research* 32: 1626-1634.

MORRISON, S. J., METZLER, D.R., DWYER, B.P. (2002). Removal of As, Mn, Mo, Se, U, V and Zn from groundwater by zero-valent iron in a passive treatment cell: reaction progress modelling. *Journal of Contaminant Hydrology* 56: 99-116.

NAGPAL, S., CHUICHULCHERM, S., PEEVA, L., Livingston, A. (2000). Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnology and bioengineering* 70, 4: 370-380.

OKABE, S., NIELSEN, P.H., CHARAKLIS, W.G. (1992) Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 40: 725-734.

OMIL, F., LENS, P., VISSER, A., HULSHOFF POL, L.W., LETTINGA, G. (1998). Long-term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering* 57: 676-685.

POSTGATE, J.R. (1984). *The sulphate reducing bacteria* 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

POULSON, S.R., COLBERG, P.J.S., DREVER, J.I. (1997). Toxicity of heavy metals (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans*. *Geomicrobiology Journal* 14: 41-49.

PRASAD, D., WAI, M., BERUBE, P., HENRY, J. G. (1999). Evaluating substrates in the treatment of acid mine drainage. *Environmental Technology* 20: 449-459.

REIS, M.A.M., ALMEIDA, J.S., LEMOS, P.C., CARRONDO, M.J.T. (1992). Effect of hydrogen sulfide on growth of sulphate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 40: 593-600.

REISMAN, D.J., GUSEK, J.J., BISHOP, M. (2003). A pre-treatability study to provide data for construction of a demonstration bioreactor. *Tailings and Mine Waste '03*: 305-315, Swets & Zeitlinger, Lisse, ISBN 90 5809 593 2.

STUMM, W., MORGAN, J.J. (1996). *Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., NewYork.

TASSÉ, N., GERMAIN, D. (2002). Évaluation de la performance de divers types de résidus forestiers pour le traitement du drainage minier acide. Symposium 2002 sur l'environnement et les mines, Rouyn-Noranda, QC, Canada, 3-5 November.

TREVORS, J.T. (1996). Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 26: 53-59.

TSUKAMOTO, T.K., KILLION, H.A., MILLER, G.C. (2004). Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Research* 38: 1405-1418.

TUOMINEN, L., KAIRESALO, T., and HARTIKAINEN, H. (1994). Comparison of Methods for inhibiting bacterial activity in sediment. *Applied and Environmental microbiology* 60: 3454-3457.

TUTTLE, J.H., DUGAN, P.R., RANGLES, C.I. (1969) Microbial sulfate reduction and its potential utility as an acid mine water pollution abatement procedure. *Applied Microbiology* 17: 297-302.

UBEROI, V., BJATTACHARYA, S.K. (1995). Interactions among sulfate reducers, acetogens, and methanogens in anaerobic propionate systems. *Water Environment Research* 67: 330-339.

UTGIKAR, V.P., CHEN, B., CHAUDHARY, N., TABAK, H.H., HAINES, J.R., GOVIND, R. (2001). Acute toxicity of heavy metals due to acetate-utilizing mixed cultures of sulfate-reducing bacteria: EC100 AND EC50. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2662-2669.

UTGIKAR, V.P., HARMON, S.M., CHAUDHARY, N., TABAK, H.H., GOVIND, R., HAINES, J.R. (2002) Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulphide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental Toxicology* 17: 40-48.

UTGIKAR, V.P., TABAK, H.H., HAINES, J.R., GOVIND, R. (2003). Quantification of toxic and inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of sulfate-reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 82: 306-312.

VON REGE, H., SAND, W. (1998). Evaluation of biocide efficacy by microcalimetric determination of microbial activity in biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 33: 227-235.

WAYBRANT, K.R., BLOWES, D.W., PTACEK, C.J. (1998). Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environmental Science and Technology* 32: 1972-1979.

WAYBRANT, K.R., PTACEK, C.J., BLOWES, D.W. (2002). Treatment of mine drainage using permeable reactive barriers: column experiments. *Environmental Science and Technology* 36: 1349-1356.

WEBB, J.S., MCGUINNESS, S., LAPPIN-SCOTT, H.M. (1998). Metal removal by sulphate-reducing bacteria from natural and constructed wetlands. *Journal of Applied Microbiology* 84: 240-248.

WIDELL, F. (1998). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*, John Wiley & Sons, 459-584.

WILDEMAN, T., UPDEGRAFF, D. (1997) Passive bioremediation of metals and inorganic contaminants. In: *Perspectives in Environmental Chemistry*, D.L. Macalady. Ed. Oxford University Press, New York.

WOLF, D.C., DAO, T.H., SCOTT, H.D., LAVY, T.L. (1989). Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. *Journal of Environmental Quality* 18: 39-44.

WOLF, D.C., SKIPPER, H.D. (1994). Soil Sterilization. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. Pp. 41-51. Eds. R.W. Weaver, J.S. Angle, P.S. Botlomley. SSSA Book Series, Wisconsin, USA.

ZALUSKI, M.H., TRUDNOWSKI, J.M., HARRINGTON-BAKER, M.A., BLESS, D.R. (2003). Post-mortem findings on the performance of engineered SRB field-bioreactors for acid mine drainage control. Cairns QLD, 12-18 July.

APPENDIX I:

**PROTOCOLE P62-B: ANALYSE DES SOURCES DE CARBONE QUI SERONT
UTILISÉES POUR LE TRAÎTEMENT DU DRAINAGE MINIER ACIDE AU
MOYEN D'UN MUR RÉACTIF SULFATO-RÉDUCTEUR (MRSR)**

AND

**PROTOCOLE P-54D: DÉTERMINATION DES SUBSTANCES FACILEMENT
DISPONIBLES (SFD) D'UN MATERIEL ORGANIQUE**

	PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # : P 62B	Nombres de pages : 12	
Version : 9	Date : 2.09.2004	
Auteur(s) : <u>Viktors Kūlnieks</u> _____		
Approuvé par : _____ Gérald Zagury _____ Manon Leduc _____ _____	Signatures : ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____	Date : _____ _____ _____

Titre : Analyse des sources de carbone qui seront utilisées pour le traitement du drainage minier acide au moyen d'un mur réactif sulfato-réducteur (MRSR).

Mots clé : DMA, bactéries sulfato-réductrices, précipitation des métaux, mélange réactif.

1.Objectif(s)

Le but de ce protocole est d'analyser les différentes sources de carbone (fumier de volaille, copeaux d'érable, tourbe de sphagnum, compost de feuilles, copeaux de sapin, brin de scie), utilisées dans les mélanges réactifs pour le traitement du drainage minier acide (DMA) grâce à une biobarrière, soit Mur Réactif Sulfato Réducteur (MRSR). Il s'agit d'analyser l'efficacité de la consommation des sulfates, de la précipitation des métaux et de l'augmentation du pH d'un mélange réactif submergé dans une eau de DMA. Les essais seront réalisés en cuvette, dans des bocaux de verre, scellés afin de maintenir les conditions anaérobies nécessaires pour la croissance des bactéries sulfato-réductrices, qui vont utiliser les sulfates comme accepteur d'électrons et la matière organique comme donneur d'électrons. Les métaux vont précipiter en sulfures métalliques.

Les effets des différentes sources de carbone seront étudiés afin de compléter les études précédentes qui avait choisi le mélange offrant les meilleures performances.

2. MATÉRIELS

Matériel pour la préparation du drainage minier acide synthétique :

- balance analytique et standard de balance
- volume nécessaire = $18 \times 800 \text{ ml} = 14.4 \text{ L}$ (+ volume pour les analyses + volume perdu pendant la filtration du DMA). Alors, on fait 18 L pour simplicité (9 ballons de 2 l)
- 9 ballons jaugés de 2000 ml
- 9 Erlenmeyer a vide de 500 ml
- 5400 mg pierre à chaux (CaCO_3)
- coupelle en plastique
- spatule métallique
- mélange 3% $\text{H}_2(\text{g})/97\% \text{N}_2(\text{g})$
- Argon grade anaérobique
- CO_2 grade environnemental
- Azote grade HP

Matériel pour la préparation des mélanges réactifs :

- récipient en verre PYREX (1L)
- spatule métallique
- coupelle en plastique
- balance 0.00 g
- 18 bocaux de verre de 2000 ml
- 18 bouchons en téflon équipé de valves Mininert
- Tiroir hors lumière et gros sac en plastic (rempli d'azote) pour les réacteurs

Matériel pour l'échantillonnage :

- Gros sac à gants
- bonbonne d'azote (N_2 grade HP+)
- seringues en plastique de 10 ml, 30 ml, et 60 ml
- aiguilles d'échantillonnage 12 pouces
- seringues, acetone, acide nitrique 10% pour le rinçage des aiguilles

Matériel pour les analyses :

- pH-mètre Accumet Modèle 25
- l'électrode à pH (ORION ROSS 8175 BN : Électrode qui support le H_2S !) et la sonde à POR
- seringues de 10, 250 μl , etc., micropipette de 1000 et de 5000 μl avec embouts de plastique
- filtres 0.45 μm , White HAWP, 25 mm
- spectrophotomètres HACH DR/2010 et Cary 100, et les réactifs nécessaires pour chaque analyse (Fe^{2+} , SO_4^{2-} , S^{2-})
- cuvettes 25 ml (HACH), et 4 ml (Cary)

Réactifs :

- $18 \times 8,5 = 153 \text{ g}$ sulfate de fer heptahydrate, ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) ACS
- $18 \times 0,7 = 12,6 \text{ g}$ sulfate calcique (CaSO_4) ACS
- $18 \times 0,5 = 9 \text{ g}$ sulfate de magnésium (MgSO_4) ACS

- $18 \times 0,1 = 1,8$ g sulfate de nickel, hexahydrate ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ACS
- $18 \times 0,1 = 1,8$ g sulfate de zinc, heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ACS
- $18 \times 0,12 = 2,16$ g sulfate de sodium (Na_2SO_4) ACS
- $18 \times 0,07 = 1,26$ g sulfate de potassium (K_2SO_4) ACS
- $18 \times 0,05 = 0,9$ g sulfate de manganèse, tétrahydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ACS
- $18 \times 0,02 = 0,36$ g de sulfure de cadmium ($\text{Cd SO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$)
- 25 ml hydroxyde de sodium (NaOH 6N)
- pour 200 g de mélange réactif par réacteur (50% matière organique) et en duplicata :
- $(100 \times 2) + (4 \times 4) = 208$ g (sec) copeaux de bois d'érable non traité (Bergeron et fils, QC)
- $(100 \times 2) + (60 \times 4) = 440$ g (sec) compost de feuilles (la ville de Montréal)
- $(100 \times 2) + (36 \times 4) = 344$ g (sec) fumier de volaille (Ecolo-Nature, QC)
- $100 \times 2 = 200$ g (sec) tourbe de sphaigne (Jardinière, QC)
- $100 \times 2 = 200$ g (sec) copeaux compostés de sapins (conifères du Nord d'Ontario grâce à Jeff Bain de l'université de Waterloo)
- $100 \times 2 = 200$ g (sec) brin de scie (conifères d'une scierie a Manitoba, grâce à Matt Lindsay de l'université de Waterloo)
- $10 \text{ ml} \times 2 = 20$ ml éthanol pur
- $6 \times 18 = 108$ g (sec) urée
- $60 \times 18 = 1080$ g (sec) sable propre
- $30 \times 18 = 540$ g (sec) (plus un peu pour le dénombrement des bactéries BSR du sédiment) sédiment de ruisseau (à préserver sous son eau de cours d'eau et à échantillonner avec le minimum d'eau possible)
- $4 \text{ g} \times 18 = 72$ g pierre à chaux (CaCO_3)
- 330 μl de formaldéhyde (solution de 35.6-38%)

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Préparation du DMA synthétique

Composant	Masse moléculaire	Conc. cible (mg/L)	Molarité (mol/l)	Source	Masse moléculaire	Masse a ajouter par L de solution (g)	Conc. SO_4^{2-} en solution (mg/l)	Molarité de SO_4^{2-} en solution (mol/l)
Fe^{2+}	55.847	1350	0.024173	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278.01756	6.720571	2322.163	0.024173
* Ca^{2+}	40.078	200	0.00499	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	172.17216	0.859185	479.3832	0.00499
Mg^{2+}	24.305	100	0.004114	MgSO_4	120.3686	0.495242	395.2421	0.004114
Ni^{2+}	58.69	15	0.000256	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	262.84528	0.067178	24.55195	0.000256
Zn^{2+}	65.39	15	0.000229	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.56056	0.065964	22.03631	0.000229
Na^+	22.98977	20	0.00087	Na_2SO_4	142.04314	0.247141	167.1415	0.00174
K^+	39.0983	15	0.000384	K_2SO_4	174.2602	0.133709	73.70929	0.000767

Mn ²⁺	54.938	12	0.000218	MnSO ₄ ·H ₂ O	169.01688	0.036918	20.98298	0.000218
Cd ²⁺	112.411	10	8.9E-05	CdSO ₄ ·8/3H ₂ O	256.51535	0.022819	8.545747	8.9E-05
**SO ₄ ²⁻	96.0636	3500	0.036434				3513.756	0.036577
Ph		5.3-5.7						

Le tableau 1 : composition de DMA synthétique

*Concentration actuelle plus haute due à la saturation de l'eau de DMA avec du CaCO₃**Concentration actuelle plus haute due au H₂SO₄ utilise durant la preparation du DMA**Préparation de l'eau saturée en CaCO₃ et la solution des sulfates de métaux sauf le fer (Lindsay)**

La préparation du DMA prend 3 jours. Il est important de faire au moins une essai de la procédure et mesurer le sulfate et le fer pour savoir si les concentrations cibles sont atteintes. Ensuite, la procédure peut être suivie en masse dans 9 ballons de 2 L avec des tubes de gaz pour chaque bouteille. Il faut bien identifier les bouteilles et noter les quantités actuelles des sels ajoutés. Un ballon de 2000 ml va servir pour le pair duplicata (800 ml de DMA filtrée dans chaque réacteur).

Jour 1 de préparation : Ajouter du CaCO₃ en excès (moins de 1000 mg: le montant actuelle ajoutée ici pendant l'expérience était 1000 mg = 500 mg/l, mais il y restait un peu de CaCO₃ hors solution après quelque jours de bullage avec CO₂) à d'environ 1500 ml de l'eau deionisée dans un bêcher de 2000 ml pour augmenter la capacité tampon (carbonate). Ensuite, faire le bullage dans la solution avec du CO₂ (g) pour 24 h. Ceci solubilise mieux le carbonate (pour balancer l'acidité/déséquilibre créé par le CO₂).

Jour 2 de préparation : Laisser la solution à s'équilibrer avec l'atmosphère. Ajouter 2x les quantités des sulfates de Ca, Mg, Ni, Zn, Na, K, Mn, Cd calculés dans le tableau 1 et mélanger la solution sur une plaque agitante pour 24 h.

Jour 3 de préparation : Transférer la solution dans la boîte à gants sous l'atmosphère d'azote et faire de bullage Ar(g) de grade anaérobique en solution pour 30-60 minutes.

Préparation de la solution de FeSO₄

Jour 1 de préparation : Pendant la bullage de la solution de CaCO₃, faire de bullage de l'Argon de grade anaérobique en 200 ml 0,1 N H₂SO₄ pour 24 h sous la hotte chimique dans des Erlenmeyer à vide pour éviter l'évaporation de l'acide.

Jour 2 de préparation : Dissoudre 2x le montant calculé dans le tableau 1 de sulfate de fer dans le H₂SO₄. Ensuite, faire de bullage 3% H₂(g)/97 % N₂(g) dans la solution (pour réduire le POR) pour 24 h et vérifier le POR.

Préparation Finale

Jour 3 de préparation : Mettre les lecteurs de POR et du pH dans la boîte à gants et ouvrir le détendeur d'azote. Laisser le milieu à s'équilibrer pour 10 minutes. Transférer la solution de sulfate de fer à la boîte à gants sous l'atmosphère d'azote. Ajouter les deux solutions à un ballon jaugé de 2000 ml. Mélanger bien. Vérifier le pH et le POR. Ajuster le pH à 5,5 ± 0,2 avec du H₂SO₄ ou de NaOH (préparer des solutions de 1 et 10 N de chaque). Ajouter de l'eau deionisée jusqu'à la jauge et mélanger bien. Filtrer l' à 0.45 µm et transférer le aux bouteilles bouchées pour son ajout aux mélanges et pour son analyse.

3.2 Préparation des mélanges réactifs

Les mélanges étudiés (Tableau 2) contiennent cinq composants principaux : une source de carbone, une source de bactéries, une source d'azote, un support poreux et un neutralisant du pH. Les pourcentages présentés ont été choisis à partir des chiffres de Cocos et al. (2001) et les travaux courants de Matt Lindsay à l'université de Waterloo. Les essais de traitement de l'eau souterraine contaminée par le DMA seront faits en cuvette, dans des bocaux de verre de 2000 ml scellés avec des couvercles en téflon munies des

valves Mininert.

Les composants seront mélangés sous la hotte chimique, à l'aide d'une spatule plastique dans un récipient en verre. La proportion de solides et de DMA dans les pots d'analyse est 200 g mélange (poids sec) / 800 ml DMA sauf pour mélange #7 (éthanol). Celui va avoir seulement 10 ml d'éthanol et 100g de mélange non-source de carbone (urée, sable, sédiment, chaux). Les proportions utilisées par Ioana Cocos (Cocos, 1999) étaient 100 g mélange + 300 ml DMA (1/3 poids/volume), mais il n'y restait pas beaucoup de liquide après 41 jours. La proportion proposée ici de 200 g / 800 ml assure assez de liquide pour toutes les analyses nécessaires pendant les 70 jours d'expérience et assez matière organique dans chaque réacteur pour l'utilisation de tout le sulfate si un minimum de 3.4 % C du COT (érable, tourbe, feuilles, fumier) est disponible dans le temps. Les bocaux de 2 l sont utilisés parce que 200 g du mélange avec la tourbe et 800 ml de liquide ne rentrent pas dans un bocal de 1 l.

Après la mise en place des 9 mélanges réalisés en duplicata, placer les bocaux dans la boîte à gants (2 à la fois) et les remplir avec le 800 ml de DMA synthétique (toujours déoxygené/fermé), puis les réacteurs seront scellés et incubés à la température ambiante ($-21 \pm 1^\circ\text{C}$) dans des gros sacs en plastique remplis d'azote (hors de la lumière) afin d'éviter le contact avec l'oxygène (et éventuelles odeurs).

1. Faire le poids sec selon la protocole A7 de tous les composants des mélanges avant de faire les mélanges (au moins un jour avant de commencer l'expérience) pour savoir les quantités humides nécessaires et laver les bouteilles avec du HNO_3 10% et de l'eau déionisée.
2. Bien marquer les bouteilles cuvées (1 et 1D, 2 et 2D, etc., D pour duplicata)
3. Mettre la balance, les composants des mélanges, 2 bouteilles (les duplicata) à la fois et leurs bouchons équipés des valves Mininert et les coupelles et spatules nécessaires sous la hotte chimique.
4. Ouvrir la première bouteille et tarer la balance. En utilisant la coupelle appropriée selon le composant de la mélange, peser le montant nécessaire de chaque composant et ajouter l'un à la bouteille, en changeant la coupelle pour chaque composant différent. Fermer la bouteille.
5. Répéter les étapes pour le reste des bouteilles.

3.3 Ajout du DMA aux mélanges

Ouvrir le détendeur d'azote et laisser équilibrer le sac à gants. Mettre 2 mélanges, 2 bouteilles du DMA, et un cylindre gradué de 1000 ml dans le sac à gants. Il faut échantillonner chaque DMA pour l'analyse de fer et de sulfate (voir l'échantillonnage du groupe 1). La boîte à gants encore équilibrée, ajouter 800 ml du DMA dans le premier mélange en notant quel mélange du DMA était utilisé et fermer les bouteilles. Répéter ces étapes.

	Pourcentage en mélange (%p/p)								
Réacteur	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9*
SOURCES DE CARBONE									
Copeaux de bois d'érable	50	0	0	0	0	0	0	2	2
Tourbe de sphagnum	0	50	0	0	0	0	0	0	0
Compost de feuilles	0	0	50	0	0	0	0	30	30
Copeaux compostés de conifères	0	0	0	50	0	0	0	0	0
Fumier de volaille	0	0	0	0	50	0	0	18	18
Brin de scie de conifères	0	0	0	0	0	50	0	0	0
Éthanol	0	0	0	0	0	0	10 ml	0	0

NUTRIMENTS	
Urée	3
SUPPORT POREUX	
Sable	30
SOURCE DE BACTÉRIES	
Sédiment de ruisseau	15
NEUTRALISEUR DU pH	
Pierre à chaux	2
* Stérilisé avec du formaldéhyde 100 mg par duplicate = 120 mg/l = 0.05 % (poids/poids = formaldéhyde/mélange) = 0.0125 % (poids/volume = formaldéhyde/DMA) = 330 µl de la solution 38% Concentrations choisies en considérant Tuominen et al. 1994, Omil et al 1999 et von Rege and Sand, 1998.	

Tableau 2 : Composition des mélanges réactifs.

Note : Les poids sont exprimés en pourcentages de poids secs.

3.3 Suivi des essais

Étapes chronologiques de l'échantillonnage :

Compte tenu que les séances d'échantillonnage diffèrent en fonction des analyses prévues, cette section décrit les soins particuliers pour chaque groupe prévu. Par ailleurs, les trois groupes des analyses sont les suivantes :

- **Groupe 1 :** séances d'échantillonnage prévues pour les jours 0 et 70, qui regroupe les analyses suivantes : pH, POR, concentration en métaux, COD, COT, NH_4^+ , NPP (aussi fait jours 35, 70), alcalinité, concentration en sulfate, en sulfure, en fer ferreux.
- **Groupe 2 :** séances d'échantillonnage prévues chaque 6-9 jours à partir du jour 1, qui regroupe les analyses suivantes : pH, POR, COD, concentration en sulfate, en fer ferreux et en sulfures (12 j), métaux.
- **Groupe 3 :** séances d'échantillonnage prévues 3 fois pendant l'expérience, qui regroupe les analyses suivantes : NPP, alcalinité.

L'échantillonnage du groupe 1 :

- 1.0 Déposer dans le gros sac à gants le pH-mètre avec les électrodes à pH et à POR, six réacteurs (3 en duplicata), six seringues d'échantillonnage en plastique de 60 ml, six aiguilles d'échantillonnage, 6 bouteilles commandées de Philip pour le NH_4^+ et 6 tubes à centrifugeuse de 15 ml pour l'analyse des métaux, 6 bouteilles à centrifugeuse de 50 ml pour l'alcalinité, 6 tubes à centrifugeuse de 15 ml pour le COT, 6 tubes à centrifugeuse de 15 ml pour le COD, des filtres White Hawp à 0.45 microns et 6 tubes de 50 ml à centrifugeuse avec leurs bouchons ;
- 2.0 Fermer le sac à gants et ouvrir le détendeur de la bonbonne d'azote. Laisse à s'équilibrer 10 minutes ;
- 3.0 Pour chaque pot : Ouvrir le valve Mininert du premier réacteur et prélever 60 ml à l'aide d'une seringue en plastique de 60 ml. Verser-le dans un tube à centrifugeuse identifiée de 50 ml et fermer le bouchon. Prélever encore plus que 50 ml et verser 20 ml dans un deuxième tube à centrifugeuse identifiée de 50 ml. Fermer le valve Mininert;

NB Prelever 20 ml de moins pour une des duplicata : on fait le NPP sur seulement une des duplicata

- 4.0 En utilisant ce qui reste dans le syringe, verser un peu plus que 5 ml (pour l'analyse de pH et POR) dans un petit tube à centrifugeuse identifiée et bien fermer son bouchon. Verser 3 ml dans un tube de 5 ml (pour l'analyse de COT) et fermer son bouchon. Verser le reste (environ 20 ml) dans un tube

pour le décompte bactérien selon la protocole 28A (*seulement pour une des duplicata!*);

- 5.0 Continuer la procédure pour les autres cinq réacteurs en changeant l'aiguille et syringe;
- 6.0 Ouvrir les petits tubes à centrifugeuse identifiés, et commencer l'analyse du POR et pH. Noter les valeurs dans le cahier du laboratoire ;
- 7.0 Fermer le détendeur d'azote et ouvrir le sac à gants et sortir les tubes à centrifugeuse de 50 ml;
- 8.0 Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à la température de la pièce à une vitesse de 3650 rot/min. ;
- 9.0 Prélever (avec la syringe de 60 ml) le surnageant de la première bouteille centrifugée et filtrer 50 ml dans un contenant de 60 ml pour l'envoi pour l'analyse d'alcalinité. Filtrer 3 ml dans un tube identifié de 5 ml (pour l'analyse de COD) et fermer le bouchon. Prélever (avec le syringe de 30 ml) le surnageant de la deuxième bouteille centrifugée et filtrer 10 ml dans une bouteille identifiée pour l'analyse de NH_4^+ (les bouteilles doivent être commandées de Philip contenant de l'acide H_2SO_4 pour la préservation de l'échantillon). Filtrer 5 ml dans un tube (préablement commandée de Philip Analytique) pour l'analyse des métaux. Filtrer le reste dans un vials en plastique identifiées de 15 ml. Il est probable que plusieurs filtres White Hawp de 0.45 microns seront nécessaires ;

10.0

Préparer les fioles jaugées de 25 ml pour la préparation des solutions nécessaires (concentrations dans la gamme de leur analyse au spectrophotomètre) en sulfate et en fer et leur subséquente analyse de concentration à l'aide du spectrophotomètre Cary 100. Il faut préalablement faire des courbes de calibration pour le sulfate et le fer. Une programme adéquat d'analyse est déjà disponible pour le sulfure. Il y a des réactifs pour chaque analyse. Voir le bouquin HACH DR/2010 Volume 2 pour le processus d'analyse.

Pour chaque analyse, l'échantillon doit être dilué avec de l'eau déionisée afin d'être dans la gamme de linéarité prévue : SO_4^{2-} 0-70 mg/l, S^{2-} 0-0.6 mg/l, Fe^{2+} 0-3 mg/l ($c_1v_1 = c_2v_2$). Par exemple, si la concentration en solution est supposée être vers 1000 mg/l de fer ferreux, il faut pipeter (avec le micropipette) 25 μl dans une fiole pour avoir 1 mg/l quand celui ci est rempli de H_2O deionisée. En plus, la longueur d'onde doit être ajustée pour chaque type d'analyse, soit 450 pour SO_4^{2-} , 665 pour S^{2-} , 510 pour Fe^{2+} . Noter l'absorbance indiquée par l'appareille et calculer la concentration d'échantillon en utilisant les courbes de calibration antérieurement tracées. Il faut mesurer l'absorbance de liquide dilue sans réactif (le blanc) et le soustraire de l'absorbance avec le réactif avant de calculer la concentration.

Note : Répéter les étapes 1.0 – 13.0 pour les 12 réacteurs qui restent. Faire aussi le NPP pour le sédiment seul dès que possible. Rincer les aiguilles avec de l'acétone (enlève les organiques), de l'eau deionisée, de l'acide nitrique 10% (enlève les métaux), et encore de l'eau deionisée entre sessions d'échantillonnage.

L'échantillonnage du groupe 2:

Faire le processus décrit dans « échantillonnage de groupe 1 » mais cette fois ci en prélevant 15 ml avec une syringe de 30 ml. Garder un peu plus que 4 ml pour l'analyse de pH et POR et centrifuger et filtrer le reste pour les analyses des métaux (5ml), le COD (3 ml) et le sulfate, fer, sulfure (3ml).

L'échantillonnage du groupe 3 :

Faire le processus décrit dans « échantillonnage de groupe 1 » mais cette fois ci en prélevant le montant nécessaire pour le NPP ou l'alcalinité. Garder un peu plus que 4 ml pour l'analyse de POR et pH.

Les analyses à effectuer et la fréquence sont présentées dans le tableau suivant :

	Contenant (plastique, P ou verre, V)	Volume à prélever	Filtrer ?	Limite de détection	Préservation	Méthode d'analyse	Fréquence

pH		P, V	4 ml total	Non	-	Analyse immédiate	Électrode ORION ROSS 8175 BN	6-9 jours
POR							Électrode ACCUMET 13.620.82	
NH4⁺		P, V	10 ml	Oui	0.02 mg/l	H ₂ SO ₄ pH<2	SM 4500-NH3-G	Jour 1 et 70
COT		P	3 ml	Non	0.05 mg/l	-	STM 5310 C Persulfate Ultraviolet Method	Jour 1 et 70
COD		P	3 ml	Oui	0.05 mg/l	-	STM 5310 C	6-9 jours
Alcalinité		P, V	50 ml	Oui	1 mg/L	-	Titration Acidimétrique	Jour 0, 35, 70
Métaux	Ca	P	5 ml	Oui	0.1 ppm	-	ICP-AES	6 -9jours
	Mg				0.1 ppm			
Ni	0.01 ppm							
Zn	0.05 ppm							
Na	0.5 ppm							
K	1 ppm							
Mn	0.005 ppm							
Cd	0.005 ppm							
Fe	0.1 ppm							
	EUD (Annexe 2)							
Fe²⁺		P	3 ml total	Oui	0 mg/l	Analyse immédiate	Spectrophotomètre Cary 100	6-9 jours
SO₄²⁻		P, V		Oui	7 mg/l	Analyse immédiate	Spectrophotomètre Cary 100	6-9 jours
S²⁻		P, V		Oui	0.01 mg/l	Analyse immédiate	Spectrophotomètre Hach DR/2010	12 jours

NPP	P, V	16 ml	Non		Analyse immédiate	PE 28A	Jour 0, 35, 70
	Volume totale minumum	399 mL	$= 4*(70/6)+10*2+3*2+3*(70/6)+3*50+5*(70/6)+3*(70/6)+16*3$ $=\Sigma[\text{volume par échantillon}*(\text{durée de l'expérience/fréquence d'échantillonnage})]$				

Tableau 3 : Les paramètres à analyser et les données d'échantillonnage.

4. RÉFÉRENCES

Beaulieu, S. Protocole Expérimental PE 28D « Bioaugmentation d'un biofiltre sulfato-réducteur à l'aide d'une tourbe granulaire bioactivée en bactéries sulfato-réductrices », École Polytechnique de Montréal, 1999.

Cocos, I "Choix d'un mélange réactif optimal qui sera utilisé pour le traitement du drainage minier acide au moyen d'un mur réactif sulfato-réducteur (MRSR)." École Polytechnique de Montréal, 1999.

Lindsay, M. University of Waterloo

Omill, F, Mendez, D., Vidal, G, Mendez, R., and Lema, J.M. «Biodegradation of formaldehyde under anaerobic conditions » Enzyme and Microbial Technology 24 :255-262, 1999.

Philip Analytique, QC

Tuominen, L., Kairesalo, T., and Hartikainen, H. « Comparison of Methods for inhibiting bacterial activity in sediment » Applied and Environmental microbiology, Sept. 1994, p. 3454-3457

Von Rege, H. et Sand, W. « Evaluation of biocide efficacy by microcalimetric determination of microbial activity in biofilms » Journal of Microbiological Methods, 33, 227-235, 1998.

5. Annexe 1 (Beaulieu, 1999)

Tableau 3 – Analyses par spectrophotométrie : dilutions des échantillons

Elément	Limites de la méthode	Gamme de concentrations	Volume d'échantillon	Volume d'eau déionisée	Facteur de dilution
Fer (Fe ²⁺) $\lambda = 510 \text{ nm}$	0 – 3 mg/l	5 à 100 mg/l	500 µl	24.5 ml	50
		100 à 700 mg/l	100 µl	24.9 ml	250
Sulfate (SO ₄ ²⁻) $\lambda = 450 \text{ nm}$	7 – 70 mg/l	0 à 500 mg/l	1000 µl	24.0 ml	25
		500 à 3000 mg/l	500 µl	24.5 ml	50
		3000 à 8000 mg/l	200 µl	24.8 ml	125
Sulfures (S ²⁻) $\lambda = 665 \text{ nm}$	0 – 0.6 mg/l	0 à 10 mg/l	1000 µl	24.0 ml	25
		10 à 50 mg/l	200 µl	24.8 ml	125

Annexe 2 (Philip Analytique)



Limites rapportées dans le LIMS pour métaux par ICP-OES (ppm)

	ES	ESD	F (µg)	H	I (µg)	L	S	EU	EUD
Ag	0.005	0.005	5	2	5	0.05	2	0.02	0.02
Al	0.05	0.05	20		20	0.1	20	0.05	0.05

As			5	2	5		5	0.05	0.05
B	0.02	0.02	2	2	2	0.2	2	0.02	0.02
Ba	0.005	0.005	0.5	10	0.5	0.2	10	0.005	0.005
Be		0.005		1	0.5	0.2	2	0.005	0.005
Bi			20		20		20	0.2	
Ca	0.1	0.1	50		10	0.5	50	0.1	0.1
Cd	0.001	0.001	0.5	1	0.5	0.005	0.5	0.005	0.005
Ce							10		
Co	0.005	0.005	1		0.5	0.02	2	0.01	0.01
Cr	0.005	0.005	1	2	1	0.05	5	0.01	0.01
Cs							50	0.05	
Cu	0.005	0.005	1		1	0.05	5	0.01	0.01
Eu							n.d.		
Fe	0.01	0.05	50	10	1	0.2	50	0.1	0.1
Ga							n.d.		
Ge							10		
Hg						0.05	5	0.05	
K		1	100		100		100	1	1
La							10	0.05	
Li							10	0.02	
Mg	0.2	0.2	20	5	20	0.5	20	0.1	0.1
Mn	0.005	0.005	1		1	0.05	10	0.005	0.005
Mo	0.005	0.005	5	5	5	0.05	1	0.05	0.05
Na	0.5	0.5	50	25	50	5	50	0.5	0.5
Ni	0.005	0.01	1		1	0.05	5	0.01	0.01
P		0.1	10		10	0.2	20	0.1	0.1
Pb	0.01	0.01	5	10	5	0.05	5	0.02	0.02
S			25		25		100	1	
Sb	0.1	0.1	10	10	10	0.1	10	0.1	0.02
Sc							1		
Se			10	5	10	0.1	10	0.1	0.1
Si	0.05		1		5	0.5	10	0.05	0.05
Sn	0.01	0.01	5	2	5	0.1	2	0.05	0.05
Sr			0.5		0.5		0.5	0.005	
Te			20		20		20	0.2	
Th							2		
Ti		0.01	1		1	0.1	10	0.01	0.01
Tl				20	10	0.1	20	0.1	
U						0.5	50	0.5	0.5
V		0.02	2		2	0.05	10	0.02	0.02
W			5		5		10	0.05	0.05
Y							50		
Zn	0.01	0.01	1		1	0.2	10	0.05	0.05
Zr							5		

Notes: EP: eau potable; ES: eau souterraine; ESD: eau sout. dissoute; F: Filtres, frottis; H: huile;

I: barboteur; L: lixiviat; S: sol, solide; EU: eau usée; EUD: eau usée dissous

		PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # : P-54 D		Nombres de pages : 7	
Version : 3-3		Date : 21.08.2003	
Auteur(s) : <u>Simona Dobran</u> <u>Viktors Kulnieks</u>			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Gerald Zagury</u> _____ _____		Signatures : _____ Date : _____ ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____	

• Titre : Détermination des substances facilement disponibles d'un matériel organique (SFD) (e.g. de la tourbe et fumier de poulet composté, copeaux de bois, compost de feuilles)
Mots clefs : composition de la matière organique, biodégradation de la matière organique, substances facilement disponibles.

1. OBJECTIF

L'objectif de ce protocole est de déterminer le contenu de substances facilement disponibles aux microorganismes (SFD) des différents matériaux organiques ou substrats. Ainsi, le contenu des SFD de ces matériaux organiques sera un paramètre important dans le choix de la source de matière organique appropriée d'un sol synthétique contaminé avec une solution d'arséniate de cuivre chromaté (CCA).

2. Theorie

En général, la matière organique retrouvée dans un sol est composée de deux fractions :

- une fraction labile facilement décomposable qui servira comme source de carbone disponible aux microorganismes du sol et qui favorise l'activité microbienne d'un sol.
- une fraction récalcitrante à la décomposition (surtout pendant des essais de laboratoire de court terme). Cette fraction est composée de substances humiques (e.g. acides humiques, fulviques et les humines du sol) qui représente 65-93 % de la matière organique d'un sol naturel.

En ce qui concerne un matériel organique, la fraction biodégradable est représenté par les substances facilement disponibles (SFD). Pour déterminer le contenu de substances facilement disponibles (SFD) des substrats (la tourbe, etc.), qui vont constituer la source de matière organique des sols dans le cadre du projet, une version simplifiée de la méthode Forage Fibre Analysis sera appliquée.

La méthode Forage Fibre Analysis est une méthode largement utilisée dans le domaine agronomique pour évaluer la biodégradabilité d'un matériel organique. (D. Prasad et al., 1999, H.K. Goering et P.J. Van Soest, 1970.).

3. METHODOLOGIE

La procédure repose sur l'extraction avec reflux par une solution de 5% HCl de la fraction SFD du matériel organique, qui contient des sucres solubles, d'hémicellulose, des aminoacides et certaines protéines. Plus le pourcentage de SFD extraits par l'acide est grand plus le matériel organique est facilement décomposable. (Prasad et al. 1999, D.M. H.K.Goering et P.J.Van Soest, 1970)

4. MATERIEL ET REACTIFS

4.1 Matériels

- Balance de 0,0001 de précision
- 2 creusets de type Gooch fritté de 50 ml pour chaque matière organique (4 creusets s'ils sont disponibles)
- système de filtration sous vide
- 2 Erlenmeyer à vide de 1000 ml munis de joints d'étanchéité en liège pour chaque matière organique
- 2 systèmes de digestion avec reflux pour chaque matière organique
- 2 ballons de 500 ml à fond rond pour chaque matière organique
- ballons volumétriques 500 ml et 1000 ml
- calottes chauffantes
- 2 condensateurs pour chaque matière organique

- pipette sérologiques jetable stérile 100ml , 25 ml
- 3 cylindres gradués (25 ml , 250 ml, 500 ml)
- 2 bouteilles de 500 ml et 1000 ml avec bouchon visible pour les solutions préparées
- hotte chimique;
- eau déionisée
- dessiccateur
- four(s) (60 ° C, 105 ° C)
- 2 assiettes grandes d'aluminium
- pince pour les creusets
- pince pour les billes
- matière organique tamisée à <2mm sauf les copeaux de bois (les plus petits morceaux choisis de taille moins d'environ 2cm x 3cm)

4.2. Réactifs

- Acétone 90%, v/v - Dans un ballon de 500 ml mesurer avec un cylindre 450 ml d'acétone (AC- grade HPLC) et compléter avec de l'eau deionisée jusqu'à la jauge. (160 ml /matière en duplicata)
- HCl 5% (p/p)(d= 1.0230 g/ml) - Dans un ballon volumétrique de 1000 ml ajouter 800 ml d'eau deionisée. Mesurer 116,66 ml HCl concentré, 12 N (d= 1.19 g/ml) à l'aide d'une pipette et ajouter dans le ballon volumétrique. Agiter par petites rotations pour éviter la surchauffe du ballon. Compléter avec de l'eau deionisée jusqu'à jauge. (400 ml/ matière en duplicata)

Calculs :

$$m \text{ HCl } 5\% = 1000 \text{ ml} \times d \text{ HCl } 5\%(\text{g/l}) \times 5 \text{ g}/100 \text{ g} = 51,15 \text{ g HCl}$$

$$\text{Nombre de moles HCl, } n = 51,15/36,5 = 1,4 \text{ moles HCl}$$

$$\text{Nombre d'équiv.-gram} = 1,4$$

$$C_2 = 1,4 \text{ N}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$12 \times V_1 = 1,4 \times 1000$$

$$V_1 = 116,66 \text{ ml HCl } 12\text{N}$$

5. PROCÉDURE

Recommandations :

- Il est important de bien nettoyer les creusets avant leur utilisation. Le nettoyage sera faite avec le détergent et ensuite rincer avec de l'acetone et de l'eau distillée et deionisée. Si c'est possible, au lieu de les laver à l'acetone, c'est recommande

de les tremper en acide nitrique bouillante pour 1h. Après le lavage, les creusets seront identifiés avec un crayon rouge résistant à l'acide, introduits à l'étuve (105 degrés C) pendant une nuit et ensuite refroidis au dessiccateur pendant une heure.

- Toutes les pesées seront effectuées sur la balance analytique avec une précision de 0,0001 g, bien calibré à chaque utilisation.
- La manipulation des creusets pesés doit se faire à l'aide d'une pince et/ou de gants propres et secs.

5.1 Peser une quantité d'environ 20,00 g de chaque matériel organique (préalablement préparés selon l'étape 5.1 du protocole P-54 B) dans des assiettes d'aluminium.

5.2. Faire sécher les échantillons pendant la nuit dans le four à 60 ° C.

5.3. Refroidir les échantillons au dessiccateur pendant une demi-heure.

5.4. Pour chaque matière organique, peser 2 creusets de type Gooch frittés identifiés de 50 ml et noter le poids (PC1. (précision 0,0000 g)

5.5. Ajouter environ exactement 2,5000 g de chaque matériel organique séché (duplicata) dans les creusets et peser (PC11) .(Faire en parallèle le protocole de « poids sec » des échantillons séchés a 60 ° C)

5.6. Installer les creusets sur les Erlemeyers de 1000 ml avec les joints d'étanchéité à liège et connecter au système de filtration sous vide.

5.7. Rincer les échantillons en ajoutant 20 ml d'acétone 90% à l'aide d'un cylindre gradué.

5.8. Utiliser un vide faible au début du filtrage et augmenter le vide seulement au besoin.

5.9. Répéter 3 autres fois les étapes 5.6 -5.7. et disposer le filtrat (les lipides, résines et cires) .

5.10 Rincer les précipités avec de l'eau deionisée et filtrer à l'aide d'un système de filtrage sous vide (repete le rincage au moins 5 fois pour enlever l'acetone)

5.11. Sécher les creusets avec les précipités dans le four à 60 ° C pendant la nuit.

5.12. Refroidir les creusets au dessiccateur pendant un demi -heure.

5.13. Peser les creusets avec les précipités séchés et noter le poids.(P1)

5.14. Placer les ballons de digestion sur une balance et tarre-la à zéro.

5.15. Transférer les résidus dans les ballons de digestion de 500 ml identifiés.

5.16. Peser les résidus et noter le poids. (PC22 p)

5.17. Transférer dans chacun de ballons, 20 billes en verre, préalablement pesées (Pb).

5.18. Ajouter 200 ml de HCl 5% dans chaque ballon avec le cylindre gradué et faire la digestion à reflux pendant 1 h.

5.19. Refroidir l'extrait (des sucres solubles, amidon, amino -acides et hemicellulose).

5.20. Laver (ou faire le trempage en acide) les creusets et peser-les à nouveau (PC2) .

Si ils sont disponibles, utiliser des autres creusets propres (preablement nettoyes et seches) pour sauver du temps

5.21. Installer les creusets sur un système de filtrage par vide.

5.22. Transférer l'extrait dans les creusets.

5.23. Rincer les ballons avec 3 portions d'eau.

5.24. Filtrer les extraits.

- 5.25. Rincer avec de l'eau d'ionisée au moins 5 fois
- 5.26. Disposer les filtrats (hémicellulose et polysaccharides).
- 5.27. Sécher les creusets avec les précipités pendant la nuit à 60 ° C.
- 5.28. Peser les creusets avec les précipités secs. (P2)

6. CALCULS

- Contenu de lipides, résines et cires, R :

$$R = 100 \times \{ (PC11 - PC1)_{\text{sec}} - (P1 - PC1) \} / (PC11 - PC1)_{\text{sec}}, (\%)$$

PC1: poids creuset Gooch, g (5.3)

P1 : poids creuset Gooch avec l'échantillon séché après l'enlèvement de résines, lipides et cires, g (5.11)

PC11 : poids creuset avec 2,5000 g matériel organique, g

$(PC11 - PC1)_{\text{sec}} : (PC11 - PC1) - (PC11 - PC1) \times (g \text{ eau} / g \text{ matière humide})^*$

*résultat de « poids sec »

- Concentration de substances facilement disponibles, SFD :

$C_{\text{SFD}} = \{ PC22 \text{ p} - (P2 - PC2 - Pb) \} \times 100 / [(PC11 - PC1)_{\text{sec}} - P]$ (g/100g matériel organique sec)

PC2: poids creuset Gooch, g (5.15)

PC22 t : poids théorique du résidu avant digestion = P1 - PC1, g

PC22 p : poids pratique du résidu avant digestion, g

P2 : poids creuset avec le précipité sec, g (5.20)

Pb : poids des billes en verre, g

P : pertes: (PC22 t - PC22 p), g

- Le contenu de SFD:

$$SFD = 100 \times \{ PC22 \text{ p} - (P2 - PC2 - Pb) \} / [(PC11 - PC1)_{\text{sec}} - P_{\text{sec}}], (\%)$$

7. RÉFÉRENCE (S)

1. D.Prasad , M.Wal, P.Berube , J.G. Henry ,1999. Evaluating substrates in the biological treatment of acid mine drainage. *Environmental Technology* , 20, 449-458
2. H.K. Goering et P.J. Van Soest , 1970. Forage Fiber Analyses. Agricultural Handbook

no.379 , U.S. Dept. of Agriculture , Washington , D.C. USA , 1-20

APPENDIX II:

**PROTOCOLE P-36A; CHOIX D'UN MÉLANGE RÉACTIF OPTIMAL QUI
SERA UTILISÉ POUR LE TRAÎTEMENT DU DRAINAGE MINIER ACIDE AU
MOYEN D'UN MUR RÉACTIF SULFATO-RÉDUCTEUR (MRSR)**

PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P 36-A	Pages: 6
Version: 1	Date Début: mai 1999
	Date fin
Auteur: Ioana Cocos Approuvé par: Gérald Zagury	
Signatures:	
Date:	

Titre: Choix d'un mélange réactif optimal qui sera utilisé pour le traitement du drainage minier acide au moyen d'un mur réactif sulfato-réducteur (MRSR).
Mots clés: DMA, bactéries sulfato-réductrices, précipitation des métaux, mélange réactif

1. Objectif(s)

Le but de ce protocole est de choisir le mélange réactif qui sera utilisé pour le traitement du drainage minier acide grâce à une biobarrière (MRSR). Il s'agit d'analyser l'efficacité de la consommation des sulfates, de la précipitation des métaux et de l'augmentation du pH d'un mélange réactif submergé dans une eau de drainage minier acide. Les essais seront réalisés en cuvette, dans des bocaux de verre, afin de maintenir les conditions anaérobies nécessaires pour la croissance des bactéries sulfato-réductrices, qui vont utiliser les sulfates comme accepteur d'électrons et la matière organique comme donneur d'électrons et vont précipiter les métaux en sulfures métalliques.

Les effets des différentes sources de carbone (cellulosique et organique), et des différents supports poreux (actif ou inerte) seront étudiés afin de choisir le mélange offrant les meilleures performances.

2. MATÉRIELS

Matériel pour la préparation du drainage minier acide synthétique :

- balance analytique et standard de balance
- un (1) ballon jaugé de 1000 ml
- coupelle en plastique
- spatule métallique

Matériel pour la préparation des mélanges réactifs :

- récipient en verre RYREX (1L)
- spatule métallique
- coupelle en plastique
- balance 0.00 g
- 34 bocaux de verre de 500 ml

- 34 bouchons en téflon équipé de valves Mininert
- 3 bacs en plastique

Matériel pour l'échantillonnage :

- boîte à gants
- bonbonne d'azote (N_2 grade HP+)
- seringues en plastique de 10 ml, 30 ml, et 60 ml
- aiguilles d'échantillonnage
- éthanol, eau déionisée, kimwipes pour le rinçage des aiguilles

Matériel pour les analyses :

- pH- mètre Accumet Modèle 25
- l'électrode à pH (ORION ROSS 8175 BN), et la sonde à POR
- pipettes stériles de 1 ml et 10 ml
- micropipette de 1000 μ l et de 5000 μ l avec embouts de plastique
- filtres 0.45 μ m, White HAWP, 25 mm
- spectrophotomètre DR/2010, et les réactifs nécessaires pour chaque analyse (Fe^{2+} , SO_4^{2-} , S^{2-})
- cuvettes 25 ml

Réactifs :

- 3.9714 g sulfate de fer heptahydrate, ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$) ACS
- 0.0002 g sulfate cuprique ($CuSO_4$) ACS
- 0.032 g sulfate de zinc, heptahydrate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ACS
- 0.0035 g sulfate de nickel, hexahydrate ($NiSO_4 \cdot 6H_2O$) ACS
- 0.0042 g sulfate de cobalt, heptahydrate ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$) ACS
- 0.1445 g sulfate de manganèse, monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$) ACS
- 1.093 g sulfate de sodium (Na_2SO_4) ACS
- 25 ml hydroxyde de sodium (NaOH 6N)
- 648.5 g copeau de bois d'érable non traité
- 1098.5 g compost de feuilles, de la ville de Montréal
- 687 g fumier de volaille
- 52 g urée
- 142 g résidu minier oxydé
- 114 g sable propre
- 2166 g sédiment de ruisseau
- 34 g pierre à chaux ($CaCO_3$)

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Préparation du DMA synthétique

La composition du DMA synthétique est basée sur les données réelles existantes sur le lieu d'implantation de la biobarrière, soit les suivantes (tableau 1) :

Élément	Concentration dans l'eau souterraine (mg/l)	Critères de qualité*(mg/l)
Fe	1.22 – 800	0.05
Cu	0.01 - 0.08	0.002-0.004
Zn	0.02 - 7.3	0.03
Ni	0.04 - 0.8	0.025-0.15
Co	0.02 - 0.89	-
Mn	0.28 - 47	0.01
SO ₄ ²⁻	103 - 2940	50
PH	4.2 - 7.7	6.5-8.5

Note : * Valeurs extraites de la Directive N° 019 pour les industries minières

Tableau 1 : Composition de l'eau souterraine d'un site minier

Pour la préparation du DMA synthétique, les quantités des sulfates de : Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, mentionnées dans la première partie seront ajoutées dans un ballon jaugé de 1000 ml, afin d'obtenir les concentrations maximales retrouvées sur le site. Ensuite, le mélange sera dilué avec de l'eau déionisée jusqu'à 1 L.

Le pH de la solution finale sera corrigé par l'ajout d'une solution de NaOH 6N (Gray, N.F. et O'Neill, C., 1995). La solution basique sera lentement ajoutée afin de monter le pH de la solution jusqu'à 5,5 – 6.

Le DMA synthétique doit être préparé quotidiennement. Si la conservation (4°C) s'avère nécessaire, l'apparition d'un précipité sera observée, à cause de l'instabilité chimique du DMA traduite par la précipitation rapide des métaux.

3.2 Préparation des mélanges réactifs

Les mélanges étudiés (Tableau 2) contiennent quatre composants principaux : une source de carbone, une source de bactéries, un support poreux et un neutraliseur du pH. Les pourcentages présentés ont été choisis à partir des données existantes dans la littérature. Le plan expérimental a été réalisé à partir du logiciel Statistica.

Les essais de traitement de l'eau souterraine contaminée par le DMA seront faits en cuvette, dans des bocaux de verre de 500 ml avec des couvercles en téflon munies des valves Mininert.

Les composants seront mélangés sous la hotte chimique, à l'aide d'une spatule métallique dans un récipient en verre. La proportion de solides et de DMA dans les pots d'analyse, soit 100 g mélange / 300 ml DMA, est obtenue en sachant que le volume minimal nécessaire pour les analyses est de 275 ml, et qu'un facteur de densité de 1,5 est utilisé pour la conversion de la masse en volume.

Après la mise en place des 17 mélanges réalisés en duplicata, les bocaux seront remplis avec le DMA synthétique déoxygené (par bullage d' N_2 pendant 5 minutes), puis les réacteurs seront scellés et incubés à la température ambiante ($\sim 21 \pm 1^\circ C$) dans un bac en plastique, afin d'éviter les éventuelles odeurs.

Type de mélange (%p/p)																	
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#1 1	#1 2	#1 3	#1 4	#1 5	#1 6	#17

SOURCES DE CARBONE																	
Déchets cellulose																	
Copeau de bois	30	30	-	-	30	10	30	10	30	30	3	3	30	30	10	10	17,87
Compost de Feuilles	-	-	30	30	10	30	10	30	3	3	30	30	10	10	30	30	17,87
Déchets organiques																	
Fumier de volaille	20	20	20	20	10	10	10	10	20	20	20	20	13	13	13	13	15,75
NUTRIMENTS																	
Urée	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
SUPPORT POREUX																	
Résidu minier oxydé	8	-	8	-	8	8	-	-	5	-	5	-	5	-	5	-	3,25
Sable	-	8	-	8	-	-	8	8	-	5	-	5	-	5	-	5	3,25
SOURCE DE BACTÉRIE																	
Sédiment de ruisseau	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
NEUTRALISE-UR DU pH																	
Pierre à chaux	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Note : Les poids sont exprimés en pourcentages de poids sec (wt. %).

Tableau 2 : Composition des mélanges réactifs.

3.3 Suivi des essais

Étapes chronologiques de l'échantillonnage :

Compte tenu que les séances d'échantillonnage diffèrent en fonction des analyses prévues, cette section

décrit les soins particuliers pour chaque groupe prévu. Par ailleurs, les trois groupes des analyses sont les suivantes :

- ❑ **Groupe 1** : séances d'échantillonnage prévues pour les jours 1 et 41, qui regroupe les analyses suivantes : pH, POR, concentration en métaux, C.O.T., N.K.T., NPP, alcalinité, concentration en sulfate, en sulfure, en fer.
- ❑ **Groupe 2** : séances d'échantillonnage prévues pour les jours 5, 13, 21, et 33, qui regroupe les analyses suivantes : pH, concentration en sulfate, en fer et en sulfures.
- ❑ **Groupe 3** : séances d'échantillonnage prévues pour les jours 9 et 25, qui regroupe les analyses suivantes : pH, POR, C.O.T., concentration en métaux, en sulfates et en fer.

L'échantillonnage du groupe 1 :

- 11.0 Déposer dans la boîte à gants le pH-mètre avec les électrodes à pH et à POR, les premiers six réacteurs, six seringues d'échantillonnage en plastique de 60 ml, six seringues d'échantillonnage de 30 ml, trois aiguilles d'échantillonnage et six tubes de 50 ml à centrifugeuse avec leurs bouchons ;
- 12.0 Fermer la boîte à gants et ouvrir le détendeur de la bonbonne d'azote ;
- 13.0 Ouvrir le premier pot et prélever 83 ml à l'aide de deux seringues en plastique de 60 ml et 30 ml ;
- 14.0 Mettre 12 ml dans le tube à centrifugeuse et bien fermer son bouchon ;
- 15.0 Continuer la procédure pour les autres cinq réacteurs ;
- 16.0 Arrêter le détendeur de la bonbonne d'azote ;
- 17.0 Ouvrir la boîte à gants et sortir les réacteurs, et les seringues d'échantillonnage ;
- 18.0 Fermer la boîte à gants, ouvrir les tubes à centrifugeuse identifiés R1.1 et R2.1, et commencer l'analyse du POR et pH. La procédure sera répétée pour tous les autres réacteurs, en notant les valeurs dans le cahier du laboratoire ;
- 19.0 Ouvrir la boîte à gants et sortir les tubes à centrifugeuse et le pH-mètre ;
- 20.0 Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à la température de la pièce à une vitesse de 7000 rot/min. ;
- 21.0 Filtrer le surnageant à l'aide des filtres 0.45µm dans des vials en plastique de 7 ml ;
- 22.0 Préparer les cuvettes pour l'analyse de la concentration en sulfates, sulfures, et en fer à l'aide du spectrophotomètre DR/2010. Pour chaque analyse, l'échantillon doit être diluer avec l'eau déionisée afin d'être dans la gamme de linéarité prévue : SO_4^{2-} 0-70 mg/l, S^{2-} 0-0.6 mg/l, Fe^{2+} 0-5 mg/l. De plus, la longueur d'onde doit être ajustée pour chaque type d'analyse, soit 450 pour SO_4^{2-} , 665 pour S^{2-} , 510 pour Fe^{2+} . Noter dans le cahier de laboratoire l'absorbance indiquée par l'appareille et calculer la concentration d'échantillon en utilisant les courbes de calibration antérieurement tracées.
- 23.0 Préparer les bouteilles pour les analyses de COT et NKT, en transvidant 70 ml de la solution nonfiltrée ;

Note : Répéter les étapes 1.0 – 13.0 pour les autres six réacteurs (duplicata). Pour cette deuxième série d'analyse, le volume prélevé est de 93 ml, la différence de 10 ml étant nécessaire pour le décompte bactérien réalisé conforme le protocole PE-28A.

L'échantillonnage du groupe 2 :

- 1.0 Déposer dans la boîte à gants six réacteurs, six seringues de 5 ml en plastique, deux aiguilles d'échantillonnage, et pour le rinçage des aiguilles : une boîte de Kimwipes un becher avec de l'eau déionisée et un becher avec de l'éthanol.
- 2.0 Fermer la boîte à gants et ouvrir le détendeur de la bonbonne d'azote ;
- 3.0 Mettre les valves Mininert en position ouverte, percer le septum avec l'aiguille, et prélever 2 ml de solution dans la première seringue ;
- 4.0 Changer la seringue, et bien rincer l'aiguille avec de l'eau déionisée et éthanol ;
- 5.0 Continuer le prélèvement jusqu'au dernier réacteur ;
- 24.0 Arrêter le détendeur de la bonbonne d'azote ;

- 6.0 Ouvrir la boîte à gants et sortir les réacteurs et les seringues d'échantillonnage ;
- 7.0 Transvider le contenu des seringues dans des fioles de 2 ml, et mesurer le pH de la solution ;
- 8.0 Centrifuger les fioles et filtrer le surnageant à l'aide des filtres de 0.45 μm ;
- 9.0 Mesurer la concentration en sulfate, en sulfure et en fer à l'aide du spectrophotomètre DR/2010.

Note : répéter les étapes 1.0 – 9.0 pour les autres six réacteurs (duplicata).

L'échantillonnage du groupe 3 :

- 1.0 Déposer dans la boîte à gants le pH-mètre avec les électrodes à pH et à POR, six réacteurs, six seringues de 30 ml en plastique et six tubes de 50 ml à centrifugeuse avec leurs bouchons ;
- 2.0 Fermer la boîte à gants et ouvrir le détendeur de la bonbonne d'azote ;
- 3.0 Ouvrir le premier réacteur et prélever 29 ml dans une seringue. Transvider 9 ml dans le tube à centrifugeuse et bien fermer le bouchon ;
- 4.0 Continuer cette opération jusqu'au dernier réacteur ;
- 5.0 Arrêter le détendeur de la bonbonne d'azote ;
- 6.0 Ouvrir la boîte à gants et sortir les réacteurs, et les seringues d'échantillonnage ;
- 7.0 Fermer la boîte à gants, ouvrir les tubes à centrifugeuse identifiés R1.1 et R2.1, et commencer l'analyse du POR et pH. La procédure sera répétée pour tous les autres réacteurs, en notant les valeurs dans le cahier du laboratoire ;
- 8.0 Ouvrir la boîte à gants et sortir les tubes à centrifugeuse et le pH-mètre ;
- 9.0 Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à la température de la pièce à une vitesse de 7000 rot/min ;
- 10.0 Filtrer le surnageant à l'aide des filtres 0.45 μm dans des vials en plastique de 7 ml ;
- 11.0 Mesurer la concentration en sulfate, en sulfure et en fer à l'aide du spectrophotomètre DR/2010.

Les analyses à effectuer et la fréquence sont présentées dans le tableau suivant :

	Contenant	Volume à prélever	Préservation	Temps de conservation	Méthode d'analyse	Fréquence
pH	P, V ⁽²⁾	4 ml	-	A.I. ⁽³⁾	Électrode ORION ROSS 8175 BN	Chaque 4 jours
POR	P, V ⁽²⁾	4 ml	-	A.I. ⁽³⁾	Électrode ACCUMET 13.620.82	Chaque 8 jours
Azote Kjeldahl⁽¹⁾	P, V ⁽²⁾	50 ml	H ₂ SO ₄ pH<2	28 jours, 4°C		Au début et à la fin des expériences.
COT⁽¹⁾	P ⁽²⁾	20 ml	H ₂ SO ₄ pH<2	28 jours, 4°C	5310C (Standard Methods)	Chaque 8 jours
Alcalinité	V ⁽²⁾	4 ml	-	A.I. ⁽³⁾	Titration potentiométrique	Au début et à la fin des expériences.

Métaux	Ni	P	8 ml	-	6 mois, 4°C	(AA/ICP) ⁽⁴⁾	Chaque 8 jours
	C	P		-	6 mois, 4°C	(AA/ICP)	
	u	P		-	6 mois, 4°C	(AA/ICP)	
	Z						
	n						
Fe²⁺		P	400 µl	-	A.I. ⁽³⁾	Spectrophotomètre	Chaque 4 jours
SO₄²⁻		P, V	200 µl (0-70 mg/l)	-	28 jours, 4°C	Spectrophotomètre HACH, et HPLC	Chaque 4 jours
Sulfures		P, V ⁽²⁾	100 µl (0-0.6 mg/l)	-	A.I. ⁽³⁾	Spectrophotomètre	Chaque 4 jours
NPP		P, V ⁽²⁾	10 ml	-	A.I. ⁽³⁾	PE 28-A	Jours 1 ; 15 ; 41

Note : 1 - Analyses faites par un laboratoire externe ; 2 - P= plastique, V= verre ; 3 - A.I.= Analyse immédiate ; 4 - Absorption atomique

Tableau 3 : Les paramètres à analyser et les données d'échantillonnage.

Après incubation (d'une durée prévue d'environ 34 jours), le mélange montrant le meilleur taux de consommation des sulfates sera sélectionné. De plus, les autres paramètres qui vont influencer le choix du meilleur mélange seront le contenu en matière organique (traduit par la concentration en C.O.T.), et le rapport C :N.

4. RÉFÉRENCES

BLOWES, D. W., PTACEK C.J., BAIN, J.G., WAYBRANT, K.R., et ROBERTSON, W.D. (1995). Treatment of mine drainage water using in situ permeable reactive walls. Mining and the environment, Sudbury, Ontario.

GRAY, N.F., et O'NEILL, C. (1995). "Artificial acid mine drainage for use in laboratory simulation studies" Fresenius Envir Bull (4) Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland, 481-484

KUYUCAK, N., ST-GERMAIN, P. (1994). In situ treatment of acid mine drainage by sulphate reducing bacteria in open pits: scale-up experiences. International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage, Pittsburgh.

LYEW, D., SHEPPARD J.D. (1997). Effects of physical parameters of a gravel bed on the activity of sulfate reducing bacteria in the presence of acid mine drainage. Journal of chemical technology and biotechnology, 70, 223-230.

PERRY, K. A. (1995). Sulfate reducing bacteria and immobilization of metals. Marine georesources and geotechnology 13, 33-39.

WAYBRANT, K. R., BLOWES, D. W. et PTACEK, C.J. (1998). Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. Environmental science and technology, 32, 1972-1979.

WAYBRANT, K. R., BLOWES, D. W. et PTACEK, C.J. (1995). A geochemical and mineralogical investigation of porous reactive walls for the prevention of acid mine drainage. Proceedings of Sudbury '95 - Mining and the environment

ANNEXES: MODIFICATION

Pendant la période d'échantillonnage les modifications suivantes sont survenues:

- Les analyses pour déterminer la concentration en sulfures ont commencé après 33 jours, à cause du volume d'échantillon nécessaire (25 ml). La première série de valeurs enregistrées est en moyenne autour de 4.05 mg/l.
- Pour les analyses de métaux, la lecture du jour 9 est annulée, parce que les données sont non-disponibles. De plus, la première série d'échantillons (jour 1) a été filtrée et analysée après environ un mois de la date de prélèvement. Pendant cette période, les vials contenant la solution ont été gardés dans la chambre froide à 4°C.
- La durée totale des analyses était prévue pour 33 jours et l'échantillonnage chaque 4 jour. En effet, à partir du jour 25 les étapes d'échantillonnage ont été espacées chaque 8 jours, ce qui a eu comme résultat l'augmentation de la durée totale des analyses à 41 jours.

APPENDIX III:**PROTOCOLE P28-A: DÉNOMBREMENT TOTAL DES BACTÉRIES
SULFATO-RÉDUCTRICES (BSR) PAR LA MÉTHODE DES NPP EN TUBE**

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE28A	Pages: 8
Version: 6	Date Début: 10/02/98
	Date fin: 23/06/99
Auteurs: Sophie Beaulieu Approuvé par: Gérald Zagury Sandra Estrela	
Signatures: Date: ____ / ____ / ____	

Titre: Dénombrement total des bactéries sulfato-réductrices (BSR) par la méthode des NPP en tube

Mots clés: bactéries sulfato-réductrices (BSR), dénombrement, nombre le plus probable (NPP)

Objectif(s)

Cette méthode de dénombrement s'applique à toute substance pouvant contenir des bactéries sulfato-réductrices (BSR), par exemple dans les sédiments et les échantillons liquides. La méthode a aussi été développée afin de dénombrer la quantité de BSR dans la tourbe granulaire. Il s'agit d'une estimation de la densité moyenne de bactéries sulfato-réductrices dans un échantillon donné, par un test statistique. L'échantillon est dilué en série dans des tubes contenant un milieu de croissance pour être ensuite incubé. Il y a croissance dans les tubes d'incubation lorsqu'un micro-organisme ou plus est présent. Le nombre de micro-organismes sulfato-réducteurs dans l'échantillon est déterminé d'après le nombre de tubes où il y a eu croissance pour chaque dilution et en se servant des tables de l'index des NPP.

Matériels

- incubateur conventionnel à 30 °C
- pipettes stériles de 1 ml et 10 ml
- micropipette de 1000 µl et de 5000 µl
- embouts à micropipette stériles
- bouteilles à dilution de 150 ml à bouchons vissables (1 par dilution)

- tubes d'essai à bouchons vissables de 15 ml (5 par dilution + 2 pour les contrôles)
- support pour les tubes pouvant en contenir au moins 30
- bouteille de 1L avec dispensette de 10 ml et 100 ml
- huile minérale (paraffine liquide) stérile
- eau distillée stérile
- éthanol 85 %
- dessiccateur
- coupelles d'aluminium
- balance analytique
- wrist action
- vortex
- spatules stériles
- ballons jaugés 500 ml et 1L
- bonbonne d'azote (N₂) grade HP+
- aiguilles longues (15 cm) reliées à des tubes flexibles
-

Milieu d'extraction et d'incubation

Milieu modifié Starkey Medium A

- 3.5 g lactate de sodium C₃H₅NaO₃ (ou 4.67 ml d'une solution 56.8%)
- 2.0 g sulfate de magnésium MgSO₄·7H₂O
- 1.0 g chlorure d'ammonium NH₄Cl
- 0.5 g phosphate de potassium K₂HPO₄
- 0.5 g sulfate de sodium Na₂SO₄
- 0.1 g chlorure de calcium CaCl₂·2H₂O
- 0.1 g acide thioglycolique C₂H₄O₂S (ou 77.3 µl d'une solution 98%)
- 0.001 g sulfate d'ammonium ferreux Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O
- 1 l eau distillée H₂O

Pour un dénombrement sur un échantillon de tourbe granulaire

- H₂O de dilution tamponnée (solution de travail)
- bouteilles à dilution de 150 ml
- boîte ou sac à gant relié à une bonbonne d'azote grade HP+
- mortier et pilon

H₂O de dilution tamponnée

Solutions stock

- 1 - Dissoudre 34 g de KH₂PO₄ dans 500 ml, ajuster le pH à 7.2 avec du NaOH 1N et diluer avec de l'eau distillée jusqu'à 1 l. Cette solution est le "stock de phosphate"
- 2 - Dissoudre 38 g de Mg Cl₂ dans un litre d'eau distillée

Conserver les solutions dans des contenants bien scellés et entreposer à 4 °C

Solution de travail (bouteilles de dilution)

Ajouter 1.25 ml de la solution stock de phosphate et 5 ml de la solution de $MgCl_2$ à 500 ml d'eau

Amener à 1 l avec de l'eau et bien mélanger noter le pH au cahier de laboratoire

Réactif pour vérifier la présence de H_2S

- Solution stock de chlorure ferrique ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) :

Dissoudre 13.5 g du chlorure ferrique dans un mélange de 250 ml d'eau et 250 ml de HCl (SG 1.19). Placer dans un contenant ambré et scellé pour éviter tout contact avec l'air, conserver à 4 °C. Cette solution doit être renouvelée à chaque mois.

- Solution stock de dihydrochlorure p-aminodimethylaniline :

Dissoudre 1 g de dihydrochlorure p-aminodimethylaniline ($C_8H_{12}N_2P_2HCl$) dans 500 ml de HCl 6 N. Conserver à 4 °C jusqu'à 1 mois dans un contenant ambré et bien scellé.

Méthodologie

Les tubes contenant le milieu d'incubation, les bouteilles contenant l'eau de dilution, l'huile minérale, les embouts de micropipette ainsi que tout récipient servant à contenir la suspension doivent être stérilisés à l'autoclave (121 °C, 15 psi, 30 min). Le vortex, les pipettes et les spatules peuvent être stérilisés sous les rayons U.V. pendant 10 min sous la hotte laminaire (consulter le PSO # S3 pour le fonctionnement de la hotte).

Un schéma opératoire est présenté en annexe

3.1 Choix du nombre de dilutions

Si la densité de bactéries sulfato-réductrices (BSR) dans l'échantillon est inconnue, il faudra effectuer 6 dilutions de la suspension primaire (6 dilutions x 5 réplicats). Si l'échantillon provient d'un milieu « naturel », effectuer également la dilution 10^{-1} , car la concentration de BSR n'est généralement pas très élevée dans l'environnement étant donné leur faible vitesse de croissance.

Si la plage de densité microbienne est connue, il est possible d'effectuer moins de dilutions. Un tableau des dilutions suggérées est présenté dans le PSO # A12.

3.2 Préparation des tubes et des bouteilles de dilution

Tubes de dilution

- 1- Chauffer jusqu'à dissolution le milieu modifié Starkey et dispenser 9 ml du milieu par tube (5 réplicats), boucher les tubes et stériliser (121 °C, 15 psi, 30 min).
- 2- Le pH du milieu devrait être d'environ 7.2 après autoclavage. Vérifier ceci en transvidant stérilement une certaine quantité dans un bécher.

- 3- Avant de procéder à l'inoculation des tubes contenant le milieu de croissance, il faut les chauffer dans un bain à 60 °C, puis les refroidir rapidement jusqu'à 20 °C, afin d'assurer une concentration minimale en oxygène
- 4- Lorsque les tubes sont prêts, s'assurer qu'ils sont bien fermés et ne pas oublier de les numéroté (toujours identifier les tubes après l'autoclavage et le chauffage dans le bain car le feutre s'efface à l'eau chaude)

Bouteilles de dilution

Une bouteille de dilution doit être préparée pour chaque série de tube de dilution (voir schéma opératoire)

- 1- Bien mélanger l'eau de dilution tamponnée et dispenser sous forme de dilution de 90 ml dans des bouteilles à bouchons vissés à l'aide de la dispensette de 100 ml
- 2- Stériliser les bouteilles contenant la solution Par autoclavage (121 °C, 15 psi, 20 min)
- 3- Identifier les bouteilles (10^{-1} , 10^{-2} , ...)

3.3 préparation de la suspension primaire (10^0)

Pour un échantillon de tourbe granulaire

Les BSR étant des micro-organismes anaérobies, les manipulations qui suivent doivent être exécutés dans une atmosphère exempte d'oxygène. Une boîte ou un sac à gant relié à une bonbonne d'azote doit être utilisé.

- 1- Retirer un cube de tourbe du réacteur (1 cube = 1 à 3 cm³ selon le cas)
- 2- Enlever le maximum de solution de celui-ci en l'écrasant délicatement
- 3- Briser le cube de tourbe à l'aide d'un pilon et d'un mortier jusqu'à obtention de fines particules
- 4- Mettre en suspension dans une bouteille contenant 100 ml d'eau de dilution tamponnée et 30 billes de verre (préalablement stérilisée).
- 5- Agiter la suspension par barbotage à l'azote pendant environ 5 minutes

Pour un sédiment prélevé dans un cours d'eau, il n'est pas nécessaire de travailler dans une boîte à gant pour effectuer ces manipulations.

- 1- Mettre le sédiment en suspension dans son eau de prélèvement
- 2- Prélever environ 100 ml de la suspension et verser dans une bouteille hermétique stérile
- 3- Agiter la suspension par bullage à l'azote pendant environ 5 minutes

Travailler dès maintenant en conditions stériles, passer les goulots des tubes et des bouteilles à la flamme après ouverture et avant fermeture.

3.4 Préparation des bouteilles de dilutions (10^{-1} – 10^{-6})

- 1- Avant inoculation, chaque bouteille de dilution doit être bullée à l'azote au moins 2 minutes à l'aide d'une l'aiguille. Passer l'aiguille à la flamme avant de l'introduire dans la bouteille.
- 2- Ouvrir la bouteille identifiée 10^{-1} et passer le goulot à la flamme
- 3- Brasser manuellement la bouteille 10^0 pendant 10 secondes, ouvrir et passer le goulot à la flamme
- 4- Rebrasser et Pipetter 10 ml avec une pipette stérile ou 2x5ml avec la micropipette et dispenser dans la bouteille identifiée 10^{-1}
- 5- Passer les goulots à la flamme et fermer. La bouteille 10^{-1} est préparée
- 6- Passer l'aiguille à la flamme, la refroidir en la plongeant dans l'eau stérile et buller à l'azote la bouteille 10^{-1} pendant au moins 1 minute
- 7- Répéter les étapes 2 à 6 en utilisant la nouvelle dilution préparée comme inoculum jusqu'à la dernière dilution voulue

3.5 Inoculation des tubes

- 1- Ouvrir le tube identifié 10^{-1} et passer le goulot à la flamme
- 2- Brasser manuellement la bouteille 10^0 pendant 10 secondes
- 3- Pipetter 1 ml à la micropipette en continuant de brasser
- 4- Dispenser dans le tube identifié 10^{-1}
- 5- Répéter les étapes 1 à 4 pour les quatre autres tubes identifiés 10^{-1} , on obtient les aliquots de la dilution 10^{-1}
- 8- Reboucher les tubes et les agiter 3 secondes au vortex
- 9- Changer l'embout de la micropipette et répéter les points 1 à 6 avec chaque autre bouteille à dilution : avec la bouteille 10^{-1} on obtient les 5 tubes 10^{-2} et ainsi de suite
- 10- Préparer deux contrôles en inoculant ceux-ci avec 1 ml d'eau stérile.
- 11- Pipetter 2 à 3 ml d'huile minérale stérile dans chacun des tubes afin de s'assurer qu'ils seront sous des conditions anaérobies
- 12- Incuber tous les tubes à 30 °C, y compris les deux contrôles, pendant 21 jours ou jusqu'à ce que les résultats ne changent plus de façon significative dans le temps

Après la période d'incubation, observer chaque tube. Si un précipité noir s'est formé, le tube est compté positif. Si un dépôt clair s'est formé dans le tube ou le tube est demeuré limpide comme les contrôles, le tube est compté négatif.

Confirmation des résultats douteux

S'il y a un doute du résultat d'un tube, procéder aux étapes suivantes :

- 1- Ajouter dans le tube 0.5 ml de la solution de chlorure ferreux

2- Ajouter ensuite de 0.5 ml de la solution stock p-aminodimethylaniline

Les réactifs doivent être ajoutés au fond du tube à l'aide d'une seringue ou d'une longue pipette pasteur

Une couleur bleue apparaissant au bout de 10 min signifie qu'il y a du H_2S donc un tube positif.

3.6 Calcul de la densité de micro-organismes

- 1- Sélectionner la combinaison de tubes positifs : trois dilutions successives sont choisies afin de déterminer l'index NPP. Choisir la plus grande dilution qui donne un résultat positif maximum (5/5 étant le maximum et 0/5 le minimum) et les deux suivantes. Le nombre de tubes positifs pour chacune de ces trois dilutions constitue la combinaison de positifs. Voir les exemples de calcul dans le PSO #A12.
- 2- Noter l'index NPP correspondant à cette combinaison à l'aide du tableau 3.1.
- 3- Multiplier l'index par 10^x , la plus petite dilution de la combinaison de positifs étant 10^x . Ce résultat correspond au nombre de bactéries sulfato-réductrices (BSR) par 100 ml de suspension.
- 4- On peut exprimer les résultats en nombre de micro-organismes par g SEC de sédiment ou de tourbe, en déterminant le poids sec de la suspension primaire à l'aide de la méthode décrite au point 3.7.

Tableau 3.1 – Index NPP (limite de confiance de 95 % selon la combinaison de positifs lorsque 5 tubes par dilution sont utilisés)

3.7 Détermination du poids sec de l'échantillon (suspension)

Afin de pouvoir exprimer la quantité de micro-organismes par masse de tourbe ou de sédiment sec, le poids sec de la suspension primaire (10^0) doit être déterminé :

- 1- Mettre les coupelles d'aluminium propres au four à 105 °C pendant au moins 5 heures, les laisser refroidir au moins une heure au dessiccateur par la suite
- 2- Identifier et peser les coupelles d'aluminium propres et sèches
- 3- Bien mélanger la suspension primaire (10^0) de sédiment ou la suspension de tourbe qui a été utilisée pour inoculer les tubes à l'étape précédente.
- 4- Pipetter de 15 à 20 ml de la suspension dans la coupelle (noter le volume), répéter 3 fois par échantillon
- 5- Mettre les coupelles au four à 105 °C pendant 6 heures ou jusqu'à ce le contenu soit sec et son poids constant
- 6- Sortir les coupelles du four et les laisser refroidir dans un dessiccateur au moins une heure
- 7- Peser les coupelles

Le poids sec se calcule comme suit :

$$\text{poidssec} = \frac{m_{\text{sec}} - m_{\text{coupelle}} - m_c}{V_{\text{suspension}}} \quad \text{et} \quad m_c = 0.23 \text{ mg/ml} \times V_{\text{suspension}}$$

où

m_{sec}	masse de la coupelle contenant la suspension séchée
m_{coupelle}	masse de la coupelle vide et propre
m_c	facteur de correction pour la quantité de sel dans l'eau de dilution
$V_{\text{suspension}}$	volume de suspension pipeté dans la coupelle

3.8 Décontamination des tubes après lecture des résultats

Cette étape est obligatoire afin de ne pas contaminer le réseau d'égout. Tous les tubes doivent être autoclavés (121 °C, 15 psi, 30min). Leur contenu refroidi est ensuite jeté à l'évier sous la hotte car il peut y avoir dégagement de mauvaises odeurs (H_2S) !

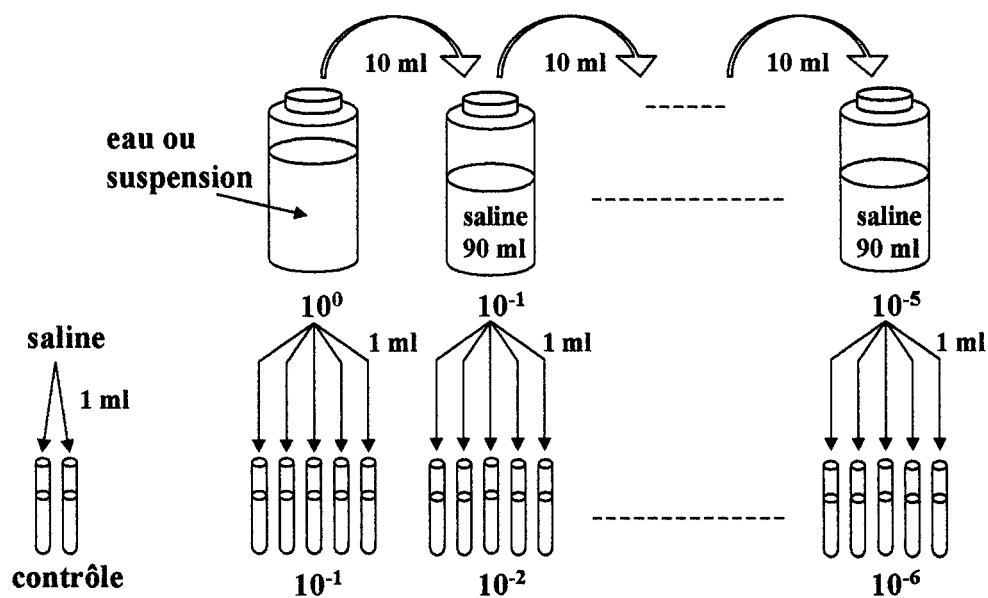
Références

ASTM (1990), « Standard test methods for sulfate-reducing bacteria in water and water-formed deposits », D4412 – 84, pp.533-535.

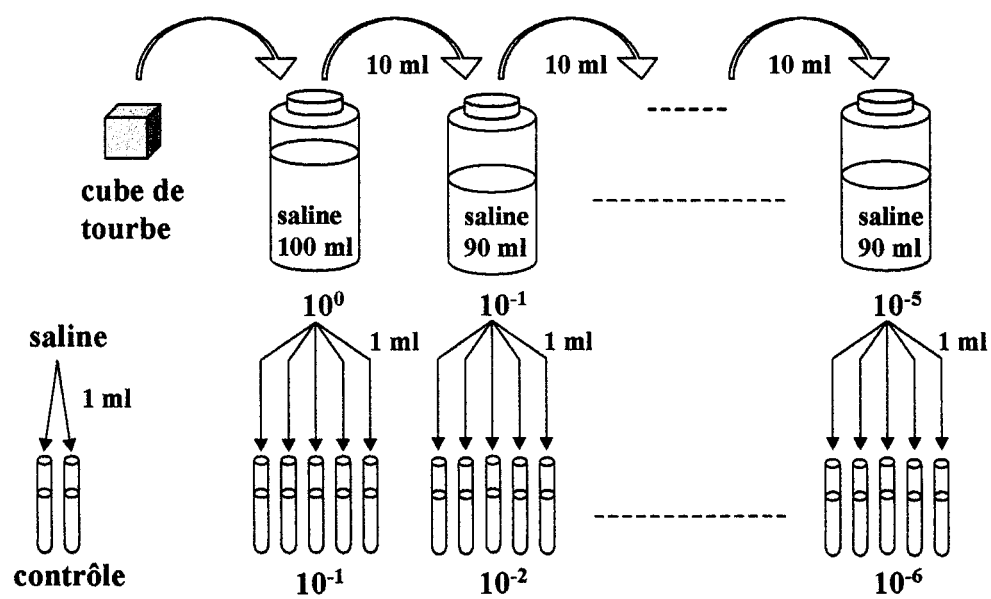
Standard methods for the examination of water and wastewater 16 th edition (1985), « 209 A. Total solids dried at 103-105 °C », pp.93-94.

Annexe : Schéma opératoire

Échantillon liquide



Échantillon de tourbe

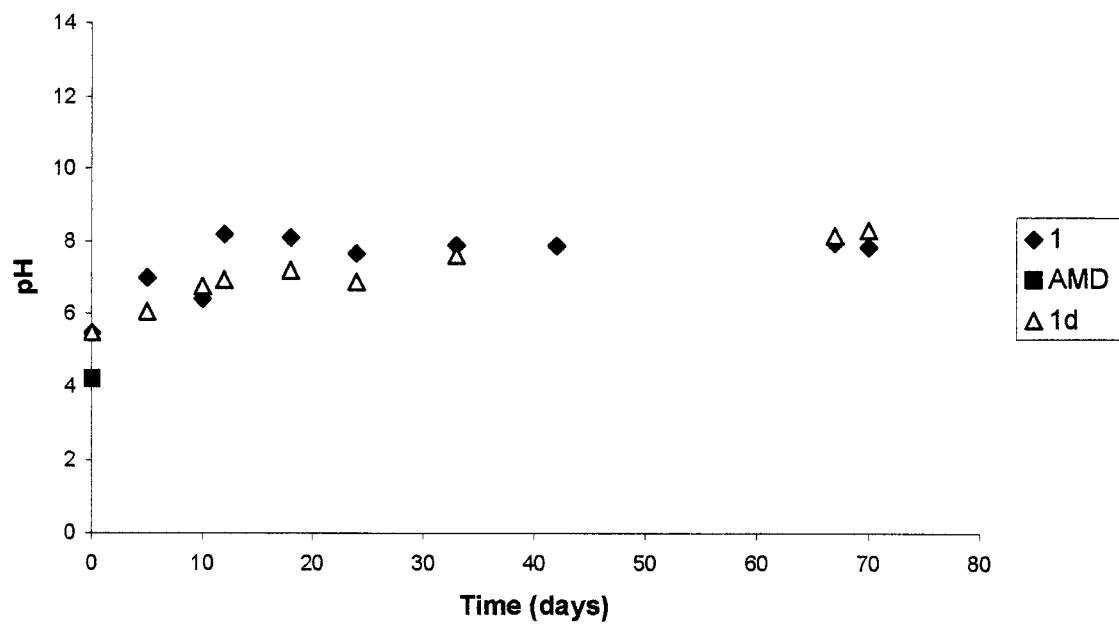


**APPENDIX IV: SUPPLEMENTARY GRAPHS AND TABLES FROM BATCH
EXPERIMENT NOT INCLUDED IN CHAPTER 3**

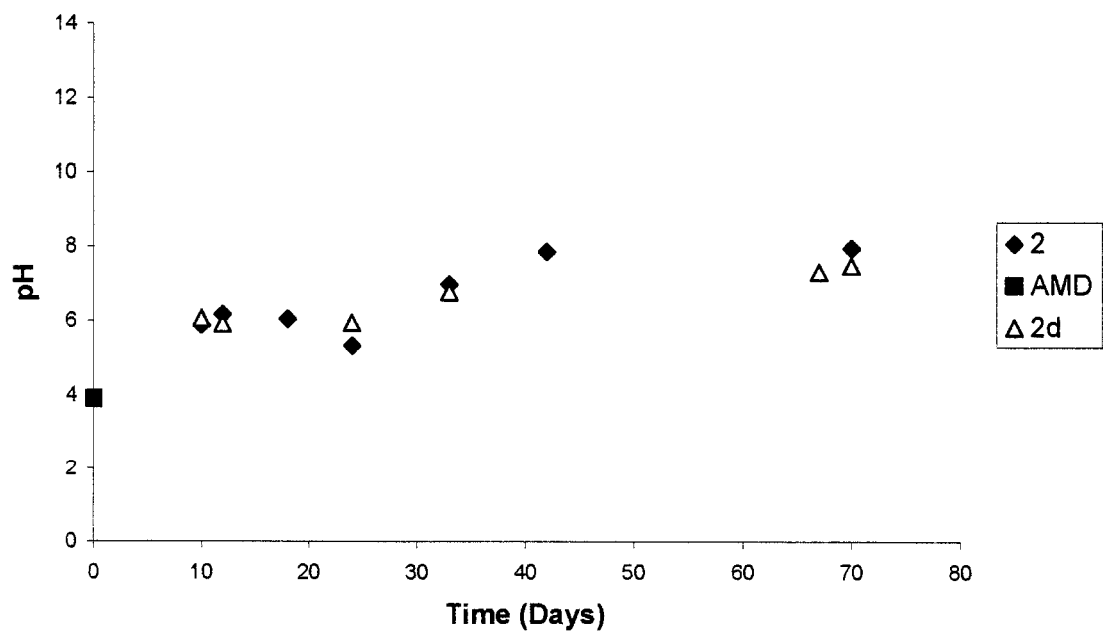
Parameter (Graph or Table)	Pages
PH	130-135
ORP	136-141
Sulphate	142-147
DOC	148-153
NH ₄	154-155
Alkalinity	156-157
Sulphides	158-159
BSR Enumeration	160-161
Metals	162-164
Ferrous Iron	165-170
Metal Hydroxide, carbonate and sulphide solubility curves	171-174

pH

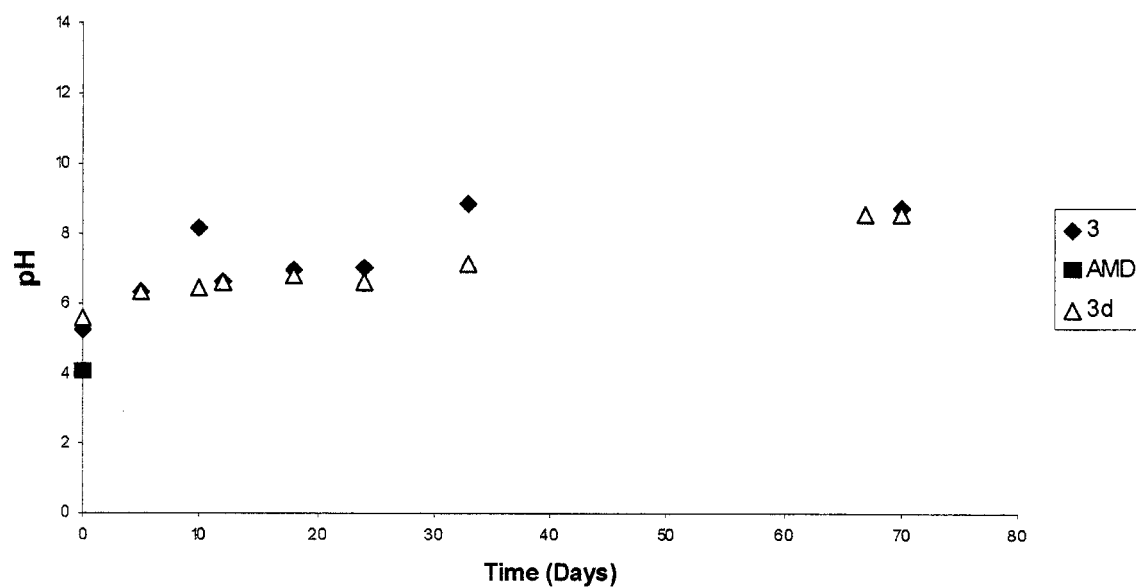
pH vs Time, Reactor 1: Maple Wood Chips



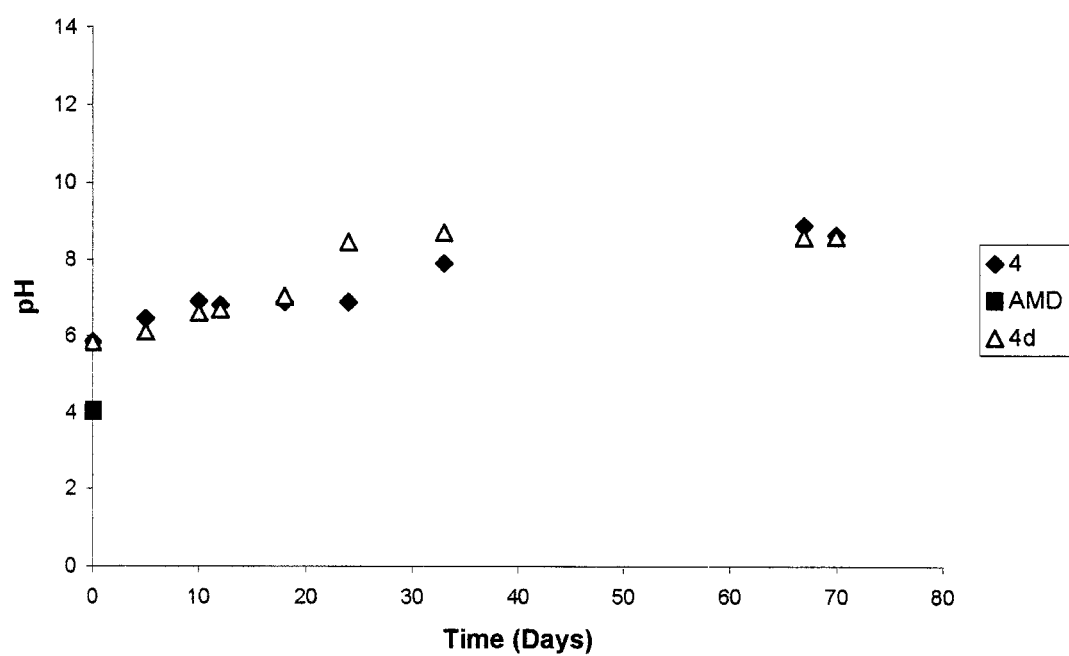
pH vs Time, Reactor 2: Sphagnum Peat Moss



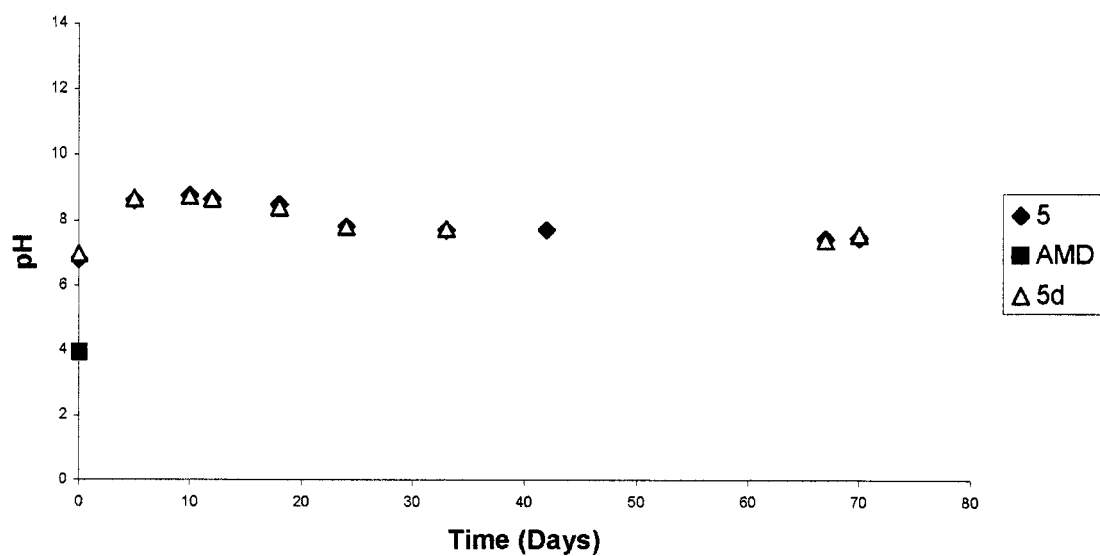
pH vs Time, Reactor 3: Leaf Compost



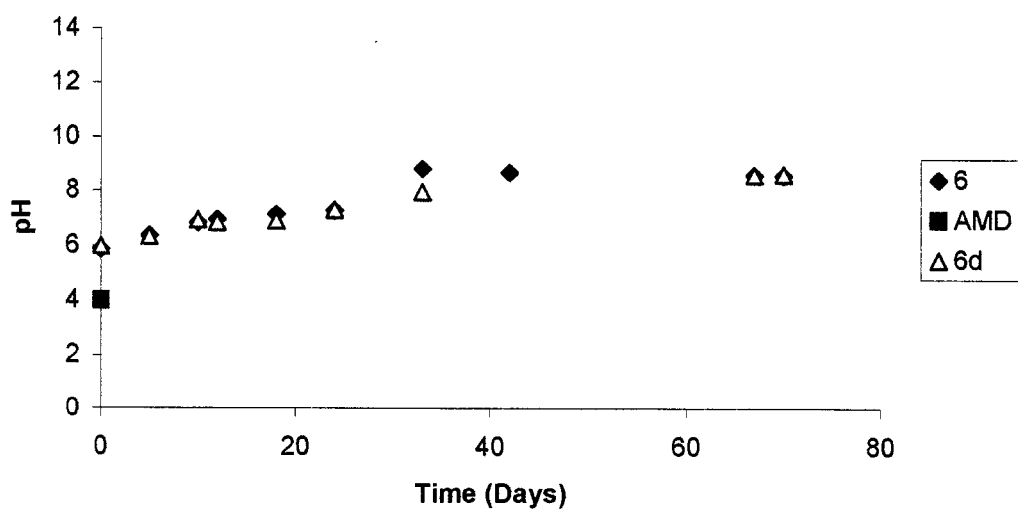
pH vs Time, Reactor 4: Conifer Compost



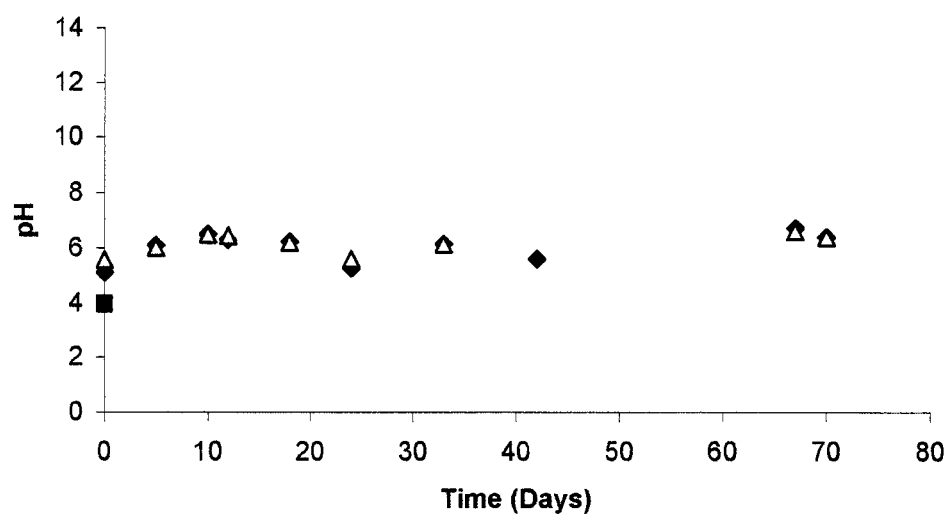
pH vs Time, Reactor 5: Poultry Manure



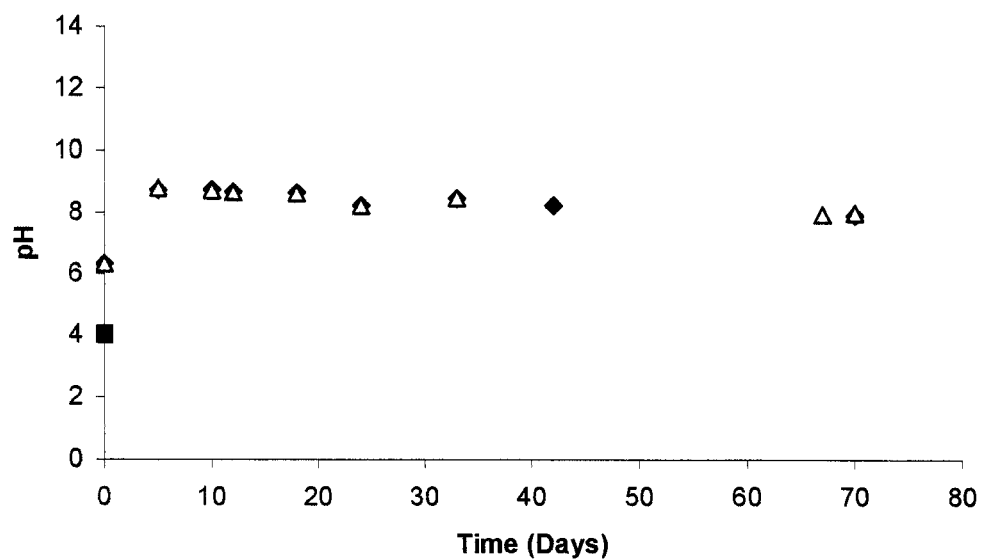
pH vs Time, Reactor 6: Conifer Sawdust



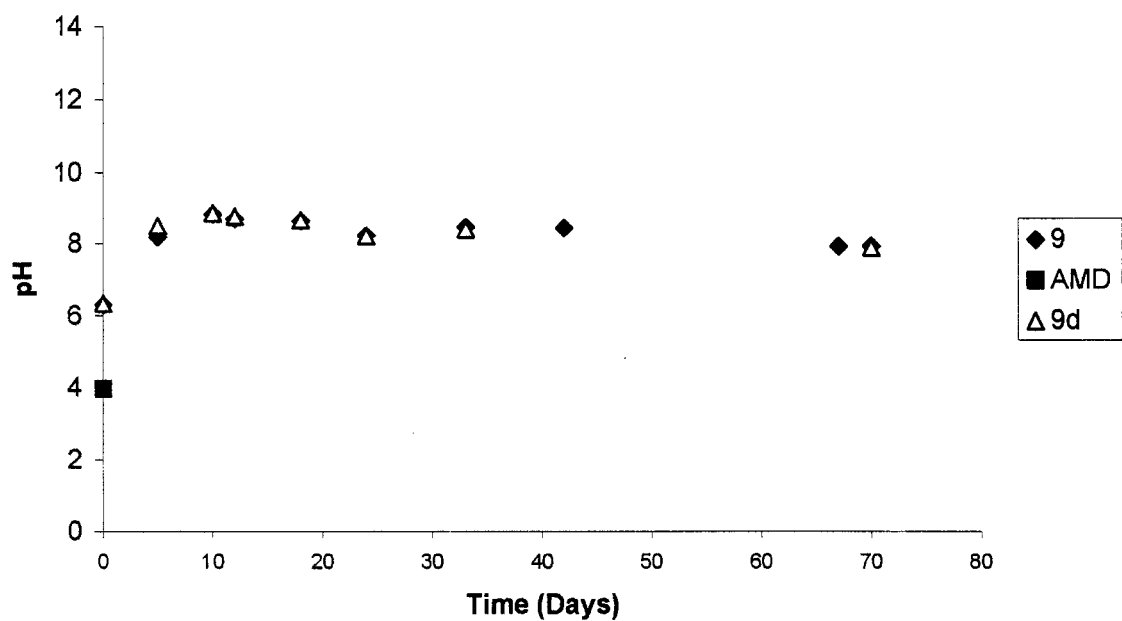
pH vs Time, Reactor 7: Ethanol



pH vs Time, Reactor 8: Substrate mixture

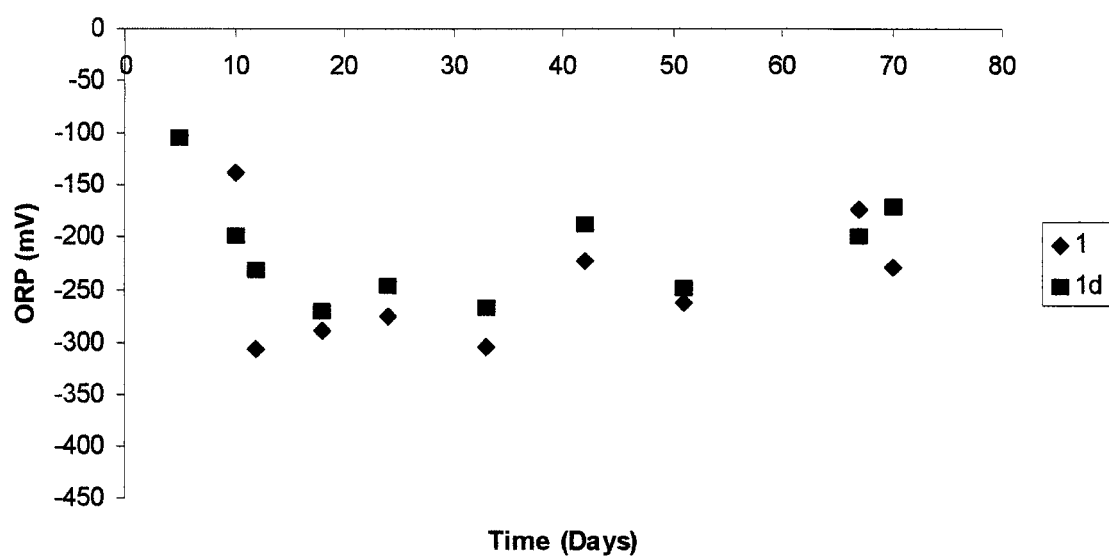


pH vs Time, Reactor 9: Substrate mixture + formaldehyde

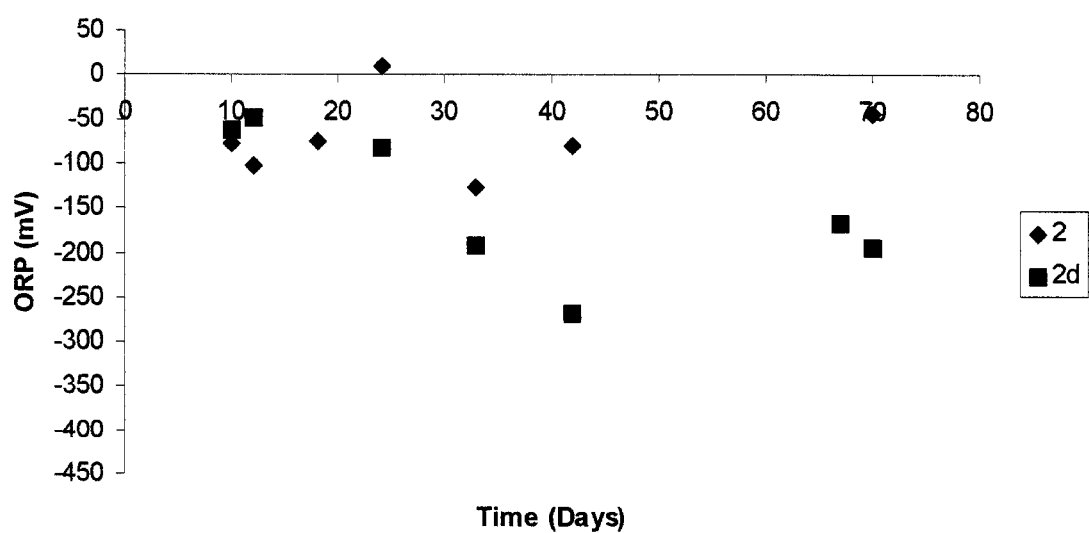


ORP

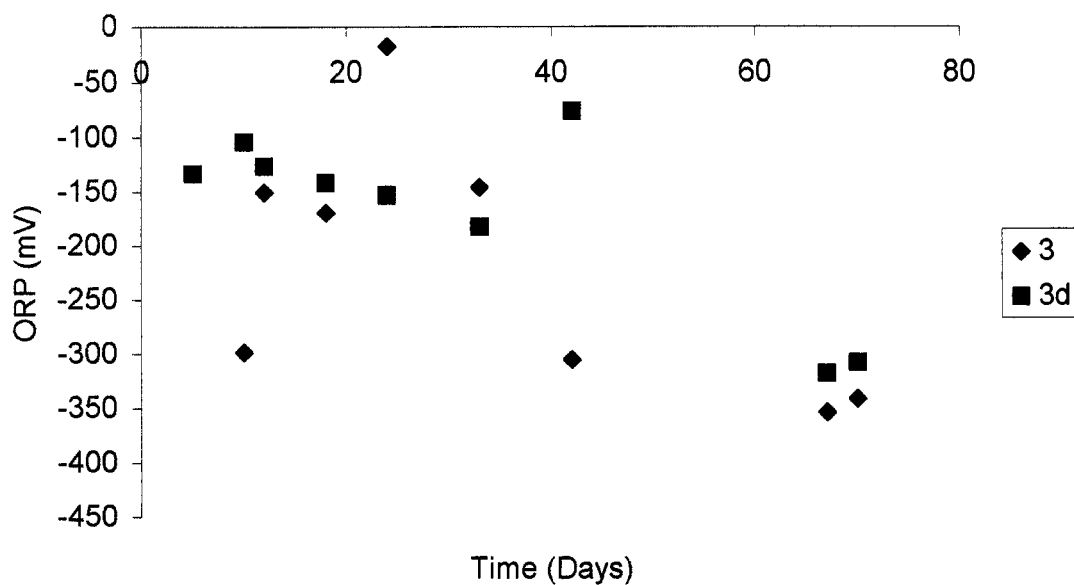
ORP vs Time, Reactor 1: Maple Wood Chips



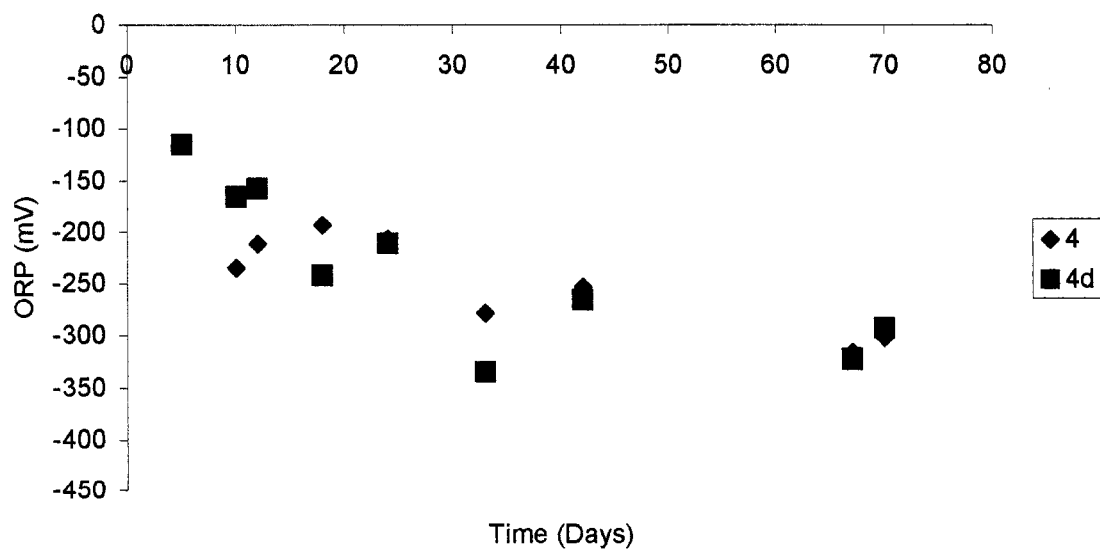
ORP vs Time, Reactor 2: Sphagnum Peat Moss



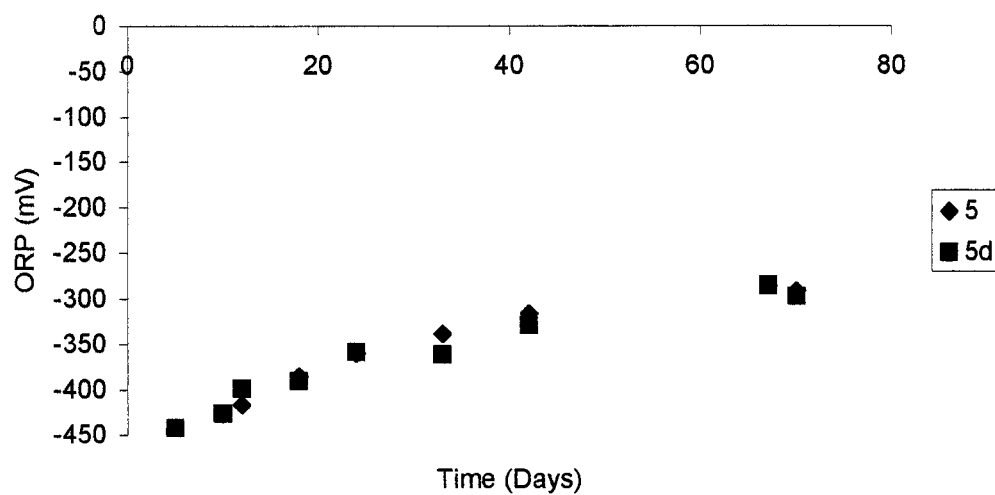
ORP vs Time, Reactor 3: Leaf Compost



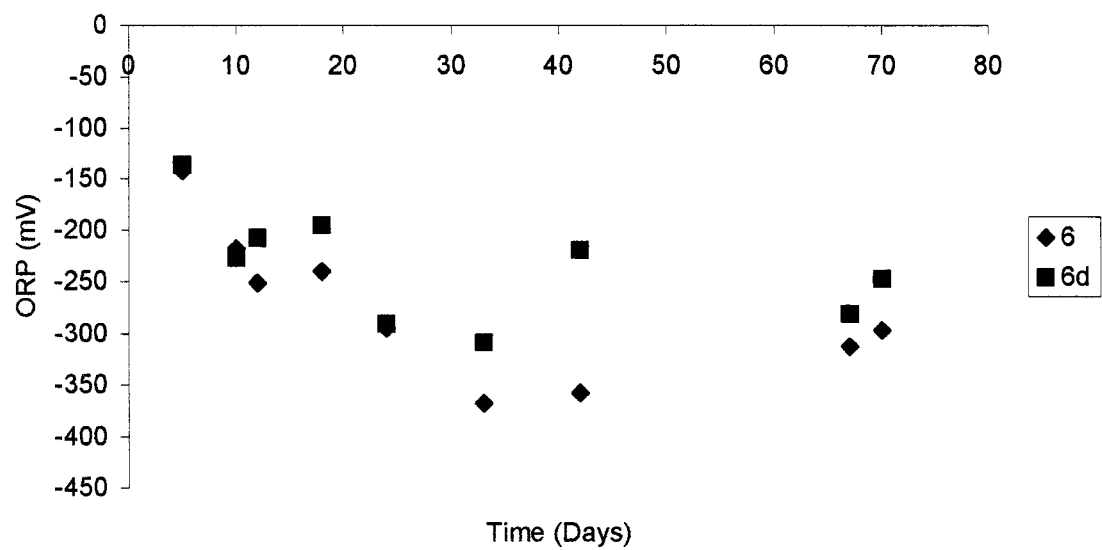
ORP vs Time, Reactor 4: Conifer Compost

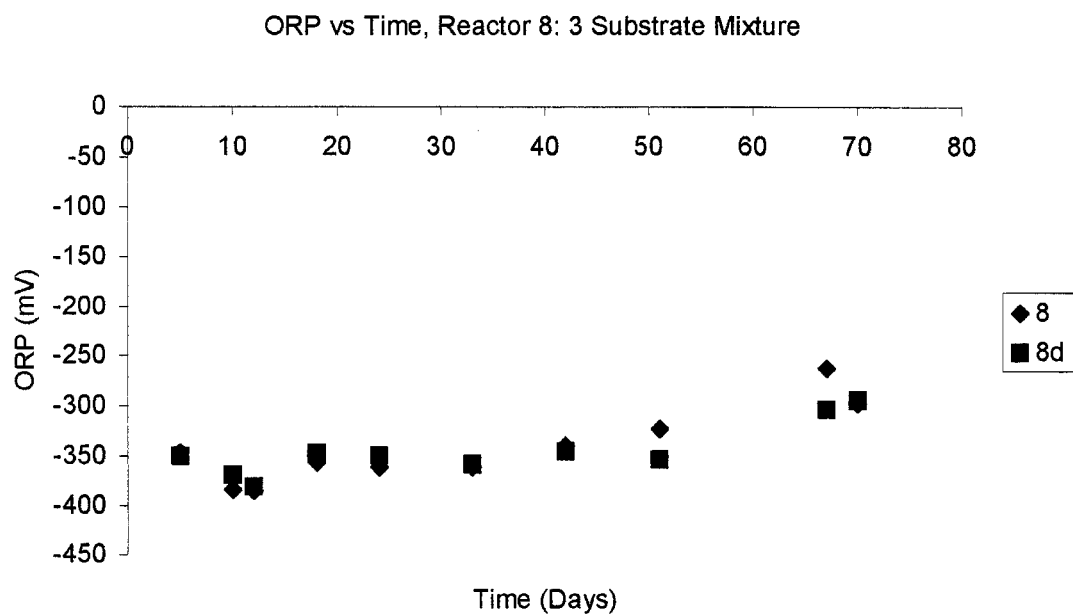
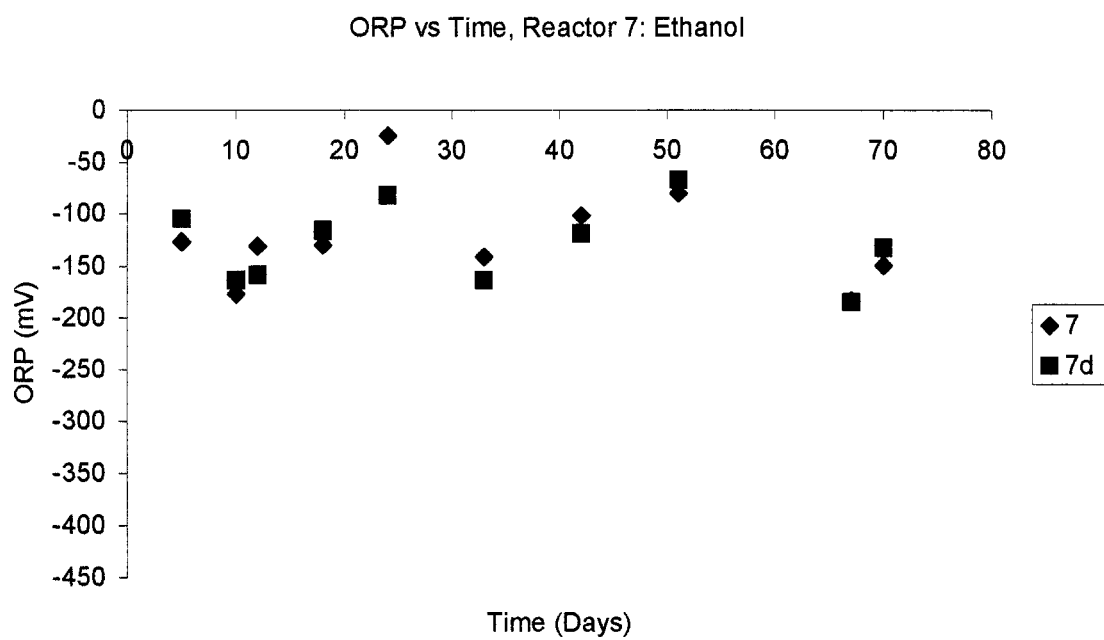


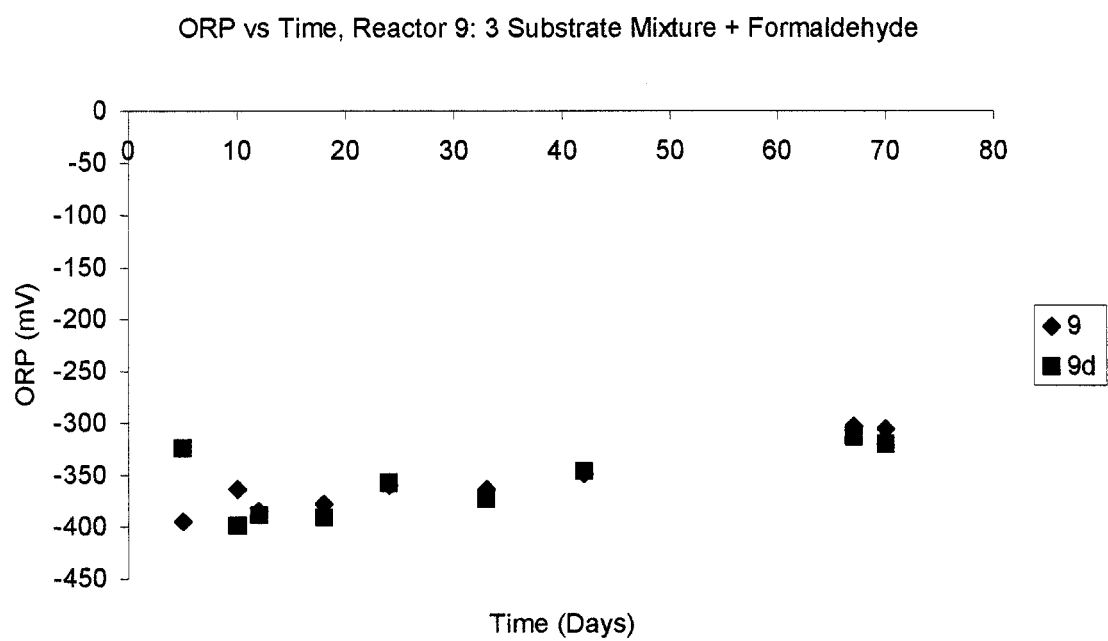
ORP vs Time, Reactor 5: Poultry Manure



ORP vs Time, Reactor 6: Conifer Sawdust

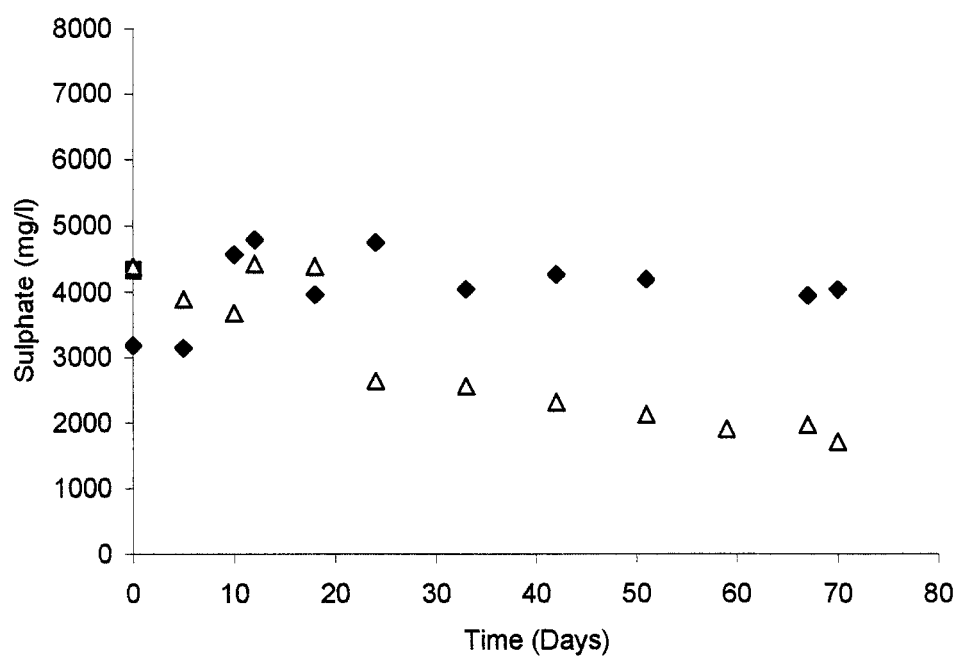




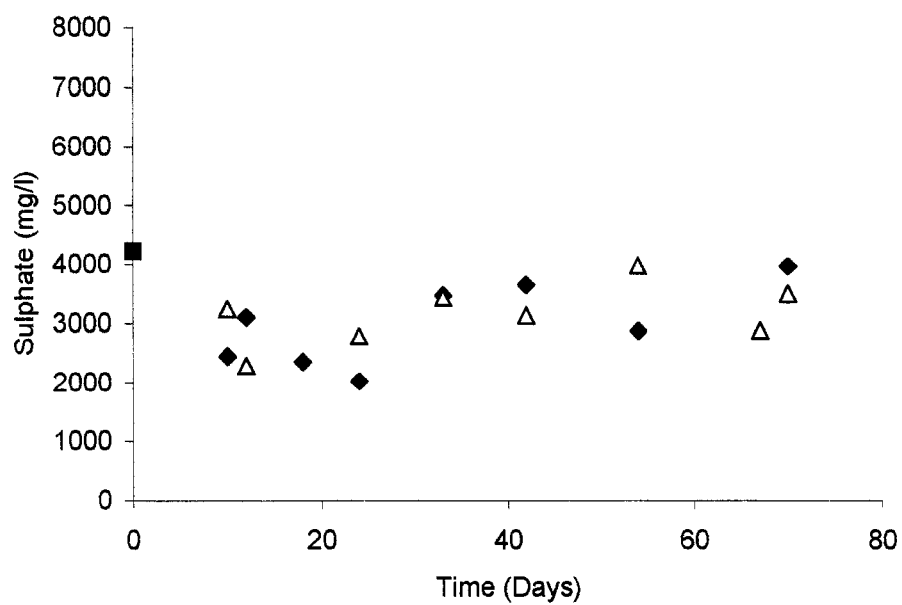


Sulphate

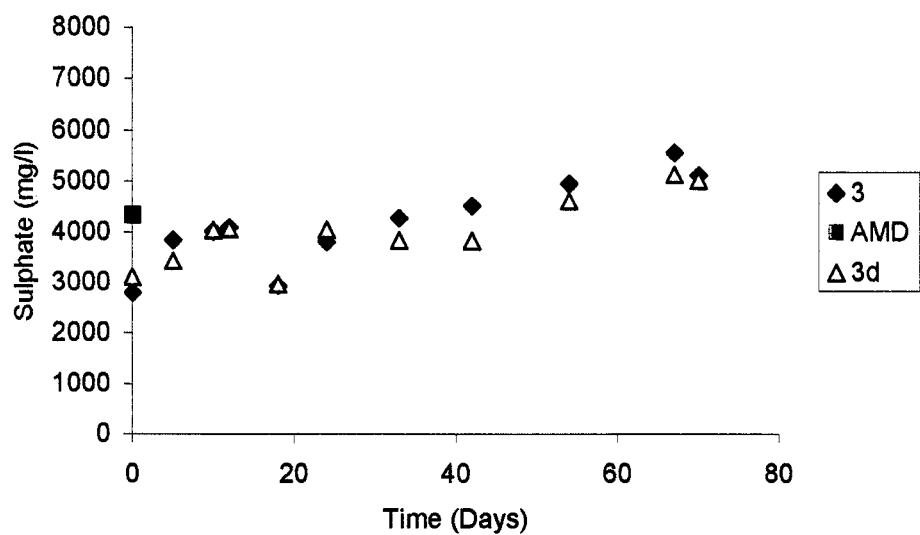
Sulphate vs Time, Reactor 1: Maple Wood Chips



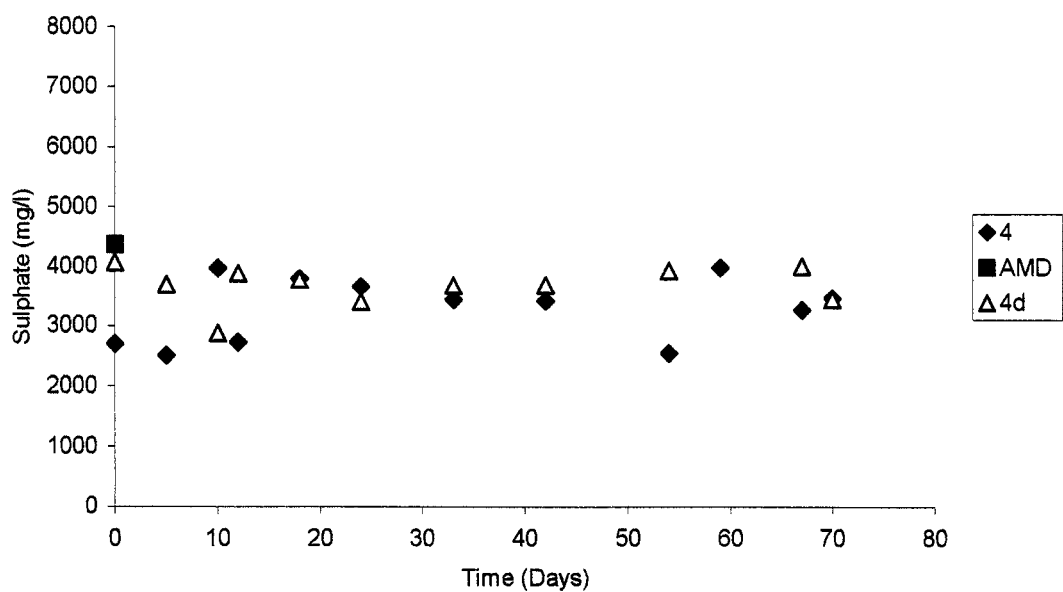
Sulphate vs Time, Reactor 2: Sphagnum Peat Moss



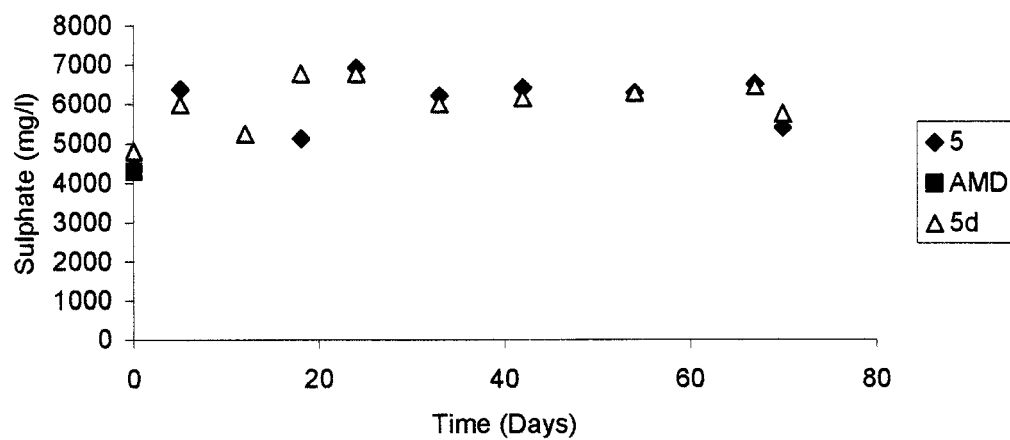
Sulphate vs Time, Reactor 3: Leaf Compost



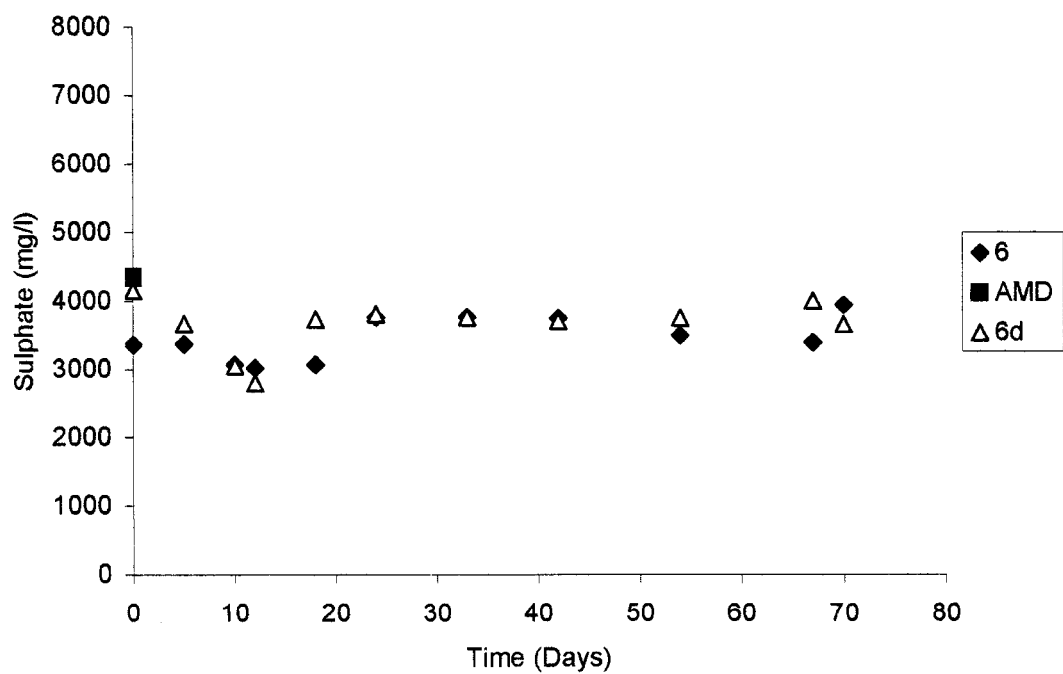
Sulphate vs Time, Reactor 4: Conifer Compost



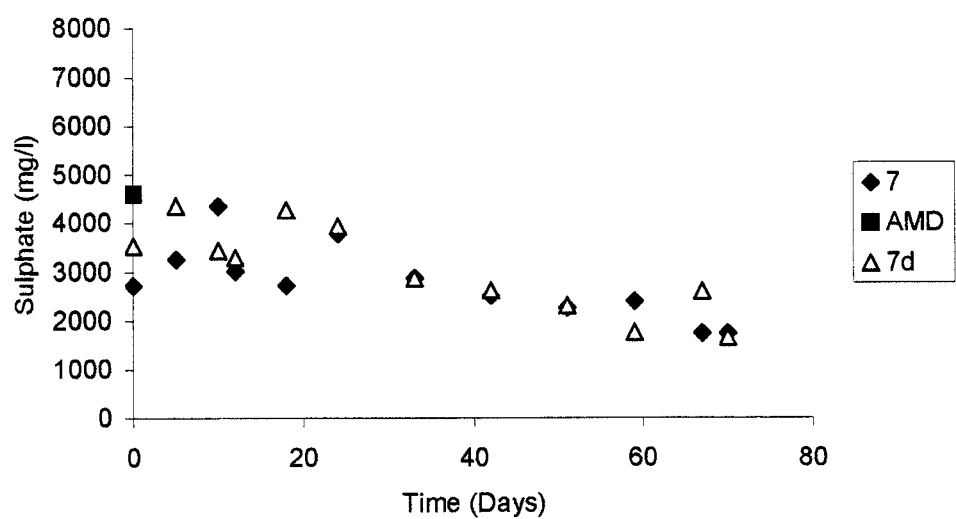
Sulphate vs Time, Reactor 5: Poultry Manure



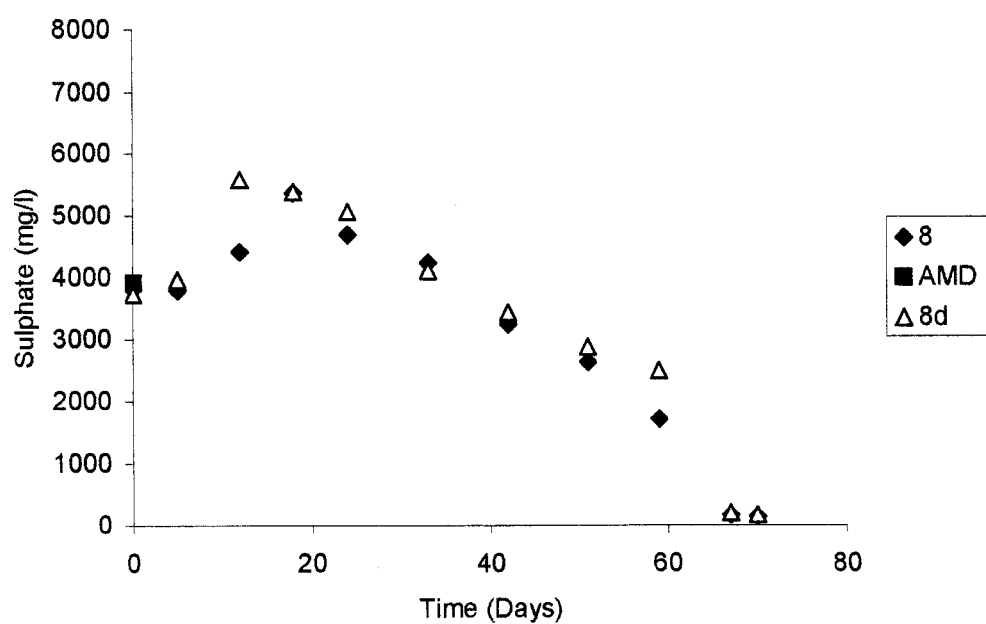
Sulphate vs Time, Reactor 6: Conifer Sawdust



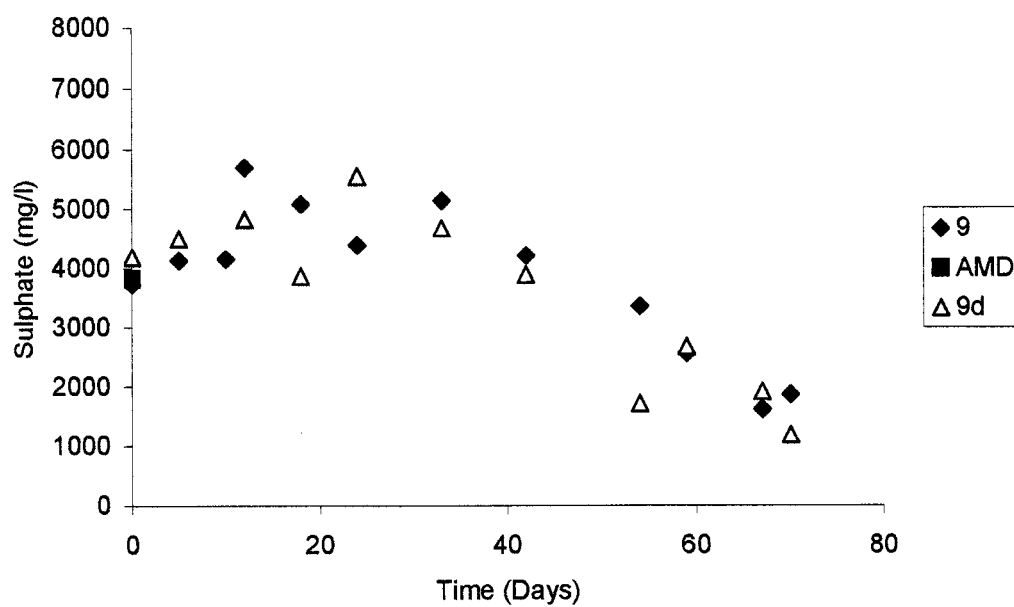
Sulphate vs Time, Reactor 7: Ethanol



Sulphate vs Time, Reactor 8: 3 Substrate Mixture

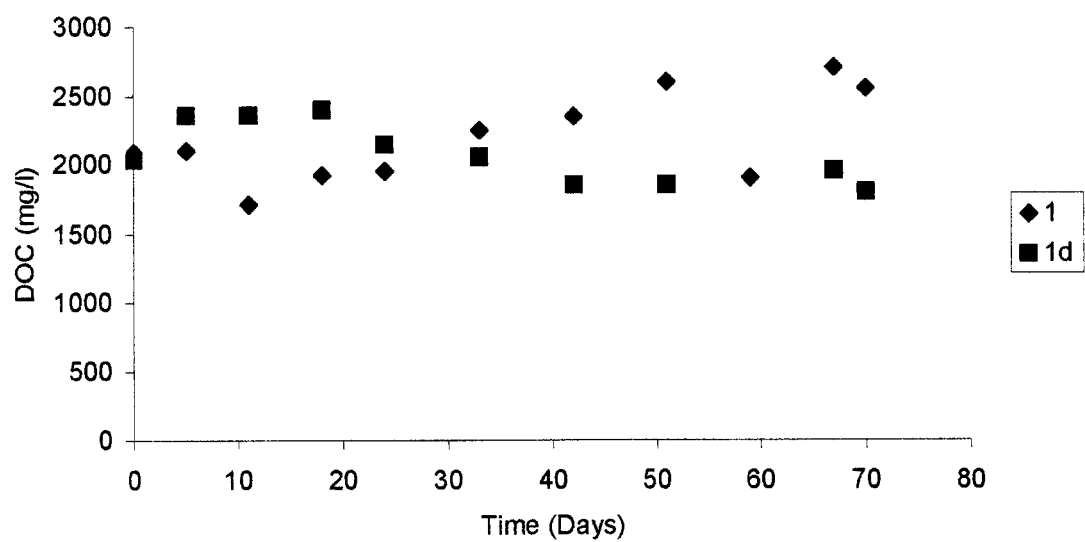


Sulphate vs Time, Reactor 9: 3 Substrate Mixture + Formaldehyde

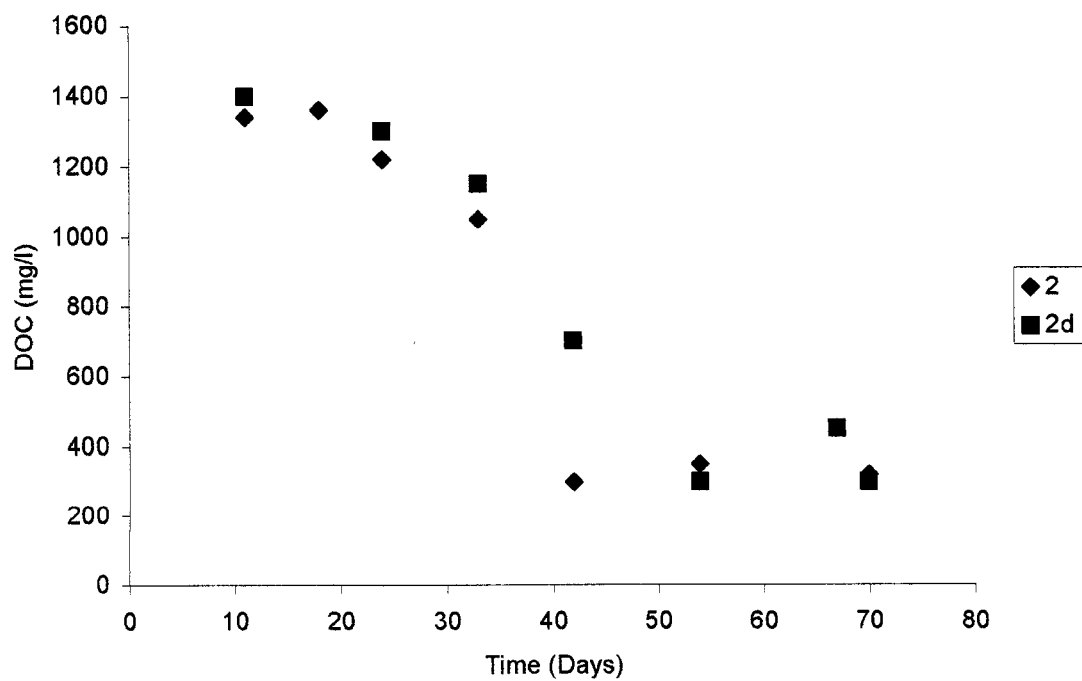


DOC

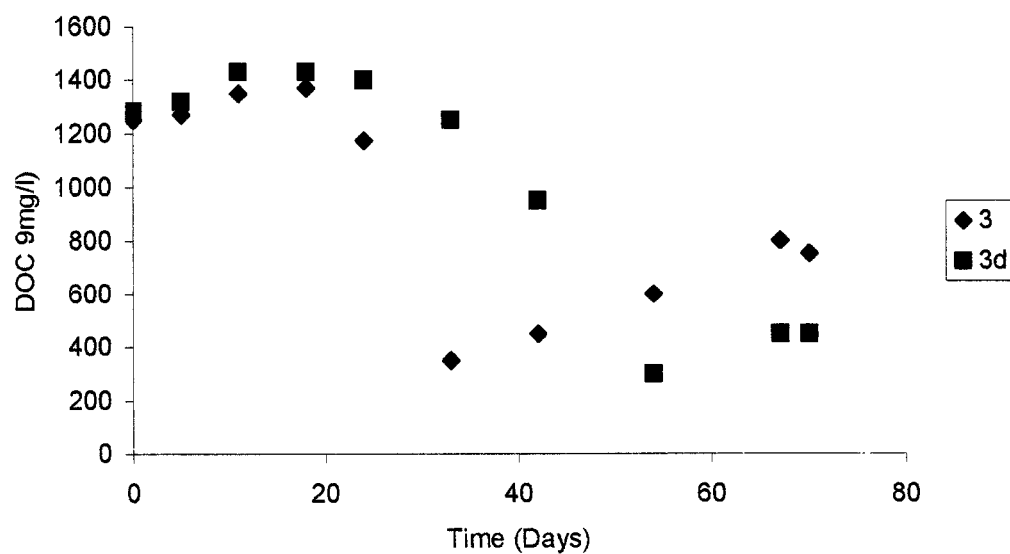
DOC vs Time, Reactor 1: Maple Wood Chips



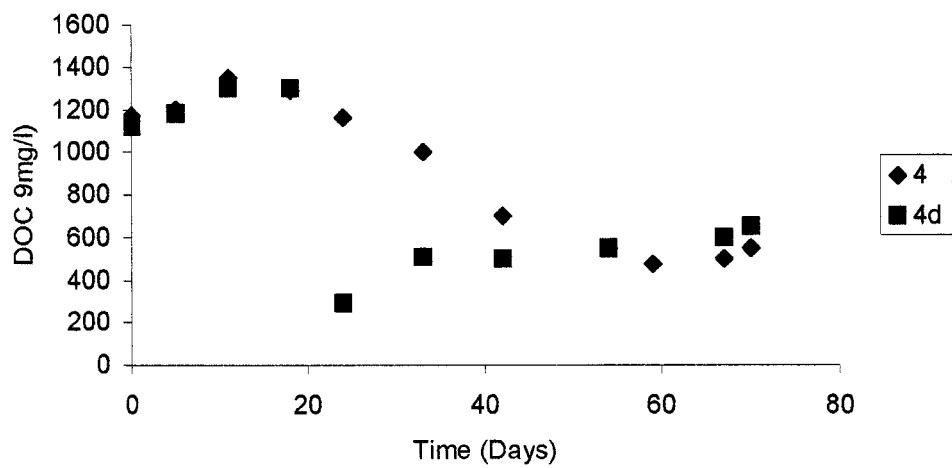
DOC vs Time, Reactor 2: Sphagnum Peat Moss



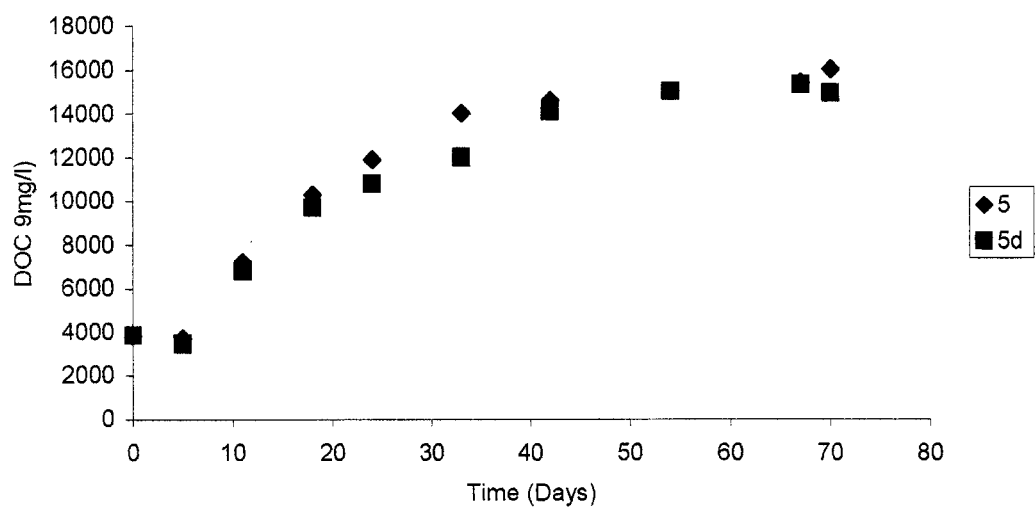
DOC vs Time, Reactor 3: Leaf Compost



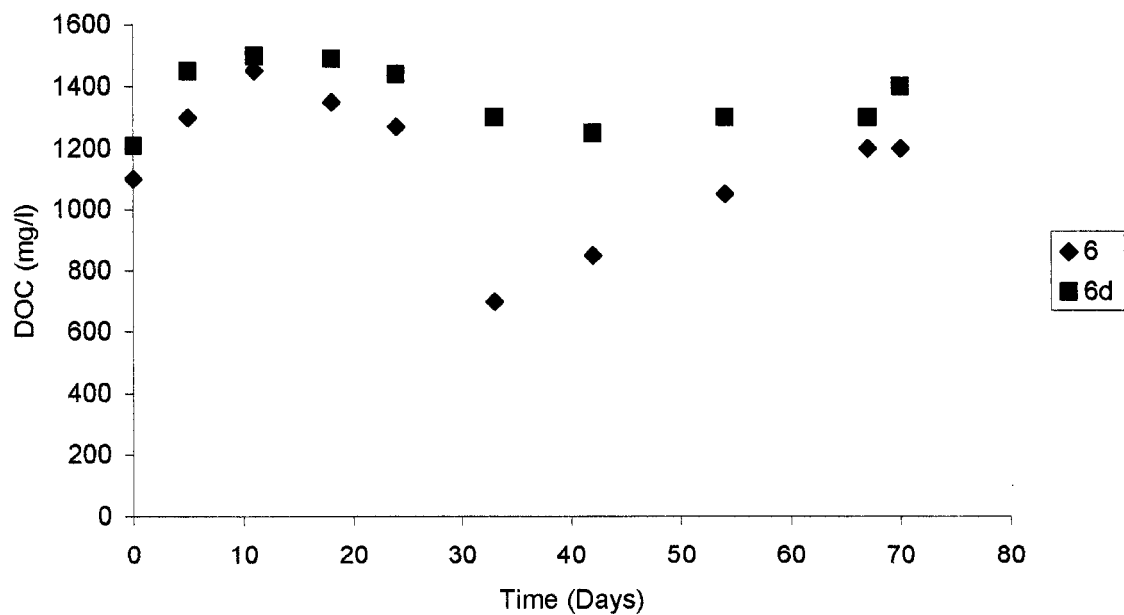
DOC vs Time, Reactor 4: Conifer Compost



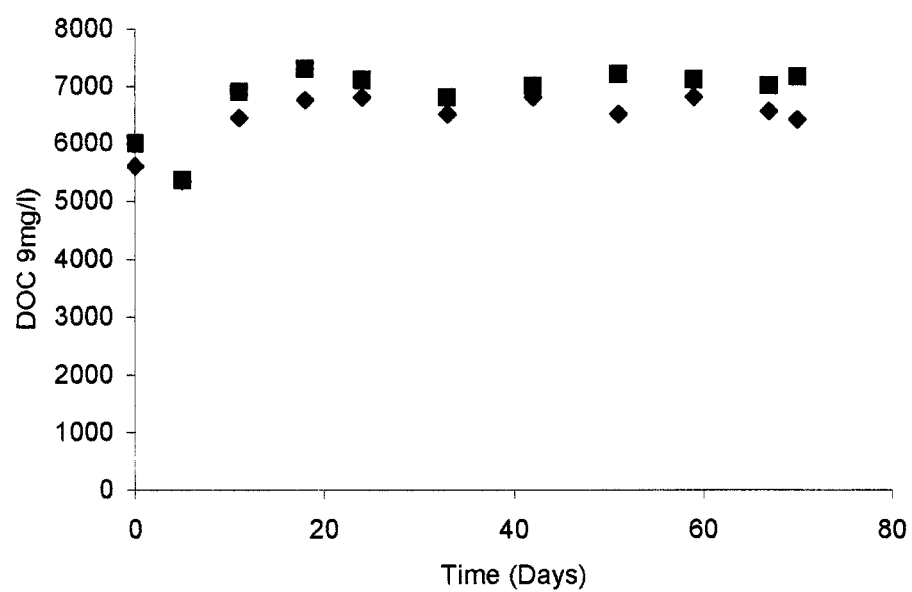
DOC vs Time, Reactor 5: Poultry Manure



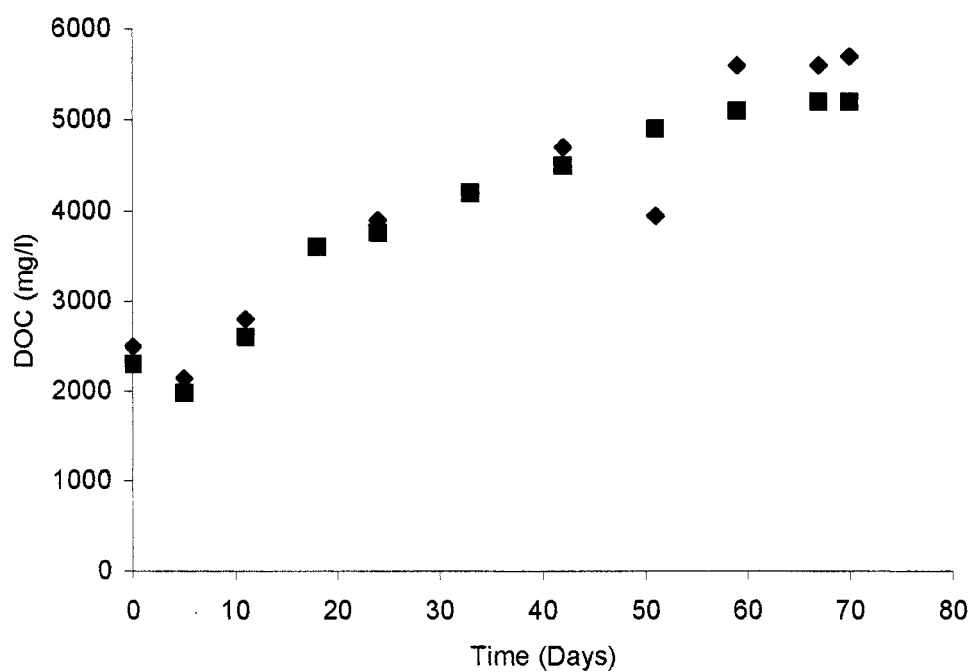
DOC vs Time, Reactor 6: Conifer Sawdust



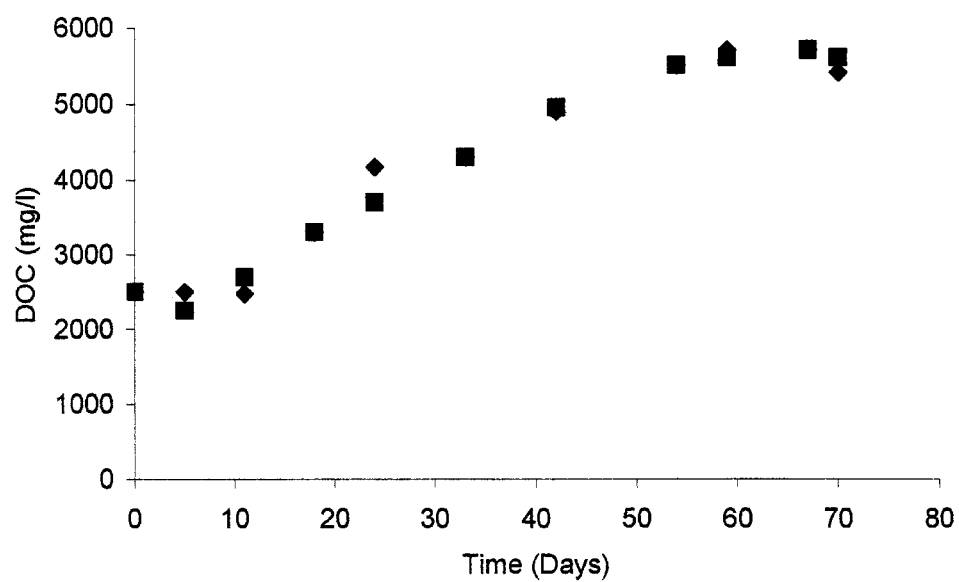
DOC vs Time, Reactor 7: Ethanol



DOC vs Time, Reactor 8: 3 Substrate Mixture



DOC vs Time, Reactor 9: 3 Substrate Mixture + Formaldehyde





	May 1st	July 10th
NH₄⁺-N (mg/l)		
Reactor, organic component	day 0	day 70
1, maple wood chips	1.5	2500
2, sphagnum peat moss		1500
3, leaf compost	2.4	2000
4, conifer wood compost	2.6	1900
5, poultry manure	380	6500
6, conifer sawdust	20	2300
7, ethanol	0.99	320
8, mixture of 1,3,7	220	3600
9, mixture of 1,3,7 w formaldehyde	190	4000
1d, maple wood chips	1	2500
2d, sphagnum peat moss		1800
3d, leaf compost	1.9	2100
4d, conifer wood compost	2.8	2100
5d, poultry manure	400	6300
6d, conifer sawdust	3.2	2000
7d, ethanol	1.1	310
8d, mixture of 1,3,7	170	3600
9d, mixture of 1,3,7 w formaldehyde	180	3700

Average NH₄⁺-N (mg/l)	0	70
R1, maple wood chips	1.25	2500
R2, sphagnum peat moss		1650
R3, leaf compost	2.15	2050
R4, conifer wood compost	2.7	2000
R5, poultry manure	390	6400
R6, conifer sawdust	11.6	2150
R7, ethanol	1.045	315
R8, mixture of 1,3,7	195	3600
R9, mixture of 1,3,7 w formaldehyde	185	3850

Alkalinity

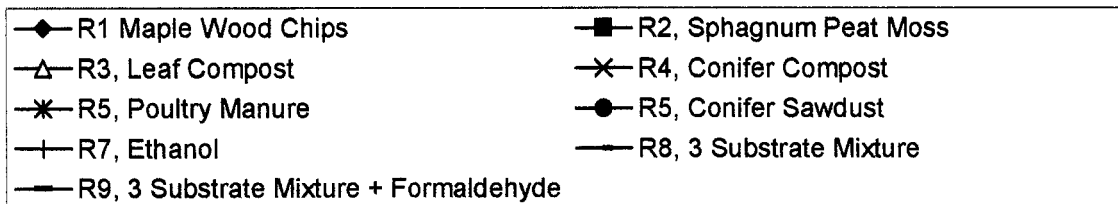
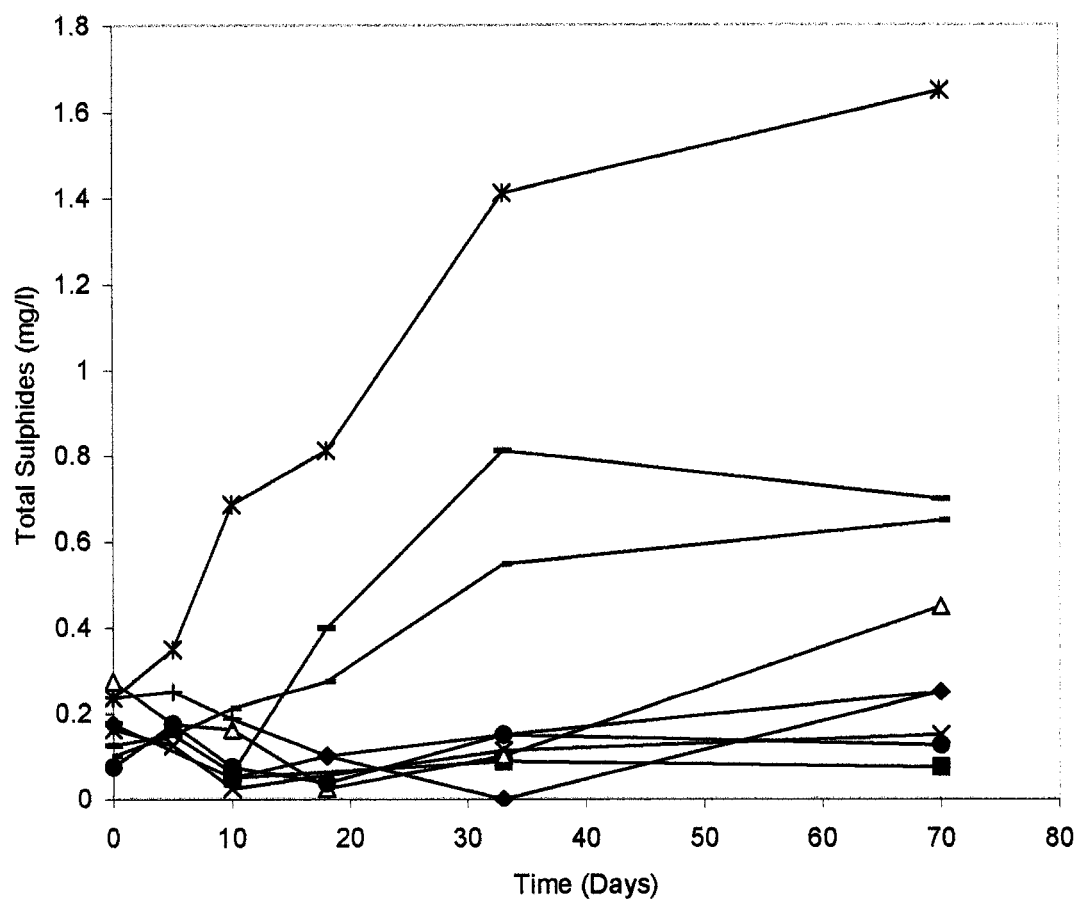
Alkalinity as CaCO ₃ (mg/l)	May 1st day	June 3rd day	July 10th day
Reactor, organic component	0	33	70
1, maple wood chips	3.8	6100	5600
2, sphagnum peat moss			3100
3, leaf compost	5.2	5800	5200
4, conifer wood compost	9.3	1200	4900
5, poultry manure	230	21000	19500
6, conifer sawdust	3.3	6500	5800
7, ethanol	2	1300	2100
8, mixture of 1,3,7	110	12000	13200
9, mixture of 1,3,7 w formaldehyde	120	12000	12400
1d, maple wood chips	6.2	3100	7500
2d, sphagnum peat moss			4100
3d, leaf compost	2.5	720	5550
4d, conifer wood compost	7.2	5700	5300
5d, poultry manure	410	27000	19400
6d, conifer sawdust	2	1300	5000
7d, ethanol	2	1300	2100
8d, mixture of 1,3,7	130	12000	13000
9d, mixture of 1,3,7 w formaldehyde	92	12000	12350

2 = < 2

Average Alkalinity as CaCO ₃ (mg/l)			
R1, maple wood chips	5	4600	6550
R2, sphagnum peat moss			3600
R3, leaf compost	3.85	3260	5375
R4, conifer wood compost	8.25	3450	5100
R5, poultry manure	320	24000	19450
R6, conifer sawdust	2.65	3900	5400
R7, ethanol	2	1300	2100
R8, mixture of 1,3,7	120	12000	13100
R9, mixture of 1,3,7 w formaldehyde	106	12000	12375

Sulphides

Average Sulphides vs Time



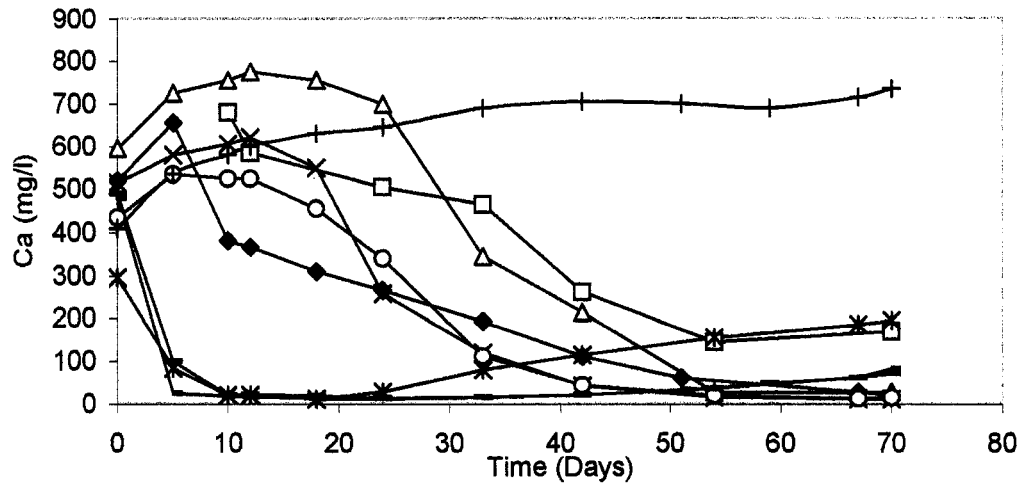
**Sulphate Reducing Bacteria (SRB)
Enumeration via Most Probable
Number Technique (MPN)**

Units: cells/100ml, 2=Not Detected

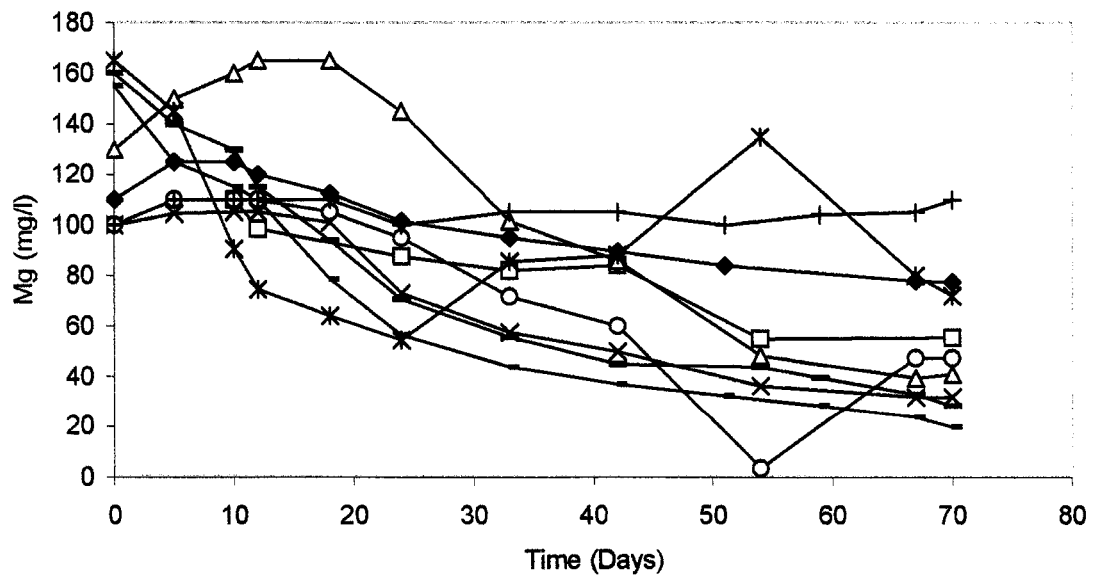
	Sediment	Day 0	Day 24	Day 70
Reactor, Substrate				
1, Maple Wood Chips	25	30	170	280000
2, Sphagnum Peat Moss	25		23000	17000
3, Leaf Compost	25	8	23000	130000
4, Conifer Compost	25	50	22000	8000
5, Poultry Manure	25	25	23000	8000
6, Conifer Sawdust	25	4	11000	3000
7, Ethanol	25	2	2	300
8, 3 Substrate Mixture	25	140	3000	13000
9, 3 Substrate Mixture + Formaldehyde	25	500	30000	5000

Metals

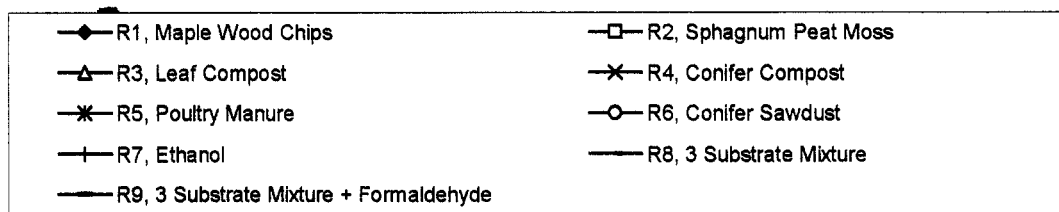
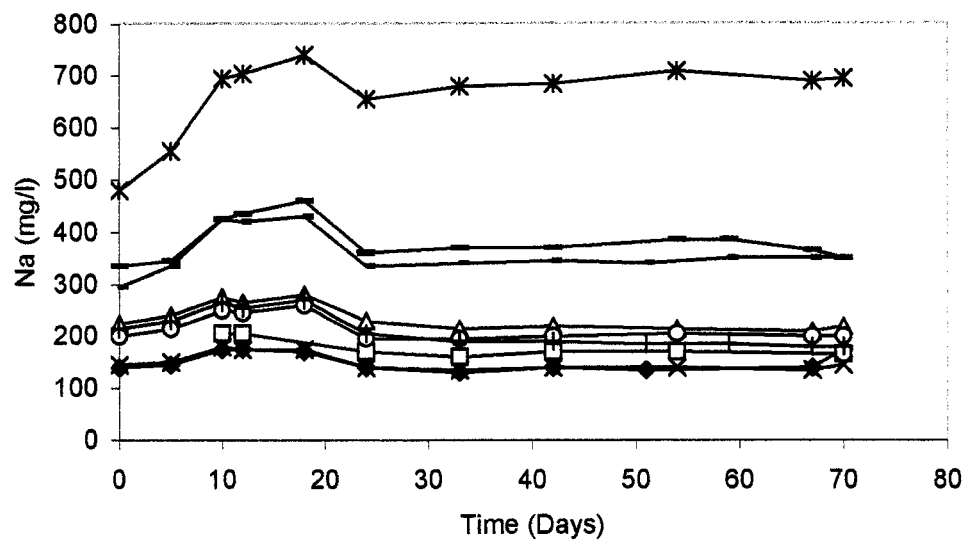
Average Ca vs Time



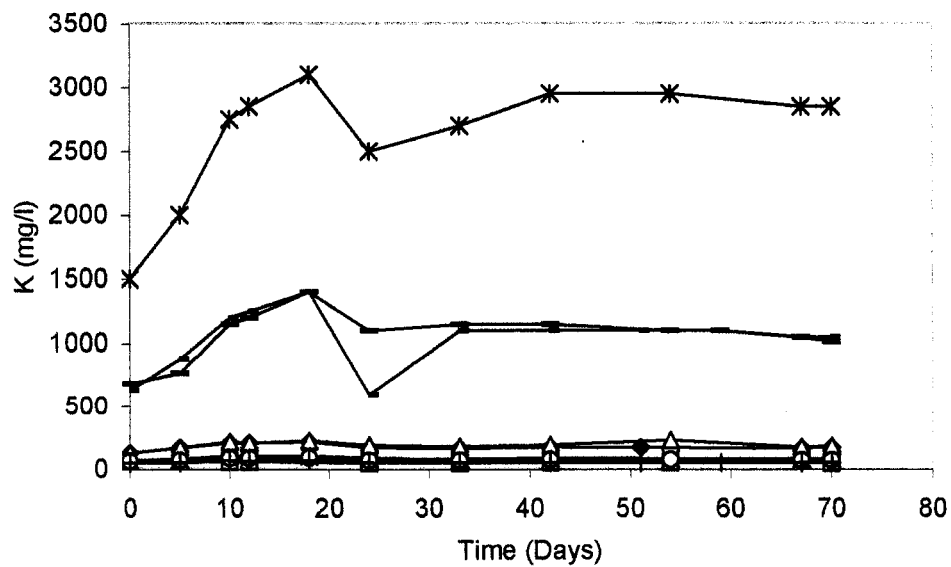
Average Mg vs Time



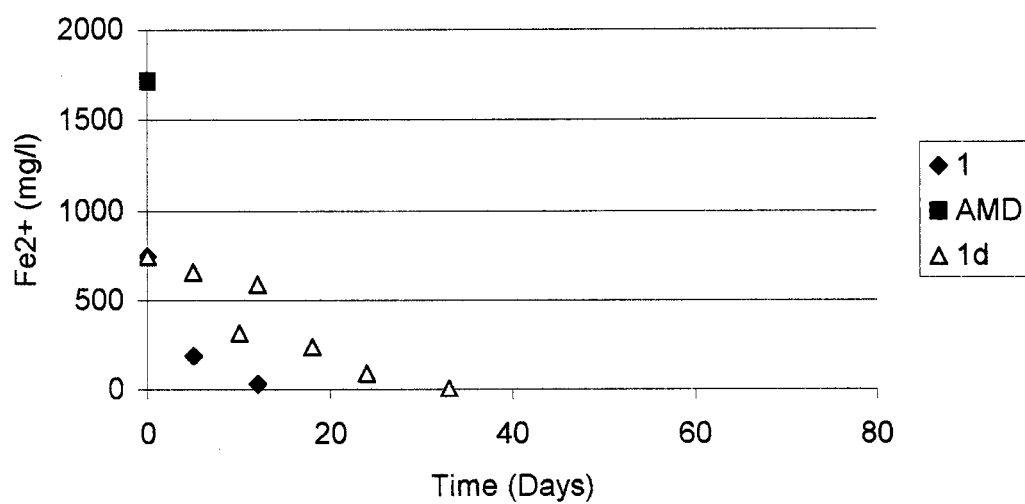
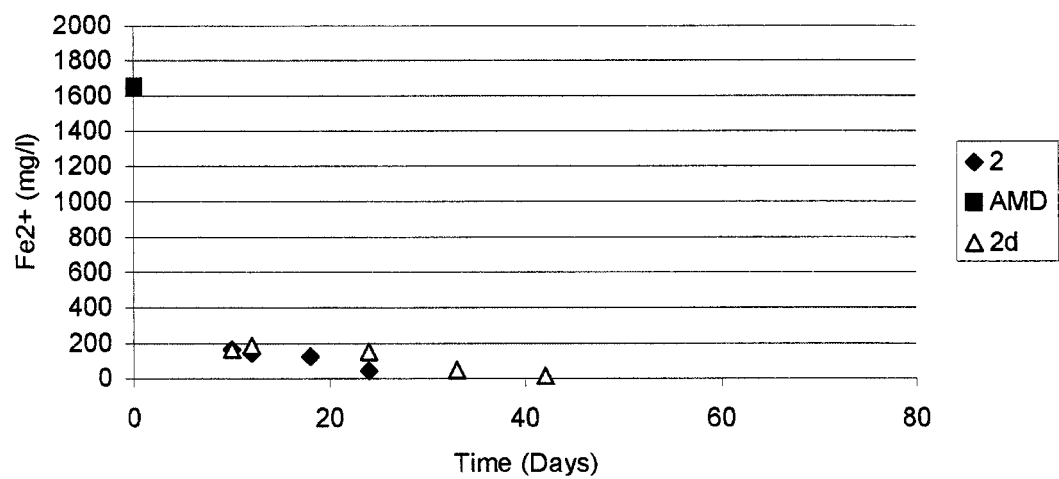
Average Na vs Time

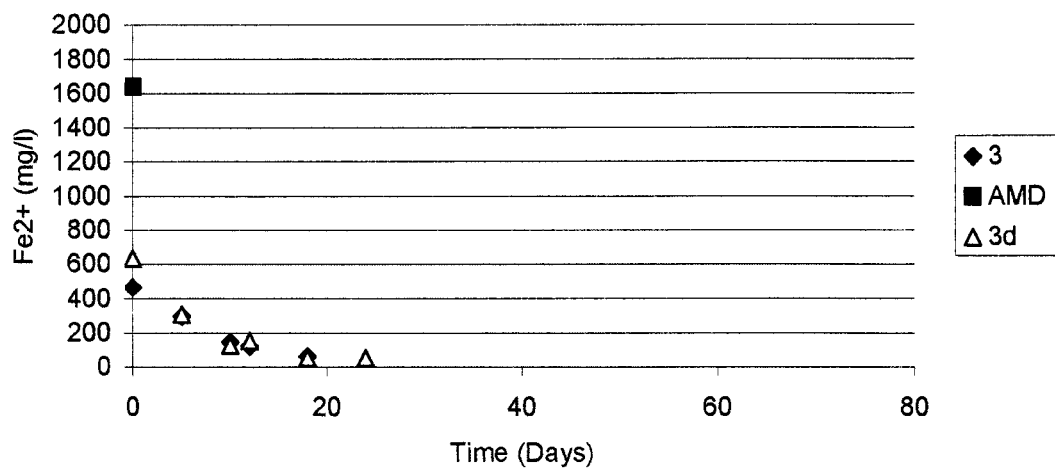
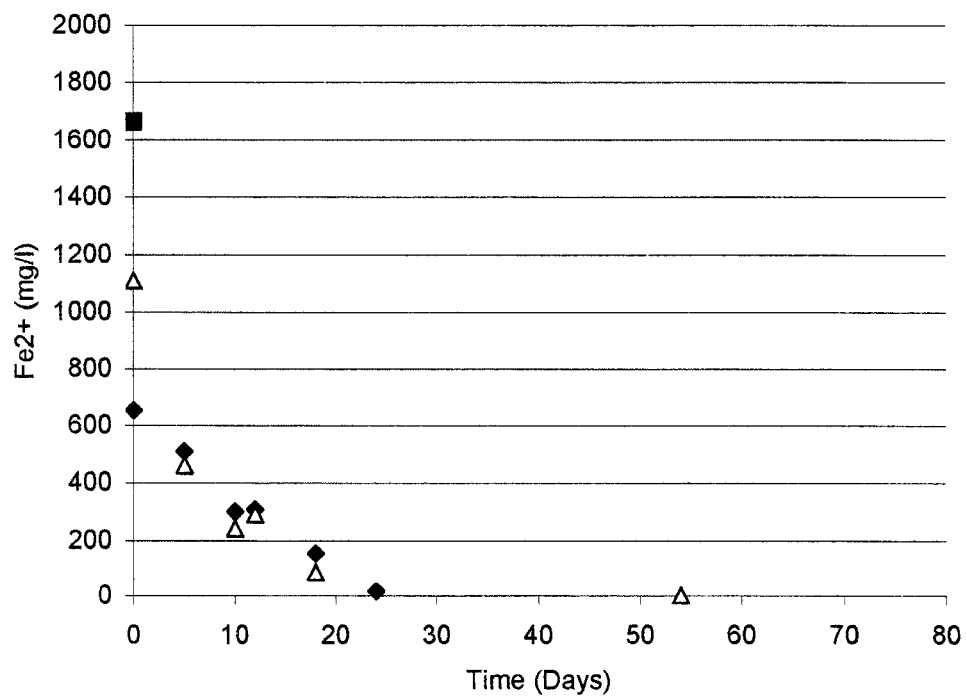


Average K vs Time

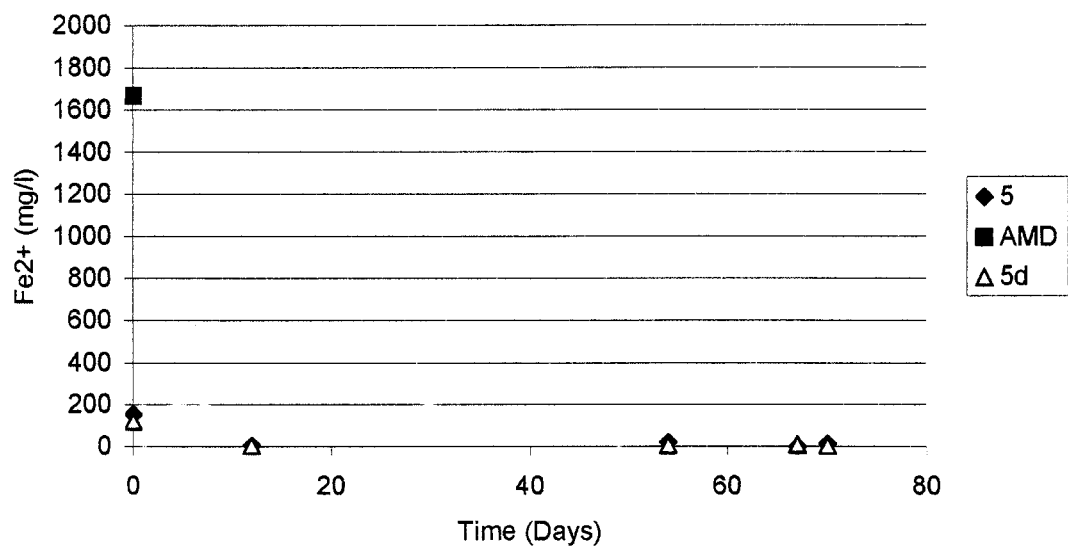


Ferrous Iron

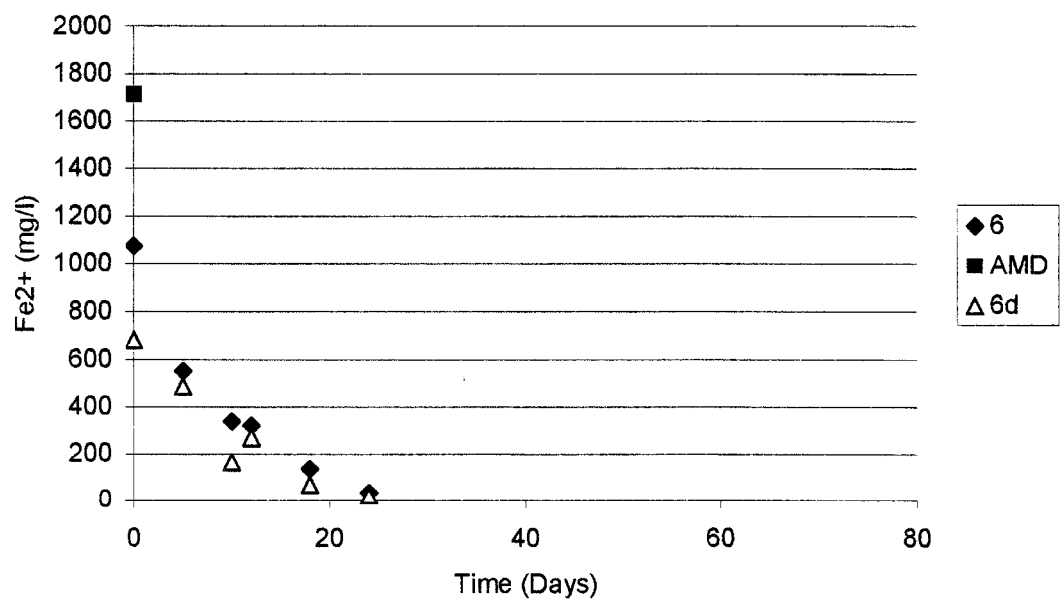
Fe²⁺ vs Time, Reactor 1: Maple Wood ChipsFe²⁺ vs Time, Reactor 2: Sphagnum Peat Moss

Fe²⁺ vs Time, Reactor 3: Leaf CompostFe²⁺ vs Time, Reactor 4: Conifer Compost

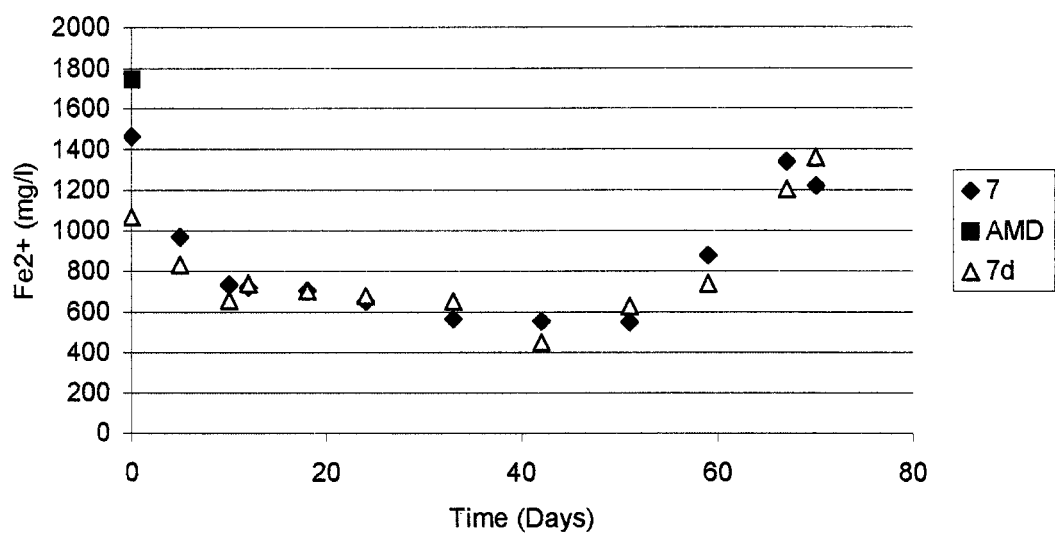
Fe2+ vs Time, Reactor 5: poultry Manure



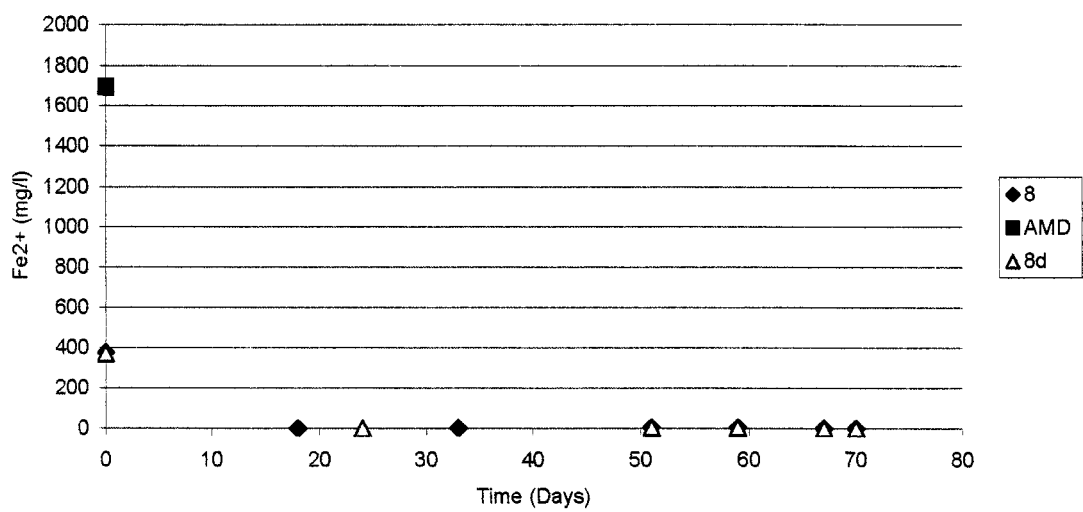
Fe2+ vs Time, Reactor 6: Conifer Sawdust

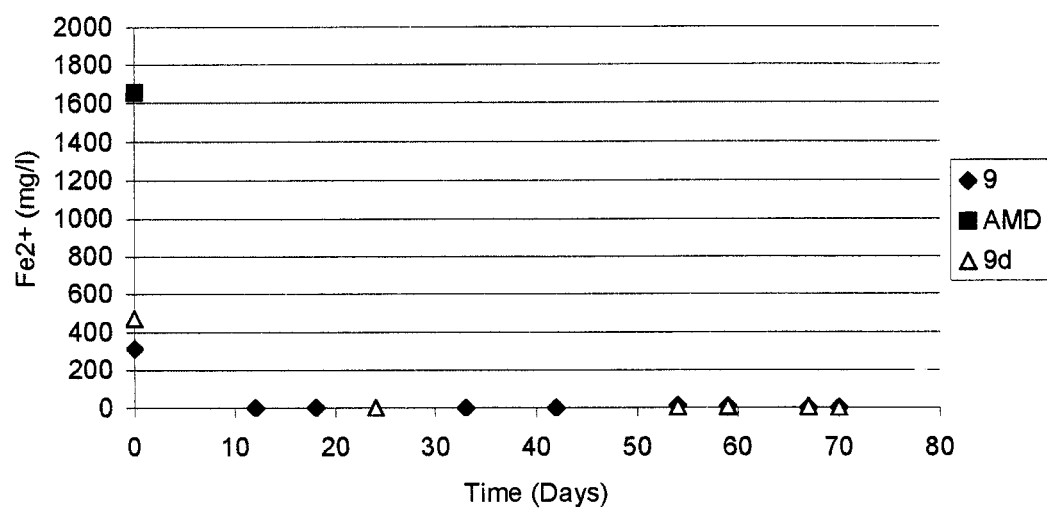


Fe2+ vs Time, Reactor 7: Ethanol



Fe2+ vs Time, Reactor 8: 3 Substrate Mixture



Fe²⁺ vs Time, Reactor 9: 3 Substrate Mixture + Formaldehyde

Metal Hydroxide, Carbonate and Sulphide Solubility Curves

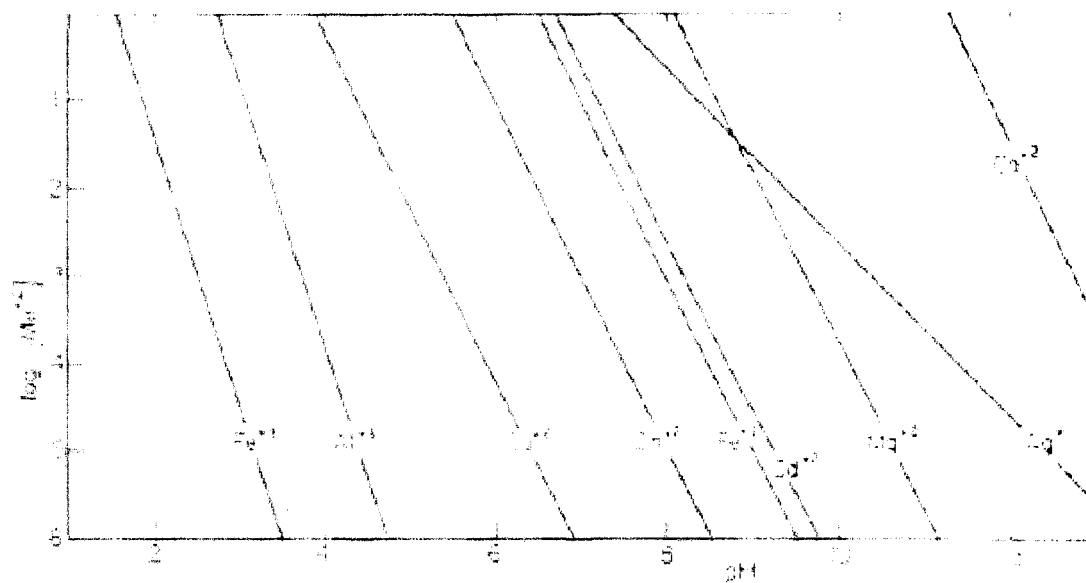
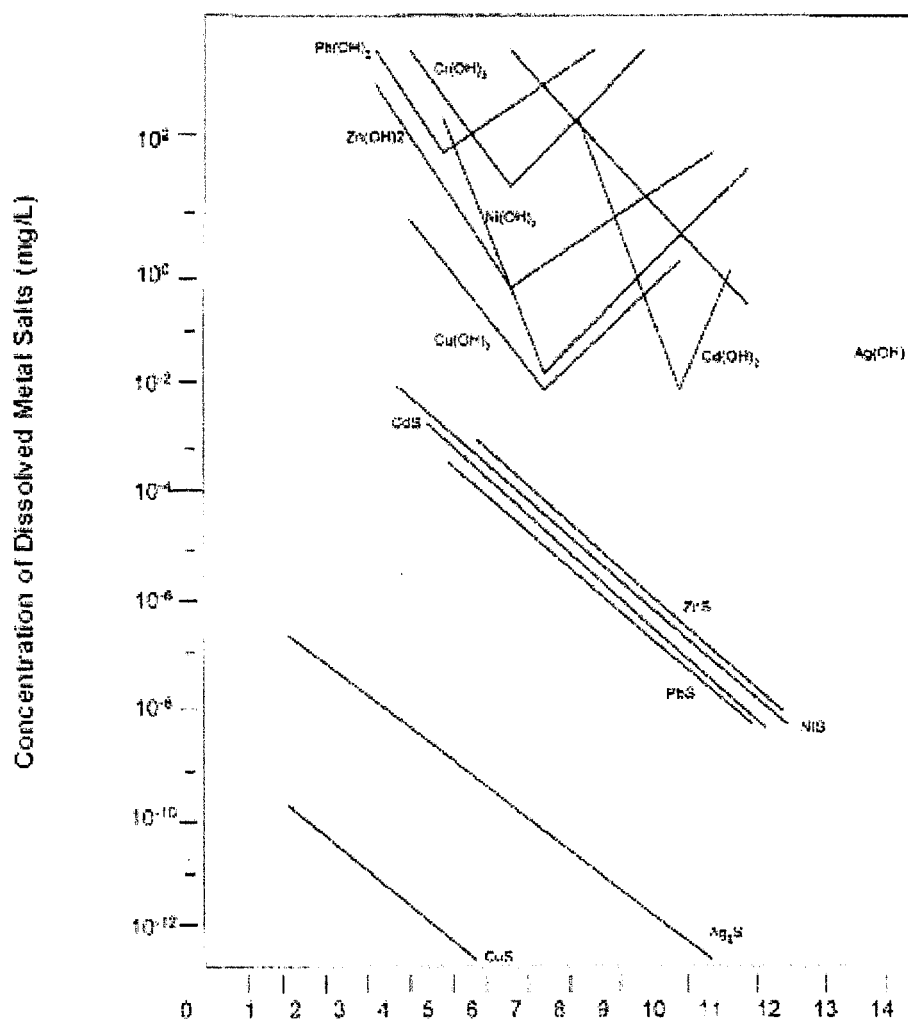


Figure 5.3 from Stumm and Morgan (1996). Metal oxide and hydroxide solubility vs pH. Free metal-ion concentration (mol/l) in equilibrium with solid oxides or hydroxides.



Solubility of metal hydroxides and sulphides as a function of pH (source: EPA 625/8-80-003).

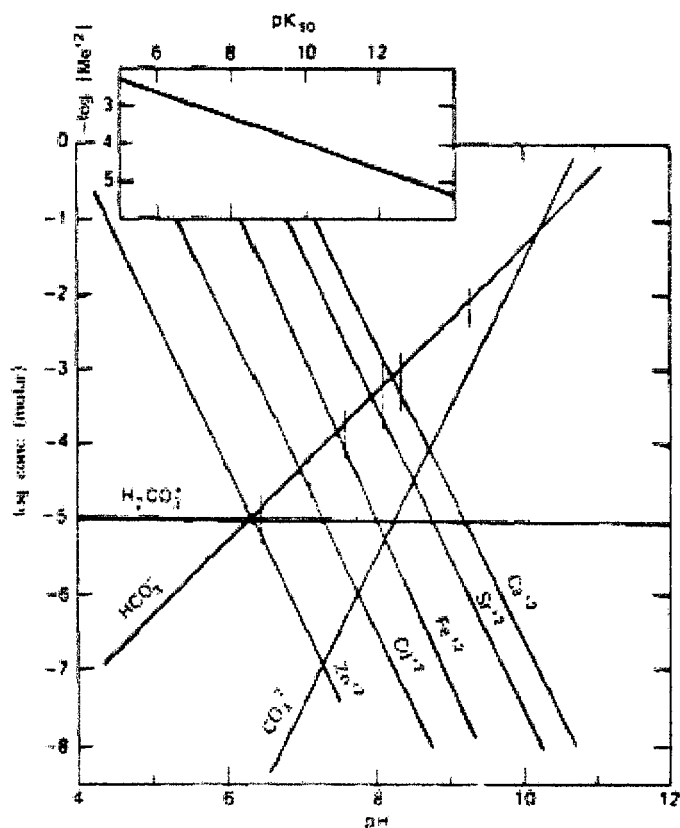


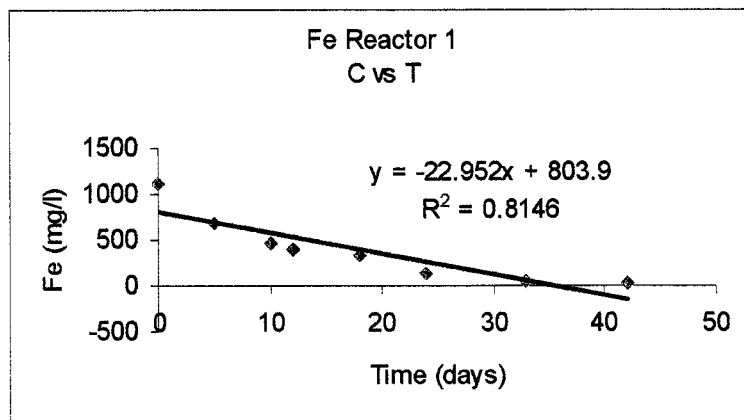
Figure 5.7 in Stumm and Morgan. Solubility of $\text{MeCO}_3(\text{s})$ as $f(\text{pH})$ at constant $\text{pCO}_2 = 10^{-3.5}$ atm. If no excess acid or base or acid are added, equilibrium composition of the solution is shown by the vertical bars. Inset gives $-\log[\text{Me}^{2+}]$ for pure $\text{MeCO}_3(\text{s})$ in suspensions in equilibrium with pCO_2 at $10^{-3.5}$ atm as $f(\text{K}_{\text{so}})$.

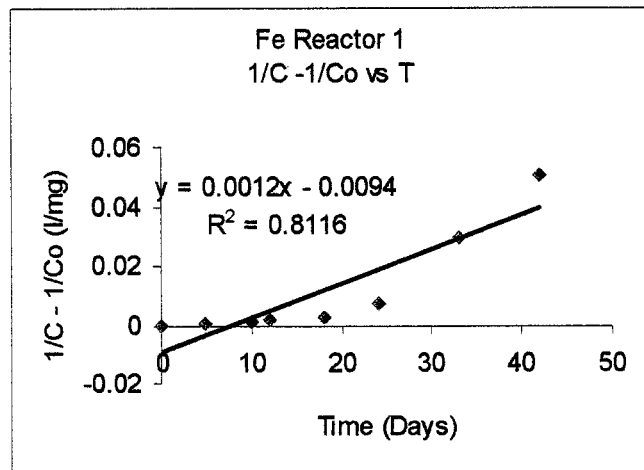
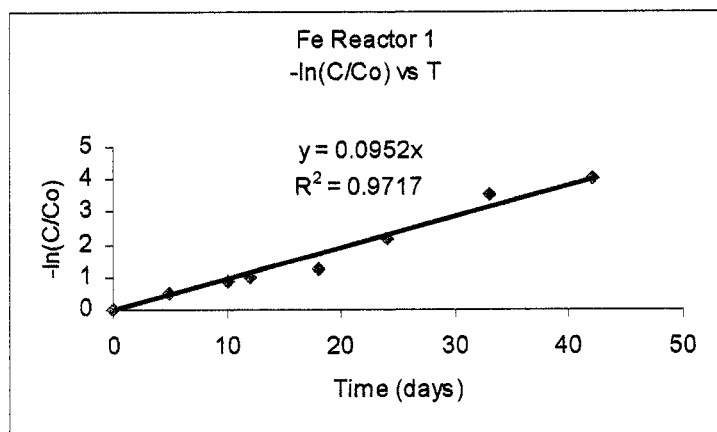
APPENDIX V:
METAL REMOVAL KINETIC MODELING

IRON

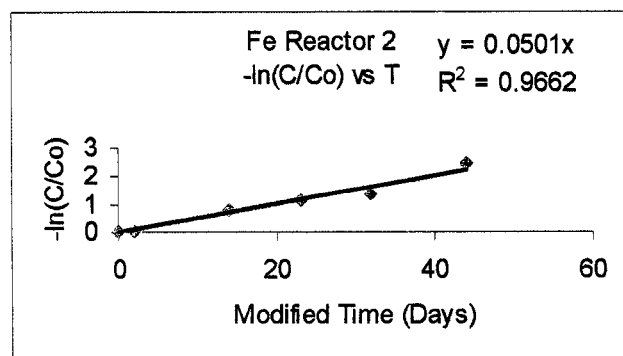
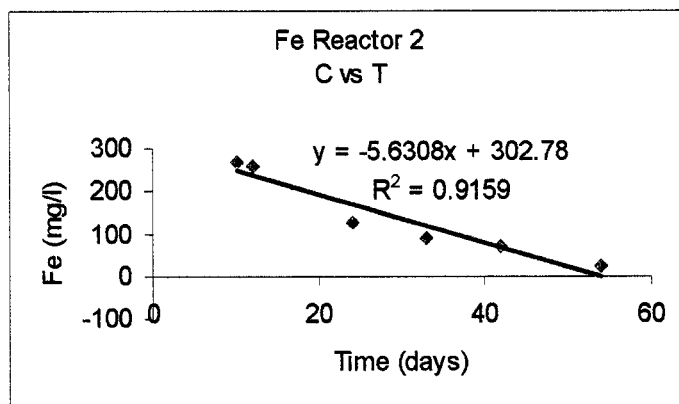
Reactor 1

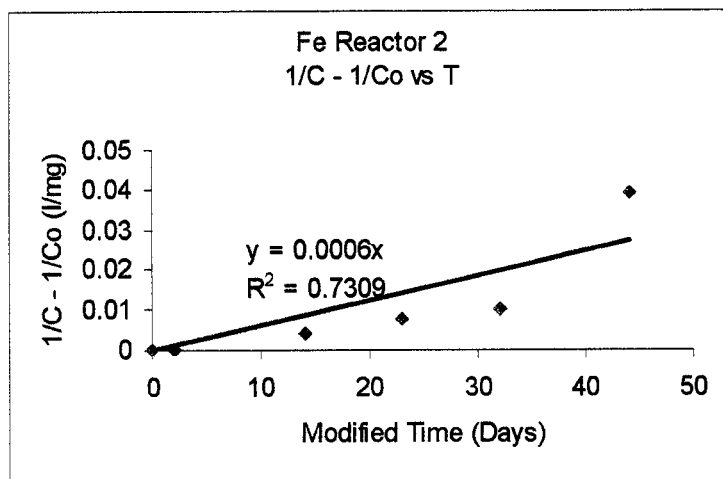
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	42
order	Conc, C.(mg/l)	1100	665	460	399.6	326	123	33	19.5
0	Co-C	0	435	640	700.4	774	977	1067	1080.5
1	$-\ln(C/Co)$	0	0.50328	0.8718	1.0126	1.2162	2.191	3.50656	4.0327
2	$1/C-1/Co$	0	0.00059	0.0013	0.0016	0.0022	0.007	0.02939	0.0504
k									
0	[mg/l/d]	####	87	64	58.367	43	40.71	32.3333	25.726
1	[d ⁻¹]	####	0.10066	0.0872	0.0844	0.0676	0.091	0.10626	0.096
2	[l/mg/d]	####	0.00012	0.0001	0.0001	0.0001	3E-04	0.00089	0.0012



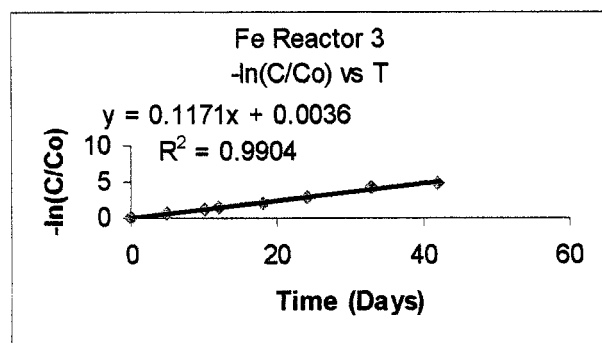
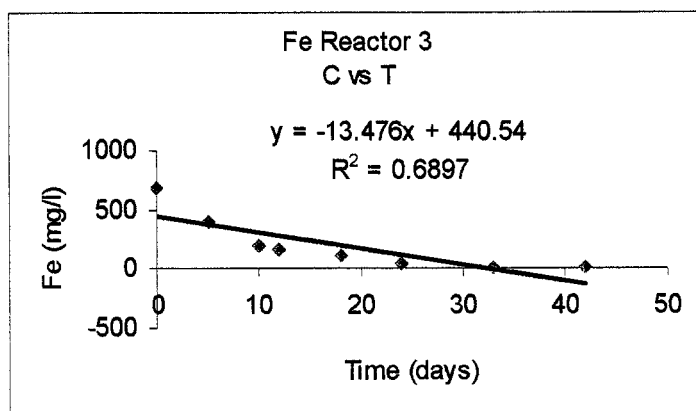


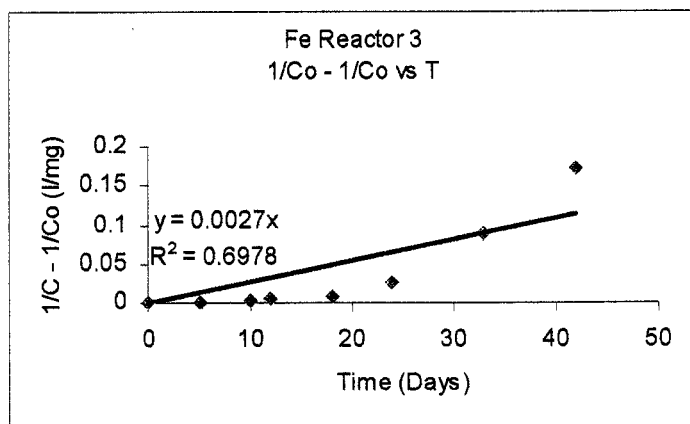
Reactor 2		0	2	14	23	32	44	modified time	
Time	T (days)	10	12	24	33	42	54		
Conc	C (mg/l)	265	260	125	86.8	71	23.5		
law	0 order	Co-C	0	5	140	178.2	194	241.5	
	1st order	$-\ln(C/Co)$	0	0.01905	0.7514	1.1161	1.317	2.423	
	2nd order	$1/C - 1/Co$	0	7.3E-05	0.0042	0.0077	0.0103	0.039	
k	0 order	[mg/l/d]	#DIV/0!	2.5	10	7.7478	6.0625	5.489	
	1st order	[d ⁻¹]	#DIV/0!	0.00952	0.0537	0.0485	0.0412	0.055	
	2nd order	[l/mg/d]	#DIV/0!	3.6E-05	0.0003	0.0003	0.0003	9E-04	





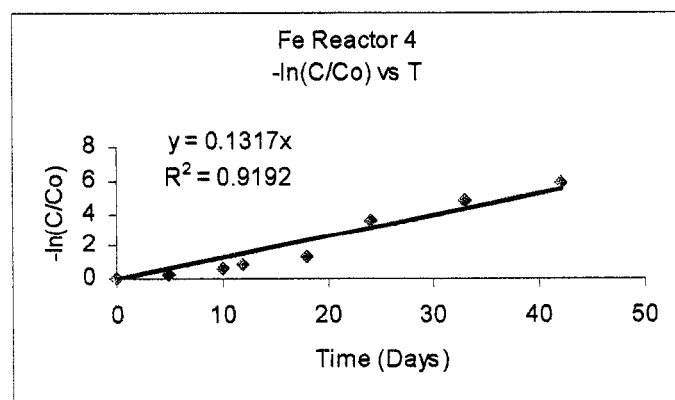
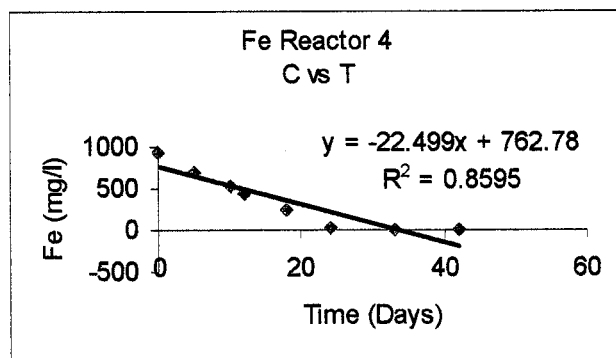
Reactor 3	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	42
order	Conc, C.(mg/l)	680	390	195	155	109.5	37.5	11	5.8
0	Co-C	0	290	485	525	570.5	642.5	669	674.2
1	$-\ln(C/Co)$	0	0.55595	1.2491	1.4787	1.8262	2.898	4.1242	4.7642
2	$1/C-1/Co$	0	0.00109	0.0037	0.005	0.0077	0.025	0.08944	0.1709
k									
0	[mg/l/d]	####	58	48.5	43.75	31.694	26.77	20.2727	16.052
1	[d ⁻¹]	####	0.11119	0.1249	0.1232	0.1015	0.121	0.12498	0.1134
2	[l/mg/d]	####	0.00022	0.0004	0.0004	0.0004	0.001	0.00271	0.0041





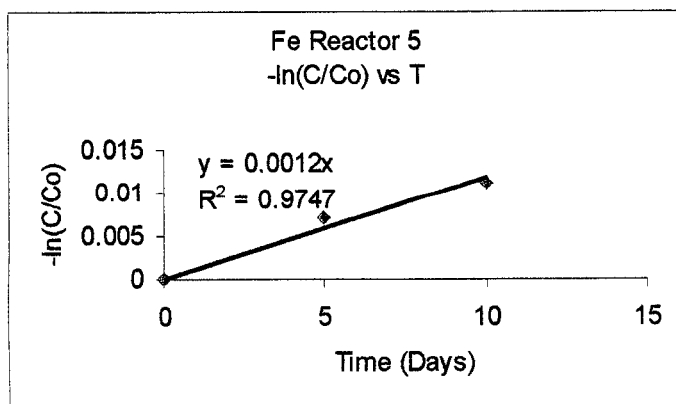
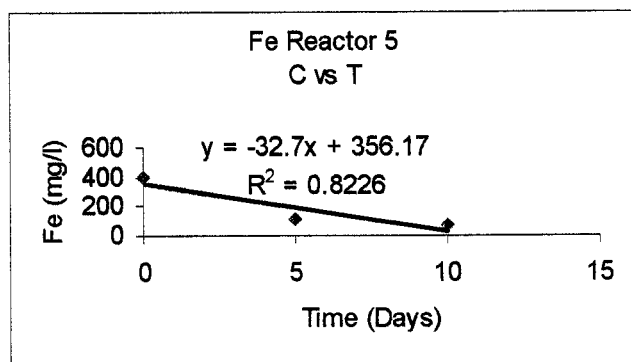
Reactor
4

	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	42
order	Conc, C.(mg/l)	925	695	535	425	245	26.9	7.9	2.55
0	Co-C	0	230	390	500	680	898.1	917.1	922.45
1	$-\ln(C/Co)$	0	0.28588	0.5475	0.7777	1.3285	3.538	4.76293	5.8937
2	$1/C-1/Co$	0	0.00036	0.0008	0.0013	0.003	0.036	0.1255	0.3911
	k								
0	[mg/l/d]	####	46	39	41.667	37.778	37.42	27.7909	21.963
1	[d ⁻¹]	####	0.05718	0.0548	0.0648	0.0738	0.147	0.14433	0.1403
2	[l/mg/d]	####	7.2E-05	8E-05	0.0001	0.0002	0.002	0.0038	0.0093



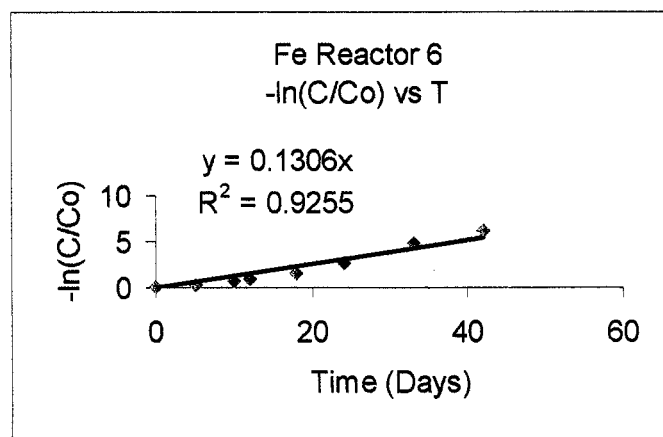
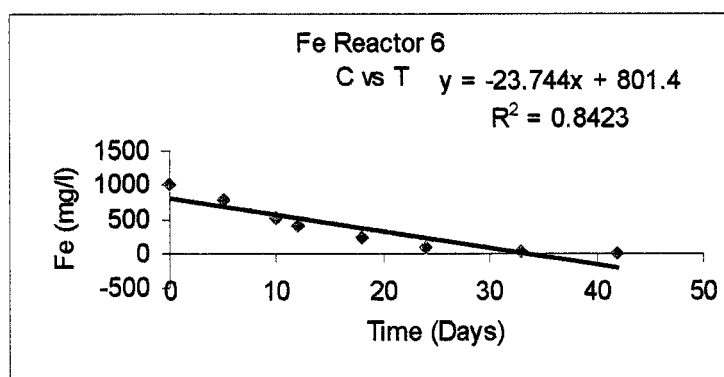
Reactor
5

	Time, T (days)	0	5	10
order	Conc, C.(mg/l)	400	105	73
0	Co-C	0	295	327
1	$-\ln(C/Co)$	0	1.3375	1.701
2	$1/C-1/Co$	0	0.00702	0.0112
	k			
0	[mg/l/d]	####	59	32.7
1	[d ⁻¹]	####	0.2675	0.1701
2	[l/mg/d]	####	0.0014	0.0011

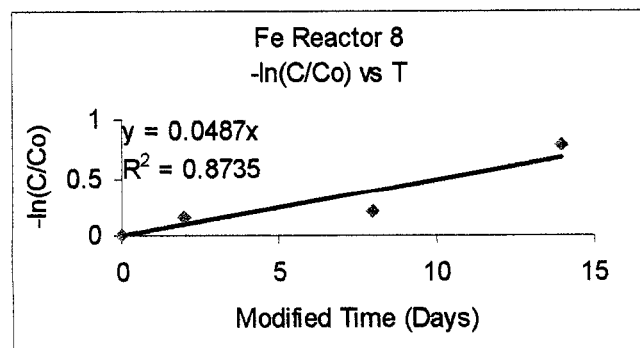
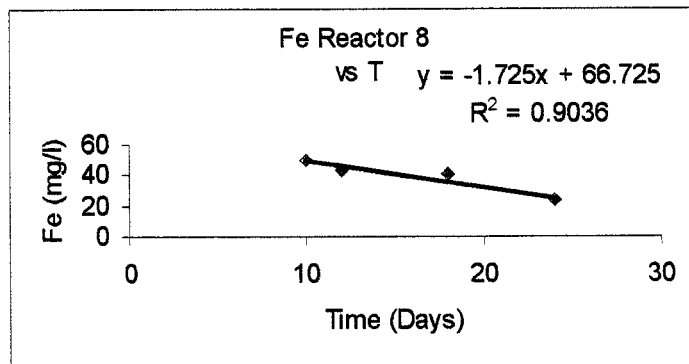


Reactor
6

	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	42
order	Conc, C.(mg/l)	995	780	510	405	220	71.5	8.4	2.1
0	Co-C	0	215	485	590	775	923.5	986.6	992.9
1	$-\ln(C/Co)$	0	0.24345	0.6683	0.8989	1.5091	2.633	4.77451	6.1608
2	$1/C-1/Co$	0	0.00028	0.001	0.0015	0.0035	0.013	0.11804	0.4752
	k								
0	[mg/l/d]	####	43	48.5	49.167	43.056	38.48	29.897	23.64
1	[d ⁻¹]	####	0.04869	0.0668	0.0749	0.0838	0.11	0.14468	0.1467
2	[l/mg/d]	####	5.5E-05	1E-04	0.0001	0.0002	5E-04	0.00358	0.0113

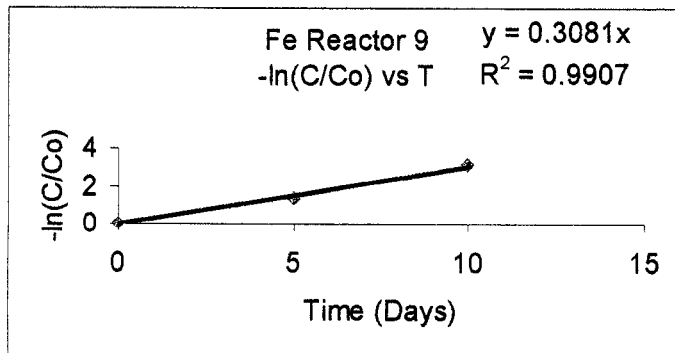
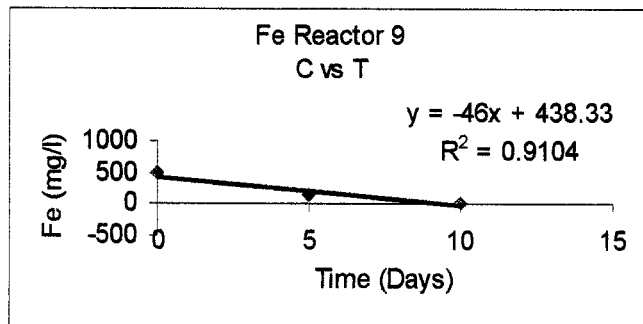


Reactor 8		0		2		8		14		modified time	
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24			33	42
order	Conc, C.(mg/l)	485	11.5	50	43	40.5	23			37.5	29
0	Co-C	0	473.5	0	7	9.5	27				
1	$-\ln(C/Co)$	0	3.7418	0	0.1508	0.2107	0.777				
2	$1/C-1/Co$	0	0.08489	0	0.0033	0.0047	0.023				
	k										
0	[mg/l/d]	####	94.7	#DIV/0!	3.5	1.1875	1.929				
1	[d ⁻¹]	####	0.74836	#DIV/0!	0.0754	0.0263	0.055				
2	[l/mg/d]	####	0.01698	#DIV/0!	0.0016	0.0006	0.002				



Reactor
9

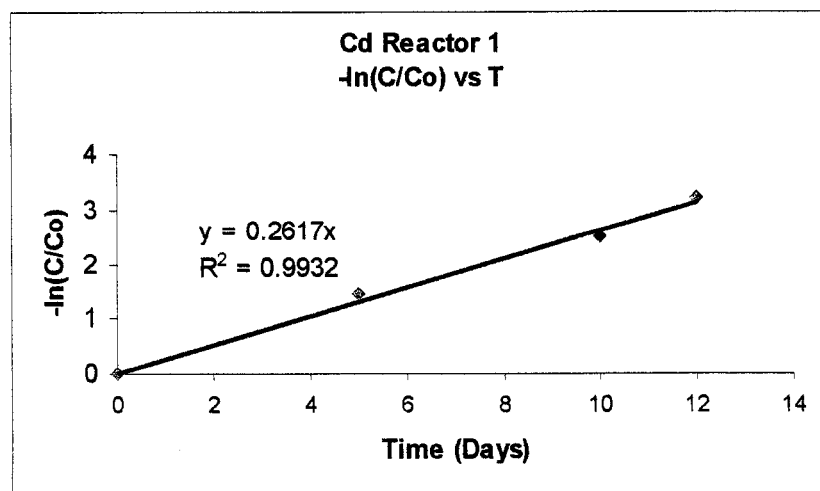
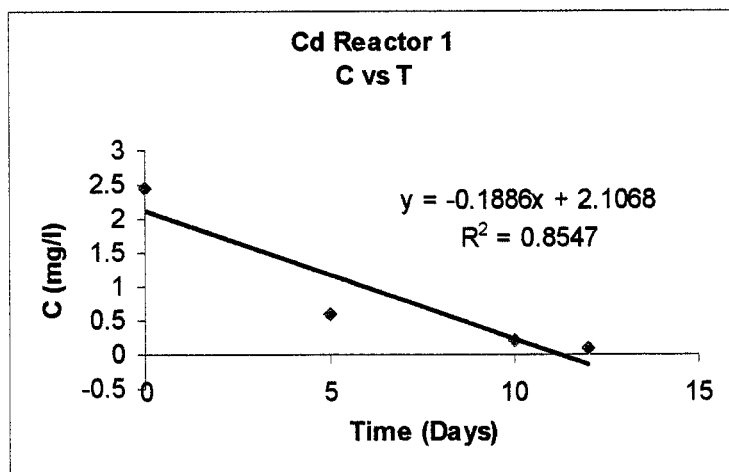
	Time, T (days)	0	5	10
order	Conc, C.(mg/l)	480	125	20
0	Co-C	0	355	460
1	$-\ln(C/Co)$	0	1.34547	3.1781
2	$1/C-1/Co$	0	0.00592	0.0479
	k			
0	[mg/l/d]	####	71	46
1	[d ⁻¹]	####	0.26909	0.3178
2	[l/mg/d]	####	0.00118	0.0048



CADMIUM

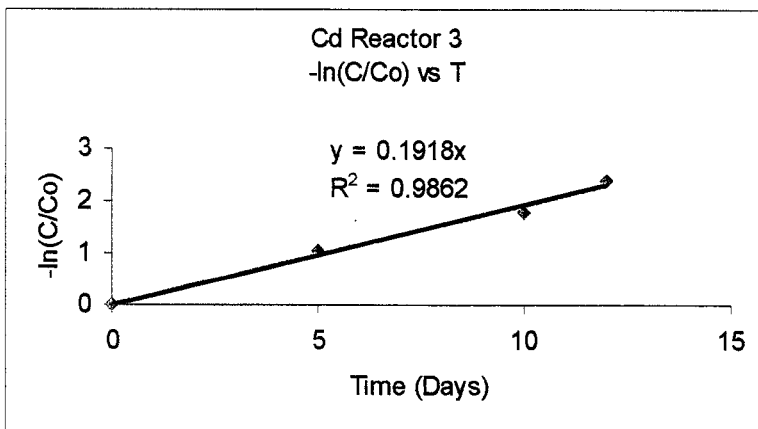
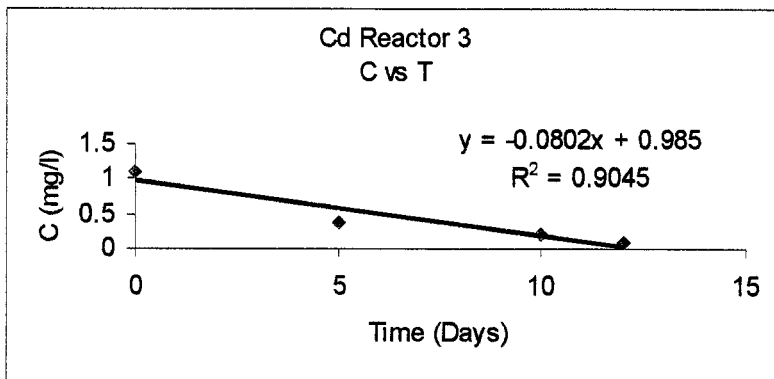
Reactor 1

		Time	T (days)	0	5	10	12
		Conc.	C (mg/l)	2.45	0.58	0.205	0.1
law	0 order	Co-C	0	1.87	2.245	2.35	
	1st order	-ln(C/Co)	0	1.44082	2.48083	3.19867	
	2nd order	1/C-1/Co	0	1.31597	4.46989	9.59184	
units	[mg/l/d]	k 0 order	#DIV/0!	0.374	0.2245	0.19583	
	[d ⁻¹]	k 1st order	#DIV/0!	0.28816	0.24808	0.26656	
	[l/mg/d]	k 2nd order	#DIV/0!	0.26319	0.44699	0.79932	

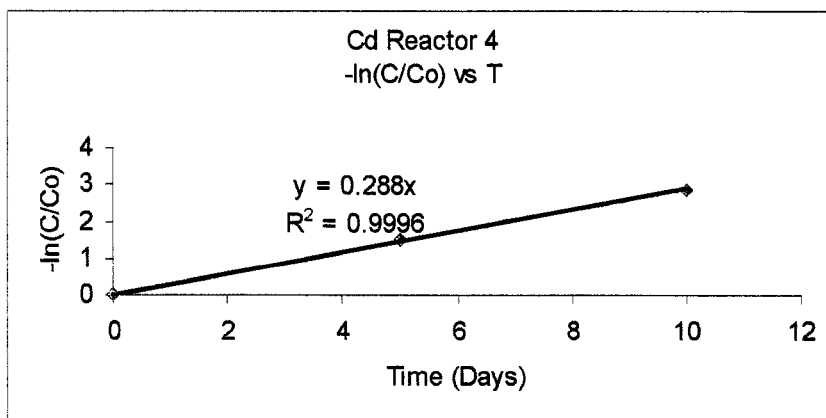
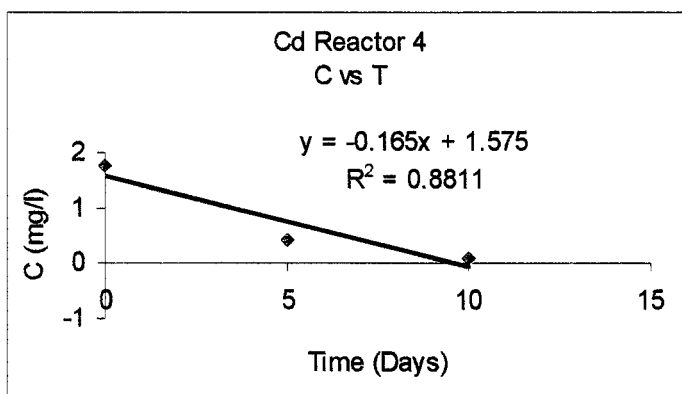


Reactor 2						
Time	T (days)	0	5	10	12	
Conc.	C (mg/l)			0.1	0.1	
law	0 order	Co-C	NA			
	1st order	-ln(C/Co)	NA			
	2nd order	1/C-1/Co	NA			
units	[mg/l/d]	k 0 order	NA			
	[d ⁻¹]	k 1st order	NA			
	[l/mg/d]	k 2nd order	NA			

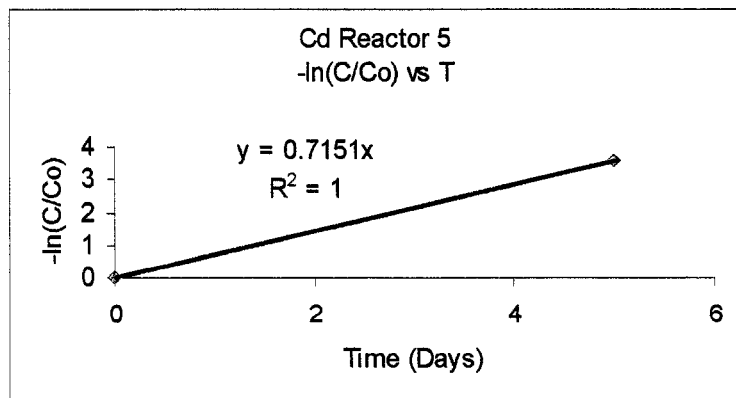
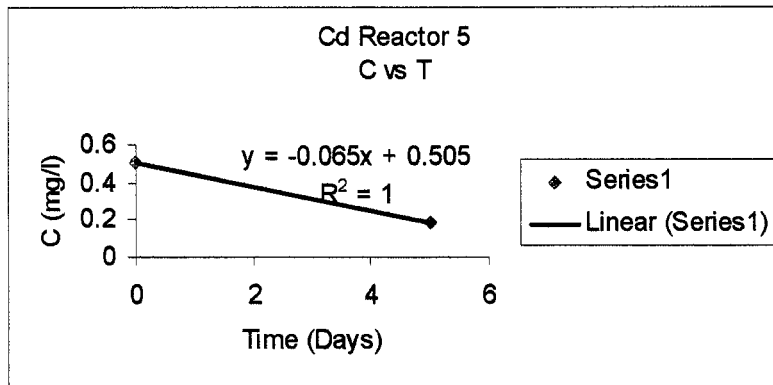
Reactor 3						
Time	T (days)	0	5	10	12	18
Conc.	C (mg/l)	1.1	0.385	0.19	0.1	0.1
law	0 order	Co-C	0	0.715	0.91	1
	1st order	$-\ln(C/Co)$	0	1.04982	1.75604	2.3979
	2nd order	$1/C - 1/Co$	0	1.68831	4.35407	9.09091
units	[mg/l/d]	k 0 order	#DIV/0!	0.143	0.091	0.08333
	[d ⁻¹]	k 1st order	#DIV/0!	0.20996	0.1756	0.19982
	[l/mg/d]	k 2nd order	#DIV/0!	0.33766	0.43541	0.75758



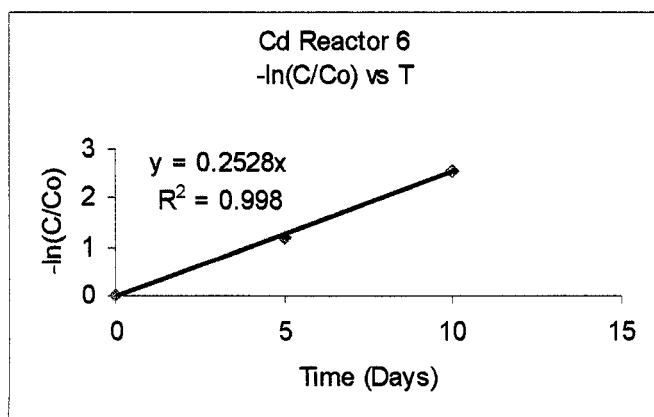
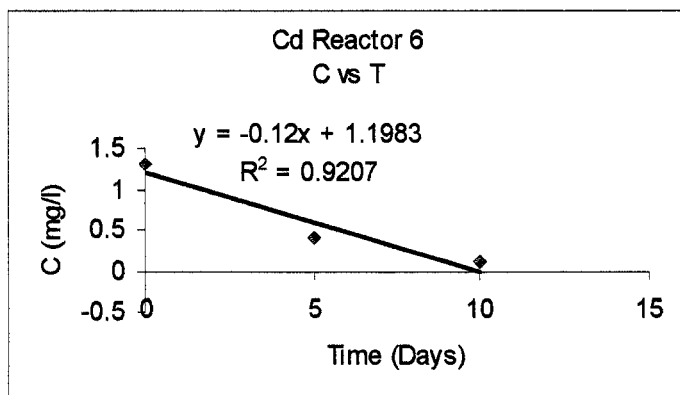
Reactor 4					
Time	T (days)	0	5	10	12
Conc.	C (mg/l)	1.75	0.4	0.1	0.1
law	0 order	Co-C	0	1.35	1.65
	1st order	$-\ln(C/Co)$	0	1.47591	2.8622
	2nd order	$1/C - 1/Co$	0	1.92857	9.42857
units	[mg/l/d]	k 0 order	#DIV/0!	0.27	0.165
	[d ⁻¹]	k 1st order	#DIV/0!	0.29518	0.28622
	[l/mg/d]	k 2nd order	#DIV/0!	0.38571	0.94286



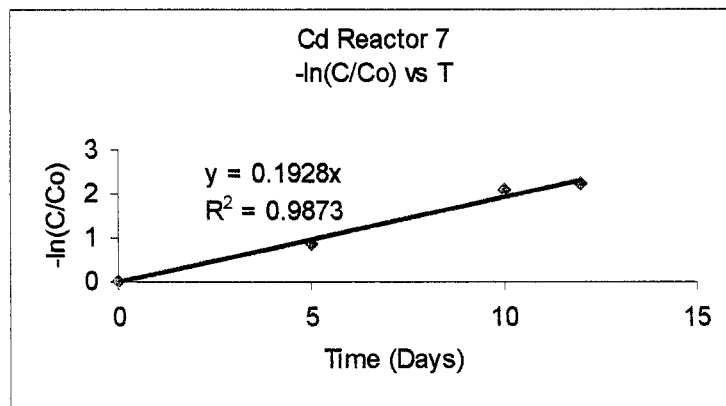
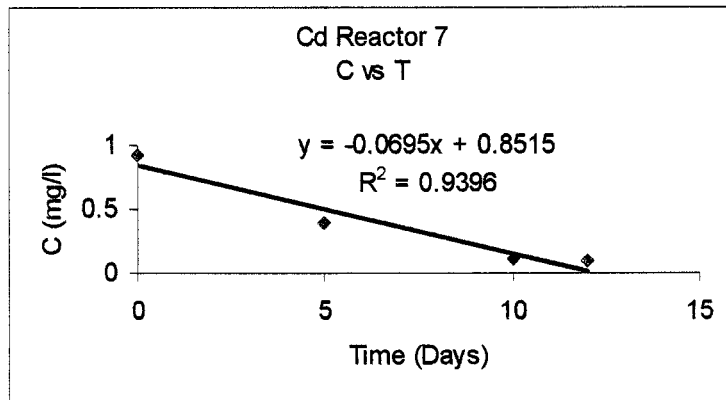
Reactor 5					
Time	T (days)	0	5	10	12
Conc.	C (mg/l)	0.505	0.18	0.28	0.345
law	0 order	Co-C	0	0.325	
	1st order	$-\ln(C/Co)$	0	1.0316	
	2nd order	$1/C - 1/Co$	0	3.57536	
units	[mg/l/d]	k 0 order	#DIV/0!	0.065NA	
	[d ⁻¹]	k 1st order	#DIV/0!	0.20632	
	[l/mg/d]	k 2nd order	#DIV/0!	0.71507	



Reactor 6					
Time	T (days)	0	5	10	12
Conc.	C (mg/l)	1.3	0.395	0.1	0.1
law	0 order	Co-C	0	0.905	1.2
	1st order	$-\ln(C/Co)$	0	1.19123	2.56495
	2nd order	$1/C-1/Co$	0	1.76241	9.23077
units	[mg/l/d]	k 0 order	#DIV/0!	0.181	0.12
	[d ⁻¹]	k 1st order	#DIV/0!	0.23825	0.25649
	[l/mg/d]	k 2nd order	#DIV/0!	0.35248	0.92308



Reactor 7						
Time		T (days)	0	5	10	12
Conc.		C (mg/l)	0.925	0.39	0.115	0.1
law	0 order	Co-C	0	0.535	0.81	0.825
	1st order	-ln(C/Co)	0	0.86365	2.08486	2.22462
	2nd order	1/C-1/Co	0	1.48302	7.61457	8.91892
units	[mg/l/d]	k 0 order	#DIV/0!	0.107	0.081	0.06875
	[d ⁻¹]	k 1st order	#DIV/0!	0.17273	0.20849	0.18539
	[l/mg/d]	k 2nd order	#DIV/0!	0.2966	0.76146	0.74324

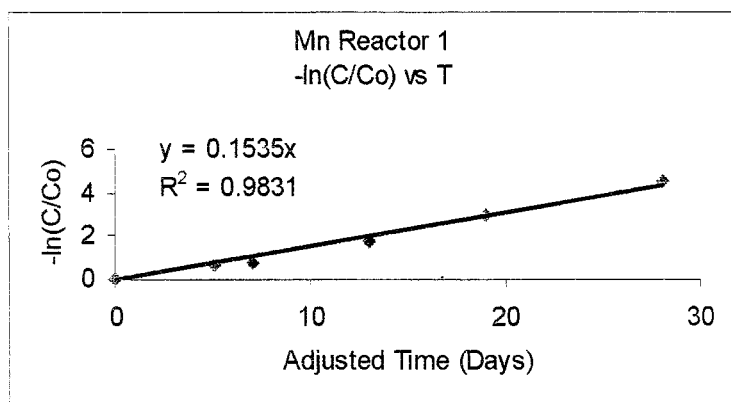
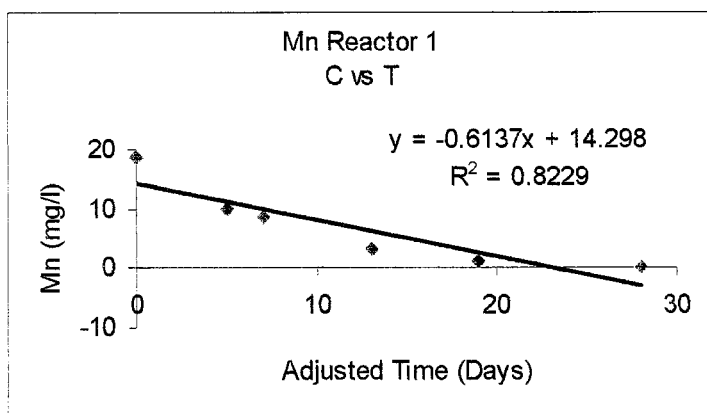


	Reactor 8					
	Time	T (days)	0	5	10	12
	Conc.	C (mg/l)	0.305	0.058	0.1	0.1
law	0 order	Co-C	0			
	1st order	-ln(C/Co)	0			
	2nd order	1/C-1/Co	0		NA	
units	[mg/l/d]	k 0 order	#DIV/0!			
	[d ⁻¹]	k 1st order	#DIV/0!			
	[l/mg/d]	k 2nd order	#DIV/0!			

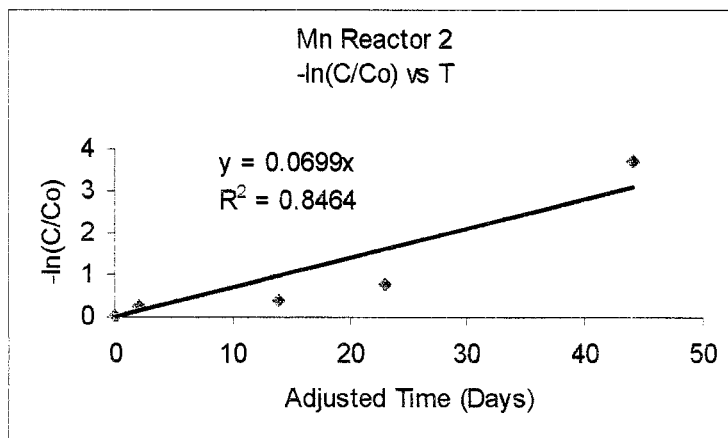
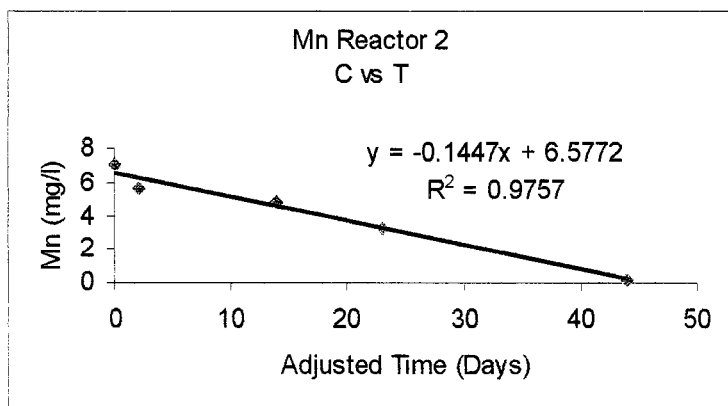
	Reactor 9				
	Time	T (days)	0	5	10
	Conc.	C (mg/l)	0.45	0.0575	0.1
law	0 order	Co-C	0		
	1st order	-ln(C/Co)	0		
	2nd order	1/C-1/Co	0		NA
units	[mg/l/d]	k 0 order	#DIV/0!		
	[d ⁻¹]	k 1st order	#DIV/0!		
	[l/mg/d]	k 2nd order	#DIV/0!		

MANGANESE

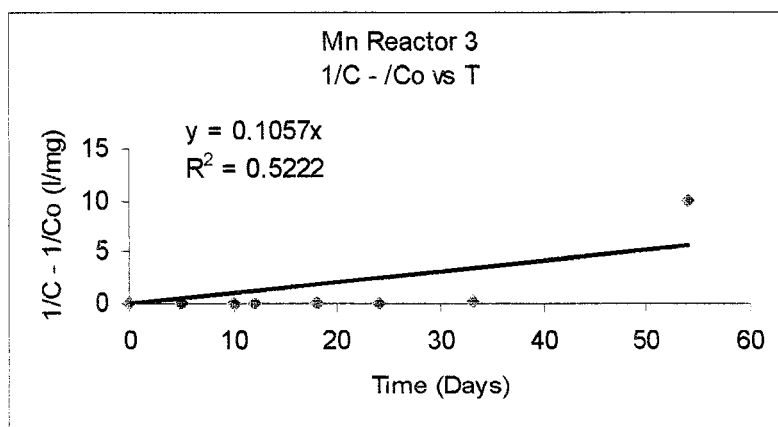
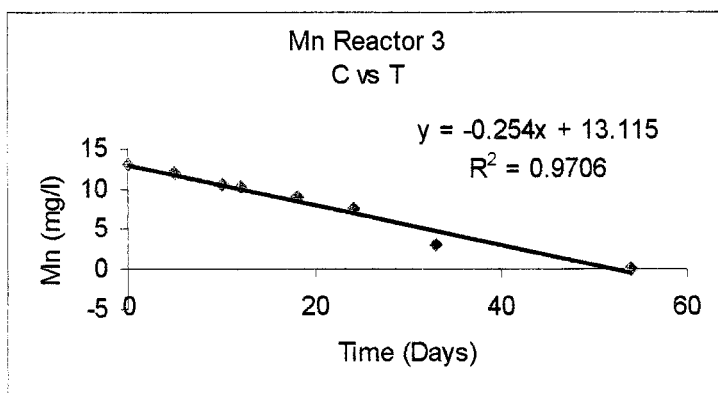
Reactor 1		Adj. time	0	5	7	13	19	28
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33
or-der	Conc, C.(mg/l)	18.5	18.5	10.05	8.55	3.3	1	0.2
0	Co-C	0	0	8.45	9.95	15.2	17.5	18.3
1	-ln(C/Co)	0	0	0.610198	0.771839	1.72385	2.917771	4.527209
2	1/C-1/Co	0	0	0.045448	0.062905	0.24898	0.945946	4.945946
	k							
0	[mg/l/d]	#DIV/0!	#DIV/0!	1.69	1.421429	1.16923	0.921053	0.653571
1	[d ⁻¹]	#DIV/0!	#DIV/0!	0.12204	0.110263	0.1326	0.153567	0.161686
2	[l/mg/d]	#DIV/0!	#DIV/0!	0.00909	0.008986	0.01915	0.049787	0.176641

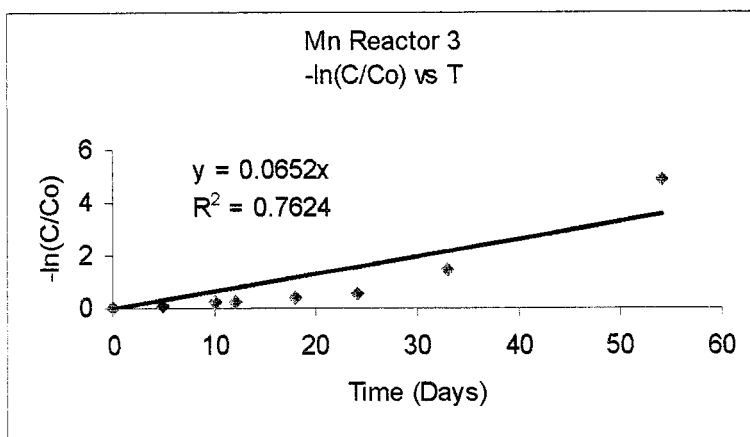


Reactor 2		Adjusted time		0	2	14	23	44
	Time, T (days)	0	5	10	12	24	33	54
or-der	Conc, C.(mg/l)			7.05	5.65	4.75	3.25	0.175
0	Co-C	NA		0	1.4	2.3	3.8	6.875
1	-ln(C/Co)	NA		0	0.221372	0.39488	0.774373	3.695997
2	1/C-1/Co	NA		0	0.035147	0.06868	0.165848	5.572442
	k							
0	[mg/l/d]	NA		#DIV/0!	0.7	0.16429	0.165217	0.15625
1	[d ⁻¹]	NA		#DIV/0!	0.110686	0.02821	0.033668	0.084
2	[l/mg/d]	NA		#DIV/0!	0.017574	0.00491	0.007211	0.126646

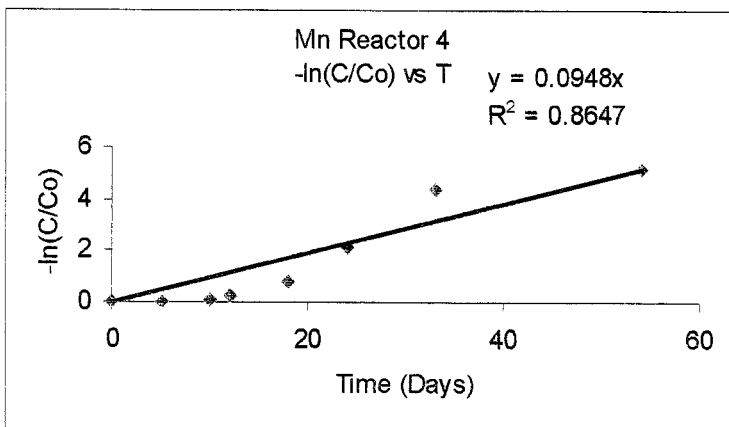
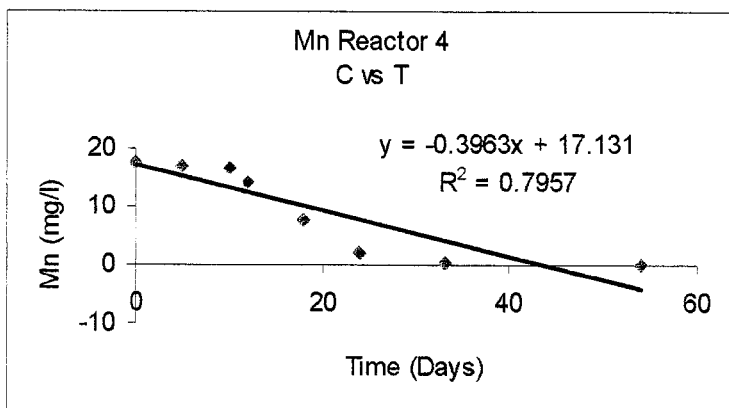


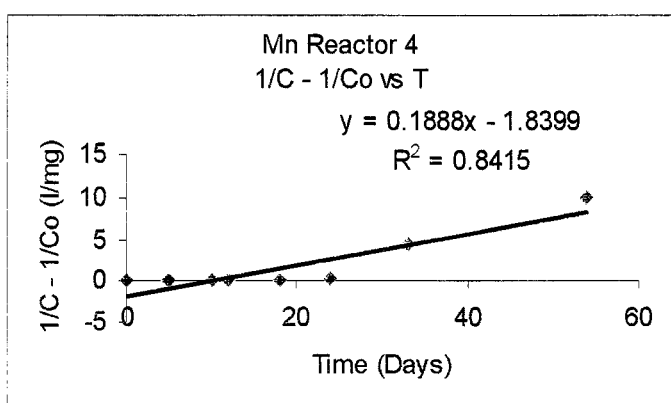
Reactor 3									
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	54
Conc, C (mg/l)		13	12	10.5	10.3	9.05	7.4	2.95	0.1
Co-C		0	1	2.5	2.7	3.95	5.6	10.05	12.9
-ln(C/Co)		0	0.08004	0.213574	0.232805	0.36218	0.563469	1.483144	4.8675345
1/C-1/Co		0	0.00641	0.018315	0.020164	0.03357	0.058212	0.26206	9.9230769
k									
[mg/l/d]		#DIV/0!	0.2	0.25	0.225	0.21944	0.233333	0.304545	0.2388889
[d ⁻¹]		#DIV/0!	0.01601	0.021357	0.0194	0.02012	0.023478	0.044944	0.0901395
[l/mg/d]		#DIV/0!	0.00128	0.001832	0.00168	0.00187	0.002426	0.007941	0.1837607



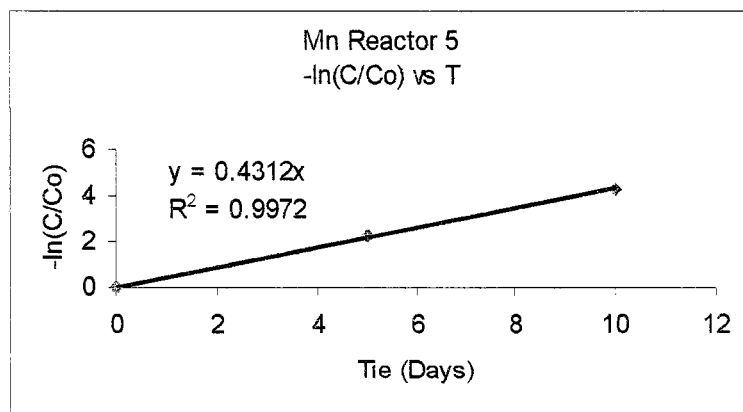
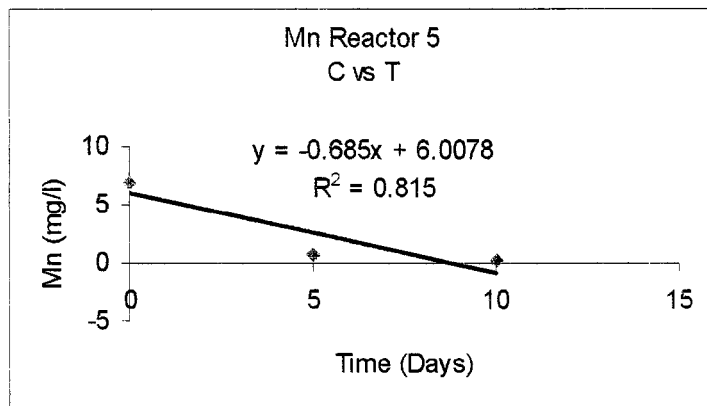


Reactor 4									
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	54
	Conc, C.(mg/l)	17.5	17	16.5	14	7.75	2.15	0.23	0.1
0	Co-C	0	0.5	1	3.5	9.75	15.35	17.27	17.4
1	$-\ln(C/Co)$	0	0.02899	0.058841	0.223144	0.81451	2.096733	4.331877	5.164786
2	$1/C-1/Co$	0	0.00168	0.003463	0.014286	0.07189	0.407973	4.290683	9.9428571
	k								
0	[mg/l/d]	#DIV/0!	0.1	0.1	0.291667	0.54167	0.639583	0.523333	0.3222222
1	[d ⁻¹]	#DIV/0!	0.0058	0.005884	0.018595	0.04525	0.087364	0.131269	0.0956442
2	[l/mg/d]	#DIV/0!	0.00034	0.000346	0.00119	0.00399	0.016999	0.130021	0.184127

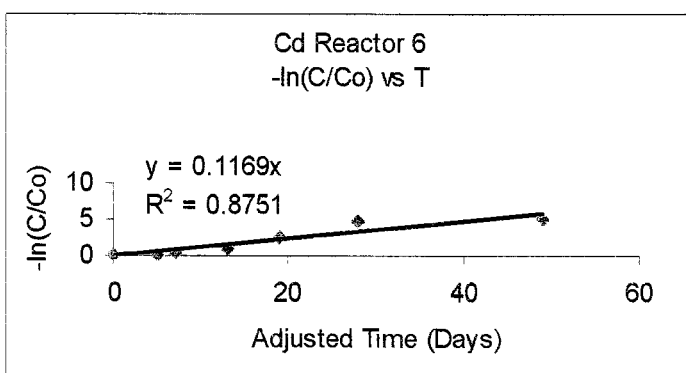
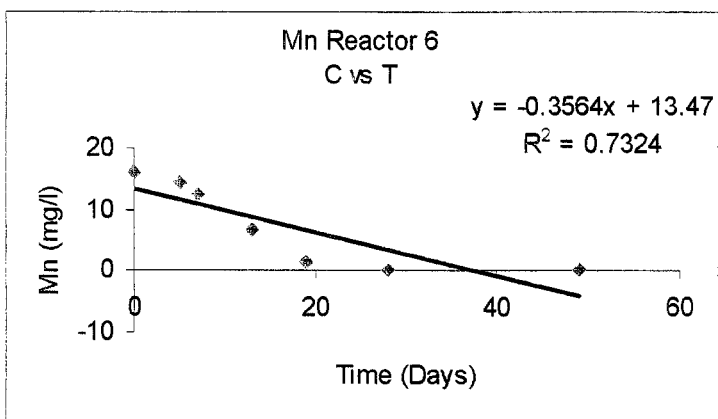




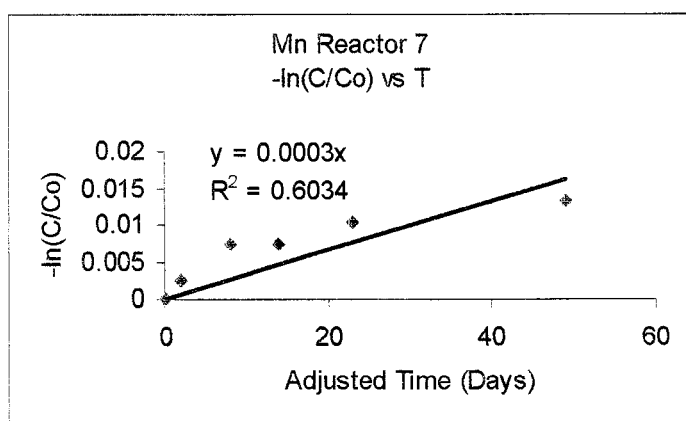
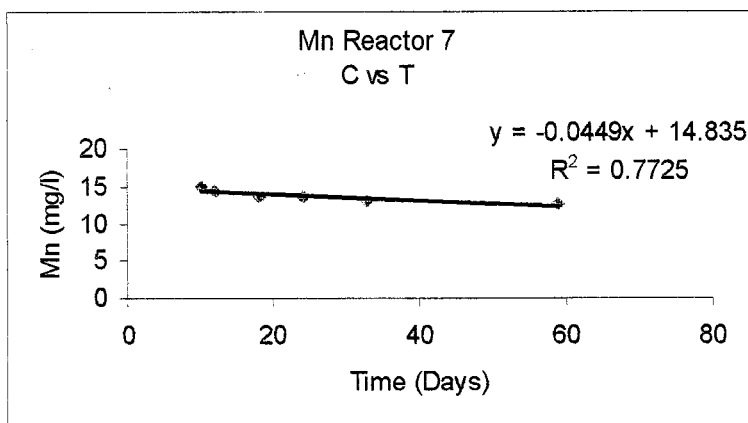
Reactor 5				
	Time, T (days)	0	5	10
or-der	Conc, C.(mg/l)	6.95	0.6985	0.1
0	Co-C	0	6.2515	6.85
1	-ln(C/Co)	0	2.29756	4.241327
2	1/C-1/Co	0	1.28775	9.856115
	k			
0	[mg/l/d]	#DIV/0!	1.2503	0.685
1	[d ⁻¹]	#DIV/0!	0.45951	0.424133
2	[l/mg/d]	#DIV/0!	0.25755	0.985612



Reactor 6		Adj. Time	0	5	7	13	19	28	49
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	54
	Conc, C (mg/l)	16	16	14.5	12.5	6.65	1.28	0.14	0.1
0	Co-C	0	0	1.5	3.5	9.35	14.72	15.86	15.9
1	-ln(C/Co)	0	0	0.09844	0.24686	0.87797	2.525729	4.738702	5.0751738
2	1/C-1/Co	0	0	0.006466	0.0175	0.08788	0.71875	7.080357	9.9375
	k								
0	[mg/l/d]	#DIV/0!	#DIV/0!	0.3	0.5	0.71923	0.774737	0.566429	0.3244898
1	[d ⁻¹]	#DIV/0!	#DIV/0!	0.019688	0.035266	0.06754	0.132933	0.169239	0.103575
2	[l/mg/d]	#DIV/0!	#DIV/0!	0.001293	0.0025	0.00676	0.037829	0.25287	0.2028061

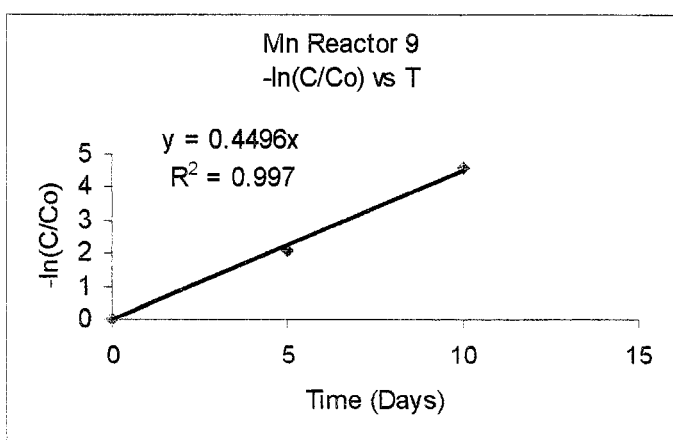
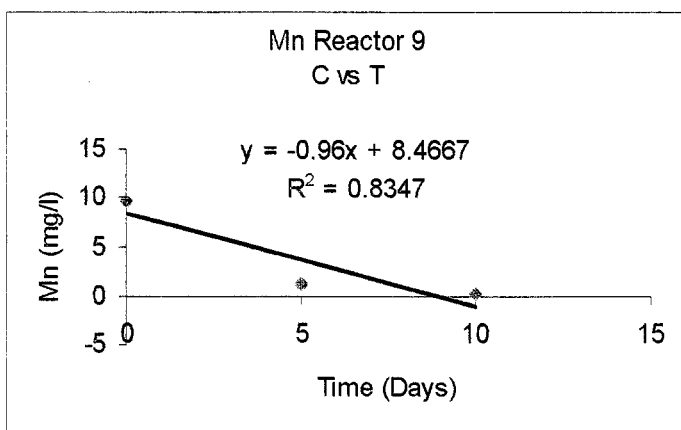


Reactor 7			Adj. Time	0	2	8	14	23	49
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	59
	Conc, C (mg/l)	13.5	14.5	15	14.5	13.5	13.5	13	12.5
or-der									
0	Co-C	0	-1	0	0.5	1.5	1.5	2	2.5
1	-ln(C/Co)	0	-0.07146	0	0.033902	0.10536	0.105361	0.143101	0.1823216
2	1/C-1/Co	0	-0.00511	0	0.002299	0.00741	0.007407	0.010256	0.0133333
	k								
0	[mg/l/d]	#DIV/0!	-0.2	#DIV/0!	0.25	0.1875	0.107143	0.086957	0.0510204
1	[d ⁻¹]	#DIV/0!	-0.01429	#DIV/0!	0.016951	0.01317	0.007526	0.006222	0.0037208
2	[l/mg/d]	#DIV/0!	-0.00102	#DIV/0!	0.001149	0.00093	0.000529	0.000446	0.0002721



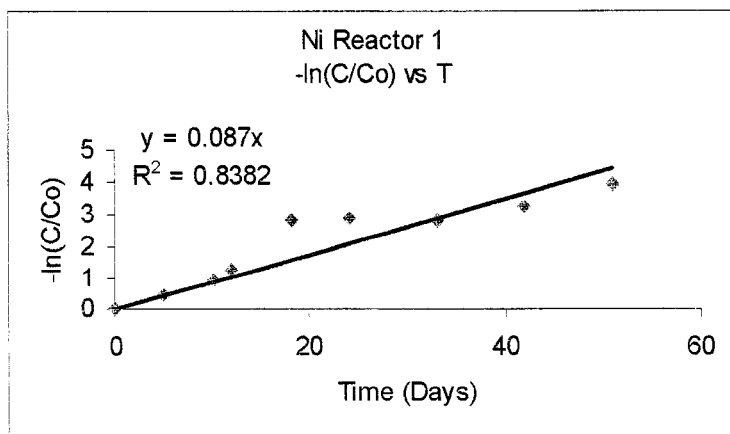
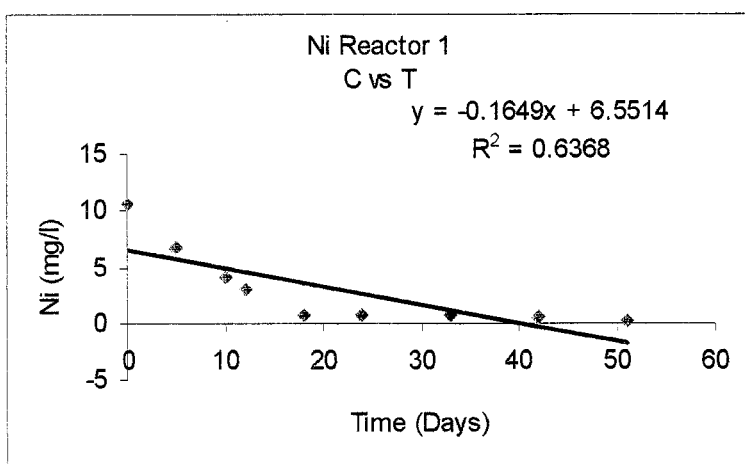
Reactor 8				
	Time, T (days)	0	5	10
	Conc, C. (mg/l)	8.1	0.05	0.1
or-der				
0	Co-C	0		
1	$-\ln(C/Co)$	0		
2	$1/C-1/Co$	0		NA
	k			
0	[mg/l/d]	#DIV/0!		
1	[d ⁻¹]	#DIV/0!		
2	[l/mg/d]	#DIV/0!		

Reactor 9				
	Time, T (days)	0	5	10
Conc, C (mg/l)				
0	Co-C	0	8.5	9.6
1	$-\ln(C/Co)$	0	2.0898	4.574711
2	$1/C-1/Co$	0	0.73024	9.896907
	k			
0	[mg/l/d]	#DIV/0!	1.7	0.96
1	[d ⁻¹]	#DIV/0!	0.41796	0.457471
2	[l/mg/d]	#DIV/0!	0.14605	0.989691

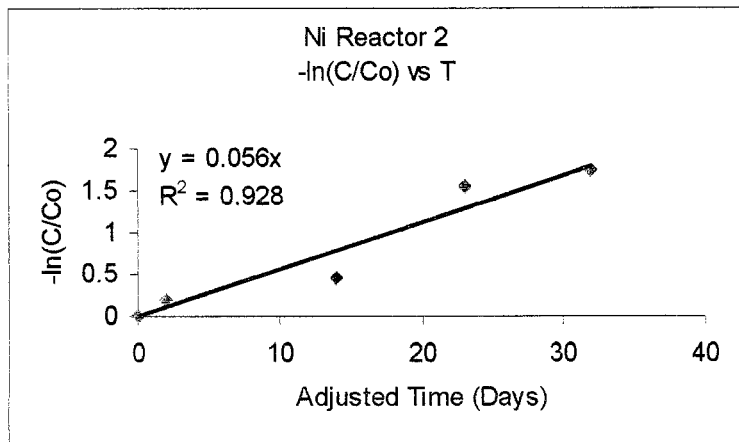
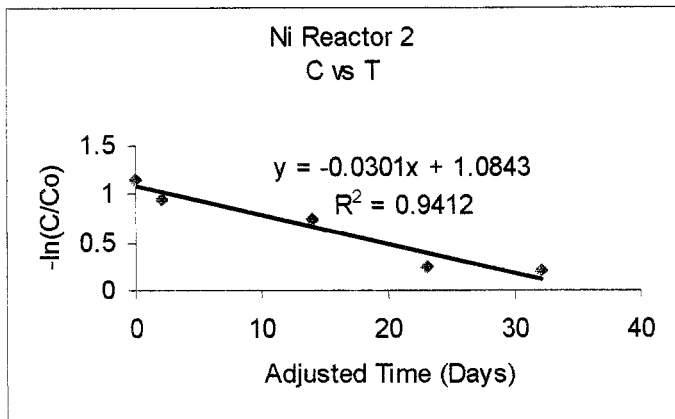


NICKEL

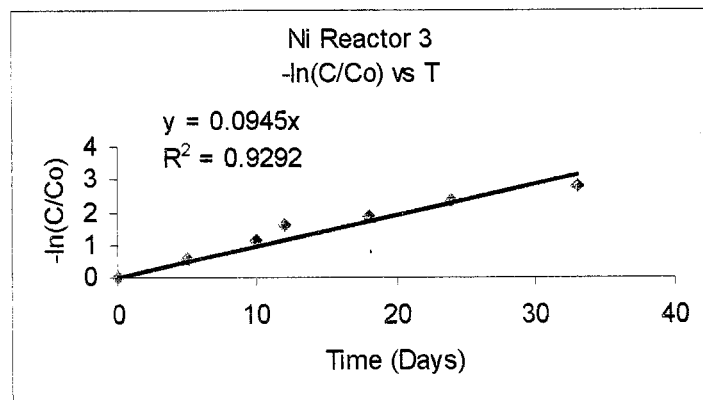
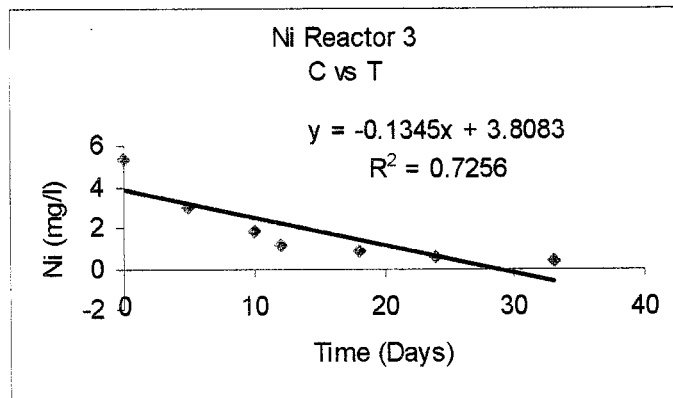
Reactor 1										
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	42	51
Conc, C, (mg/l)		10.5	6.7	4.05	3.05	0.65	0.6	0.65	0.4	0.2
or-der										
0	Co-C	0	3.8	6.45	7.45	9.85	9.9	9.85	10.1	10.3
1	$-\ln(C/Co)$	0	0.4493	0.9527	1.2362	2.7822	2.8622	2.78216	3.2677	3.96081
2	$1/C-1/Co$	0	0.054	0.1517	0.2326	1.4432	1.57143	1.44322	2.4048	4.90476
k										
0	[mg/l/d]	#DIV/0!	0.76	0.645	0.6208	0.5472	0.4125	0.29848	0.2405	0.20196
1	[d ⁻¹]	#DIV/0!	0.0899	0.0953	0.103	0.1546	0.11926	0.08431	0.0778	0.07766
2	[l/mg/d]	#DIV/0!	0.0108	0.0152	0.0194	0.0802	0.06548	0.04373	0.0573	0.09617

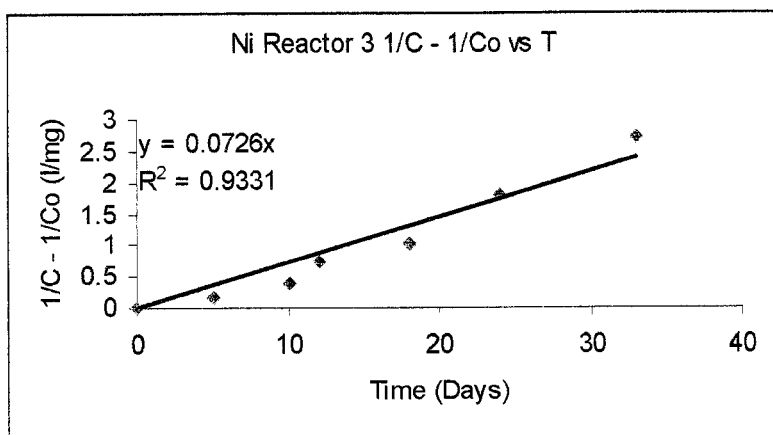


Reactor 2		Adjusted time	0	2	14	23	32	
	Time, T (days)	0	5	10	12	24	33	42
or- der	Conc, C.(mg/l)			1.15	0.955	0.735	0.245	0.2
0	Co-C	NA		0	0.195	0.415	0.905	0.95
1	-ln(C/Co)	NA		0	0.186	0.448	1.5463	1.7492
2	1/C-1/Co	NA		0	0.178	0.491	3.2121	4.1304
	k							
0	[mg/l/d]	NA		#DIV/0!	0.098	0.03	0.0393	0.0297
1	[d ⁻¹]	NA		#DIV/0!	0.093	0.032	0.0672	0.0547
2	[l/mg/d]	NA		#DIV/0!	0.089	0.035	0.1397	0.1291

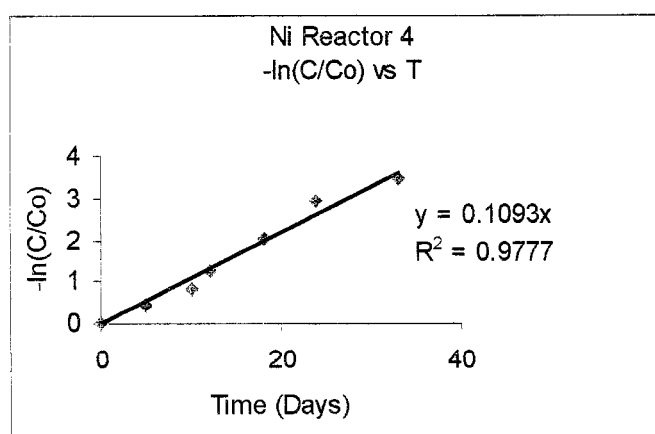
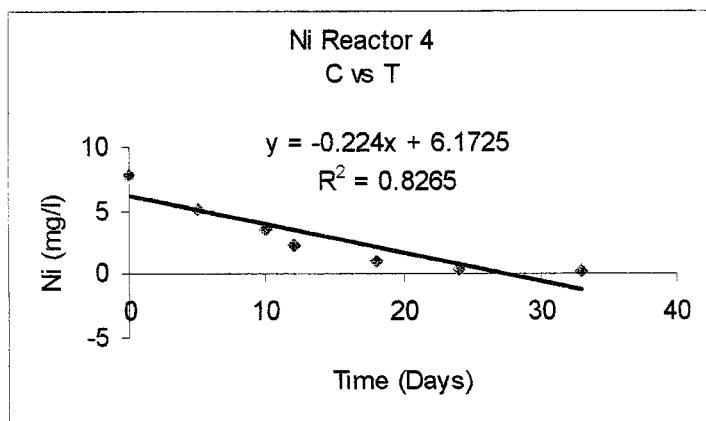


Reactor 3								
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33
Conc, C (mg/l)		5.35	3	1.8	1.11	0.83	0.505	0.345
Co-C		0	2.35	3.55	4.24	4.52	4.845	5.005
$-\ln(C/Co)$		0	0.578	1.089	1.573	1.863	2.3603	2.7413
$1/C - 1/Co$		0	0.146	0.369	0.714	1.018	1.7933	2.7116
k								
0 [mg/l/d]		####	0.47	0.355	0.353	0.251	0.2019	0.1517
1 [d ⁻¹]		####	0.116	0.109	0.131	0.104	0.0983	0.0831
2 [l/mg/d]		####	0.029	0.037	0.059	0.057	0.0747	0.0822

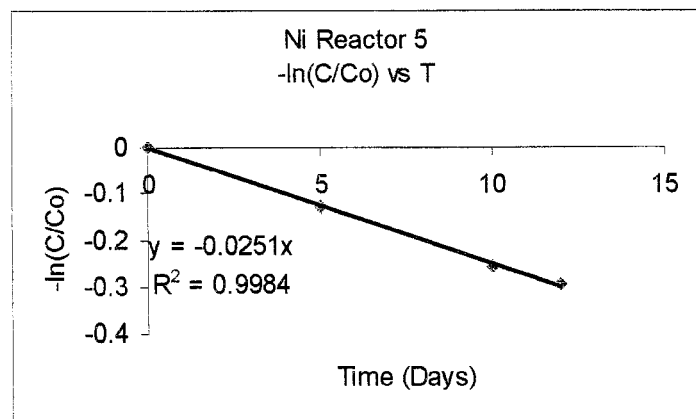
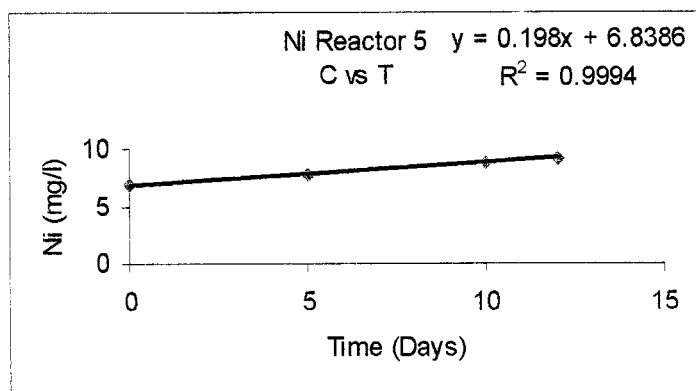




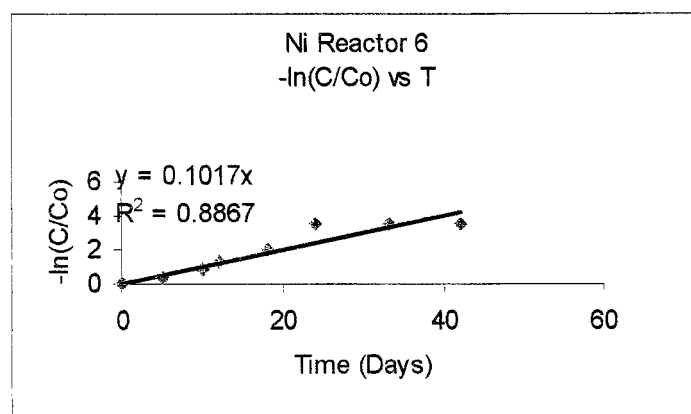
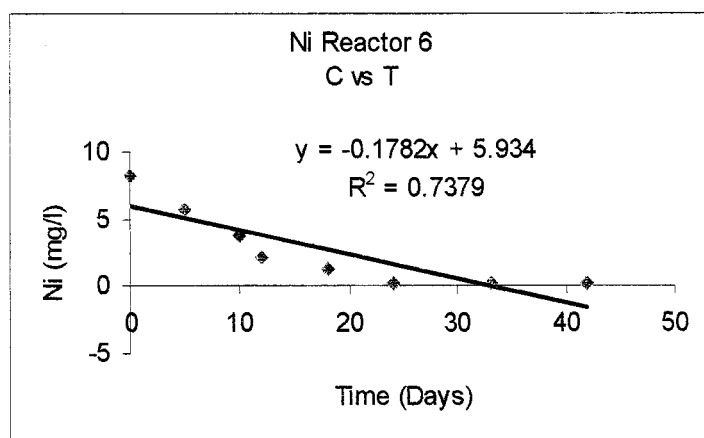
Reactor 4									
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	54
	Conc, C. (mg/l)	7.85	5.1	3.5	2.2	1.055	0.41	0.245	0.24
0	Co-C	0	2.75	4.35	5.65	6.795	7.44	7.605	7.61
1	$-\ln(C/Co)$	0	0.431	0.808	1.272	2.007	2.9521	3.467	3.488
2	$1/C-1/Co$	0	0.069	0.158	0.327	0.82	2.3116	3.9542	4.039
	k								
0	[mg/l/d]	####	0.55	0.435	0.471	0.378	0.31	0.2305	0.141
1	[d ⁻¹]	####	0.086	0.081	0.106	0.111	0.123	0.1051	0.065
2	[l/mg/d]	####	0.014	0.016	0.027	0.046	0.0963	0.1198	0.075



Reactor 5					
	Time, T (days)	0	5	10	12
or-der	Conc, C. (mg/l)	6.85	7.8	8.85	9.2
0	Co-C	0	-0.95	-2	-2.35
1	$-\ln(C/Co)$	0	-0.13	-0.256	-0.295
2	$1/C-1/Co$	0	-0.018	-0.033	-0.037
	k				
0	[mg/l/d]	####	-0.19	-0.2	-0.196
1	[d ⁻¹]	####	-0.026	-0.026	-0.025
2	[l/mg/d]	####	-0.004	-0.003	-0.003

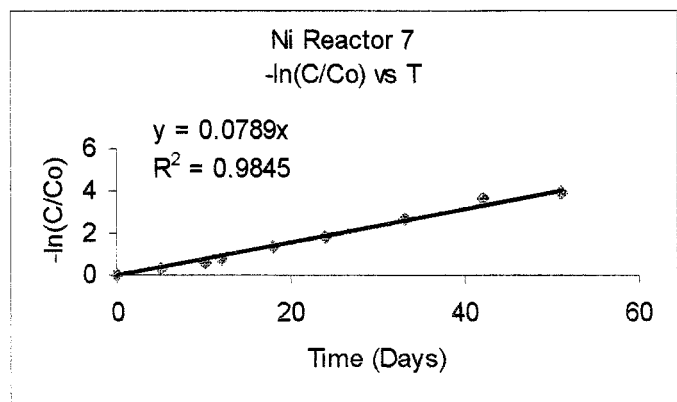
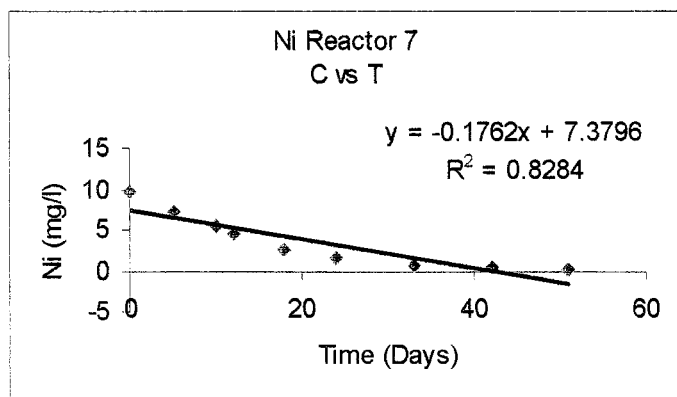


Reactor 6									
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	42
	Conc, C (mg/l)	8.25	5.7	3.75	2.2	1.17	0.25	0.255	0.235
0	Co-C	0	2.55	4.5	6.05	7.08	8	7.995	8.015
1	$-\ln(C/Co)$	0	0.37	0.788	1.322	1.953	3.4965	3.4767	3.558
2	$1/C - 1/Co$	0	0.054	0.145	0.333	0.733	3.8788	3.8004	4.134
	k								
0	[mg/l/d]	####	0.51	0.45	0.504	0.393	0.3333	0.2423	0.191
1	[d ⁻¹]	####	0.074	0.079	0.11	0.109	0.1457	0.1054	0.085
2	[l/mg/d]	####	0.011	0.015	0.028	0.041	0.1616	0.1152	0.098



Reactor 7

	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	42	51
or- der	Conc, C.(mg/l)	9.65	7.15	5.5	4.45	2.55	1.65	0.655	0.25	0.2
0	Co-C	0	2.5	4.15	5.2	7.1	8	8.995	9.4	9.45
1	-ln(C/Co)	0	0.3	0.562	0.774	1.331	1.7662	2.6901	3.653	3.8764
2	1/C-1/Co	0	0.036	0.078	0.121	0.289	0.5024	1.4231	3.896	4.8964
	k									
0	[mg/l/d]	####	0.5	0.415	0.433	0.394	0.3333	0.2726	0.224	0.1853
1	[d ⁻¹]	####	0.06	0.056	0.065	0.074	0.0736	0.0815	0.087	0.076
2	[l/mg/d]	####	0.007	0.008	0.01	0.016	0.0209	0.0431	0.093	0.096



Reactor 8		Adjusted Time		0	2	8	14	23	32	41
	Time, T (days)	0	5	10	12	18	24	33	42	51
or-der	Conc, C.(mg/l)	4.25	3.8	4.35	3.95	1.715	0.505	0.58	0.375	0.275
0	Co-C	0	0.45	0	0.4	2.635	3.845	3.77	3.975	4.075
1	-ln(C/Co)	0	0.112	0	0.096	0.931	2.1534	2.0149	2.451	2.7612
2	1/C-1/Co	0	0.028	0	0.023	0.353	1.7503	1.4943	2.437	3.4065
	k									
0	[mg/l/d]	####	0.09	#DIV/0!	0.2	0.329	0.2746	0.1639	0.124	0.0994
1	[d ⁻¹]	####	0.022	#DIV/0!	0.048	0.116	0.1538	0.0876	0.077	0.0673
2	[l/mg/d]	####	0.006	#DIV/0!	0.012	0.044	0.125	0.065	0.076	0.0831

