

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
Eau, Terre et Environnement

**UTILISATION D'EFFLUENTS RICHES EN MATIÈRE ORGANIQUE
COMME MILIEUX DE CULTURE LORS DE LA BIOLIXIVIATION
DE SULFURES MÉTALLIQUES**

Par

Stéphane PICHER

Mémoire présenté

pour l'obtention

du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

en Sciences de l'Eau

Jury d'évaluation

Examineur externe

M. Mostafa BENZAAZOUA, UQAT

Examineur interne

M. Patrick DROGUI, INRS-ETE

Directeur de recherche

M. Jean-François BLAIS, INRS-ETE

Codirecteur de recherche

M. Roger GUAY, Université Laval

REMERCIEMENTS

De sincères remerciements se doivent d'être adressés d'abord à mon directeur de recherche M. Jean-François Blais pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ces études de second cycle. La formation en biohydrométallurgie que j'ai reçue de lui a été pour moi un guide précieux. Je tiens aussi à remercier chaleureusement M. Patrick Drogui et Mme Nathalie Meunier, pour leur encadrement quotidien au laboratoire. À de très nombreuses reprises, ils ont su répondre, de façon claire, à mes nombreux questionnements, profitant ainsi de longues années d'expériences.

Je suis très reconnaissant de l'aide qui m'a été offerte par mon codirecteur de recherche M. Roger Guay, professeur de microbiologie à la Faculté de Médecine de l'Université Laval, pour m'avoir aidé à tracer la ligne directrice de mes travaux.

Je tiens à exprimer la profonde gratitude que j'ai envers mes parents et mes frères, pour le support moral la compréhension et l'encouragement qu'ils m'ont offert.

Il m'est aussi précieux de souligner et de remercier l'aide offerte par le personnel technique de l'INRS-ETE soit, Mme Pauline Fournier, Mme Michelle G.-Bordeleau, M. Sébastien Duval, Mme Sylvie St-Pierre et M. René Rodrigue pour leur assistance technique lors de la réalisation des mesures analytiques effectuées au cours de mes travaux.

La réalisation de ces travaux aurait été impossible sans l'apport financier du Conseil Canadien de Recherche en Science et Génie (CRSNG) et du Fond Concerté d'Aide à la Recherche du Québec (FCAR).

La passion et le plaisir que j'ai eu au cours de ces deux ans passés à l'INRS-ETE résultent d'une atmosphère amicale, d'un encadrement idéal et d'un enseignement de qualité. De sincères remerciements à tout les membres et amis(es) que j'ai eu le plaisir de connaître et de côtoyer.

RÉSUMÉ

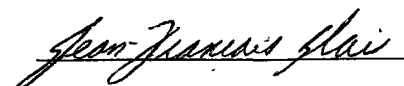
Depuis une cinquantaine d'années, les procédés de biolixiviation sont de plus en plus utilisés pour la récupération des métaux dans l'industrie minière. *Thiobacillus ferrooxidans* est la bactérie principalement impliquée dans ces procédés. Elle possède la capacité de transformer les sulfures de métaux en sulfates solubles. L'opération des procédés de biolixiviation requiert l'addition d'éléments nutritifs pour soutenir la croissance bactérienne. Le présent projet de recherche avait pour objectif d'examiner les possibilités d'utiliser différents types d'effluents riches en matière organique comme sources de nutriments pour la croissance de *T. ferrooxidans* lors de la biolixiviation de sulfures métalliques. Pour ce faire, des essais de biolixiviation ont été réalisés en fioles agitées, en présence de 10 % (p/v) d'un concentré de sulfures issu de la flottation de résidus miniers. Différentes dilutions de trois types d'effluents organiques (filtrat de déshydratation de boues d'épuration municipales, surnageants de centrifugation de boues de papetières et de lisier de porc) ont été employées comme milieux de culture en comparaison à un milieu synthétique. L'activité microbienne a été suivie par les mesures du potentiel d'oxydoréduction (POR), ainsi que de la solubilisation du Fe, du Cu et du Zn.

La dilution des effluents organiques s'est avérée nécessaire afin de diminuer les concentrations de carbone organique dissout (COD) inhibant la croissance de *T. ferrooxidans*. La toxicité du COD est apparue à une concentration supérieure à 180 mg/L dans le cas de surnageant de lisier, alors qu'une concentration supérieure à 500 mg/L inhibait la croissance dans le filtrat de boues d'épuration. En revanche, aucun effet inhibiteur n'a été observé dans le cas de l'utilisation du surnageant de boues de papetières. Une importante baisse du COD a été mesurée lors de tous les essais de biolixiviation. Ce phénomène pourrait être attribuable à la consommation de la matière organique dissoute par la microflore hétérotrophe acidophile présente dans les effluents. La croissance de la moisissure *Cladosporium* sp. a été vérifiée dans chacun des milieux.

Les meilleurs rendements de solubilisation du Fe, du Cu et du Zn ont été obtenus en utilisant le surnageant de boues papetières non-dilué avec des valeurs respectives de 45 %, 43 % et 35 %. Dans ce cas, la solubilisation du Cu et du Zn était supérieure à celle mesurée avec un milieu synthétique employé comme contrôle positif. Cependant, la concentration de Fe en solution au terme de l'essai était légèrement inférieure à la valeur du contrôle. La valeur de solubilisation du Fe la plus élevée en utilisant le filtrat de boues d'épuration a été de 41 %. Le meilleur résultat obtenu avec le surnageant de lisier consiste en une solubilisation de 32 % du Fe mesurée.

En somme, cette étude a permis de démontrer que des effluents riches en matière organique peuvent être utilisés pour soutenir la croissance de *T. ferrooxidans* lors de la biolixiviation de sulfures métalliques. Cette pratique pourrait être mise à profit dans divers types de systèmes de lixiviation bactérienne, dont la biolixiviation en réacteur, en piles et la biolixiviation *in situ*.


Stéphane Picher
Étudiant


Jean-François Blais
Directeur de recherche

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
TABLES DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 – NOTIONS FONDAMENTALES CONCERNANT LA BIOHYDROMÉTALLURGIE	3
1,1 Historique	3
1,2 Mécanismes impliqués dans les processus de biolixiviation	5
1,2,1 Mécanisme direct	5
1,2,2 Mécanisme indirect	6
1,3 Cinétique de croissance microbienne	7
1,4 Microorganismes lixivians	10
1,4,1 <i>Thiobacillus</i>	11
1,4,2 <i>Leptospirillum</i>	13
1,4,3 Bactéries thermophiles	13
1,4,4 Moisissures	14
1,4,5 Autres organismes hétérotrophes acidophiles	14
1,5 Applications des procédés de biolixiviation à l'échelle industrielle	16
1,5,1 Lixiviation en cuve	17
1,5,2 Lixiviation en tas	17
1,5,3 Lixiviation in-situ	18
CHAPITRE 2 – PARAMÈTRES INFLUENÇANT LA BIOLIXIVIATION	19

2,1	Effet du type de substrat	19
2,2	Effet du pH	19
2,3	Effet de la température	21
2,4	Effet de l'oxygène dissous	22
2,5	Métaux lourds	23
2,5,1	Cadmium	23
2,5,2	Cuivre	24
2,5,3	Fer	24
2,5,4	Magnésium	25
2,5,5	Zinc	25
2,6	Effet de la source de carbone	25
2,7	Effet des éléments nutritifs	26
2,7,1	Azote	26
2,7,2	Phosphore	27
2,7,3	Composés organiques	27
CHAPITRE 3 – HYPOTHÈSE DE RECHERCHE, OBJECTIFS SPÉCIFIQUES ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE		31
3,1	Hypothèse de recherche	31
3,2	Objectifs spécifiques	32
3,2,1	Sélection du milieu et acclimatation à la présence de matière organique	32
3,2,2	Cinétiques d'oxydation	32
3,2,3	Caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile	32
3,3	Démarche expérimentale	33
CHAPITRE 4 – DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE		35
4,1	Préparation du concentré de sulfures	35
4,2	Souche bactérienne	39

4,3 Milieux de culture	40
4,4 Mesure du pH et du potentiel d'oxydoréduction (POR)	43
4,5 Analyse des ions ortho-phosphates (ortho-PO_4^{3-})	44
4,6 Analyse des ions ammoniacque (NH_4^+)	45
4,7 Analyse des éléments métalliques en solution	46
4,8 Analyse du carbone organique dissout (COD)	47
4,9 Conditions expérimentales	47
4,9,1 Acclimatation de la souche bactérienne	47
4,9,2 Essais de cinétique	48
4,9,2,1 Analyse des ions ferreux (Fe^{2+}) et ferriques (Fe^{3+})	50
4,9,3 Caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile	50
4,9,3,1 Mesure des populations microbiennes hétérotrophes acidophiles	51
4,9,3,2 Identification des microorganismes	51
CHAPITRE 5 – RÉSULTATS ET DISCUSSION	53
5,1 Acclimatation de la souche bactérienne	53
5,1,1 Acclimatation à un surnageant de centrifugation de boues de papetières	53
5,1,2 Acclimatation à un effluent de déshydratation de boues d'épuration municipales	54
5,1,3 Acclimatation à un surnageant de centrifugation de lisier de porc	56
5,2 Détermination de la concentration maximale inhibitrice en COD	57
5,3 Oxydation du fer ferreux après une période d'acclimatation d'un an	63
5,4 Lixiviation des métaux au cours de la période d'acclimatation	71
5,5 Lixiviation des métaux après une période d'acclimatation d'un an	77
5,5,1 Effets engendrés par la procédure de lavage du concentré de sulfures	77
5,5,2 Lixiviation des métaux	79
5,6 Cinétique de croissance microbienne	82

5,7	Observation et caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile	93
5,7,1	Conditions opératoires	93
5,7,2	Caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile	94
CHAPITRE 6 – CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS		99
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Analyse chimique à l'ICP-AES du concentré de sulfures _____	36
Tableau 2	Analyse chimique à l'absorption atomique à la flamme du concentré de sulfures _____	37
Tableau 3	Analyse chimique à l'ICP-AES du concentré de sulfures lavé et digéré _____	38
Tableau 4	Analyse chimique à l'absorption atomique à la flamme du concentré de sulfures lavé et digéré _____	39
Tableau 5	Composition chimique du milieu 9K (Silverman et Lundgren, 1959) _____	40
Tableau 6	Analyse chimique à l'ICP-AES des trois effluents organiques testés et du milieu synthétique _____	42
Tableau 7	Caractérisation des différents milieux de culture additionnés du concentré de sulfures _____	43
Tableau 8	Composition en N_{tot} et P_{tot} dans chacun des effluents organiques testés en plus du milieu synthétique _____	43
Tableau 9	Caractérisation des différents milieux de culture additionnés du concentré de sulfures lavé _____	49
Tableau 10	Mesures initiales et finales des différents paramètres au cours de la biolixiviation _____	61
Tableau 11	Concentration et pourcentages de solubilisation du cuivre, du fer et du zinc après un mois d'incubation _____	72
Tableau 12	Concentration et pourcentages de solubilisation du cadmium après un mois d'incubation _____	74
Tableau 13	Pourcentages d'enlèvement des métaux dans le concentré de sulfures métalliques après le lavage _____	78
Tableau 14	Valeurs de solubilisation du cuivre, du fer et du zinc dans les différents milieux après un mois d'incubation _____	81
Tableau 15	Taux de croissance, temps de génération et concentration maximale en fer ferrique obtenu par les bactéries ferrooxydantes dans les différents effluents organiques en comparaison à celui obtenu dans le milieu 9K _____	84
Tableau 16	Taux de croissance, temps de génération et concentration maximale en fer ferrique obtenu par les bactéries ferrooxydantes dans les différents effluents organiques en comparaison à celui obtenu dans le milieu 9K _____	89

Tableau 17	Dénombrement de la microflore hétérotrophe acidophile présente dans les milieux de culture liquide préparés avec les effluents organiques et le milieu synthétique	95
Tableau 18	Caractéristiques morphologiques des colonies obtenues sur milieu GTS-2,5 après 120 heures d'incubation à 30°C	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Courbe de croissance microbienne dans une culture en mode cuvée	8
Figure 2	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (a) image au microscope électronique à balayage et (b) coupe en microscopie électronique à transmission (x 30 000) (source : http://www.mines.edu/fs_home/jhoran/ch126/thiobaci.htm)	12
Figure 3	Photographie d'un procédé de biolixiviation en tas du cuivre (Bingham Canyon, Utah, États-Unis) (source : http://www.mines.edu/fs_home/jhoran/ch126/thiobaci.htm)	18
Figure 4	Évolution du POR dans le temps pour quatre dilutions de l'effluent de déshydratation de boues de papetières	54
Figure 5	Évolution du POR dans le temps pour quatre dilutions de l'effluent de déshydratation de boues d'épuration municipales	55
Figure 6	Évolution du POR dans le temps pour cinq différentes dilutions du surnageant de centrifugation de lisier de porc	57
Figure 7	POR maximal atteint en fonction de la concentration de carbone organique dissout pour différentes dilutions des trois milieux de culture testés	58
Figure 8	Évolution du pH dans le temps pour trois conditions testées en plus du contrôle positif	62
Figure 9	Évolution du POR dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de boues de papetières concentré	65
Figure 10	Évolution du POR dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de boues d'épuration	66
Figure 11	Évolution du POR dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de lisier de porc	67
Figure 12	Évolution du pH dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de boues de papetières concentré	68
Figure 13	Évolution du pH dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de boues d'épuration	69
Figure 14	Évolution du pH dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de lisier de porc	70

Figure 15	Mesures initiales et finales du plomb en solution après une période de biolixiviation de 30 jours avec quatre concentrations différentes de surnageant de centrifugation de boues de papetières	75
Figure 16	Mesures initiales et finales du plomb en solution après une période de biolixiviation de 30 jours avec quatre concentrations différentes de filtrat de boues d'épuration	76
Figure 17	Mesures initiales et finales du plomb en solution après une période de biolixiviation de 30 jours avec quatre concentrations différentes de surnageant de centrifugation de lisier de porc	77
Figure 18	Évolution du logarithme de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base de filtrat de boues de papetières	85
Figure 19	Évolution du logarithme de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base de filtrat de boues d'épuration	86
Figure 20	Évolution du logarithme de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base d'effluent de déshydratation de lisier	87
Figure 21	Évolution du logarithme Népérien de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base d'un filtrat de boues de papetières	90
Figure 22	Évolution du logarithme Népérien de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base d'un filtrat de boues d'épuration	91
Figure 23	Évolution du logarithme Népérien de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base d'un effluent de déshydratation de lisier	92
Figure 24	Évolution du POR dans le temps pour les trois milieux constitués d'effluent organique en comparaison à celui obtenu avec le milieu à base de milieu synthétique	94

LISTE DES SYMBOLES

9K :	milieu 9K (Silverman et Lundgren, 1959)
% sol. :	pourcentage de solubilisation des métaux
BE :	filtrat de déshydratation de boues d'épuration municipales
BP :	surageant de centrifugation de boues de papetières
COD :	carbone organique dissout
DMA :	drainage minier acide
DRA :	drainage rocheux acide
ED :	eau distillée
g :	temps de génération
k :	constante de vitesse moyenne (i.e. taux d'oxydation)
L :	surageant de centrifugation de lisier de porc
MS :	milieu synthétique (i.e. milieu 9K sans ajout de sulfate ferreux)
n :	nombre de générations
POR :	potentiel d'oxydoréduction

INTRODUCTION

Tôt dans les années 1950, des développements considérables dans le domaine de la lixiviation microbienne ont fait naître une nouvelle discipline, maintenant connue sous le nom de biohydrométallurgie (Torma, 1987). La biolixiviation se définit comme étant un procédé de métallurgie extractive par voie humide, mettant à profit la propriété qu'ont certains microorganismes d'oxyder les sulfures métalliques. On appelle réactions de biolixiviation, l'ensemble des réactions biologiques et chimiques menant à la solubilisation des métaux (Rossi, 1990). Depuis une cinquantaine d'années, l'utilisation des procédés de biolixiviation a augmenté de façon importante à l'échelle internationale, particulièrement en ce qui a trait au traitement de minéraux à faibles teneurs en métaux valorisables. Plus récemment, ces procédés ont aussi été appliqués pour la décontamination de divers types de rejets et sites contaminés par les métaux lourds, qui ne pourraient être traités de façon rentable par les procédés conventionnels (Bosecker, 1997; Chartier *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 1999). Certains indices portent à croire que, dans la Grèce antique il y a plus de 2000 ans, des techniques biologiques d'extraction du cuivre existaient déjà (Rossi, 1990). Néanmoins, les mécanismes de cette technologie n'étaient pas connus à cette époque. En 1922, grâce aux travaux de Rudolfs et Helbronner, l'existence de microorganismes du sol capables d'oxyder des sulfures de zinc, fut découverte. Le rôle de ces organismes ne fut toutefois pas discerné avant 1947, lorsque Colmer et Hinkle réussirent pour la première fois l'isolement et la caractérisation d'une bactérie ayant la capacité d'accélérer l'oxydation des ions ferreux; à savoir, *Ferrobacillus ferrooxidans*.

La biolixiviation des minéraux sulfureux est catalysée par certains microorganismes qui obtiennent leur énergie à partir de l'oxydation de substances inorganiques comme par exemple la pyrite (FeS_2) ou la chalcopirite (CuFeS_2), etc. La majorité des auteurs s'accordent pour dire que les deux espèces les plus souvent impliquées dans les réactions de biolixiviation sont *Thiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans* (Boon *et al.*, 1996; Bosecker, 1997; Krebs *et al.*, 1997). Ces microorganismes oxydent les minéraux sulfureux et transforment ainsi les sulfures de métaux peu solubles en sulfates de métaux solubles.

Les procédés de biolixiviation, comme par exemple les procédés de lixiviation en cuve ou en tas, requiert normalement l'addition de nutriments afin de supporter la croissance des bactéries lixiviantes (Jensen et Webb, 1995 ; Silverman et Lundgren, 1959). Le milieu 9K a été utilisé, depuis 1959, comme milieu de culture synthétique dans la majorité des procédés de biolixiviation conventionnels (Jensen et Webb, 1995; Silverman et Lundgren, 1959). Puisqu'une partie importante des coûts associés à ces technologies est imputable à l'utilisation d'éléments nutritifs pour soutenir la croissance bactérienne, il a été décidé dans le cadre de cette étude, d'évaluer si certains déchets organiques pourraient être employés comme sources alternatives et économiques de nutriments. Les déchets étudiés sont un surnageant de centrifugation de boues secondaires de papeteries, un effluent de déshydratation des boues d'épuration municipales ainsi qu'un surnageant de centrifugation issu du lisier de porc. Ces effluents organiques contiennent d'importantes concentrations en carbone organique dissout.

Parmi les espèces bactériennes lixiviantes, *T. ferrooxidans* est celle dont la croissance semble la plus affectée par la présence de composés organiques (Tuttle et Dugan, 1976). De plus, d'autres substances comme certains acides organiques, des alcools primaires, des protéines, des sucres, des détergents anioniques, des surfactants cationiques, etc. sont aussi considérés comme étant des substances toxiques à la croissance de *T. ferrooxidans* (Landesman *et al.*, 1966; Alexander *et al.*, 1987; Tuovinen *et al.*, 1971a). En revanche, la présence d'organismes hétérotrophes dans les milieux de culture peut contribuer à réduire l'effet inhibiteur de ces composés. Ces organismes se nourrissent des substances organiques, favorisant ainsi l'apparition des conditions propices à la croissance des espèces lixiviantes (Pronk et Johnson, 1992).

L'étude comprend deux parties principales : la première traite de l'adaptation et la croissance des microorganismes en présence des déchets organiques ci-haut énumérés. La seconde partie évalue la capacité des microorganismes à favoriser la mise en solution des métaux. Le présent ouvrage expose, dans un premier chapitre, quelques notions théoriques concernant les réactions de biolixiviation, les organismes qui y sont impliqués et présente certains procédés industriels déjà en application. Le second chapitre traite de l'influence de certains paramètres sur les réactions de biolixiviation. Les chapitres subséquents présentent la méthodologie utilisée, les résultats obtenus suite à la réalisation des travaux, les discussions qui en découlent et les conclusions tirées.

CHAPITRE 1 – NOTIONS FONDAMENTALES CONCERNANT LA BIOHYDROMÉTALLURGIE

Ce chapitre présente un ensemble de connaissances de base en biohydrométallurgie dont un bref historique de cette science, une description des microorganismes impliqués dans les procédés biohydrométallurgiques, un exposé des mécanismes responsables de la biolixiviation des sulfures métalliques, un rappel de notions de base en cinétique de croissance bactérienne, ainsi que les principales applications industrielles dans ce domaine.

1,1 Historique

La biohydrométallurgie est un procédé d'extraction minérale qui, par voie humide, met à profit la propriété qu'ont certains microorganismes d'oxyder de nombreux composés soufrés à l'état réduit (Ehrlich, 1990, Schippers, 1996). Déjà, en l'an 166 avant notre ère, dans l'île de Chypre, un procédé de biolixiviation *in-situ* a été observé dans une mine de cuivre (Rossi, 1990). Très tôt, quelques publications sur le sujet ont été rédigées. Par exemple, le livre d'origine chinoise *Huainancius*, quelques années avant notre ère et le livre « *The principles and guidelines of copper leaching* », rédigé entre 1094 et 1098, et rapportant les principes utilisés dans l'usine de Chiangshan (Rossi, 1990). À cette époque, les observations relatives au lessivage minéral étaient expliquées de façon chimique, par des réactions impliquant de l'eau et de l'oxygène (Krebs *et al*, 1997).

Les nombreuses découvertes comme la compréhension du concept d'autotrophie vers la fin du 19^{ième} siècle (Rossi, 1990; Torma, 1987) et le développement rapide des techniques d'isolement et de culture microbiennes permirent, au début des années 1900, de mettre en évidence l'existence de bactéries du genre *Thiobacillus* et d'autres espèces, présentant des caractéristiques exceptionnelles et capable d'oxyder les composés sulfurés. De nombreuses recherches ultérieures permirent l'isolement des espèces fortement acidogènes *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans*, considérées comme les plus importantes au niveau des réactions de lixiviation des métaux (Boon, 1999; Bosecker, 1997; Leduc et Ferroni, 1994; Oolman, 1993;

Smith *et al.*, 1988; Torma, 1987) et d'une variété d'autres espèces de thiobacilles (Rossi, 1990). Même si les procédés de biolixiviation étaient observés et utilisés depuis des centaines d'années, ce ne fut qu'en 1947 qu'une relation de cause à effet fut établie entre l'observation du caractère acide des effluents miniers et la présence de bactéries très acidogènes (Bosecker, 1997; Colmer et Hinkle, 1947; Leduc et Ferroni, 1994). Au cours de cette même année, Colmer et Hinkle (1947) isolèrent pour la première fois la bactérie *T. ferrooxidans* à partir de drainages miniers acides. La biohydrométallurgie est donc née, permettant ainsi le développement de nombreuses techniques d'extraction par lixiviation bactérienne (Bosecker, 1997; Colmer et Hinkle, 1947; Rossi, 1990; Torma, 1987).

De nombreuses possibilités sont aujourd'hui envisagées face aux traitements des minéraux à faible teneur en métaux et face aux problèmes engendrés par le drainage minier acide (DMA) ainsi que le drainage rocheux acide (DRA) par l'utilisation de la biolixiviation. En effet, l'utilisation des bactéries permet la récupération de métaux dans des minerais à faible teneur ou des résidus miniers qui ne pourraient pas être traités efficacement par pyrométallurgie (Bosecker, 1997; Krebs *et al.*, 1997; Nemati *et al.*, 1998). De plus, l'utilisation de la pyrométallurgie tend à diminuer à cause de l'augmentation des coûts liés à l'énergie et aux contrôles de la pollution qui sont de plus en plus contraignants (Ballester *et al.*, 1989). En somme, la biolixiviation est une technique sans impact sur l'environnement, nécessitant moins d'énergie et un faible coût d'opération comparativement aux techniques physiques conventionnelles (Ballester *et al.*, 1989; Ballester *et al.*, 1990; Bosecker, 1997; Krebs *et al.*, 1997; Nemati *et al.*, 1998).

1,2 Mécanismes impliqués dans les processus de biolixiviation

La biolixiviation fait appel à deux mécanismes nommés biolixiviation directe (ou lixiviation biologique) et lixiviation indirecte (aussi appelée lixiviation chimique) (Bacelar-Nicolau et Johnson, 1999; Bosecker, 1997; Leduc et Ferroni, 1994; Nemati *et al.*, 1998; Rossi, 1990; VanAswegen et Marais, 1999). La biolixiviation directe est amorcée par le métabolisme bactérien. Le pouvoir oxydant du fer ferrique (Fe^{3+}) et la présence d'acide sulfurique gouvernent la biolixiviation indirecte. Parmi les avantages que ces deux mécanismes apportent à l'industrie minière, on compte une réduction de l'énergie et de la quantité des réactifs requis, des coûts d'opération plus bas et la possibilité du traitement du minerai à faible teneur en métaux (Ballester *et al.*, 1990). Ces deux mécanismes travaillent de concert et ils ne sont pas dissociés dans la nature.

1,2,1 Mécanisme direct

La lixiviation biologique est amorcée lorsque s'établit un contact étroit entre la bactérie et le sulfure métallique à oxyder (Ballester *et al.*, 1990; Bosecker, 1997; Ralph, 1985; Torma, 1987). Ce contact apparaît dans les dislocations, les fentes et les imperfections de surface et est facilité par les exopolysaccharides cellulaires, les flagelles, les pilis et la protéine de surface rusticyanine que possèdent certaines espèces lixiviantes (Gehrke *et al.*, 1998). Le sulfure de métal insoluble sera oxydé en sulfate soluble au cours de deux étapes successives, catalysées par les enzymes sulfite réductase (aussi appelée sulfide oxydase) et sulfite cytochrome C oxydoréductase (aussi appelée APS réductase) (Torma, 1977). L'équation globale suivante décrit ce mécanisme (Blancarte-Zurta *et al.*, 1990; Jensen et Webb, 1994; Oolman, 1993; Ralph, 1985; Smith *et al.*, 1988; Torma, 1977) :



Les bactéries ayant la capacité d'oxyder les sulfures métalliques, tirent leur énergie de cette réaction. Par exemple, chez l'espèce *Thiobacillus ferrooxidans*, les électrons arrachés au substrat sont transportés au travers la chaîne respiratoire située dans l'espace périplasmique (Nemati *et*

al., 1998; Torma, 1977). La communauté scientifique s'entend pour l'existence de quatre accepteurs intermédiaires. Une flavoprotéine et trois cytochromes différents semblent généralement observés. L'accepteur final des électrons est l'oxygène (Torma, 1977). Les électrons enlevés au sulfure de métal circulent de la membrane externe vers l'espace périplasmique via la protéine rusticyanine, remarquablement stable à un pH très acide (Leduc et Ferroni, 1994; Nemati *et al.*, 1998). L'énergie libérée par le transport des électrons au travers la chaîne respiratoire génère de l'ATP à partir de l'ADP et de phosphate inorganique, par un mécanisme appelé phosphorylation oxydative (Leduc et Ferroni, 1994; Prescott, 1995). Une force proton-motrice est générée par un partage inégal des charges de part et d'autre de la membrane mitochondrienne, causé par le transport des ions H^+ et le potentiel membranaire (Leduc et Ferroni, 1994; Nemati *et al.*, 1998; Prescott, 1995). Lorsque les ions H^+ retournent dans la matrice mitochondriale, le potentiel réducteur (NADPH) et de l'ATP sont synthétisés (Leduc et Ferroni, 1994). Les produits de la réaction sont des ions H^+ , de l'acide sulfurique (H_2SO_4) et du fer ferrique (Fe^{3+}), dans le cas de l'oxydation d'un sulfure de fer comme la pyrite par exemple.

1,2,2 Mécanisme indirect

Comme mentionné précédemment, un mécanisme indirect d'oxydation des sulfures métalliques est aussi observé (Bacelar-Nicolau et Johnson, 1999; Bosecker, 1997; Leduc et Ferroni, 1994; Nemati *et al.*, 1998; Rossi, 1990; VanAswegen et Marais, 1999). Les produits formés au cours de l'oxydation directe, soit le Fe^{3+} et l'acide sulfurique (H_2SO_4), ont une grande influence sur la cinétique des réactions d'oxydation indirecte (Bacelar-Nicolau et Johnson, 1999; Boon, 1999; Leduc et Ferroni, 1994; Torma, 1987). La présence des ions Fe^{3+} est de première importance car ces derniers engendrent l'oxydation des sulfures métalliques selon l'équation (Jensen et Webb, 1994; Hiroyoshi *et al.*, 1999; Schippers, 1996; Smith *et al.*, 1988; Torma, 1987) :



Au cours du procédé d'oxydation indirecte, le rôle de la bactérie est d'accélérer la vitesse de réoxydation du fer ferreux en fer ferrique, laquelle est très lente en son absence (Bosecker, 1997;

Fowler *et al.*, 1999; Torma, 1987). Le soufre libre généré est, par la suite, transformé en acide sulfurique (Blais *et al.*, 1992b; Blancarte-Zurita, 1988; Bosecker, 1997; Torma, 1987), selon l'équation :



La production d'acide sulfurique favorise la mise en solution des métaux oxydés selon l'équation suivante (Torma, 1987) :



En l'absence de bactéries ferrooxydantes et en présence d'une concentration élevée de fer ferrique (Fe^{3+}), la lixiviation indirecte peut être observée avec une cinétique lente. En effet, l'oxydation chimique des sulfures métalliques est indépendante de l'oxydation du fer ferreux (Boon, 1999).

Au cours de la biolixiviation en mode cuvée, le rapport Fe^{2+}/Fe^{3+} diminuera rapidement et fera en sorte d'augmenter le taux d'oxydation par voie chimique et par voie biologique (Harvey, 1997). En ce sens, il est difficile de déterminer la contribution de chacun des mécanismes (direct ou indirect) mis en jeu dans la réaction globale. De plus, il n'existe pas dans la littérature, un consensus concernant la prédominance de l'un ou l'autre des deux mécanismes (Harvey, 1997).

1,3 Cinétique de croissance microbienne

Afin de bien comprendre les différents procédés biologiques reliés à la solubilisation des métaux, et de les appliquer de façon convenable en industrie, il est important de connaître les vitesses de croissance des organismes qui y sont impliqués. Afin d'atteindre cet objectif, une étude de cinétique de la croissance bactérienne doit être réalisée.

Quelques notions fondamentales doivent être apportées afin de bien comprendre la procédure utilisée pour l'étude cinétique. En culture discontinue (mode cuvée), les organismes se développent selon un modèle représenté graphiquement par une courbe (présentant le logarithme

du nombre de cellules en fonction du temps) ayant quatre phases distinctes : la phase de latence, la phase exponentielle, la phase stationnaire et la phase de mortalité (Figure 1) (Prescott *et al.*, 1995).

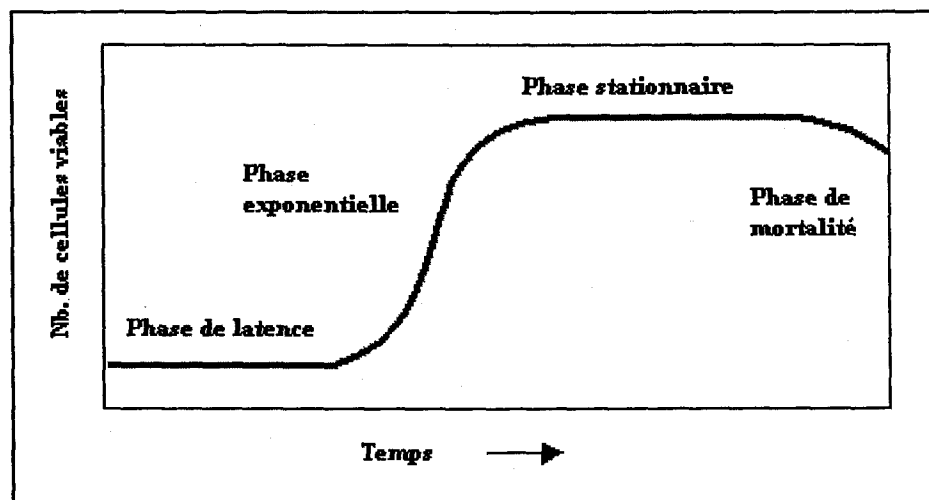


Figure 1 Courbe de croissance microbienne dans une culture en mode cuvée

Lors de l'inoculation d'un milieu de culture frais, les cellules ne se multiplient pas immédiatement. Cette période représente la phase de latence. Au cours de cette phase, les organismes procèdent à la synthèse de nouveaux constituants cellulaires (enzymes, cofacteurs, ribosomes commencement de la réplication de l'ADN, etc.). La durée de cette période est variable et dépend de plusieurs facteurs comme par exemple l'âge de l'inoculum, la température ou la composition du nouveau milieu, plus ou moins éloignée de l'ancienne. Suite à cette période, les organismes commencent à se multiplier. Ils entrent dans une phase exponentielle (ou logarithmique). À ce moment la vitesse de croissance bactérienne est maximale. Les organismes se dédoublent à une vitesse et à un intervalle régulier. Cette phase possède des caractéristiques intéressantes pour l'étude d'une espèce microbienne. En effet, la population est homogène et chaque cellule possède presque les mêmes propriétés chimiques et physiologique. La population atteint ensuite la phase stationnaire, dans laquelle la croissance devient plus lente. La population

reste stable et cette situation résulte probablement d'un équilibre entre la division et la mort cellulaire. Les éléments nutritifs sont limités à ce moment et les déchets métaboliques s'accumulent en concentration importante. La phase de mortalité survient ensuite, les éléments nutritifs sont maintenant rares et les déchets toxiques en concentration importante. Le nombre de bactéries viables diminue (Prescott *et al.*, 1995).

En phase exponentielle, étant donné que les organismes se divisent à un intervalle de temps régulier, la population doublera après un intervalle de temps appelé temps de génération (g). La population au temps t est représentée par l'équation suivante :

$$N_t = N_0 * 2^n \quad [5]$$

où N_t représente le nombre de cellules au temps t ;

N_0 représente le nombre initial de cellules;

et n représente le nombre de générations à l'intérieur de l'intervalle de temps t .

La valeur de « n » est obtenue en calculant le logarithme des deux termes de l'équation précédente de la façon suivante :

$$\log N_t = \log N_0 + n \log 2 \quad [6]$$

Il est possible de déterminer la vitesse de croissance moyenne en phase exponentielle (k), représentant le nombre de générations par unité de temps :

$$k = \frac{n}{t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2 * t} \quad [7] \text{ et } [8]$$

Le temps de génération « g » peut être obtenu. Si la population double alors la valeur de « N_t » sera égale à la valeur de « $2N_0$ », si bien que :

$$k = \frac{(\log(2N_0) - \log N_0)}{0,301 * g} \quad [9]$$

$$k = \frac{(\log 2 + \log N_0 - \log N_t)}{0,301 * g} \quad [10]$$

$$k = \frac{1}{g} \quad \text{ou} \quad g = \frac{1}{k} \quad [11]$$

L'étude de la croissance microbienne nécessite l'observation périodique de la croissance. Néanmoins, elle peut être réalisée à partir d'informations telles la quantité de substrat consommé ou la quantité de produits formés (Torma, 1977).

Différentes études ont été effectuées en ce qui concerne la vitesse d'oxydation du sulfate ferreux ou de certains résidus miniers dans des cultures en mode cuvée. Par exemple, Frattini *et al.* (2000) ont étudiés la vitesse d'oxydation du sulfate ferreux par les *Thiobacillus ferrooxidans* en présence de concentrations variables de composés organiques (glucose, cellobiose, acide galacturonique et citrique). Des temps de génération (*g*) variant de 6,4 à 36 heures ont été obtenus, selon le type de composé et sa concentration.

1,4 Microorganismes lixivants

Une variété de microorganismes peuvent tirer leur énergie de l'oxydation des sulfures métalliques. Ils sont référés comme étant les organismes lixivants. Plus particulièrement, les bactéries autotrophes du genre *Thiobacillus*, *Leptospirillum* et *Galionella*, les organismes hétérotrophes comme *Aspergillus* ou *Penicillium* et les bactéries thermophiles modérées telles que *Sulfobacillus* ou *Thiomicrospora* ont été étudiées en détail, par de nombreux auteurs (Bosecker, 1997; Krebs *et al.*, 1997; Norris, 1989; Rossi, 1990; Smith *et al.*, 1988; Torma, 1987). Tous ces microorganismes ont déjà été utilisés ou font partie de récents projets de recherche.

Les réactions chimiques et métaboliques apparaissant dans la lixiviation biologique des sulfures métalliques, sont le résultat d'un ensemble d'espèces bactériennes travaillant en étroite collaboration ou en successions essentielles à l'élaboration des conditions optimales de température, d'acidité et de disponibilité de la matière organique (Pronk et Johnson, 1992; Ralph, 1985). Les premières espèces qui apparaissent dans des conditions naturelles de lixiviation sont

généralement des bactéries hétérotrophes neutrophiles (*Acidiphilium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, certaines moisissures, etc.), lesquelles se nourrissent de matière organique souvent toxique aux espèces autotrophes fortement acidophiles. Viennent ensuite les espèces autotrophes neutrophiles thiooxydantes (*Thiobacillus thioparus*, etc.), les bactéries faiblement acidophiles (*Thiobacillus acidophilus*) et finalement, les bactéries acidophiles thiooxydantes et autotrophes (*Thiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans*). Ces microorganismes sont capables d'oxyder rapidement le substrat (FeS_2 , FeSO_4 , S^0 , etc.) en acidifiant le milieu réactionnel à des valeurs de pH inférieures à 2,0 (Pronk et Johnson, 1992; Rossi, 1990).

1,4,1 *Thiobacillus*

Les bactéries les plus actives au niveau de la biolixiviation dans le domaine minier font partie du genre *Thiobacillus* (Bacelar-Nicolau et Johnson, 1999; Boon, 1999; Bosecker, 1997; Leduc et Ferroni, 1994; Nagpal, 1996; Ralph, 1985; Smith, 1988) et plus spécifiquement *T. ferrooxidans*. Ce sont des bâtonnets droits mesurant entre 1 et 2 μm de longueur et 0,5 à 0,6 μm de largeur, se retrouvant à l'état seul ou en paire (Figure 2). Cinq propriétés caractérisent généralement *T. ferrooxidans*: 1) elle est autotrophe, donc le CO_2 de l'air sert de source de carbone. De plus, la présence de l'azote et du phosphore est essentielle avec des traces de potassium, de magnésium, de sodium, de calcium et de cobalt; 2) cette bactérie est chimiolithotrophe, elle peut oxyder directement le soufre élémentaire, le tétrathionate, le thiosulfate ou les sulfures métalliques; 3) elle est aussi mésophile, elle croît à des températures situées entre 20 et 40°C; 4) *T. ferrooxidans* acidophile, avec des valeurs de pH optimales situées entre 1,0 et 4,5 et 5) cette bactérie est aérophile, elle utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons mais possède quand même la capacité de croître en absence d'oxygène. Elle est habituellement mobile, à l'aide d'un seul flagelle polaire et non sporulante (Bosecker, 1997; Jensen et Webb, 1994; Nemati *et al.*, 1998; Ralph, 1985; Rossi, 1990; Smith, 1988). Les deux espèces de thiobacilles les plus étudiées sont *Thiobacillus thiooxidans* et *Thiobacillus ferrooxidans*. Warksman et Joffe (1922) furent les premiers scientifiques à isoler *T. thiooxidans*. La bactérie *T. ferrooxidans* fut isolée pour la première fois par Colmer et Hinkle, en 1947. Au niveau physiologique, elles sont similaires par contre, *T. ferrooxidans* possède la capacité d'obtenir ses électrons des molécules de fer ferreux

(Colmer et Hinkle, 1947; Harvey et Crundwell, 1997; Leduc et Ferroni, 1994; Nemati *et al.*, 1998; Smith, 1988; Torma, 1977). De plus, en absence d'oxygène, le fer ferrique peut servir d'accepteur final d'électrons.

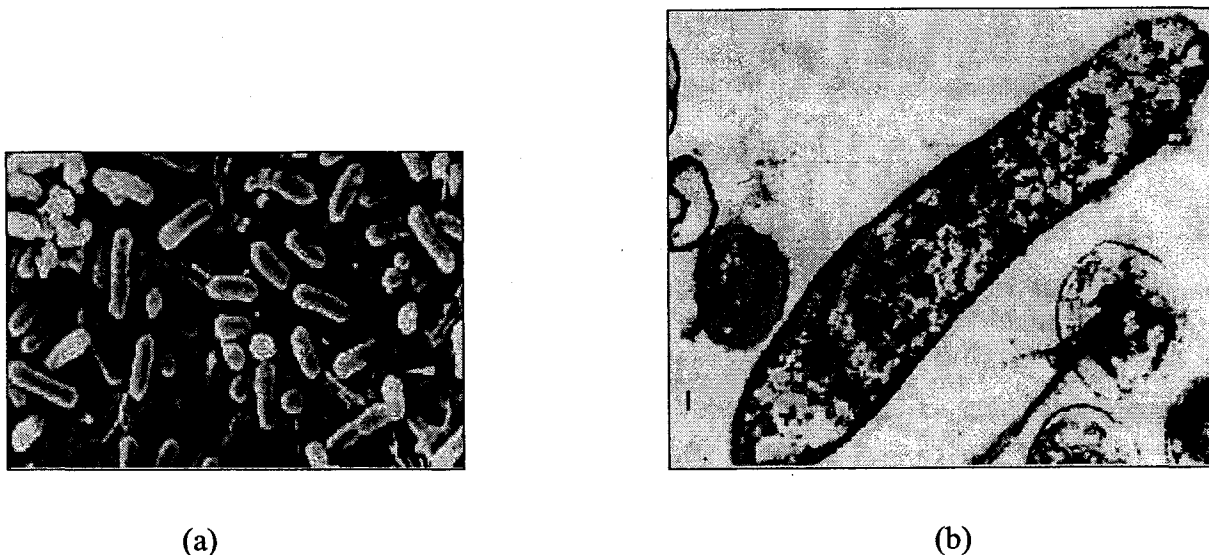


Figure 2 *Thiobacillus ferrooxidans* (a) image au microscope électronique à balayage et (b) coupe en microscopie électronique à transmission (x 30 000) (source : http://www.mines.edu/fs_home/jhoran/ch126/thiobaci.htm)

Vers la fin des années 1980, Hüber et Stetter, deux scientifiques allemands, ont isolés d'autres espèces de *Thiobacillus* capables d'oxyder directement les sulfures métalliques (Hüber et Stetter, 1989; Bosecker, 1997). La bactérie halotolérante *Thiobacillus prosperus* peut croître en présence de 6 % de NaCl. Elle oxyde l'ion ferreux, les composés soufrés réduits et les sulfures. L'espèce *T. cuprinus* possède la capacité d'oxyder plusieurs sulfures mais surtout les sulfures de cuivre (Hüber et Stetter, 1990). En 1992, Drobner *et al.* isolèrent une nouvelle espèce, *T. plumbophilus*. Cette bactérie n'utilise que la galène (PbS), le sulfure d'hydrogène et l'hydrogène comme substrats oxydables (Drobner *et al.*, 1992). Elle ne peut croître en utilisant d'autres sulfures métalliques.

1,4,2 *Leptospirillum*

Ce genre bactérien, spiralé et acidophile, utilise le carbone du CO₂ atmosphérique. Il puise son énergie de l'oxydation du fer ferreux et de divers sulfures métalliques et a besoin de l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Boon, 1999; Bosecker, 1997). L'espèce *Leptospirillum ferrooxidans* est la plus souvent isolée des filtrats acides (Bacelar-Nicolau et Johnson, 1999). Elle fut isolée pour la première fois en Arménie, par les chercheurs Markosyan *et al.* (Bosecker, 1997; Rossi, 1990). Elle est résistante à des valeurs de pH acide avec une valeur optimale située autour de 3,0 (Balashova, *et al.*, 1974). Elle peut tolérer des concentrations élevées d'uranium, d'argent et de molybdène (Bosecker, 1997). Par contre, cette espèce ne peut oxyder toute seule les sulfures métalliques. Une association étroite s'instaure donc dans la nature avec les espèces *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans*.

1,4,3 Bactéries thermophiles

Les bactéries thermophiles sont des organismes qui peuvent se développer à des températures supérieures à 55°C (Prescott *et al.*, 1995). Certaines bactéries thermophiles modérées possèdent la caractéristique d'oxyder des sulfures métalliques à de hautes températures (Bosecker, 1997). Par exemple, elles peuvent croître sur la pyrite, la pentlandite et la chalcopryrite à une température située aux alentours de 50°C (Bosecker, 1997). La biolixiviation des sulfures métalliques avec des organismes thermophiles s'est faite, dans un premier temps, avec les genres bactériens *Acidianus* et *Sulfolobus* (Brierley et Brierley, 1973). *Acidianus brierleyi*, un coccus Gram négatif, fut isolé pour la première fois par Brierley et Brierley, en 1973 en utilisant la molybdénite comme substrat, afin de solubiliser le molybdène. Ces études ont aussi démontré que l'espèce *A. brierleyi* peut solubiliser la chalcocite et la chalcopryrite de façon plus efficace que l'espèce *Thiobacillus ferrooxidans*, initialement reconnue comme lixivante. Un avantage à l'utilisation de ce type de bactéries est l'élimination des systèmes de refroidissement des bioréacteurs, essentiels afin de maintenir inférieurs à 30°C la température interne (Torma, 1977). En effet, seul un bon isolement est nécessaire afin conserver l'énergie libérée sous forme de chaleur, au cours des réactions métaboliques.

1,4,4 Moisissures

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes. C'est à dire qu'ils utilisent des molécules organiques réduites comme source de carbone et d'énergie (Prescott *et al.*, 1995). Elles nécessitent donc des suppléments de matière organique pour leur croissance (Bosecker, 1997; Prescott *et al.*, 1995). Les équations présentées précédemment peuvent être utilisées afin de comprendre les mécanismes qu'empruntent ces organismes pour lixivier les métaux. Plus particulièrement, la réduction enzymatique des composées hautement oxydés et la production d'acides organiques sont responsables de la lixiviation (Bosecker, 1997). Quelques expériences récentes démontrent le pouvoir de ces organismes. Par exemple, les résultats obtenus par Tungkaviveshkul *et al.* (1995), démontrent qu'il est possible de solubiliser et d'extraire 70 % du zinc présent dans des résidus miniers contenant des silicates de zinc, à partir de cultures de *Aspergillus* et de *Penicillium* avec addition de sucrose comme source de carbone et d'énergie.

Il ne serait pas surprenant de retrouver plusieurs espèces de moisissures en co-culture avec la bactérie *Thiobacillus* lors de procédés de biolixiviation. En effet, ces organismes sont très versatiles et leur croissance est possible à des pH excessivement bas et des concentrations de métaux en solution importantes (Gamache, 2001).

1,4,5 Autres organismes hétérotrophes acidophiles

Depuis quelques années, une attention particulière est portée sur la présence de microorganismes hétérotrophes fortement acidophiles à l'intérieur de cultures de *Thiobacillus ferrooxidans*, considérées comme étant pures (Lobos *et al.*, 1986). Au début des années 1970, l'obtention de cultures pures de *T. ferrooxidans*, adaptées à une croissance en présence de glucose et ayant perdues la capacité d'oxyder le fer ferreux fut rapportée (Tabita et Lundgren, 1971a, 1971b; Shafia *et al.*, 1972; Tuovinen et Nicholas, 1977). Ces observations ont soulevées une controverse et la pureté de ces cultures fut rapidement mise en doute (Guay et Silver, 1975; Tuovinen *et al.*, 1978). En milieu naturel, la coexistence entre des organismes hétérotrophes et la bactérie *T. ferrooxidans* a été rapportée pour la première fois en 1972, par Zavarzin. Toutefois, la présence d'organismes hétérotrophes acidophiles dans les environnements miniers était connue

depuis 1968, grâce aux travaux de Tuttle et collaborateurs (Tuttle *et al.*, 1968). Depuis ce temps, plusieurs souches ont été isolées d'une grande variété de cultures de *T. ferrooxidans* dans lesquelles des organismes hétérotrophes se développaient (Guay et Silver, 1975; Harrison, 1981; Lobos *et al.*, 1986; Wichlacz *et al.*, 1986). Ces organismes ne peuvent utiliser le fer ferreux comme source d'énergie (Harrison, 1981). Ils puisent alors leur énergie de deux sources majeures : des composés organiques toxiques à la croissance de *T. ferrooxidans* présents dans le milieu ou de certaines molécules organiques excrétées par l'activité métabolique (ou lors de la lyse), comme par exemple le pyruvate, le glutamate, l'aspartate, la sérine, la glycine et autres acides aminés (Lobos *et al.*, 1986). La coexistence de ces deux espèces est essentielle, étant donné la sensibilité élevée de *T. ferrooxidans* envers la matière organique. Les organismes hétérotrophes font apparaître dans le milieu de culture les conditions propices à la lixiviation par les organismes autotrophes (Butler et Kempton, 1987; Harrison, 1984; Kishimoto et Tano, 1987).

Depuis le début des années 1980, de nombreux projets de recherche s'orientent vers la caractérisation de ces organismes et plusieurs nouvelles espèces ont été proposées. La majorité de ces organismes sont des bactéries faisant partie du genre *Acidiphilium*, décrit et proposé par Harrison, en 1981 (Harrison, 1981). Harrison isole une nouvelle espèce, *A. cryptum*, à partir d'effluents issus d'environnements miniers de l'est, du mid-ouest et de la région des montagnes rocheuses aux États-Unis. Cinq ans plus tard, en 1986, Lobos et ses collaborateurs isolèrent *A. organovorum* (Lobos *et al.*, 1986). Au cours de la même année, Wichlacz et collaborateurs isolèrent *A. angustum*, *A. facilis* et *A. rubrum* (Wichlacz *et al.*, 1986). En 1991, l'espèce *A. symbioticum* fut découverte par l'équipe de Bhattacharyya (Bhattacharyya *et al.*, 1990). Les caractéristiques générales de ces organismes sont les suivantes : ce sont des bactéries Gram négatives, aérobies, mésophiles, en formes de bâtonnets et tolérant des valeurs de pH situées entre 1,9 et 5,9. Elles ne forment pas d'endospores et certaines sont mobiles par la présence d'un flagelle polaire ou deux flagelles latéraux. Elles poussent facilement sur des milieux contenant du glucose et 0,01 % de trypticase. Néanmoins, une concentration de 0,05 % de trypticase semble inhiber sa croissance. Ce ne sont pas des organismes lixivians mais leur présence semble faciliter la croissance des organismes lixivians, sensibles à la présence de matière organique.

Certains projets de recherche innovateurs mettent à profit la capacité qu'ont les organismes hétérotrophes acidophiles de dégrader les composés organiques, afin de faciliter la croissance de

Thiobacillus ferrooxidans dans certaines conditions. Une expérience menée par Butler *et al.*, en 1987, décrit une nouvelle procédure afin de faciliter la culture de *T. ferrooxidans* en milieu gélosé. La présence d'organismes hétérotrophes dans le milieu de culture facilite la dégradation des molécules organiques issues de l'agent gélifiant et permettent la formation de colonies de *T. ferrooxidans* à la surface du milieu solide (Butler et Kempton, 1987). Tout comme dans les environnements miniers naturels, une relation symbiotique s'instaure au cours de cette expérience : dans un premier temps, les organismes hétérotrophes acidophiles dégradent les molécules organiques présentes dans le milieu de culture et contribuent aussi à la baisse du pH par la production d'acides organiques. Des conditions propices au développement de *T. ferrooxidans* apparaissent. Ensuite, la croissance de *T. ferrooxidans* facilite à son tour la croissance des organismes hétérotrophes par la production de déchets métaboliques et par la synthèse de molécules organiques au cours du processus de fixation du CO₂. Une fois de plus, les organismes hétérotrophes viennent en aide aux autotrophes en évitant l'accumulation de déchets issus du métabolisme (Bhattacharyya *et al.*, 1990; Harrison, 1984).

1,5 Applications des procédés de biolixiviation à l'échelle industrielle

Au cours des 50 dernières années, de nombreuses techniques d'extraction minérale à l'aide de procédés biologiques ont vus le jour. Le développement de ces nouvelles technologies permet un traitement économique de minerais pauvres et de résidus miniers à faible teneur en métaux (Ralph, 1985). Ces procédés offrent certains avantages comme par exemple des coûts de capitalisation inférieurs de 12 à 20 % comparés aux procédés physiques, des coûts d'opération inférieurs de 10 %, des temps de mise en place réduits, un accroissement de la récupération de métaux précieux de 2 à 13 % et une certification plus facile à obtenir.

Les prochaines sections décrivent quelques technologies déjà en application, à l'échelle internationale.

1,5,1 Lixiviation en cuve

Le procédé de biolixiviation en cuve se retrouve à l'échelle industrielle depuis 1988 (VanAswegen et Marais, 1999). Par exemple, la technologie BIOX[®], soumise à une étude pilote par la compagnie GENCOR, utilise l'oxydation biologique de concentré de flottation de sulfures afin d'altérer le minerai contenant l'or. Au total, six usines dans cinq pays différents sur trois continents ont recours à ce procédé. Le procédé consiste en un certain nombre de cuves, généralement trois, d'égales dimensions, reliées en parallèle, constituant le réacteur primaire. Un réacteur secondaire est formé de cuves reliées en séries. Une population de *Thiobacillus ferrooxidans* et de *Leptospirillum ferrooxidans* est établie dans les réacteurs qui sont maintenus à une température située entre 40 et 45°C avec un système de refroidissement. De façon générale, le temps de rétention est de cinq à six jours et plus de 50 à 70 % de l'oxydation se produit dans le réacteur primaire (VanAswegen et Marais, 1999). Les coûts reliés à l'agitation et à l'aération de la liqueur sont importants (Nagpal, 1996).

1,5,2 Lixiviation en tas

Le procédé de biolixiviation en tas, utilisant le genre *Thiobacillus*, se retrouve à l'échelle industrielle (Nagpal, 1996). Ce procédé est utilisé pour le traitement de minerais à faible teneur en métaux précieux. Il consiste en l'installation de tas de minerai sur une surface imperméabilisée. Un arrosage constant du substrat est essentiel à l'établissement d'une population capable de lixiviation biologique du minerai. De façon générale, l'effluent acide est recueilli à la base du tas et est retourné au sommet. Une population de *Thiobacillus ferrooxidans* peut s'établir en moins de deux à quatre mois si les conditions climatiques sont favorables. La lixiviation s'effectue rapidement à partir de ce moment (Hiroyoshi *et al.*, 1990; Bosecker, 1997; Rossi, 1990; Torma, 1977).

Les installations les plus importantes mesurent plus de 200 mètres de hauteur et ont un diamètre de 80 mètres au sommet et de 200 mètres à la base (Torma, 1977). Une telle lixiviation est pratiquée à l'échelle industrielle en Utah, dans la région de Bingham Canyon, aux États-Unis

(Figure 3). Dans ce pays, jusqu'à 20 % de la production annuelle de cuivre est obtenue par ce procédé (Hiroyoshi *et al.*, 1990).



Figure 3 Photographie d'un procédé de biolixiviation en tas du cuivre (Bingham Canyon, Utah, États-Unis) (source : http://www.mines.edu/fs_home/jhoran/ch126/thiobaci.htm)

1,5,3 Lixiviation in-situ

Ce type de traitement nécessite un minimum d'installations et d'investissements et est pratiqué dans une mine abandonnée (Bosecker, 1997). Les galeries sont d'abord humidifiées avec un effluent acide. Ce dernier est par la suite recueilli dans les galeries plus profondes et pompé à la surface, dans une usine de cémentation. Le minerai fracturé est oxydé et les métaux y sont extraits. Par contre, l'application de ce procédé est limitée puisqu'il est possible de contaminer une nappe phréatique située à proximité par la dispersion, dans le réseau de failles, de la liqueur contenant les métaux en solution. Ce procédé est en application dans une ancienne mine d'uranium, située à Elliot Lake en Ontario, au Canada (Bosecker, 1997; Rossi, 1990).

CHAPITRE 2 – PARAMÈTRES INFLUENÇANT LA BIOLIXIVIATION

L'efficacité de la lixiviation bactérienne dépend des conditions environnementales, de la composition des minéraux à traiter et de la capacité des bactéries à lixivier les métaux (Prescott *et al.*, 1995). Ce chapitre trace donc un portrait des paramètres pouvant influencer sur la lixiviation bactérienne.

2,1 Effet du type de substrat

La composition minérale et la quantité du substrat à oxyder est de première importance. La surface totale disponible à l'attachement des bactéries pourra influencer le taux de lixiviation. Une diminution de la grosseur des particules de substrat entraîne une augmentation de la surface disponible sans en augmenter la masse (Bosecker, 1997; Torma, 1977).

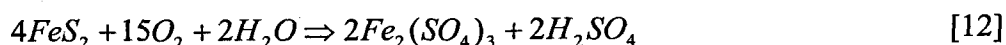
La surface active du minerai est d'autant plus importante que la densité de pulpe augmente (Torma, 1977). Il existe une limite maximale, au dessus de laquelle la croissance bactérienne est toutefois limitée. À cette concentration, la quantité d'oxygène dissous est faible et la dissolution de certains composés toxiques est assez grande pour influencer l'activité des bactéries (Ballester *et al.*, 1989; Bosecker, 1997). De plus, une grande quantité de carbonates pouvant se dissoudre à pH acide peut entraîner une hausse radicale du pH, provoquant ainsi l'inhibition de l'activité microbienne ou la mort des bactéries (Bosecker, 1997).

2,2 Effet du pH

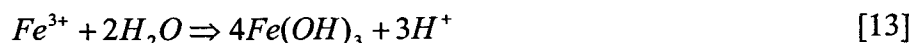
Aujourd'hui, tous les chercheurs s'accordent pour dire que des valeurs de pH très basses sont essentielles au bon fonctionnement des bactéries lixiviantes (Leduc et Ferroni, 1994; Nagpal, 1992; Norris, 1989; Ralph, 1985; Rossi, 1990). De plus, lors de la préparation du milieu de culture, l'ajustement du pH nécessitera l'ajout d'acide sulfurique. Il est important de noter que la

majorité des espèces bactériennes ne peuvent tolérer un pH inférieur à 2,0. Toutefois, il fut démontré par Tuovinen et Kelly (1973), que *T. ferrooxidans* s'adapte aisément à des valeurs de pH de cet ordre. Néanmoins, un temps d'acclimatation sera nécessaire afin de permettre la croissance sous des valeurs de pH de 1,2 (Jensen et Webb, 1994). Un pH interne relativement neutre est maintenu grâce à la translocation nette de protons vers l'extérieur de la cellule. Différentes caractéristiques, comme par exemple la présence de lipides membranaires particuliers, une grande quantité d'acides gras, des enzymes dépendantes du pH et l'élimination des ions hydrogènes au cours de la réduction de l'oxygène en eau, rendent ces bactéries aussi résistantes (Nagpal, 1996; Nemati *et al.*, 1998; Prescott, 1995).

Au cours de la période d'incubation de cultures en mode cuvée, le pH du milieu tend à s'acidifier avec le temps. Cette observation est le résultat de l'accumulation des produits de la lixiviation biologique. L'oxydation biologique de la pyrite conduit à la formation d'acide sulfurique (H_2SO_4) selon la réaction suivante (Boon *et al.*, 1999; Nemati *et al.*, 1998) :

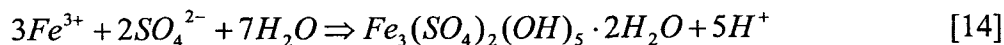


De plus, les produits des réactions de lixiviation chimique, engendrent aussi l'accumulation d'ions H^+ . La baisse de pH peut également résulter de la réaction du fer ferrique avec des molécules d'eau (Lacey et Lawson, 1970) :



Des résultats obtenus par Fowler *et al.* (1999), concernant les mécanismes de dissolution de la pyrite par la bactérie *T. ferrooxidans*, démontrent que la valeur du pH du milieu de culture n'est pas homogène en tout point. En effet, un micro-environnement semble se créer autour des particules de pyrite auxquelles les bactéries sont attachées. La valeur du pH dans cet espace est plus élevée que la valeur du pH dans le milieu environnant.

Au cours des expériences de biolixiviation, des variations quotidiennes du pH sont obtenues. Elles sont probablement engendrées par la formation de précipités de jarosite (Jensen et Webb, 1995). Les réactions suivantes décrivent le processus de formation de ces dépôts :



2,3 Effet de la température

La température joue aussi un rôle primordial afin de créer des conditions optimales de lixiviation des minéraux. La grande majorité des espèces lixiviantes sont mésophiles, c'est à dire que leurs enzymes seront dénaturées à des températures excédant 45°C et leur activité sera réduite sous une valeur de 15°C (Leduc et Ferroni, 1994). Certains travaux réalisés par Torma *et al.* (1977) indiquent que l'optimum de température pour différentes espèces de *Thiobacillus* se situe entre 25 et 45°C. Toutefois, aucune valeur minimale de température ne fut établie. Il est généralement admis que le point de congélation est la limite en dessous de laquelle l'activité microbienne devient minimale (Prescott *et al.*, 1995; Torma, 1977). Gomez et Cantero (1998) se sont attardés à l'effet de la variation de la température envers le taux de croissance de la bactérie *Thiobacillus ferrooxidans*. Les résultats suggèrent que la température optimale de croissance est de 31°C. Des températures supérieures à 45°C ou inférieures à 11°C inhibent l'activité bactérienne (Gomez et Cantero, 1998). D'après ces mêmes auteurs, des températures trop élevées dénaturent les enzymes et entraînent indirectement la déstabilisation de la membrane cellulaire et l'augmentation de la sensibilité envers l'effet toxique du fer ferrique.

Un paramètre non moins important utilisé lors de la quantification de l'effet d'une variation de température sur le taux de croissance microbienne est le coefficient de température (Q_{10}). Cette valeur se définit comme étant le taux de variation de croissance à chaque changement de 10°C au niveau de la température. Pour la majorité des réactions chimiques la valeur du Q_{10} est de 2. Cela signifie que la vitesse de la réaction double à chaque augmentation de 10°C. L'équation 16 définit ce paramètre (Torma, 1977) :

$$Q_{10} = \left(\frac{k_1}{k_2} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}} \quad [16]$$

où T_1 et T_2 représentent l'écart de température;

et k_1 et k_2 définissent les constantes de vitesse de réactions.

Selon les résultats obtenus par Karamenev et Nikolov (1988), une culture de *Thiobacillus ferrooxidans* fixée sur un substrat oxyde à un taux constant le fer ferreux à l'intérieur d'un écart de température situé entre 22 et 38°C. En revanche, des cellules en culture libres sont grandement affectées par un écart de température et possèdent une température optimale d'oxydation évaluée à 30°C. Certains auteurs suggèrent que la température de croissance optimale est dépendante de la valeur du pH du milieu. Plus le pH du milieu réactionnel est bas, plus la température optimale est basse (Jensen et Webb, 1994; Karamenev et Nikolov, 1988; Nemati *et al.*, 1998).

2,4 Effet de l'oxygène dissous

La molécule d'oxygène étant l'accepteur final des électrons enlevés aux molécules de substrat oxydés, la présence ou même l'addition d'oxygène est essentielle à la croissance des bactéries et au bon fonctionnement des réactions métaboliques de biolixiviation (Torma, 1977). Au laboratoire, une bonne agitation ou l'injection d'air au milieu est pratiquée facilement et la demande énergétique est faible (Jensen et Webb, 1994; Nagpal, 1996; Nemati *et al.*, 1998). Selon Gomez et Cantero (1998), une agitation ajustée entre 100 et 250 rpm pour des cultures en Erlenmeyers n'apporte aucune différence significative au niveau du taux d'oxydation du substrat. À l'échelle de l'industrie, ce facteur peut devenir limitant, étant donné les coûts énergétiques qui y sont associés (Torma, 1977). Pour la biolixiviation en cuve, des bioréacteurs de très grande dimensions sont utilisés et requièrent une agitation et une aération nécessitant une demande en énergie importante (Nagpal, 1996). Certains travaux démontrent que la limitation en oxygène dissout apparaît à une concentration inférieure à 10 % de la saturation (Nagpal, 1996).

2,5 Métaux lourds

La biolixiviation des sulfures métalliques entraîne inévitablement une augmentation de la quantité d'ions métalliques en solution dans le milieu de culture. Comme précédemment mentionné, cette solubilisation des métaux est due à l'effet combiné de l'oxydation biologique et de l'oxydation chimique. De façon générale, les organismes lixivians possèdent une tolérance élevée à l'accumulation, en grande quantité, de métaux lourds (Tuovinen *et al.*, 1971b). Par exemple, selon Bosecker *et al.*, ces bactéries peuvent tolérer jusqu'à 50 g/L de nickel, 55 g/L de cuivre et 112 g/L de zinc. Certains auteurs suggèrent que la tolérance à une concentration importante de métaux en solution que possèdent certains organismes, soit associée à la présence d'ADN extrachromosomique ou plasmidique (Leduc et Ferroni, 1994). La littérature présente plusieurs mécanismes de résistance des microorganismes envers les métaux lourds. Par exemple, les métaux peuvent se fixer sur la paroi cellulaire sans pénétrer à l'intérieur de la cellule. Le transport à travers la membrane plasmique peut être réduit, un système de transport actif des métaux vers l'extérieur de l'organisme peut apparaître. Les métaux lourds peuvent être emprisonnés dans des vacuoles, ou encore, ils peuvent être séquestrés par complexation dû à l'action de protéines comme la métallothionine (Gimmler, 2001; Tuovinen *et al.*, 1971b).

Ce ne sont cependant pas toutes les bactéries résistantes aux métaux en solution qui possèdent de l'ADN plasmidique. Selon Tuovinen *et al.* (1971b), la résistance aux métaux lourds chez *Thiobacillus ferrooxidans*, est affectée par la source d'énergie qui est oxydée. En effet, certains résultats démontrent que cette espèce est 2000 fois plus résistante à une concentration importante de cuivre, de nickel et de zinc lorsque cultivée en présence de fer ferreux, contrairement aux espèces qui utilisent le thiosulfate comme source d'électrons. Les cellules en croissance sur du soufre élémentaire possèdent une tolérance intermédiaire vis à vis de ces mêmes métaux (Leduc et Ferroni, 1994; Tuovinen *et al.*, 1971b; Tuovinen et Kelly, 1973).

2,5,1 Cadmium

Très peu de travaux de recherche présentent des informations relatives à l'effet du cadmium envers la croissance des bactéries lixiviantes. Néanmoins, certains résultats obtenus par Imai *et*

al. (1975), suggèrent que la croissance de *T. ferrooxidans* n'est pas inhibée par une concentration de 10 mM de cadmium (équivalent à 1,12 g/L).

2,5,2 Cuivre

Dans une très faible proportion, le cuivre est un élément nécessaire pour la constitution de certaines enzymes (Rossi, 1990). Pour des valeurs plus importantes, il n'existe pas, dans la littérature, de consensus en ce qui concerne la concentration minimale inhibitrice de cuivre pour l'oxydation des sulfures métalliques. Néanmoins, les valeurs minimales rapportées par Imai *et al.* (1975) sont de l'ordre de 0,450 g/L et les valeurs maximales rapportées par Leduc et Ferroni (1994), sont de l'ordre de 10,1 g/L, dépendamment de la longueur de la période d'adaptation ou de la source d'énergie. Toutefois, les valeurs plus récentes semblent plus réalistes dû au fait que le cuivre peut servir de source d'électrons pour la croissance de *Thiobacillus ferrooxidans*.

Les résultats obtenus par Ballester *et al.* (1990), suggèrent que la présence de cuivre, lors d'expériences de lixiviation de la sphalérite (ZnS), aurait un effet sur le taux de solubilisation du zinc. Facilement adsorbé sur la surface du minerai, il jouerait le rôle de catalyseur.

2,5,3 Fer

Dans la cellule bactérienne, le fer est nécessaire à la formation des cytochromes et autres protéines importantes. De plus, dans les réactions de biolixiviation, la présence du fer, sous forme de Fe^{3+} , est de première importance due à son grand pouvoir oxydant (Rossi, 1990). Néanmoins, selon les résultats d'une étude rapportés par Nemati *et al.* (1998), une concentration supérieure à 20 g/L de fer ferrique, réduirait l'oxydation du fer ferreux par la bactérie *Thiobacillus ferrooxidans*. Une accumulation de fer ferrique suite aux réactions d'oxydation pourrait aussi diminuer le rendement de solubilisation des métaux. Dans le même ordre d'idées, Shrihari et Gandhi (1990), rapportent qu'une concentration initiale de 5 g/L de Fe^{2+} a pour effet d'augmenter la période de latence et qu'une concentration supérieure à 20 g/L empêche complètement la croissance microbienne. Cependant, d'autres recherches ont démontré qu'une

oxydation efficace du fer ferreux peut avoir cours à des concentrations supérieures à 20 g/L (Nikolov et Karamenev, 1992).

2,5,4 Magnésium

La croissance de la bactérie *Thiobacillus ferrooxidans* est inhibée par l'enlèvement de la source de magnésium (Tuovinen et Kelly, 1973). À faible concentration, l'ion Mg^{2+} est essentiel à la fixation du CO_2 , à l'oxydation du fer et à la régulation d'autres réactions métaboliques (Rossi, 1990). Cependant, les eaux de sources naturelles contiennent plus de magnésium que la limite nécessaire à la croissance des bactéries. En outre, la majorité des sulfates contiennent aussi une petite quantité de magnésium solubilisé lors de la lixiviation (Tuovinen et Kelly, 1973). Selon ces mêmes auteurs, une concentration supérieure à 10 g/L de magnésium aurait un effet inhibiteur à l'oxydation du fer par *T. ferrooxidans*.

2,5,5 Zinc

Entrant dans la constitution de certaines enzymes, le zinc, dans une très faible proportion, semble un élément important (Rossi, 1990). Certains travaux, réalisés par Tuovinen *et al.*, au cours des années 1970, traitent de la tolérance de *Thiobacillus ferrooxidans* envers quelques ions métalliques lors de l'oxydation du fer. Parmi ceux-ci, le zinc, ajouté dans le milieu de culture sous forme de sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) inhibe la croissance de souches non-acclimatées de *T. ferrooxidans* à partir de valeurs équivalentes à 10 g/L (Tuovinen *et al.*, 1971b). Il est toutefois possible d'acclimater des souches de cette bactérie afin de les rendre aptes à croître à des teneurs en zinc nettement plus élevées.

2,6 Effet de la source de carbone

La seule source de carbone nécessaire à la croissance des espèces autotrophes est le dioxyde de carbone atmosphérique (CO_2) (Dave et Natarajan, 1982; Nagpal, 1996; Torma, 1987; VanAswegen et Marais, 1999). Il est assimilé par la cellule au cours du cycle de Calvin-Benson

(Boon, 1999; Leduc et Ferroni, 1994; Nagpal, 1992; Nagpal, 1996; Nemati *et al.*; Norris, 1989; Torma, 1977). Il existe une concentration optimale de CO₂, pour laquelle la croissance des bactéries lixiviantes est maximale (Nagpal, 1996). Plusieurs études ont démontré une augmentation de l'activité bactérienne par l'addition, aux milieux de culture, d'air ambiant enrichie en CO₂ (Nagpal, 1992; Norris, 1989). Holuigue *et al.* (1987) ont découvert qu'une augmentation de la concentration de CO₂ dans l'air, de 0,03 % (v/v) à 0,10 % (v/v), permet de doubler la vitesse de croissance bactérienne. De plus, l'enzyme ribulose 1,5-biphosphate carboxylase-oxygénase (RuBisCO), assurant la fixation du CO₂, possède une activité maximale pour une concentration de CO₂ de 0,35 % (v/v) (Nagpal, 1992).

2,7 Effet des éléments nutritifs

La quantité de nutriments disponibles et la qualité de ceux-ci feront varier le taux de croissance des bactéries lixiviantes. Généralement, les organismes lixivians sont des organismes autotrophes chimolithotrophes (Bosecker, 1997; Krebs *et al.*, 1997, 1987; Norris, 1989; Smith *et al.*, 1988; Torma, 1987). Les composés inorganiques réduits tel que le fer ou le soufre sont oxydés pour la production d'énergie. Le CO₂ atmosphérique sert de source de carbone (Prescott *et al.*, 1995). Une grande quantité de matière organique dans le milieu de culture sera néfaste à la croissance de ces organismes (Nemati *et al.*, 1998; Tuttle et Dugan, 1976). Généralement, les éléments nutritifs proviennent du minerai à traiter mais pour rendre plus efficace la lixiviation, il est essentiel d'ajouter par exemple des sels d'ammonium et de phosphate (Bosecker, 1997; Torma, 1977; Torma, 1987; VanAswegen et Marais, 1999). L'ajout de ces réactifs entraîne une augmentation des coûts d'opération liés à la mise au point des procédés de biolixiviation.

2,7,1 Azote

L'azote est nécessaire à la croissance bactérienne en vue de la synthèse des acides aminés, des purines, des pyrimidines, de cofacteurs enzymatiques et d'autres substances (Prescott, 1995; Rossi, 1990). Néanmoins, en trop grande concentration, les composés azotés peuvent être

toxiques. À ce titre, Tuovinen *et al.* (1971a) ont démontré qu'une grande quantité d'azote sous forme de nitrates aura un effet inhibiteur au cours de l'oxydation du fer ferreux. À l'inverse, selon ces mêmes auteurs, l'absence d'azote ammoniacal dans un milieu de culture acide n'empêche pas complètement l'oxydation du fer ferreux. L'azote nécessaire à la croissance serait, dans ce cas, obtenu à partir de l'azote atmosphérique.

Selon une étude effectuée par Torma *et al.* (1970) portant sur l'effet de la concentration des nutriments sur la lixiviation microbiologique, la cinétique de lixiviation serait en grande partie contrôlée par la concentration en ions ammonium.

2,7,2 Phosphore

Le phosphore est présent dans la cellule bactérienne à l'intérieur des acides nucléiques, des phospholipides, des nucléotides certaines protéines et autres composés (Prescott *et al.*, 1995; Rossi, 1990). Cet élément, directement utilisable sous forme de phosphate (ortho- PO_4^{3-}), est essentiel aux bactéries lixiviantes non seulement pour le métabolisme énergétique mais aussi pour la première étape de l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique à l'extérieur de la membrane cellulaire (Tuovinen *et al.*, 1971a). En ce sens, dans un milieu de culture, la concentration en ions phosphates affecterait la vitesse de croissance des bactéries lixiviantes (Torma, 1977).

Selon Tuovinen *et al.* (1971a), en absence de phosphore, le taux d'oxydation du fer ferreux sera réduit de 20 % après 13 repiquages. Selon les résultats obtenus par Sholeh *et al.* (1997), le taux d'oxydation du soufre et la densité de population de *Thiobacillus thiooxidans* est aussi dépendante de la quantité de phosphore dans le milieu de culture.

2,7,3 Composés organiques

La croissance de certaines espèces chimiolithotrophes du genre *Thiobacillus* est inhibée par certains composés organiques normalement considérés comme des nutriments essentiels à la croissance des organismes hétérotrophes (Lu *et al.*, 1971; Nemati *et al.*, 1998; Tuovinen *et al.*, 1971a; Tuttle et Dugan, 1976). *Thiobacillus thiooxidans* et *Thiobacillus ferrooxidans* semblent

être les plus affectés par la présence de carbone organique (Tuttle et Dugan, 1976). L'inhibition est si importante que certains auteurs rapportent qu'il est possible de prévenir le drainage minier (et rocheux) acide par l'ajout de matière organique du type glucose, cellobiose, acide galacturonique et citrique, extrait de levure, peptone, etc. (Frattini *et al.*, 1999). Cependant, il fut déjà démontré que ces espèces ne sont pas chimiolithotrophes obligatoires mais, après une période d'adaptation variable, elles peuvent croître en présence de composés organiques, utilisés comme source de carbone (Tuovinen *et al.*, 1971a; Tuttle et Dugan, 1976). Néanmoins, suite à ce traitement, *T. ferrooxidans* semble perdre la capacité d'oxydation du fer ferreux (Nemati *et al.*, 1998; Jensen et Webb, 1995). Cette information fut à la source de nombreuses controverses concernant la pureté de ces cultures de *T. ferrooxidans*, autour du milieu des années 1970. Plus tard, il fut démontré que ces cultures étaient composées d'organismes hétérotrophes acidophiles et non de la bactérie *T. ferrooxidans*.

Certains auteurs se sont intéressés à l'effet de l'addition de certains acides aminés aux milieux de culture. Les résultats ont démontré que l'ajout d'un seul acide aminé au milieu de culture exempt d'autres composés organiques peut inhiber complètement ou partiellement la croissance de certaines espèces de *Thiobacillus*. Cependant, l'inhibition étant spécifique, un acide aminé peut empêcher la croissance d'une espèce sans affecter les autres (Lu *et al.*, 1971). En revanche, les récents travaux de Rojas-Chapana et Tributsch (2000) indiquent que l'ajout d'une petite quantité de cystéine, un acide aminé, dans le milieu de culture augmente l'activité de la bactérie *Thiobacillus ferrooxidans* d'un facteur de 3. Certains indices portent à croire que l'effet inhibiteur de la matière organique envers l'activité des organismes lixivians peut donc être aboli et certains composés organiques peuvent être utilisés pour permettre leur croissance.

En 1971, certains auteurs concluent que l'action inhibitrice des composés organique rend impossible l'utilisation de déchets concentrés comme support à la croissance de thiobacilles durant la lixiviation. Ces déchets organiques contiennent une trop grande concentration de sels d'ammonium et de phosphate (Tuovinen *et al.*, 1971a). Lorsque la concentration en composés organiques semble dépasser celle des ions Fe^{2+} ou de tout autre substrat inorganique oxydable, l'inhibition devient importante (Tuttle et Dugan, 1976). L'électronégativité (i.e. la capacité d'une molécule à attirer les électrons) semble influencer les processus d'oxydation du fer ferreux. Plus la molécule organique possède une valeur d'électronégativité élevée, moins son action sera

inhibitrice (Tuttle et Dugan, 1976). Par contre, Schönborn *et al.* (1978) démontrèrent qu'il est possible d'adapter des cultures de thiobacilles acidophiles à l'oxydation de sulfures métalliques en présence de faible quantité de boues d'usines d'épuration des eaux usées.

Depuis le début des années 1990, plusieurs travaux se déroulant dans les laboratoires de l'INRS-Eau se concentrent sur la culture d'organismes lixivants en présence de fortes concentrations de matière organique. Les résultats obtenus ont mis en évidence l'existence d'une flore lixivante, indigène des boues d'épuration municipales, principalement constituée des espèces bactériennes *Thiobacillus thioparus*, *T. thiooxidans* et *T. ferrooxidans* (Blais *et al.*, 1992a; Dufresne *et al.*, 1993). Dès lors, ces organismes ont été utilisés en vue de l'élaboration de procédés de biolixiviation des métaux lourds de divers déchets organiques. Parmi ceux-ci, les procédés METIX-BS et METIX-BF sont aujourd'hui en phase de commercialisation. Néanmoins, parmi tous les travaux de biolixiviation effectués à ce jour, aucun de ceux-ci n'a pris en compte la biolixiviation de sulfures métalliques contenus dans des résidus miniers par les organismes indigènes des boues d'épuration.

CHAPITRE 3 – HYPOTHÈSE DE RECHERCHE, OBJECTIFS SPÉCIFIQUES ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

3,1 Hypothèse de recherche

Afin qu'il soit rentable, un procédé conventionnel d'extraction minérale doit remplir certaines conditions. Par exemple, le minerai traité doit contenir de grandes concentrations de métal et la source d'énergie utilisée doit être abordable et facilement accessible. Ces conditions ont prévalu dans la majeure partie de l'histoire humaine mais maintenant, l'industrie minière doit faire face à des minerais de plus faibles teneurs et des coûts d'exploitation importants (Botkin et Keller, 1995). Depuis une cinquantaine d'années, l'utilisation des procédés issus de la biohydrométallurgie répond à ces problèmes. Jusqu'à maintenant, l'ensemble de la recherche qui a été faite sur les procédés de biolixiviation semble démontrer le pouvoir inhibiteur que possède la matière organique envers la croissance des bactéries lixiviantes indigènes des effluents acides de divers environnements miniers. Toutefois, d'après nos investigations, aucune idée n'a été faite sur l'utilisation de surnageant de lisier de porc et de boues d'épuration comme milieu de culture pour la flore bactérienne indigène, *T. ferrooxydans*. De récents travaux ont démontré que ces bactéries possèdent la capacité de croître et d'oxyder le sulfate ferreux en présence de boues d'épuration (Blais *et al.*, 1992a). Il est donc possible que la croissance de ces bactéries ferrooxydantes soit obtenue en utilisant comme milieux de culture divers effluents organiques, sans apport de milieu synthétique. L'utilisation de déchets organiques contenant de grandes concentrations en nutriments (ammoniaque, phosphates, etc.) pourrait être une alternative à l'utilisation du milieu synthétique lors des procédés de biolixiviation dans le cadre du traitement de résidus miniers ou de minerais à faibles teneurs en métaux valorisables.

3,2 Objectifs spécifiques

3,2,1 Sélection du milieu et acclimatation à la présence de matière organique

L'objectif principal de ce travail de recherche consiste en l'acclimatation d'un consortium de bactéries ferroxydantes, indigènes des boues d'épuration municipales, à une croissance en présence de trois effluents organiques. De façon plus spécifique, les bactéries seront acclimatées à la croissance dans un surnageant de centrifugation de boues de papetières, dans un filtrat de déshydratation de boues d'épuration et dans un surnageant de centrifugation de lisier de porc sans apport de milieu synthétique.

3,2,2 Cinétiques d'oxydation

Une fois les bactéries bien acclimatées, un essai de cinétique sera pratiquée sur une période d'un mois afin de comparer les vitesses d'oxydation du fer ferreux en fer ferrique, ainsi que des sulfures métalliques, pour chacun des trois effluents organiques.

3,2,3 Caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile

Une concentration importante en carbone organique dissout (COD) peut inhiber la croissance de la bactérie *Thiobacillus ferrooxidans*. Toutefois, la présence d'une microflore hétérotrophe acidophile, dégradant la matière organique et rendant les conditions propices à la croissance de *T. ferrooxidans*, est possible. Cette troisième partie de l'étude a pour objectif la mise en évidence d'une microflore hétérotrophe acidophile, ainsi que la caractérisation et l'identification de cette dernière.

3,3 Démarche expérimentale

Des cultures bactériennes en mode cuvée seront faites avec des concentrations variables de matière organique, afin d'acclimater la microflore lixivante à une croissance en présence des trois effluents organiques. Chacune des expériences sera effectuée dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant des concentrations variables d'effluent organique et 5 % (v/v) d'inoculum. Le substrat sera ajouté à une densité de pulpe de 10 % (p/v). Les cultures seront incubées à 30°C, sous une agitation de 160 rpm pour une période de 30 jours chacune. Les concentrations variables de matière organique seront obtenues par dilution avec de l'eau distillée ou le milieu synthétique. L'évolution du pH, du potentiel d'oxydoréduction (POR), la concentration des éléments nutritifs (N-NH₄, P-PO₄ et COD) et la quantité de métaux en solutions (Cu, Fe et Zn) seront évaluées de façon régulière.

Suite à la période d'acclimatation couvrant une année entière, l'oxydation du substrat minéral sera comparée dans les trois milieux, à celle observée dans le milieu synthétique. De plus, les pourcentages de solubilisation du fer, du cuivre et du zinc seront calculés pour chacun des milieux. Enfin, la concentration maximale inhibitrice en carbone organique dissout sera évaluée pour chacun des milieux.

Dans un deuxième temps, la cinétique d'oxydation sera évaluée. Ce calcul sera fait à partir de la quantité de fer ferreux transformé en fer ferrique, au cours de la phase exponentielle de croissance microbienne.

Par la suite, la microflore hétérotrophe acidophile sera caractérisée. Des inoculums, servant à l'ensemencement de géloses propices à la croissance des organismes hétérotrophes acidophiles, seront issus des cultures liquides de chacun des milieux testés. Des dilutions seront faites et les géloses seront ensemencées et incubées à 30°C pour une période de 120 heures. Les colonies seront par la suite dénombrées et caractérisées. La détermination du genre sera faite par caractérisation de la morphologie structurale.

CHAPITRE 4 – DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

4,1 Préparation du concentré de sulfures

Le substrat utilisé pour les essais consistait en un concentré de flottation de sulfures provenant du site minier Norébec-Manitou (Val d'Or, Québec). Il était constitué en majeure partie de pyrite ($32,8 \pm 3,5$ % Fe), de sphalérite ($1,39 \pm 0,05$ % Zn) et de chalcoppyrite ($0,28 \pm 0,01$ % Cu). Une concentration de $2,30 \pm 0,10$ % d'aluminium indique la présence possible d'aluminosilicates. Les résultats de l'analyse au Microtrac, effectuée dans les laboratoires du COREM, indiquent que la grosseur des particules est 100 % inférieure à $53 \mu\text{m}$ (< 270 mesh). Lors de la période d'acclimatation microbienne, aucun autre traitement n'a été appliqué au concentré de sulfures. Le Tableau 1 présente la composition élémentaire du concentré obtenue par analyse à l'ICP-AES, après digestion totale à l'acide fluorhydrique (HF). Le Tableau 2 présente, pour sa part, les concentrations de Fe, Cu et Zn dans le concentré de sulfures déterminées par spectrométrie d'absorption atomique à la flamme, lesquelles ont été utilisées comme référence pour fins de calculs de solubilisation.

Tableau 1 Analyse chimique à l'ICP-AES du concentré de sulfures

Éléments	Composition du concentré de sulfures	
	(mg/kg)	
Al	23000	± 1000
Ca	3770	± 160
Cd	31,4	± 1,2
Cr	1550	± 130
Cu	2300	± 100
Fe	337000	± 18000
K	5740	± 220
Mg	48,9	± 1,3
Mn	243	± 7
Na	1560	± 70
Ni	31,6	± 0,9
P	183	± 9
Pb	567	± 23
S	307000	± 20000
Zn	8620	± 560

Tableau 2 Analyse chimique à l'absorption atomique à la flamme du concentré de sulfures

Éléments	Composition du concentré de sulfures	
	(mg/kg)	
Cu	2840	± 100
Fe	328000	± 35000
Zn	13900	± 500

Pour la réalisation des essais de cinétique, une étape additionnelle a été nécessaire avant l'utilisation du concentré de sulfures. Celui-ci a été lavé afin d'enlever les éléments nutritifs qui y étaient adsorbés initialement. La procédure de lavage consistait en une agitation du concentré dans de l'eau distillée acide (ajusté à pH 2,0 avec H_2SO_4) à une densité de pulpe de 20 % et pour une période de 24 heures. Le concentré lavé a été récupéré par filtration, rincé trois fois avec de l'eau distillée acide et séché à 80°C pour une période de 24 heures. La composition en pyrite (33 % ± 4 % Fe), sphalérite (1,32 % ± 0,04 % Zn) et chalcoppyrite (0,240 % ± 0,005 % Cu) est demeurée sensiblement la même, suite à l'étape de lavage. Les Tableaux 1 et 2 présentent la composition élémentaire du concentré de sulfures digéré tandis que les Tableaux 3 et 4 exposent la composition élémentaire du concentré de sulfures lavé et digéré.

Tableau 3 Analyse chimique à l'ICP-AES du concentré de sulfures lavé et digéré

Éléments	Composition du concentré de sulfures lavé	
	(mg/kg)	
Al	24100	± 2200
Ca	249	± 20
Cd	23,7	± 0,4
Cr	1500	± 100
Cu	2580	± 30
Fe	360000	± 7000
K	6160	± 160
Mg	50,1	± 3,6
Mn	215	± 4
Na	1670	± 40
Ni	21,3	± 1,8
P	172	± 4
Pb	572	± 16
S	345000	± 9600
Zn	6290	± 98

Tableau 4 Analyse chimique à l'absorption atomique à la flamme du concentré de sulfures lavé et digéré

Éléments	Composition du concentré de sulfures lavé	
	(mg/kg)	
Cu	2400	± 50
Fe	330000	± 39000
Zn	13200	± 400

4,2 Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée dans ce projet de recherche provenait d'une culture non purifiée de *Thiobacillus ferrooxidans*. Ces organismes ont été isolés des boues d'épuration municipales de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ) et acclimatés à la croissance en présence de sulfate ferreux dans le milieu 9K, développé par Silverman et Lundgren (1959). La composition chimique typique du milieu 9K est présentée au Tableau 5.

Tableau 5 Composition chimique du milieu 9K (Silverman et Lundgren, 1959)

Éléments		Quantité (g/L)
Sulfate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0
Phosphate de potassium	KH_2PO_4	0,5
Chlorure de potassium	KCl	0,1
Sulfate de magnésium heptahydraté	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
Chlorure de calcium	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0125
Sulfate ferreux	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44,0

4,3 Milieux de culture

Les bactéries présentes dans l'inoculum de départ ont été acclimatées dans des concentrations variables de trois milieux de cultures différents. Les milieux testés étaient un surnageant de centrifugation de boues secondaires de papetières (BP), provenant de l'usine de pâtes et papiers Bowater (anciennement connue sous le nom de Produits Forestiers Alliance, Donnacona), un effluent de déshydratation de boues d'épuration (BE) provenant de l'usine de traitement des eaux de la Communauté Urbaine de Québec (Québec) et un surnageant de centrifugation de lisier (L) provenant de la ferme expérimentale de l'Institut de Recherche et de Développement Agronomique (IRDA) située à Saint-Lambert. Le milieu 9K, dans lequel le sulfate ferreux a été remplacé par le concentré de sulfures décrit précédemment, a été utilisé pour l'obtention du contrôle positif (MS). La composition de ce milieu est la suivante (par litres d'eau distillée) : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,0 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; KCl, 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0125 g; concentré de flottation de sulfures, 20 g. Les effluents de déshydratation des boues secondaires de papetières et de lisier de porc ont été obtenus par centrifugation des boues et du lisier à 13700 x g, pour une période de 20 minutes et ce, afin de séparer la partie liquide de la partie solide. Le surnageant était récupéré pour les essais de croissance bactérienne. Les milieux ont été

conservés à 4°C, dans des bouteilles de polypropylène à l'abri de la lumière avant leur utilisation. Le Tableau 6 présente la composition chimique de chacun des milieux de culture bruts, analysés à l'ICP-AES. De plus, le Tableau 7 présente la composition en ions ammoniacque (NH_4^+), ortho-phosphate (ortho- PO_4^{3-}) et carbone organique dissout (COD) dans chacun des milieux additionnés du concentré de sulfures.

Afin de déterminer la proportion de l'azote et du phosphore se trouvant sous forme d'ammoniacque et de phosphate dans chacun des milieux de cultures, une digestion totale du type Kjeldahl a été effectuée et la concentration totale en N et en P a été déterminée. Le Tableau 8 présente ces résultats.

Tableau 6 Analyse chimique à l'ICP-AES des trois effluents organiques testés et du milieu synthétique

Éléments	Composition des milieux de culture (mg/L)							
	100 % MS		100 % BP		100 % BE		100 % L	
Al	0,093	±0,002	0,173	±0,001	0,165	±0,006	0,189	±0,026
Ca	17,1	±0,1	13,4	±0,2	255	±0	44,0	±0,2
Cr	0,002	±0,000	0,004	±0,000	<0,001	±n.d.	0,010	±0,001
Cu	0,011	±0,000	0,006	±0,001	0,004	±0,000	0,082	±0,002
Fe	0,094	±0,056	0,175	±0,003	33,7	±0,0	0,60	±0,03
K	199	±0	13,6	±0,1	48,4	±0,1	1020	±10
Mg	93,1	±0,5	2,38	±0,04	23,5	±0,2	4,27	±0,04
Mn	0,003	±n.d.	0,911	±0,012	2,88	±0,00	0,031	±0,001
Na	1,03	±0,00	180	±1	62,8	±0,3	432	±6
Ni	0,007	±0,002	0,005	±0,001	0,010	±0,001	0,052	±0,005
P	101	±0	7,04	±0,11	1,78	±0,01	146	±4
Pb	0,193	±0,001	<0,004	±n.d.	0,007	±0,002	0,101	±0,003
S	898	±2	73,6	±0,8	7,08	±0,03	26,6	±0,2
Zn	0,251	±0,000	0,067	±0,002	0,033	±0,001	0,456	±0,003

Tableau 7 Caractérisation des différents milieux de culture additionnés du concentré de sulfures

Milieux	Ammoniaque (NH_4^+) (mg/L)		Ortho-phosphates (ortho- PO_4^{3-}) (mg/L)		Carbone organique dissout (COD) (mg/L)	
100 % MS	667	± n.d.	94,9	± n.d.	36,0	± n.d.
100 % BP	27,2	± 11,8	33,2	± 16,9	116	± 68
100 % BE	61,9	± 2,8	14,5	± 0,7	326	± 95
100 % L	1860	± n.d.	114	± n.d.	3100	± n.d.

Tableau 8 Composition en N_{tot} et P_{tot} dans chacun des effluents organiques testés en plus du milieu synthétique

Milieux	N_{tot} (mg/L)		P_{tot} (mg/L)	
100 % MS	635	± 16	122	± 1
100 % BP	< 0,15	± n.d.	4,37	± 3,78
100 % BE	81,4	± 5,3	5,14	± 0,23
100 % L	2260	± 127	183	± 10

4,4 Mesure du pH et du potentiel d'oxydoréduction (POR)

Les mesures du pH et du POR ont été effectuées dans chacune des cultures à tous les deux jours. Elles sont facilitées par l'utilisation d'un pH mètre à double canal, de marque FISHER, modèle ACCUMET AR25 (FISHER SCIENTIFIC, Ont., Canada) pourvu d'une électrode de pH Ag/AgCl de marque COLE PARMER. Le POR a été suivi à l'aide d'une électrode de platine de marque COLE PARMER (COLE PARMER INSTRUMENT COMPANY, ILL., États-Unis).

L'appareil a été étalonné avant chaque utilisation par l'emploi de solutions d'étalonnage de marque VWR (VWR SCIENTIFIC PRODUCTS, PA., États-Unis, CAT. NO. 34170-100, 34170-106 et 34170-115) à des valeurs de pH situées entre 2 et 7.

4,5 Analyse des ions ortho-phosphates (ortho- PO_4^{3-})

Les concentrations initiales et finales en ions ortho-phosphates (ortho- PO_4^{3-}) ont été mesurées par colorimétrie sur un auto-analyseur du type TECHNICON (TECHNICON INDUSTRIAL SYSTEMS, NY., États-Unis). Cet appareil a été utilisé afin de mesurer les concentrations de ce composé dans les différents échantillons à partir de la méthode TECHNICON 94-70W. La réaction colorimétrique a été obtenue par la combinaison des différents réactifs (acide sulfurique 5N, tartrate de potassium et d'antimoine, molybdate d'ammonium) et les ions ortho-phosphates. Le molybdate d'ammonium et le tartrate de potassium et d'antimoine réagissent en milieu acide avec l'ortho-phosphate pour former un complexe phospho-molybdate d'antimoine. L'acide ascorbique réduit ensuite ce complexe en un autre complexe de couleur bleue. La densité optique est lue à une longueur d'onde de 660 nm et un logiciel calcule ensuite la concentration d'ions ortho-phosphates relative à la couleur du complexe formé.

Lors de la réalisation de l'essai de cinétique, la mesure des concentrations en ions phosphates a été facilitée par l'utilisation d'un auto-analyseur de marque LACHAT, modèle FIA+ (ZELLWEGER ANALYTICS, LACHAT INSTRUMENTS DIVISION, WI., États-Unis). Les mesures ont été faites à partir de la méthode QuickChem 10-115-01-1-B. La réaction colorimétrique a été obtenue de façon similaire à celle décrite précédemment. La densité-optique a été lue à une longueur d'onde de 880 nm et un logiciel calcule ensuite la concentration d'ions ortho-phosphates relative à la couleur du complexe formé.

Ces mesures ont été réalisées à partir d'échantillons filtrés et acidifiés avec de l'acide sulfurique concentré (0,5 % v/v) afin d'éviter la précipitation éventuelle des éléments en solution et conservés à 4°C. Afin de certifier les analyses effectuées, des contrôles de qualité ont été inclus dans les protocoles. Un étalon multi-éléments (Nutrient 2185) a été analysé régulièrement. Si le résultat obtenu différait de 10 % de la valeur réelle certifiée, les résultats étaient rejetés et

l'appareil était recalibré avant de débiter de nouveau les analyses. Des étalons ont été préparés dans l'acide sulfurique à partir d'une solution stock à 100 mg PO₄/L et l'appareil était étalonné entre 0 et 5 mg PO₄/L avant chacune des utilisations.

4,6 Analyse des ions ammoniacque (NH₄⁺)

Les concentrations initiales et finales en ions ammoniacque (NH₄⁺) ont été mesurées à l'aide d'un auto-analyseur du type TECHNICON (TECHNICON INDUSTRIAL SYSTEMS, N.-Y., États-Unis). Cet appareil a été employé afin de mesurer la concentration de cet élément dans les différents échantillons à partir de la méthode TECHNICON 98-70W. La réaction colorimétrique a été obtenue par la combinaison des différents réactifs (phénolate de sodium, hypochlorite de sodium, tartrate de sodium et potassium) et les ions ammoniacques. Le phénol, l'ion hypochlorite et l'ammoniacque réagissent, en milieu alcalin, pour former un composé de couleur bleue, l'indophénol. La densité optique est lue à une longueur d'onde de 630 nm et un logiciel calcule ensuite la concentration d'ions ammoniacques relative à la couleur du complexe formé.

Lors de la réalisation de l'essai de cinétique, la mesure de la concentration en ions ammoniacque a été facilitée par l'utilisation d'un auto-analyseur de marque LACHAT, modèle FIA+ (ZELLWEGER ANALYTICS, LACHAT INSTRUMENTS DIVISION, WI., États-Unis). Les mesures ont été faites à partir de la méthode QuickChem 10-107-06-2-B. La réaction colorimétrique est obtenue par la combinaison des différents réactifs (tampon à base de EDTA, salicylate de nitropusside et hypochlorite) et l'ammoniacque en solution. Lorsque l'ammoniacque, le salicylate et l'hypochlorite sont chauffés en conditions alcalines, une couleur verte est produite. La densité optique a été lue à 660 nm et un logiciel transforme, à partir de la courbe standard, la valeur obtenue en quantité d'ammoniacque.

Ces mesures ont été réalisées à partir d'échantillons filtrés, puis acidifiés avec de l'acide sulfurique concentré (0,5 % v/v) afin d'éviter la précipitation éventuelle des éléments en solution et conservés à 4°C. Afin de certifier les analyses effectués, des contrôles de qualité sont inclus dans les protocoles. Un étalon multi-éléments (Nutrient 2185) a été analysé régulièrement et si le résultat obtenu différait de 10 % de la valeur réelle certifiée, les résultats étaient rejetés et

l'appareil était recalibré. Des étalons ont été préparés dans l'acide sulfurique à partir d'une solution stock à 100 mg NH₄/L et l'appareil a été étalonné entre 0 et 10 mg NH₄/L avant chacune des utilisations.

4,7 Analyse des éléments métalliques en solution

Lors de la période d'acclimatation, les concentrations en cadmium (Cd), en cuivre (Cu), en fer (Fe), en plomb (Pb) et en zinc (Zn) ont été mesurées initialement dans chaque culture et au moment du repiquage, c'est à dire après un mois d'incubation. Un spectromètre à absorption atomique à la flamme VARIAN SpectrAA, modèle 220FS (VARIAN AUSTRALIA PTY LTD, Victoria, Australie) a été utilisé afin de mesurer la concentration de ces éléments dans les différents échantillons. La mesure des concentrations de Pb et de Zn a été réalisée avec des échantillons filtrés, non dilués, acidifiés avec de l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄ 0,5 % v/v) afin d'éviter la précipitation éventuelle des éléments en solution et conservés à 4°C. Les mesures de Cd, Cu et Zn ont été effectuées avec des échantillons filtrés, dilués (1 : 30), acidifiés avec de l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄ 0,5 % v/v) et conservés à 4°C. Afin de certifier les analyses effectués, des contrôles de qualité ont été inclus dans les protocoles. Un étalon multi-éléments SCP (numéro de catalogue 900-Q30-002, numéro de lot SC0019251, SCP SCIENCE, LaSalle, Québec) a été analysé régulièrement et si le résultat obtenu différait de 10 % de la valeur réelle certifiée, les résultats étaient rejetés et l'appareil a été recalibré. Des étalons de chacun des métaux ont été préparés à partir de solutions de références concentrées, de marque FISHER et l'appareil a été calibré avant chaque utilisation.

Comme la lecture du fer en solution peut être affectée par une grande concentration de sulfates et afin de certifier l'absence d'un effet de matrice lors de la lecture des métaux en solution, des ajouts dosés de différentes concentrations ont été réalisés sur différents échantillons. Des concentrations de 100, 200 et 300 mg/L d'une solution de référence de fer certifiée à 1000 mg/L $\pm$ 1 % (FISHER SCIENTIFIC, Ont., Canada) ont été ajoutées et les résultats sont lus de la même façon que décrite précédemment.

4,8 Analyse du carbone organique dissout (COD)

Le dosage du carbone organique en solution a été effectué dans cette expérience, pour chacun des milieux de cultures avant et après l'incubation d'un mois dans les conditions ci-dessus mentionnées. Un appareil de marque SHIMADZU modèle TOC 5000 a été utilisé. Les échantillons ont été filtrés, dilués et conservés à 4°C pour une période maximale de quatre semaines jusqu'à leur analyse.

4,9 Conditions expérimentales

4,9,1 Acclimatation de la souche bactérienne

La croissance bactérienne a été réalisée dans des flacons Erlenmeyers de 500 mL dans lesquels des volumes de 200 mL des différents milieux de culture ont été ajoutés. Le concentré de sulfures a été ajouté à une densité de pulpe de 10 % (p/v). Le pH a été ajustée à 2,5 avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4 2N) pour compenser la libération de carbonates provenant du concentré. Une proportion de 5 % (v/v) d'inoculum a été ajoutée et les cultures ont été incubées à 30°C, sous une agitation de 160 rpm dans un incubateur de marque Lab-Line (Lab-Line Instruments, Melrose, ILL). Lorsque la croissance bactérienne était observée (augmentation du POR au-dessus de 500 mV) dans un milieu de culture donné, la culture était repiquée dans le même milieu mais avec une concentration plus élevée en COD. Les dilutions de ces différents milieux ont été effectuées dans de l'eau distillée et aussi dans le milieu synthétique. Au cours de la période d'incubation, la perte en eau causée par l'évaporation était compensée avec de l'eau distillée. Le pH et le potentiel d'oxydoréduction ont été mesurés à toutes les 48 heures et ce, du début à la fin de la période d'incubation. De plus, au début et à la fin de la période d'incubation, des échantillons de 20 mL de chacune des cultures ont été puisés et filtrés pour fins de mesure des concentration de métaux, d'ions ammoniacques (NH_4^+), d'ortho-phosphates (ortho-PO_4^{3-}) et de carbone organique dissout (COD).

4,9,2 Essais de cinétique

Quatre milieux de culture ont été utilisés pour la réalisation des essais de cinétique. Ces milieux ont été choisis en fonction des performances observées au cours de la période d'acclimatation. Les milieux utilisés pour les essais étaient les suivants : 1) 100 % d'un surnageant de centrifugation de boues secondaires de papeteries, 2) 25 % d'un effluent de déshydratation de boues d'épuration, 3) 5 % d'un surnageant de centrifugation de lisier et 4) 100 % du milieu synthétique. Un contrôle négatif était constitué d'eau distillée (ED). Les effluents de déshydratation des boues secondaires de papeteries et du lisier ont été obtenus par centrifugation des boues et du lisier à 13700 x g pour une période de 20 minutes. Une concentration de 10 % (p/v) de concentré de sulfures lavé a été ajoutée à chacun de ces milieux. Le Tableau 9 présente la caractérisation de ces différents milieux de culture.

La croissance bactérienne a été réalisée dans des Erlenmeyers de 500 mL dans lesquels ont été ajoutés 250 mL de filtrat de déshydratation d'effluents organiques. Le concentré de sulfures a été ajouté à une densité de pulpe de 10 % (p/v). Le pH a été ajusté à 2,5 avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4 2N) pour compenser la libération de carbonates provenant du concentré. Une proportion de 5 % (v/v) d'inoculum a été ajoutée et les cultures ont été incubées à 30°C, sous une agitation de 160 rpm. Au cours de la période d'incubation, la perte en eau causée par l'évaporation a été compensée avec de l'eau distillée. À toutes les 48 heures lors de la période d'incubation, des échantillons de 10 mL de chacune des cultures ont été puisés et filtrés (sur filtre Whatman 234AH) pour fins de mesures de la concentration en fer ferreux (Fe^{2+}) et en fer ferrique (Fe^{3+}). La composition en ions ammoniacque (NH_4^+), ortho-phosphates (ortho-PO_4^{3-}) et carbone organique dissout (COD) a été déterminée initialement et après 30 jours d'incubation. Dans le but de suivre la croissance microbienne, les mesures du pH et du POR ont été effectuées dans chacune des cultures à tous les deux jours.

Tableau 9 **Caractérisation des différents milieux de culture additionnés du concentré de sulfures lavé**

Éléments	Composition des milieux de culture (mg/L)				
	100 % ED ^a	100 % MS	100 % BP	25 % BE	5 % L
N-NH ₄	25,2	638	17,4	16,5	116
P-PO ₄	8,06	94,0	9,96	5,03	2,01
COD	45,2	151	661	189	221
Al	34,5	32,7	32,3	32,9	25,1
Ca	1,0	1	28,2	38,6	18,8
Cd	0,167	0,159	0,211	0,197	0,173
Cr	2,33	2,30	3,29	3,21	2,66
Cu	13,7	10,8	13,2	13,5	11,6
Fe	853	797	734	810	312
K	7,6	198	21,6	13,3	65,8
Mg	25,6	126	22,1	21,7	14,2
Mn	0,78	0,74	6	1,19	0,74
Na	2,59	2,42	153	37,7	35,4
Ni	0,09	0,13	0,34	0,23	0,3
Pb	1,41	1,55	1,67	1,5	1,69
S	89800	92000	94900	89700	92300
Zn	57	54,4	71,7	67,4	58,1

a. Le milieu 100 % eau distillée (noté 100 % ED) réfère à une suspension du concentré de sulfures et non de l'eau distillée pure

4,9,2,1 Analyse des ions ferreux (Fe^{2+}) et ferriques (Fe^{3+})

Les concentrations en ions ferreux (Fe^{2+}) et ferriques (Fe^{3+}) ont été mesurées à toutes les 48 heures, dans chacun des échantillons et ce, par la méthode à la phénantroline (APHA *et al.*, 1989). Les réactifs nécessaires au dosage des ions ferreux sont une solution tampon à base d'acide acétique glacial et la solution de phénantroline. Le principe est le suivant : trois molécules de 1,10-phénantroline iront se chélater avec une molécule de fer ferreux pour former un complexe de couleur rouge-orangée. Les mesures de densités optiques étaient effectuées à 510 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre de marque MILTON ROY COMPANY, modèle UV VISIBLE SPECTRONIC 601 (MILTON ROY COMPANY, États-Unis). Les valeurs de densité optique obtenues ont été converties en quantité de fer en mg/L à l'aide d'une courbe standard établie à partir de différents étalons contenant entre 0 et 80 mg Fe/L.

La mesure du fer total en solution a été déterminée par l'ajout d'une solution d'hydroxylamine. L'ajout de ce réactif permet de réduire le fer ferrique en fer ferreux. De la même façon que décrit précédemment la solution de phénantroline a été ajoutée et la densité optique a été lue à 510 nm. La quantité de fer ferrique en solution a été obtenue par la soustraction de la concentration du fer ferreux à celle du fer total.

Chacune de ces mesures a été réalisée à partir d'échantillons filtrés (sur filtre Whatman 234AH), dilués et acidifiés avec de l'acide sulfurique concentré (0,5 % v/v) afin d'éviter la précipitation éventuelle des éléments en solution.

4,9,3 Caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile

La croissance bactérienne a été réalisée dans des Erlenmeyers de 500 mL selon la méthode décrite à la section 4,9,1.

4,9,3,1 *Mesure des populations microbiennes hétérotrophes acidophiles*

Les populations hétérotrophes acidophiles présentes dans les quatre milieux de culture décrits précédemment ont été dénombrées par la méthode d'ensemencement sur gélose. Pour ce faire, cinq milieux de culture solides ont été utilisés. D'une part, quatre milieux sont constitués avec les quatre effluents organiques, préparés à double concentration, acidifiés à pH 2,5 (H_2SO_4 2N), autoclavés à 120°C pour une période de 20 minutes. Après que la température ait atteint une valeur située autour de 70°C, une solution d'agar stérilisée est ajoutée à une concentration de 30 g/L. Le cinquième milieu, « glucose trypticase soy broth » (GTS-2,5), a été aussi préparé à double concentration, ajusté à pH 2,5, autoclavé et mélangé à 30 g/L d'agar préalablement stérilisé. La composition de ce milieu (1x) est la suivante (par litre d'eau distillée) : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; KCl, 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; α -D-glucose, 1,0 g; milieu Bacto Tryptic Soy Broth (DIFCO, France), 0,1 g (Harrison, 1981). La préparation des échantillons servant d'inoculum était la suivante : aux jours 0, 7, 14 et 28 de la période d'incubation, un échantillonnage de chacun des quatre milieux a été effectué. Un volume de 1 mL de chacune des quatre cultures a été puisé de façon aseptique et dilué dans des tubes de verre contenant 9 mL d'eau distillée stérile, acidifié à pH 2,5 (H_2SO_4 2N). Des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} ont été obtenues. Ces dilutions servent alors d'inoculum pour l'ensemencement des boîtes de Pétri. Des volumes de 0,1 mL des trois dilutions ont été déposés en triplicata à la surface des géloses correspondant à l'effluent organique de laquelle elles sont issues et aussi sur le milieu GTS-2,5, puis étalées à l'aide de tiges de verre stériles. Les milieux ont été incubés à 30°C pour une période de 120 heures. Les boîtes de Pétri contenant entre 30 et 300 colonies ont été utilisées pour la calcul de la concentration de microorganismes.

4,9,3,2 *Identification des microorganismes*

Une caractérisation primaire de la morphologie des colonies formées sur les milieux solides a permis d'identifier le groupe auquel appartenaient les organismes hétérotrophes acidophiles retrouvés. Par la suite, ces organismes ont été repiqués sur un milieu constitué d'extrait de malt gélosé à 2 % et incubés à 30°C. L'identification du genre a été effectuée selon les critères morphologiques par observation directe au microscope optique.

CHAPITRE 5 – RÉSULTATS ET DISCUSSION

5,1 Acclimatation de la souche bactérienne

Un échantillon de bactéries ferro-oxydantes indigènes des boues d'épuration municipales a été acclimaté sur une période de 11 mois, à une croissance en présence de matière organique dans trois milieux de culture différents (surnageant de lisier de porc, de boues de papetière et de filtrat de boues d'épuration municipale). Les résultats sont présentés dans les sections suivantes.

5,1,1 Acclimatation à un surnageant de centrifugation de boues de papetières

L'augmentation du POR est attribuée à l'augmentation du rapport fer ferrique / fer ferreux ($\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$) dans le milieu de culture (Pesic *et al.*, 1989). Sous ces faibles conditions de pH (inférieur à 2,0), l'augmentation de la concentration de Fe^{3+} nécessite la croissance microbienne. Les résultats de précédentes études (Lundgren *et al.*, 1964; Monod, 1942) suggèrent que la croissance de *Thiobacillus ferrooxidans* est directement proportionnelle à la concentration du Fe^{2+} oxydé. Le choix d'utiliser la valeur du POR afin d'estimer la croissance microbienne a donc été fait dans le cadre de ce projet. Plusieurs autres études utilisent aussi la concentration du substrat oxydé contrairement à la quantité de biomasse formée afin d'évaluer la croissance microbienne (Lizma et Suzuki, 1989; Harvey et Crundwell, 1997).

L'oxydation du concentré de sulfures métalliques en utilisant différentes concentrations du surnageant de boues de papetières est, dans la majorité des cas, similaire à celle obtenue par le contrôle positif. Par contre, la valeur du POR augmente après une période de latence de 2 jours dans chacune des expériences et a atteint une valeur maximale (550 mV) après une période d'environ 10 jours (Figure 4). Toutefois, après cette période, l'allure de la courbe reste la même. Une concentration en carbone organique dissout située entre 40 et 350 mg/L ne semble pas compromettre l'oxydation microbienne du concentré de sulfures. Une tendance à la baisse est notée dans chacun des milieux de culture, après 25 jours d'incubation. Ce comportement est expliqué par l'apparition de la phase de mortalité.

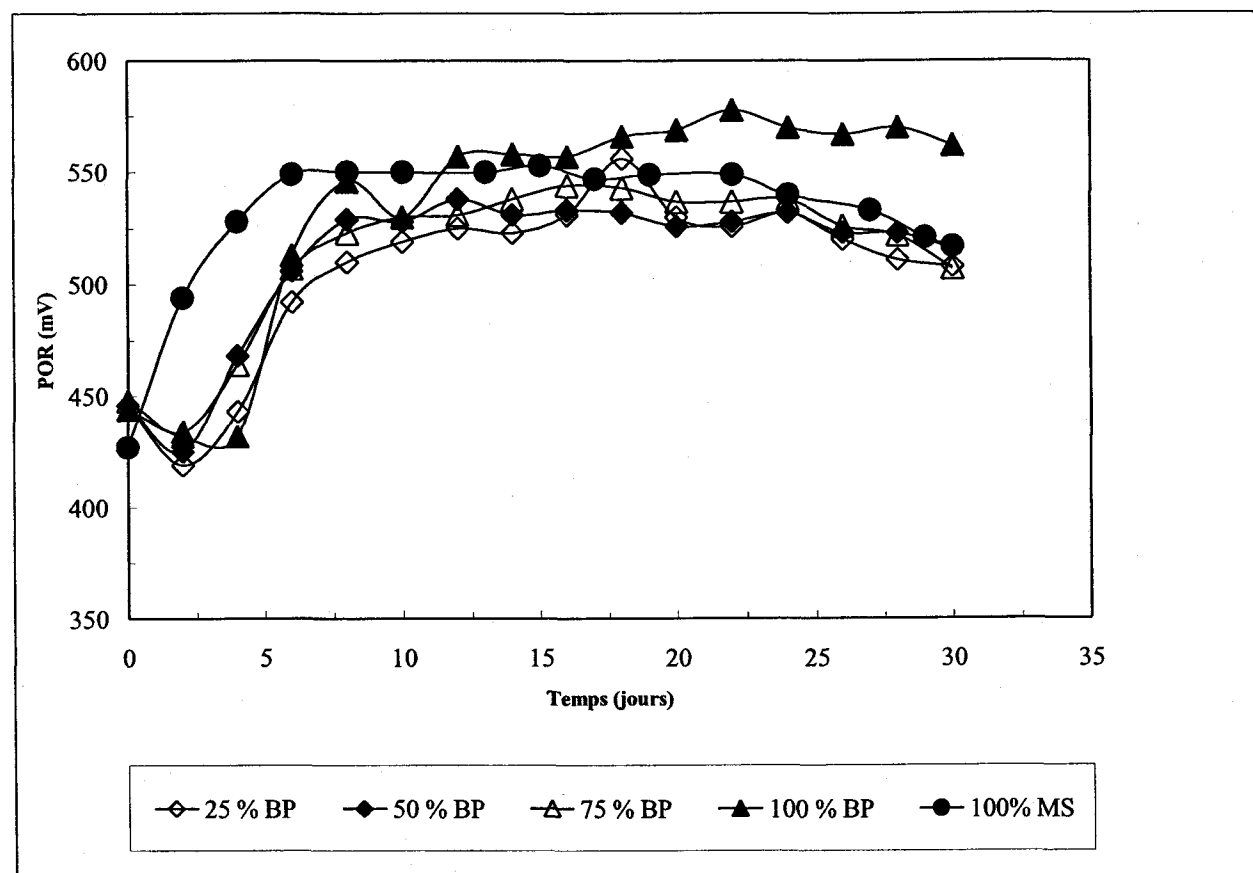


Figure 4 Évolution du POR dans le temps pour quatre dilutions de l'effluent de déshydratation de boues de papetières

5,1,2 Acclimatation à un effluent de déshydratation de boues d'épuration municipales

La valeur du POR a augmenté de 425 mV à 550 mV pour les échantillons contenant 25 %, 50 % et 75 % de filtrat de boues d'épuration municipales (Figure 5). Une période de latence de 7 à 20 jours a été enregistrée. Les résultats indiquent que la période de latence augmente en fonction de la proportion de filtrat boues dans le milieu de culture donc de la concentration en carbone organique dissout.

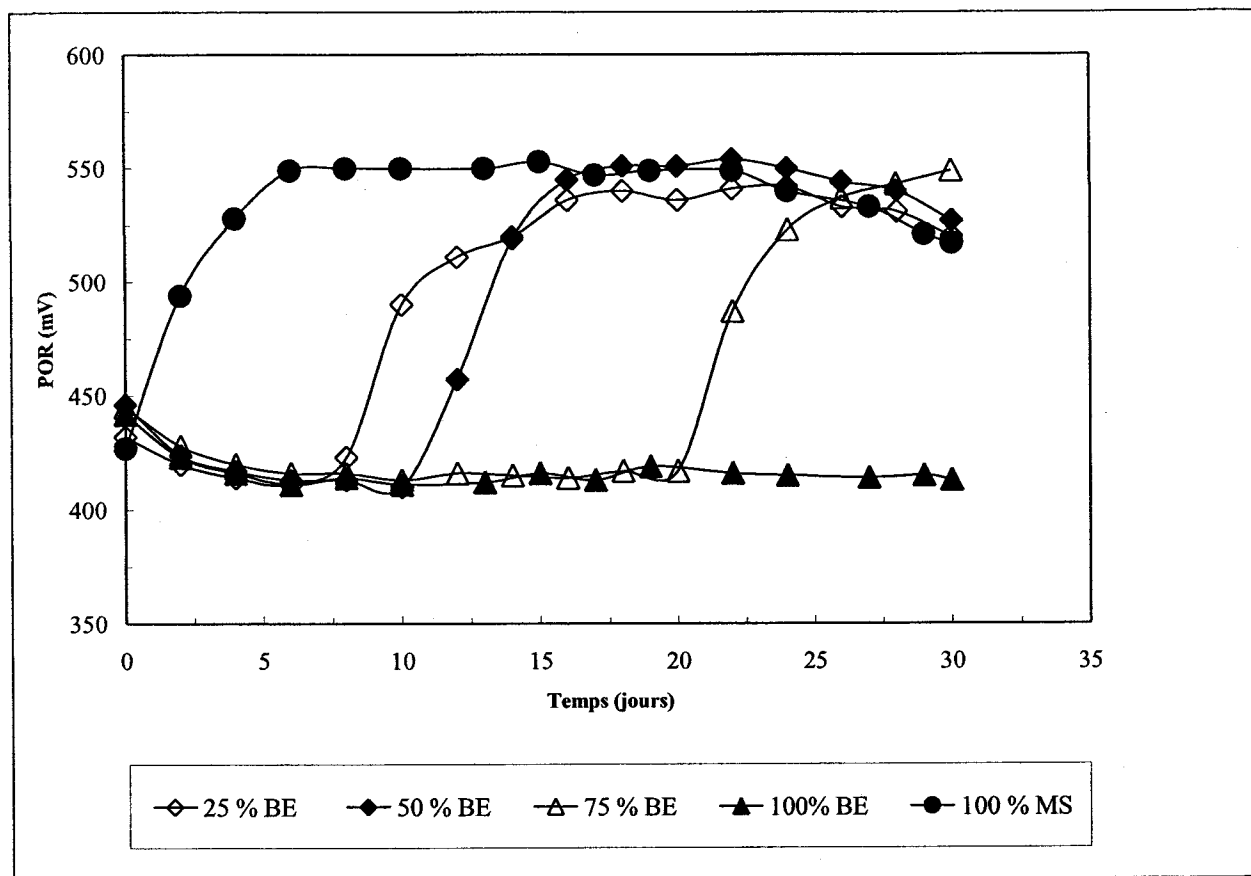


Figure 5 Évolution du POR dans le temps pour quatre dilutions de l'effluent de déshydratation de boues d'épuration municipales

Selon cette même figure, pour les échantillons contenant 100 % de filtrat de boues d'épuration, la valeur du POR décroît lentement et se stabilise autour de 400 mV pour le reste de la période d'incubation. L'oxydation des sulfures ne semble pas avoir lieu dans les échantillons concentrés en filtrat de boues d'épuration. Une concentration élevée en carbone organique dissout issue des boues d'épuration inhibe l'activité bactérienne. Selon Tuttle et Dugan (1976), les composés organiques peuvent affecter le comportement des bactéries ferro-oxydantes en réagissant, de façon non biologique, avec le fer ferreux à l'extérieur de la cellule ou en affectant, de façon non-sélective, le rôle des protéines transmembranaires de l'enveloppe ou la membrane cellulaire. Aussi, selon ces mêmes auteurs, un autre facteur contribuant à l'inhibition de l'oxydation du fer

est l'électronégativité des molécules organiques, c'est à dire la capacité d'une molécule à attirer les électrons. Plus la molécule organique possède une valeur d'électronégativité élevée, moins son action sera inhibitrice.

5,1,3 Acclimatation à un surnageant de centrifugation de lisier de porc

La Figure 6 illustre l'oxydation microbienne du concentré de sulfures dans différentes concentrations du surnageant de centrifugation de lisier de porc. Aucune augmentation du POR n'a été observée pour les échantillons contenant 25 %, 50 %, 75 % et 100 % d'effluent de lisier, durant la période d'incubation. Le POR a atteint une valeur minimale située autour de 400 mV et est resté constant pour toute la période d'incubation. Une grande concentration en composés organiques dissout dans ces milieux de culture semble être la raison pour laquelle les bactéries ne peuvent croître.

Pour les milieux constitués de 5 % du surnageant de centrifugation de lisier, la valeur du POR commence à augmenter après une période de latence de 25 jours et atteint une valeur maximale de 550 mV. Une période de latence beaucoup plus importante est observée en comparaison à celles obtenues en présence du surnageant de centrifugation de boues de papetières ou du filtrat de déshydratation de boues d'épuration. Une concentration plus importante en composés organiques dissouts mais aussi la nature de ces composés peut expliquer un tel comportement.

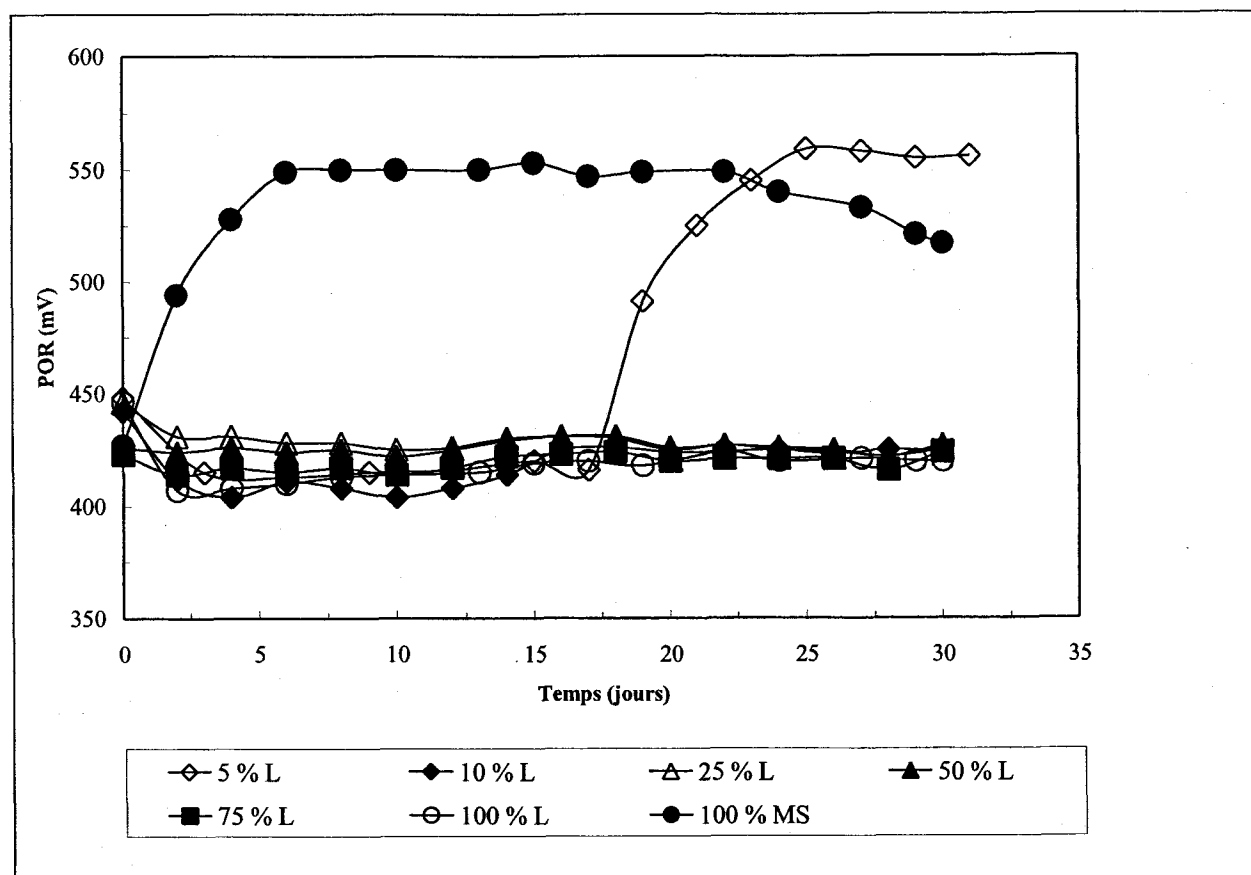


Figure 6 Évolution du POR dans le temps pour cinq différentes dilutions du surnageant de centrifugation de lisier de porc

5,2 Détermination de la concentration maximale inhibitrice en COD

La détermination de la quantité maximale inhibitrice en carbone organique dissout (COD) est un paramètre de première importance. Cette valeur permet de déduire la concentration maximale, au-dessus de laquelle la croissance microbienne devient impossible. Pour ce faire, un graphique représentant la valeur du POR en fonction de la concentration en COD a été construit (Figure 7). Les valeurs de POR retenues correspondent aux valeurs maximales lues au cours de la phase stationnaire dans chacun des milieux correspondant. Pour les milieux constitués du surnageant de centrifugation de boues de papeteries, des concentrations de COD inférieures ou égales à 350 mg/L n'ont pas d'effet sur l'oxydation microbienne du concentré de sulfures. Pour les milieux constitués de filtrat de boues d'épuration, les valeurs de POR restent stables jusqu'à une

concentration en COD de 500 mg/L et décroît par la suite autour de 400 mV. Enfin, pour les milieux constitués de surnageant de centrifugation de lisier de porc, les valeurs de POR restent stables jusqu'à une concentration de 180 mg/L. Une concentration supérieure à 180 mg/L et 500 mg/L sera inhibitrice pour des bactéries cultivées dans un milieu à base de surnageant de centrifugation de lisier et de boues d'épuration respectivement. La comparaison de ces résultats montre que l'activité bactérienne est liée à la nature des composés organiques autant qu'à leur concentration. Par exemple, une concentration en COD de 300 mg/L inhibera la croissance en présence du surnageant de centrifugation de lisier mais permettra une croissance en présence du surnageant de boues de papeteries et du filtrat de boues d'épuration.

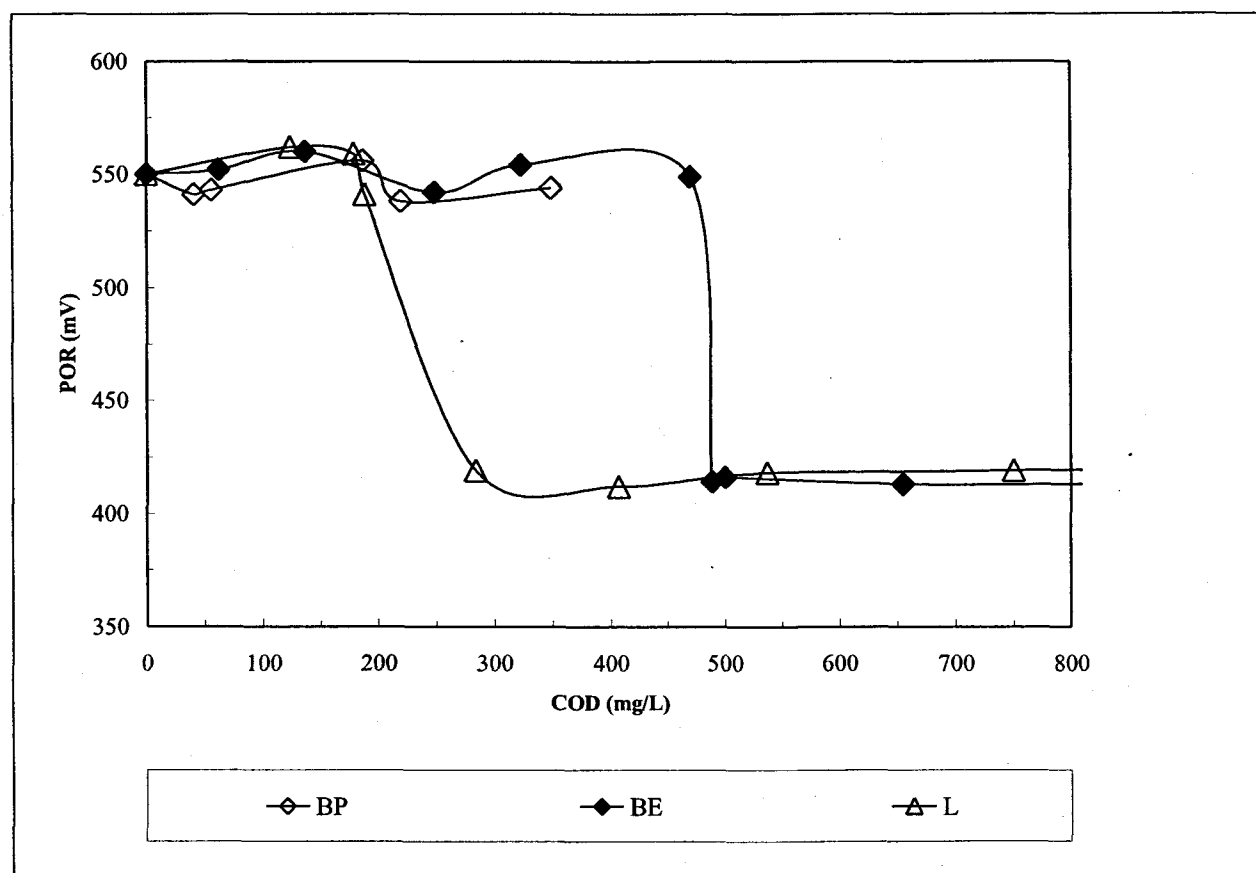


Figure 7 POR maximal atteint en fonction de la concentration de carbone organique dissout pour différentes dilutions des trois milieux de culture testés

Les composés organiques présents dans les différents milieux sont certainement de nature différente. Selon Tuttle et Dugan (1976), plusieurs composés organiques comme par exemple les acides carboxyliques, les détergents anioniques ou les agents surfactants, les acides aminés, les hydrates de carbone, etc. sont connus comme étant des inhibiteurs de l'oxydation du fer ou de la croissance microbienne de *T. ferrooxidans*. D'après les travaux menés par Tuttle et Dugan (1976), les acides carboxyliques peuvent être classés dans la catégorie des composés organiques possédant un effet inhibiteur très élevé. L'inhibition importante de l'activité microbienne dans les milieux à base du surnageant de centrifugation de lisier de porc, même en faible proportion, résulte probablement de la nature complexe des composés organiques présents dans ce type d'effluent. Le lisier issu des porcheries contient parfois des quantités appréciables de différents antibiotiques (p.ex. tétracycline) administrés aux animaux, dont la stabilité demeure stable une fois rejetés dans l'environnement (Kuhne *et al.*, 2000). Les composés organiques présents dans le surnageant de boues de papeteries et dans le filtrat de boues d'épuration municipales sont de nature moins toxique que ceux présents dans le lisier de porc. Des composés comme par exemple des acides humiques ou des détergents se retrouvent souvent dans les boues d'épuration. Les boues de papeteries contiennent des fibres de cellulose, hémi-cellulose et lignine (Adewuyi et Charmichael, 1986; Petronio *et al.*, 1993).

Comme mentionné précédemment, les réactions chimiques et métaboliques apparaissant dans la lixiviation biologique des sulfures métalliques, sont souvent le résultat d'un ensemble d'espèces bactériennes travaillant en étroite collaboration ou en successions essentielles à l'élaboration des conditions optimales de température, d'acidité et de disponibilité de la matière organique (Ralph, 1985). En ce sens, l'activité des bactéries ferro-oxydantes dans un milieu de culture contenant de grandes concentrations en matière organique peut être augmentée par la présence de bactéries hétérotrophes (Pronk et Johnson, 1992). Ces organismes se nourrissent de la matière organique toxique aux autotrophes et débarrassent ainsi le milieu des éléments qui inhibent la croissance de ces dernières. Le Tableau 10 présente la diminution de la concentration en COD entre le premier et le dernier jour d'incubation de différents échantillons. Cette diminution est attribuée à la croissance des organismes hétérotrophes acidophiles. La réduction de la concentration en COD est située entre 64 % et 78 % pour les milieux constitués de surnageant de centrifugation de boues de papeteries. Entre 73 % et 94 % pour les milieux à base de filtrat boues d'épuration municipales et entre 23 % et 59 % pour les milieux à base de surnageant de lisier de porc. Dans

les milieux constitués de surnageant de boues de papetières et de filtrat de boues d'épuration, l'élimination du COD est supérieure à celle observée dans les milieux à base de surnageant de centrifugation de lisier de porc. Ce fait confirme que les composés organiques présents dans l'effluent de déshydratation de lisier sont plus difficiles à biodégrader. Récemment, Gamache *et al.* (2001) ont observé et mesuré la croissance d'organismes hétérotrophes acidophiles au cours de procédés de biolixiviation de boues d'épuration municipales. Quelques recherches préliminaires, réalisées dans le cadre de cette présente étude, ont permis de mettre en évidence l'existence de ce type d'organismes. Les résultats démontrent la présence, d'une moisissure à une concentration située entre 4×10^4 et 7×10^4 UFC/mL

Le Tableau 10 présente aussi les concentrations en ammoniacque et ortho-phosphate dans le milieu synthétique en comparaison à celles mesurées des différents effluents organiques. La concentration en ammoniacque et en phosphates est plus élevée dans le milieu synthétique en comparaison aux filtrats de boues de papetières et de boues d'épuration. Néanmoins, une oxydation des sulfures a été observée en dépit de ces plus faibles concentrations. Ce qui porte à croire que la quantité minimale inhibitrice d'ammoniacque est inférieure à 20,4 mg/L et la quantité minimale de phosphate requise est inférieure à 18,2 mg/L. La concentration en ammoniacque et en phosphates dans l'effluent de déshydratation de lisier est supérieure, dans les deux cas, à celle retrouvée dans le milieu synthétique. Ce qui peut aussi expliquer l'important pouvoir inhibiteur de ce milieu de culture envers l'oxydation des sulfures.

L'oxydation microbienne des sulfures entraîne dans les milieux de cultures une diminution du pH de 2,2 initialement à des valeurs aussi faibles que 1,1 (Tableau 10 et Figure 8). Cette diminution du pH est attribuée à l'accumulation de l'acide sulfurique générée au cours de l'oxydation de la pyrite, selon l'équation (Boon *et al.*, 1999; Nemati *et al.*, 1998) :

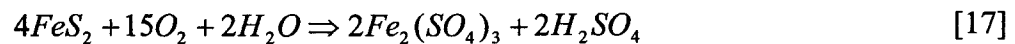


Tableau 10 Mesures initiales et finales des différents paramètres au cours de la biolixiviation

Milieux	pH		POR (mV)		COD (mg/L)		N-NH ₄ (mg/L)		P-PO ₄ (mg/L)	
	initial	final	initial	final	initial	final	initial	final	initial	final
Surnageant de boues de papetières (BP)										
25 % BP	2,23	1,71	446	508	187	61,6	20,4	5,09	25,6	24,2
50 % BP	2,23	1,69	446	516	221	78,8	21,7	5,09	29,6	26,8
75 % BP	1,84	1,69	448	507	350	75,6	28,5	12,0	40,7	30,7
100 % BP	2,21	1,73	444	557	233	67,7	23,3	5,55	53,7	33,5
Filtrat de boues d'épuration (BE)										
25 % BE	2,20	1,74	432	520	249	63,7	25,5	8,43	18,2	21,4
50 % BE	2,19	1,96	446	527	323	86,2	49,5	53,1	5,81	5,20
75 % BE	2,21	1,99	445	549	470	83,7	70,9	74,1	7,68	5,32
100 % BE	2,22	2,03	454	410	834	655	99,6	101	9,61	5,68
Surnageant de lisier de porc (L)										
5 % L	2,37	1,33	445	541	189	78,5	101	72,2	10,7	17,6
10 % L	2,43	1,71	442	424	404	61,9	203	192	17,6	6,88
25 % L	2,07	2,25	446	425	1550	950	558	546	63,0	23,0
50 % L	2,09	2,25	426	427	2810	1870	1120	1080	103	59,3
75 % L	2,16	2,35	423	424	4300	2580	1590	1550	111	83,3
100 % L	2,20	2,05	403	420	4000	3100	n.d.	1870	n.d.	115
Milieu synthétique (MS)										
100 % MS	2,21	1,25	427	517	71,5	36,0	667	607	94,9	120

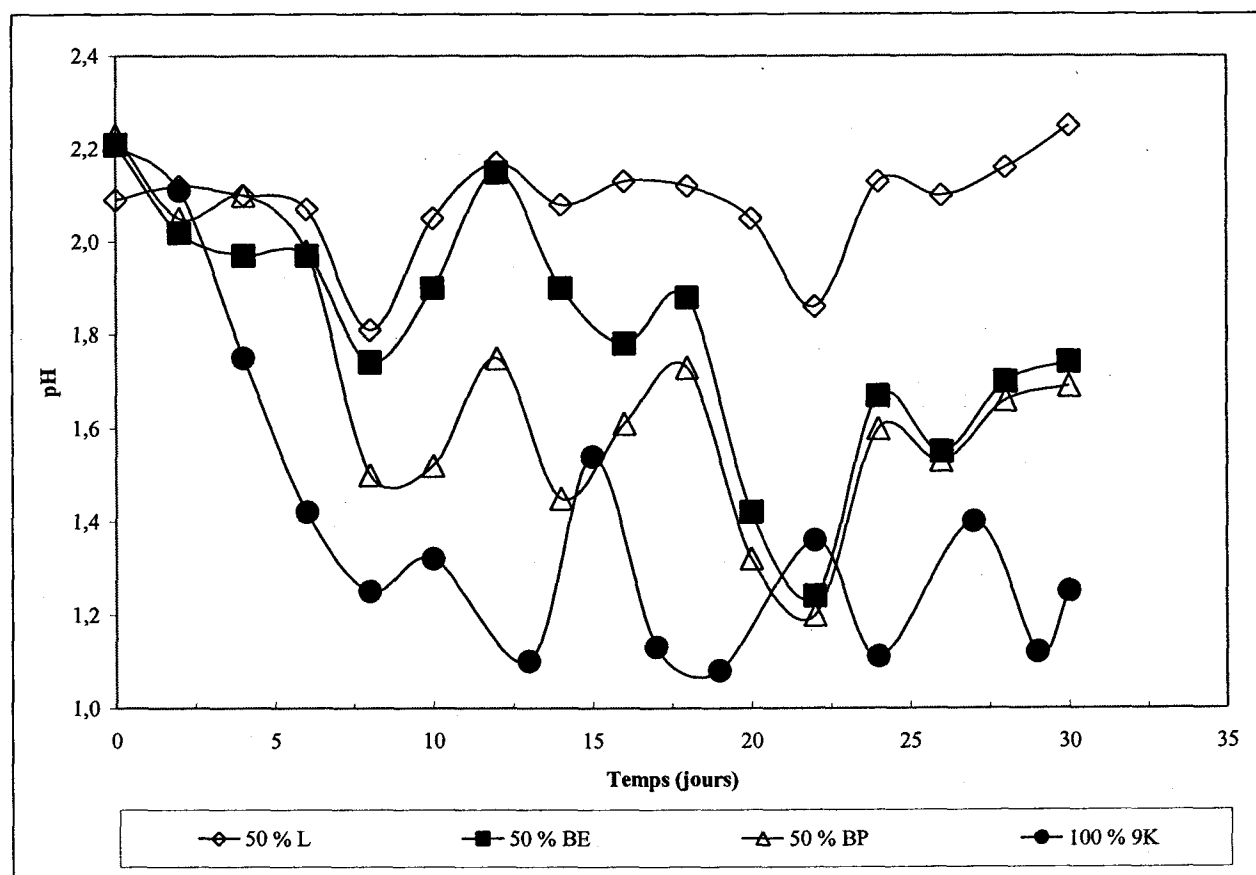
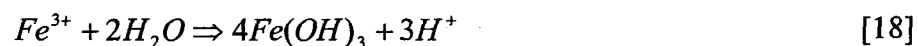
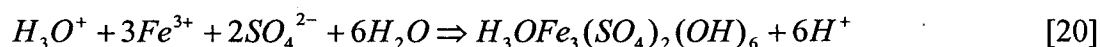


Figure 8 Évolution du pH dans le temps pour trois conditions testées en plus du contrôle positif

La baisse du pH peut aussi être reliée à l'accumulation de protons issus de la réaction entre le fer ferrique et l'eau (Lacey et Lawson, 1970) :



Les grandes fluctuations rencontrées sur cette même figure au cours de la période d'incubation peuvent être dues à la formation de précipités de jarosite et autres oxyhydroxydes de fer. Les équations 19 et 20 présentent ce phénomène (Jensen et Webb, 1995) :



5.3 Oxydation du fer ferreux après une période d'acclimatation d'un an

Les résultats présentés précédemment sont issus de la période d'acclimatation de la bactérie *Thiobacillus ferrooxidans* à une croissance en présence de différentes concentrations des trois effluents organiques testés. Les conditions optimales de croissance dans chacun des milieux soit, 100 % de surnageant de boues de papetières, 25 % de filtrat de boues d'épuration et 5 % de surnageant de lisier de porc, ont été déterminés à partir de ces résultats. La présente section met en évidence la différence au niveau de l'oxydation du concentré de sulfures avant et après la période d'acclimatation. Les Figures 9, 10 et 11 présentent l'évolution du potentiel d'oxydoréduction en fonction du temps pour différents milieux de culture contenant respectivement du surnageant de centrifugation de boues de papetières, du filtrat de boues d'épuration et du surnageant de centrifugation de lisier de porc. Sur chacun des graphiques, les résultats sont toujours comparés au contrôle positif, constitué de milieu synthétique et au contrôle négatif, constitué d'eau distillée. Comme le POR est une représentation du taux d'oxydation du fer ferreux en fer ferrique (Pesic *et al.*, 1989), il est possible de croire qu'une très faible oxydation du sulfure métallique ait eu lieu dans le contrôle négatif puisque la valeur maximale du POR se situe autour de 460 mV puis diminue et reste stationnaire à 400 mV. Contrairement au contrôle négatif, une valeur maximale supérieure à 575 mV a été enregistrée dans le contrôle positif et aucune phase de mortalité ne fût observée. Le temps de latence enregistré dans le contrôle positif était de 2 jours.

La vitesse d'oxydation du fer ferreux dans le milieu constitué du surnageant de boues de papetières (Figure 9) semble très efficace mais le plateau (phase stationnaire) est plus court que celui retrouvé avec le milieu synthétique. La phase de mortalité, c'est à dire la période au cours de laquelle le nombre de germes viables diminue débute après 12 jours d'incubation. Le POR maximal est aussi beaucoup plus faible que celui observé à l'intérieur du contrôle positif et se

situe autour de 530 mV. La Figure 10 présente les résultats obtenus avec le filtrat de boues d'épuration. Le temps de latence de 7 jours est beaucoup plus long que celui obtenu avec le milieu synthétique (2 jours). Ce résultat s'explique par la présence dans les boues d'épuration, de carbone organique dissout en plus grande concentration, par le type de molécules organiques mais aussi par la présence de composés inhibiteurs comme des détergents. Le POR maximal est comparable à celui obtenu précédemment avec le surnageant de boues de papetières, soit de 530 mV et la phase de mortalité survient progressivement. La période de latence obtenue avec le surnageant de centrifugation de lisier (Figure 11) est de 15 jours, ce qui est plus important qu'avec les deux autres milieux mais légèrement plus faible en comparaison à la période de latence obtenue au début de la période d'acclimatation qui était de 17 jours. Cette période de latence représente le temps requis aux organismes hétérotrophes pour détoxifier le milieu de culture. La présence d'antibiotiques dans le lisier de porc peut expliquer ce temps de latence. Le POR maximal est élevé (550 mV) et la phase de mortalité ne débute pas pendant de la période d'incubation.

Les Figures 9, 10 et 11 présentent une décroissance du POR au cours des deux premiers jours d'incubation. Cette observation peut être expliquée de deux façons : d'abord, l'inoculum qui est ajouté au milieu frais supporte une activité microbienne importante. Toutefois, lors d'un changement rapide des conditions environnementales, les cellules subissent un stress et entrent en phase de latence. Aussi, l'inoculum ajouté au départ contient une quantité importante d'ions Fe^{3+} qui sont réduits lors de leur passage dans le nouveau milieu de culture, du à la valeur de pH, qui est plus élevée.

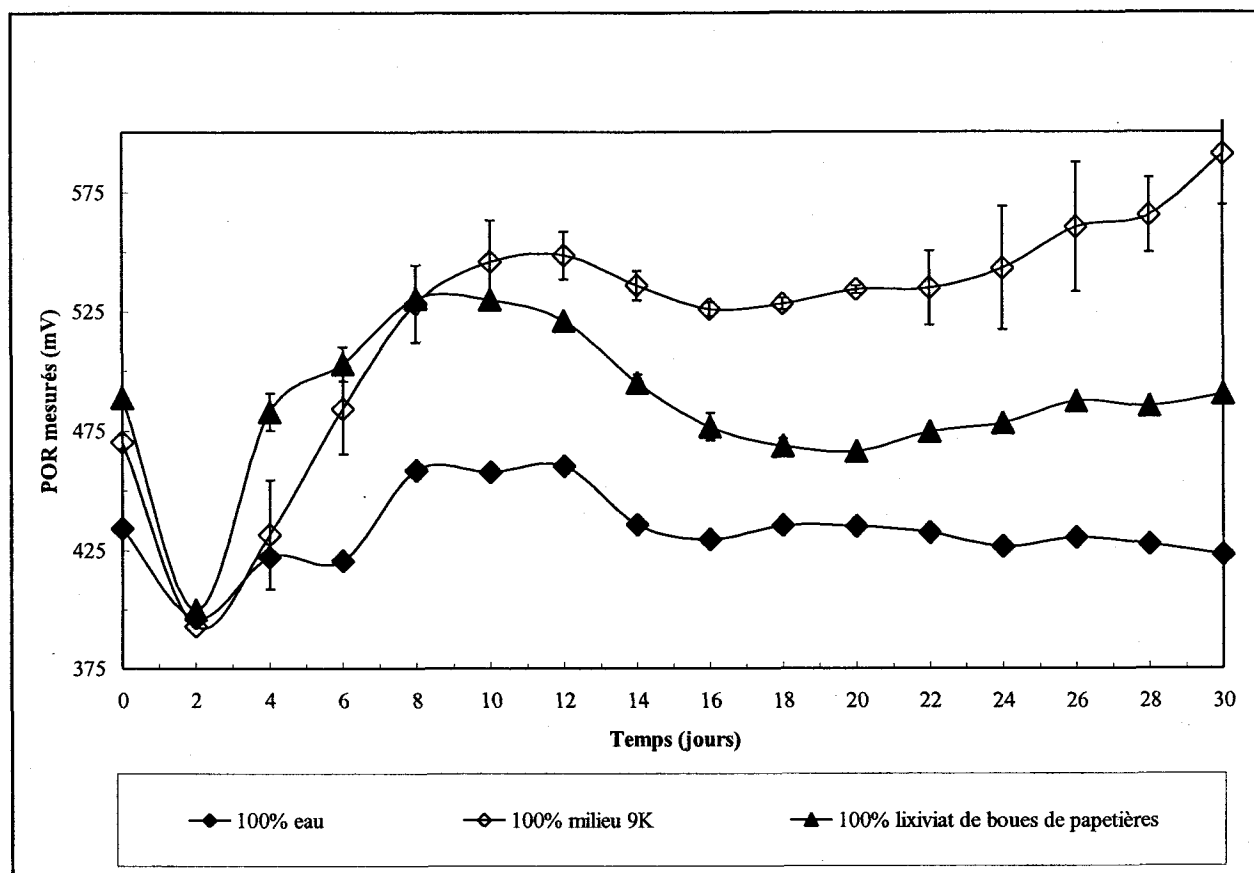


Figure 9 Évolution du POR dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de boues de papetières concentré

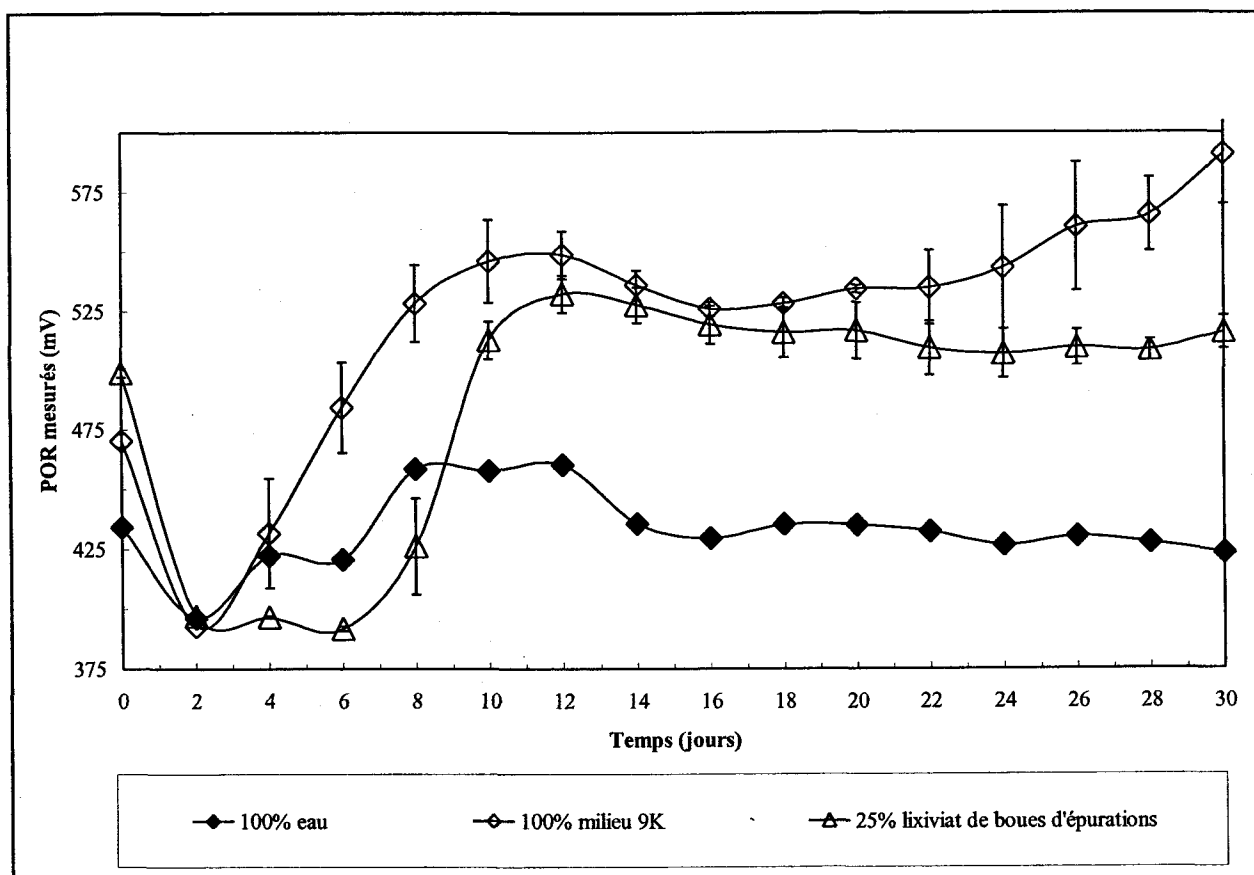


Figure 10 Évolution du POR dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de boues d'épuration

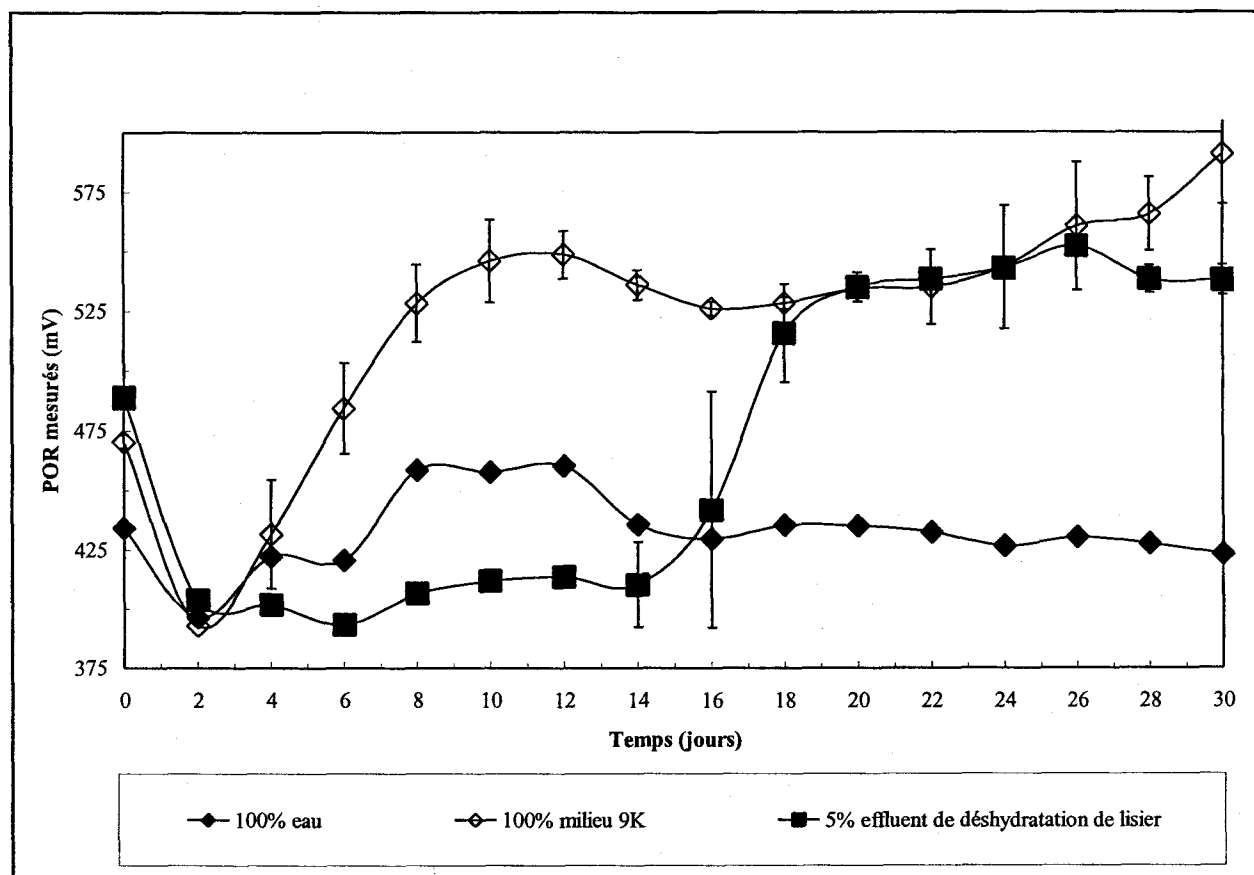


Figure 11 Évolution du POR dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de lisier de porc

L'évolution du pH dans les cultures (Figures 12, 13 et 14) suit sensiblement le même comportement que celui présenté dans la section précédente. Initialement autour de 2,3, il atteint des valeurs minimales situées entre 1,2 et 1,4. Pour ce qui est du contrôle négatif, constitué uniquement d'eau et de résidus miniers, le pH initialement ajusté à 2,5 atteint une valeur minimale située autour de 1,8 et les fluctuations sont beaucoup moins importantes que celles observées avec les autres milieux. Une très faible production d'acide sulfurique et une faible accumulation des ions H^+ , se traduisant par une baisse du pH modérée, explique ce phénomène. Ce résultat est attribué à l'absence ou à une faible croissance microbienne dans le contrôle négatif.

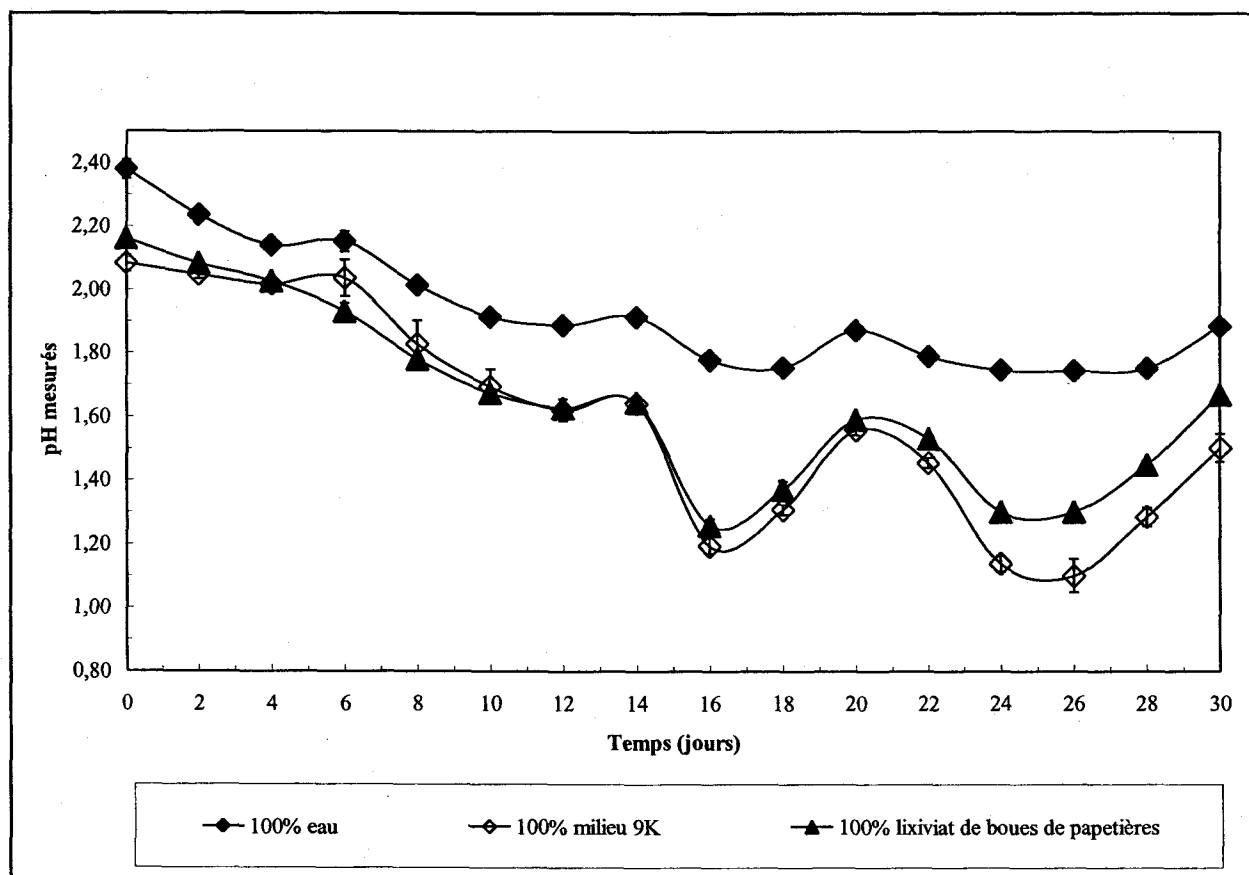


Figure 12 Évolution du pH dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de boues de papetières concentré

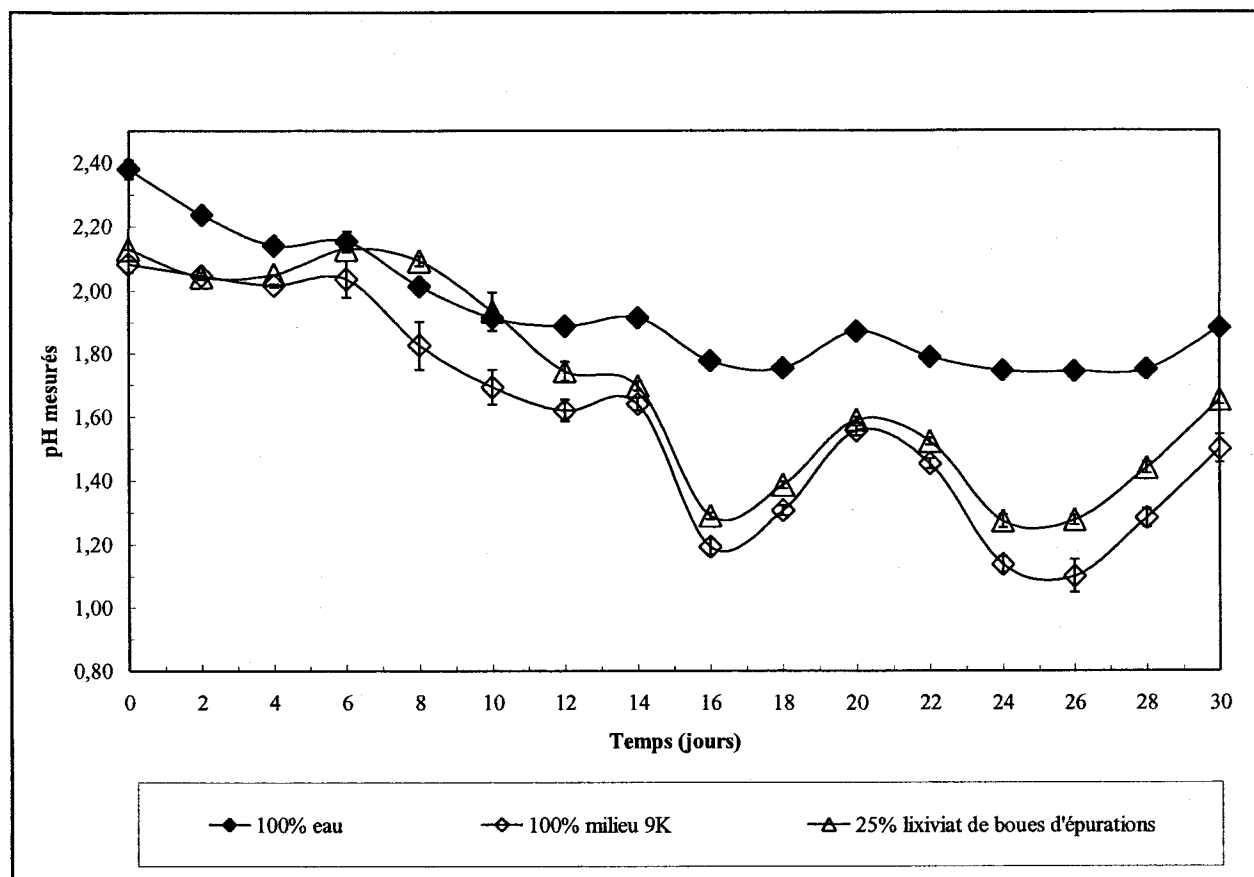


Figure 13 Évolution du pH dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de boues d'épuration

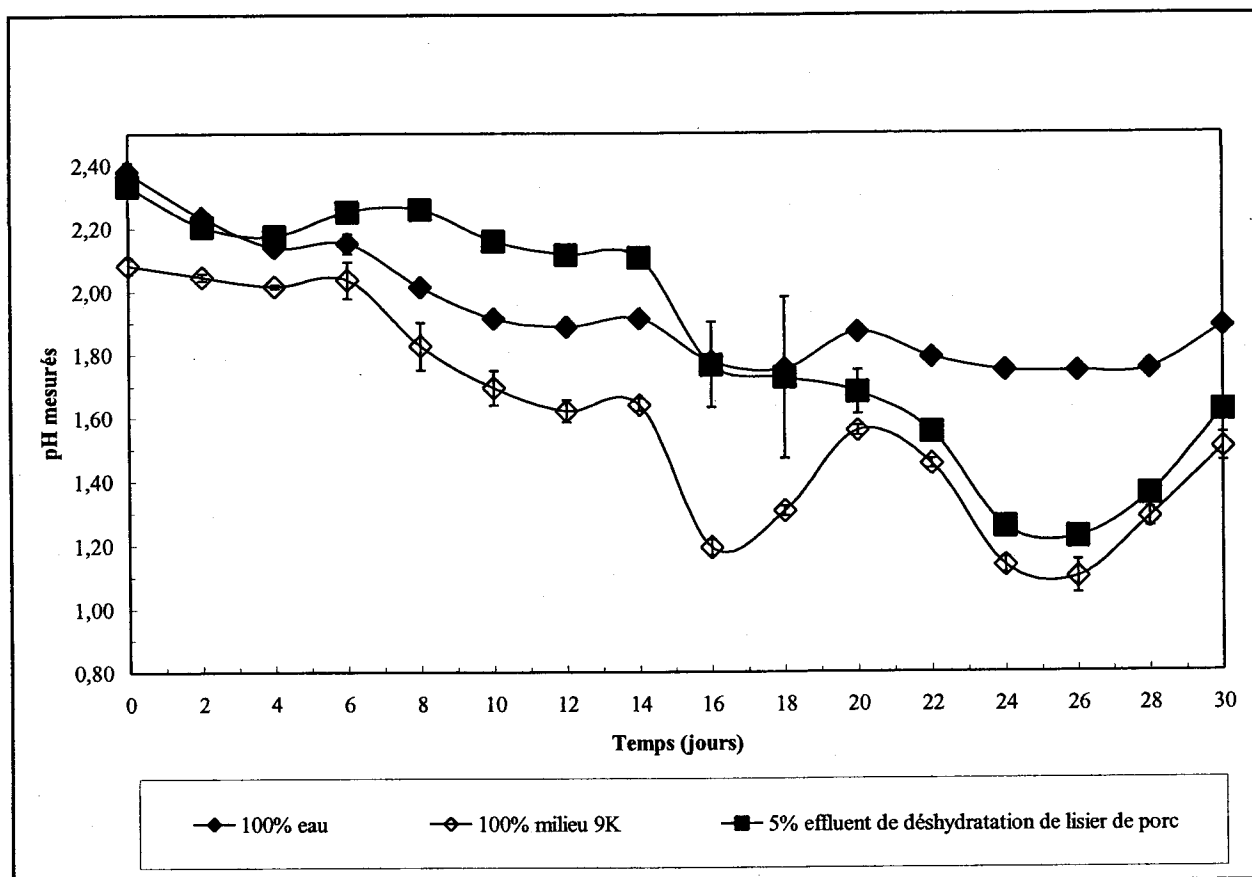


Figure 14 Évolution du pH dans le temps des cultures à base d'effluent de déshydratation de lisier de porc

5,4 Lixiviation des métaux au cours de la période d'acclimatation

Le Tableau 2 présenté précédemment illustre la composition en métaux du concentré de sulfures après digestion totale à l'acide (HF). Ces valeurs ont été utilisées afin de calculer les pourcentages de solubilisation des métaux. Cette information est obtenue de la façon suivante :

$$\frac{[M_s]}{[M_T]} * 100 \quad [21]$$

où M_s représente la concentration du métal en solution à la fin de la période d'oxydation;

et M_T représente la valeur de la concentration totale du concentré de sulfures.

Le Tableau 11 illustre la concentration en métaux en solution et les pourcentages de solubilisation dans les différents milieux de culture. De façon générale, la solubilisation des métaux dans les différents milieux de culture est faible (7,5 % à 44,5 %) en comparaison au contrôle positif fait à base de milieu synthétique (32,3 % à 55,5 %). Lorsque l'on compare les trois effluents entre eux, les meilleurs rendements de solubilisation du fer, du cuivre et du zinc sont obtenus avec le surnageant de centrifugation de boues de papetières, 44,5 %, 42,6 % et 34,9 % respectivement. Le fer est mieux solubilisé que le cuivre et le zinc. À première vue, ces résultats semblent faibles. Toutefois, lorsque l'on compare la concentration initiale et la concentration finale de fer, l'écart démontre que la solubilisation est non négligeable. Dans les milieux constitués de 50 % de surnageant de boues de papetières et de filtrat de boues d'épuration et 50 % d'eau distillée, la concentration de fer en solution est respectivement de 7980 mg/L et 8090 mg/L. La quantité de fer solubilisé dans le milieu constitué de 5 % d'effluent de déshydratation de lisier et 95 % d'eau distillée est de 8780 mg/L.

Tableau 11 Concentration et pourcentages de solubilisation du cuivre, du fer et du zinc après un mois d'incubation

Milieux	Éléments								
	Cu (mg/L)			Fe (mg/L)			Zn (mg/L)		
	initial	final	sol. (%)	initial	final	sol. (%)	initial	final	sol. (%)
Surnageant de centrifugation de boues de papetières									
25 % BP	74,1	105	37,0	3030	11000	33,5	254	426	30,6
50 % BP	74,2	101	35,6	3104	11100	33,5	250	437	31,4
75 % BP	69,8	93,7	33,0	3080	11000	33,5	244	426	30,6
100 % BP	70,8	121	42,6	1879	14600	44,5	266	485	34,9
Effluent de déshydratation de boues d'épuration									
25 % BE	89,7	119	41,9	3760	13400	40,8	268	404	29,1
50 % BE	70,2	96,5	34,0	2830	10900	33,2	237	356	25,6
75 % BE	66,3	88,3	31,1	2770	8120	24,8	227	312	22,4
100 % BE	n.d.	69,2	24,4	2800	2830	8,63	n.d.	219	15,8
Surnageant de centrifugation de lisier de porc									
5 % L	65,6	103	36,3	1810	10600	32,3	242	398	28,6
10 % L	72,5	81,1	28,6	1990	1940	5,91	240	271	19,5
25 % L	71,9	83,1	29,3	2930	2950	8,99	236	245	17,6
50 % L	67,8	76,8	27,0	2820	3070	9,36	222	227	16,3
100 % L	n.d.	65,5	23,1	n.d.	2470	7,53	n.d.	193	13,9
Milieu synthétique									
100 % MS	68,3	115	40,5	1470	18200	55,5	249	449	32,3

La solubilisation du fer est engendrée par deux mécanismes, soit la biolixiviation directe (équations 1 et 12) issue du contact physique entre le substrat minéral et la bactérie *Thiobacillus ferrooxidans* et la biolixiviation indirecte (équation 2, 3 et 4) issue de l'action oxydante du fer ferrique produit et de l'acide sulfurique. La solubilisation du cuivre et du zinc est engendrée par la biolixiviation indirecte comme mentionné pour le cas du fer et aussi par la biolixiviation directe mais de façon non préférentielle. Les valeurs de solubilisation du cuivre et du zinc plus faibles que les valeurs de solubilisation du fer sont attribuées au comportement de la bactérie *T. ferrooxidans*, qui oxyde préférentiellement le fer ferreux de la pyrite. Les essais dans lesquels l'oxydation du concentré de sulfures ne fut pas mesurée, comme par exemple le milieu constitué de 100 % de surnageant de centrifugation de boues d'épuration municipales ou 10 %, 25 %, 50 %, 75 % et 100 % de surnageant de centrifugation de lisier de porc sont associés à des pourcentages de solubilisation négligeables. Ces données portent à croire que la solubilisation des métaux est due presque exclusivement à la lixiviation chimique. L'activité microbienne ou oxydation biologique est négligeable.

Les concentrations de cadmium et de plomb en solution à l'intérieur de chacun des milieux de culture ont été mesurées au cours de la période d'acclimatation de la biomasse. La composition du concentré de sulfures étant très faible en cadmium (0,003 %), de grandes valeurs de solubilisation n'étaient pas attendues. Toutefois, les valeurs obtenues sont plus importantes que celles relatives aux autres métaux. Le Tableau 12 présente les valeurs de solubilisation du cadmium obtenues avec chacun des effluents organiques testés. Les meilleurs résultats sont issus des cultures à base de surnageant de centrifugation de boues de papeteries (52,2 % à 64,3 %). Une solubilisation de 71 % de cadmium est obtenue dans le contrôle positif. Les milieux dans lesquels l'oxydation du concentré de sulfures était absente solubilisent entre 21,7 % et 28,6 % de ce métal. Ces résultats sont attribués à la lixiviation chimique, qui est facilitée par la grande concentration en fer ferrique et en acide sulfurique.

Tableau 12 Concentration et pourcentages de solubilisation du cadmium après un mois d'incubation

Milieux	Cd (mg/L)		
	initial	final	sol. (%)
Surnageant de centrifugation de boues de papetières			
25 % BP	0,868	2,02	64,3
50 % BP	0,868	1,83	58,3
75 % BP	0,837	1,67	53,2
100 % BP	0,868	1,64	52,2
Effluent de déshydratation de boues d'épuration			
25 % BE	0,837	1,61	51,3
50 % BE	0,870	0,930	29,6
75 % BE	0,840	0,837	26,7
100 % BE	0,840	0,868	27,6
Surnageant de centrifugation de lisier de porc			
5 % L	0,837	1,55	49,4
10 % L	0,837	0,899	28,6
25 % L	0,868	0,868	27,6
50 % L	0,806	0,806	25,7
100 % L	n.d.	0,682	21,7
Milieu synthétique			
100 % MS	0,960	2,22	70,7

Aucun milieu de culture n'a permis la solubilisation apparente du plomb. Comme le montrent les Figures 15 à 17, les concentrations de plomb en solution suite aux expériences de biolixiviation sont systématiquement inférieures aux valeurs initiales. Ces résultats sont attribués au phénomène de coprécipitation du plomb lors de la formation des précipités de jarosite.

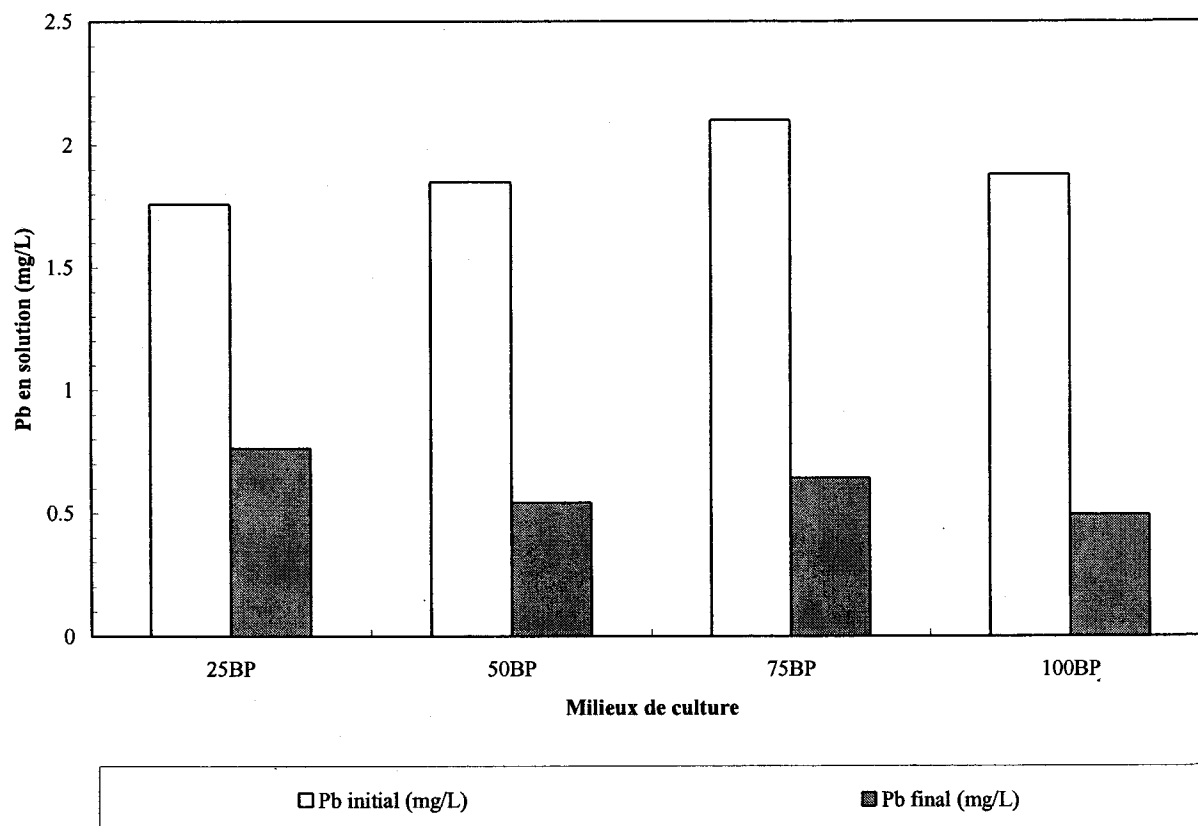


Figure 15 Mesures initiales et finales du plomb en solution après une période de biolixiviation de 30 jours avec quatre concentrations différentes de surnageant de centrifugation de boues de papetières

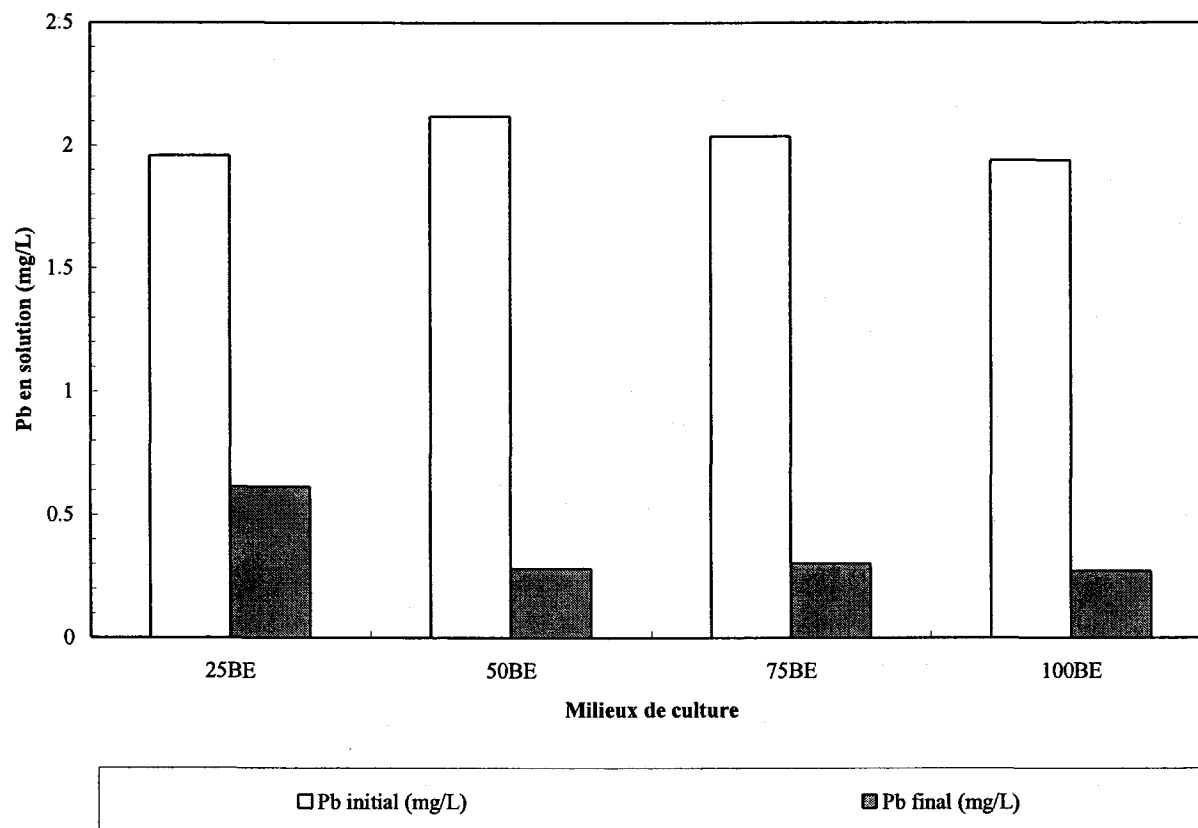


Figure 16 Mesures initiales et finales du plomb en solution après une période de biolixiviation de 30 jours avec quatre concentrations différentes de filtrat de boues d'épuration

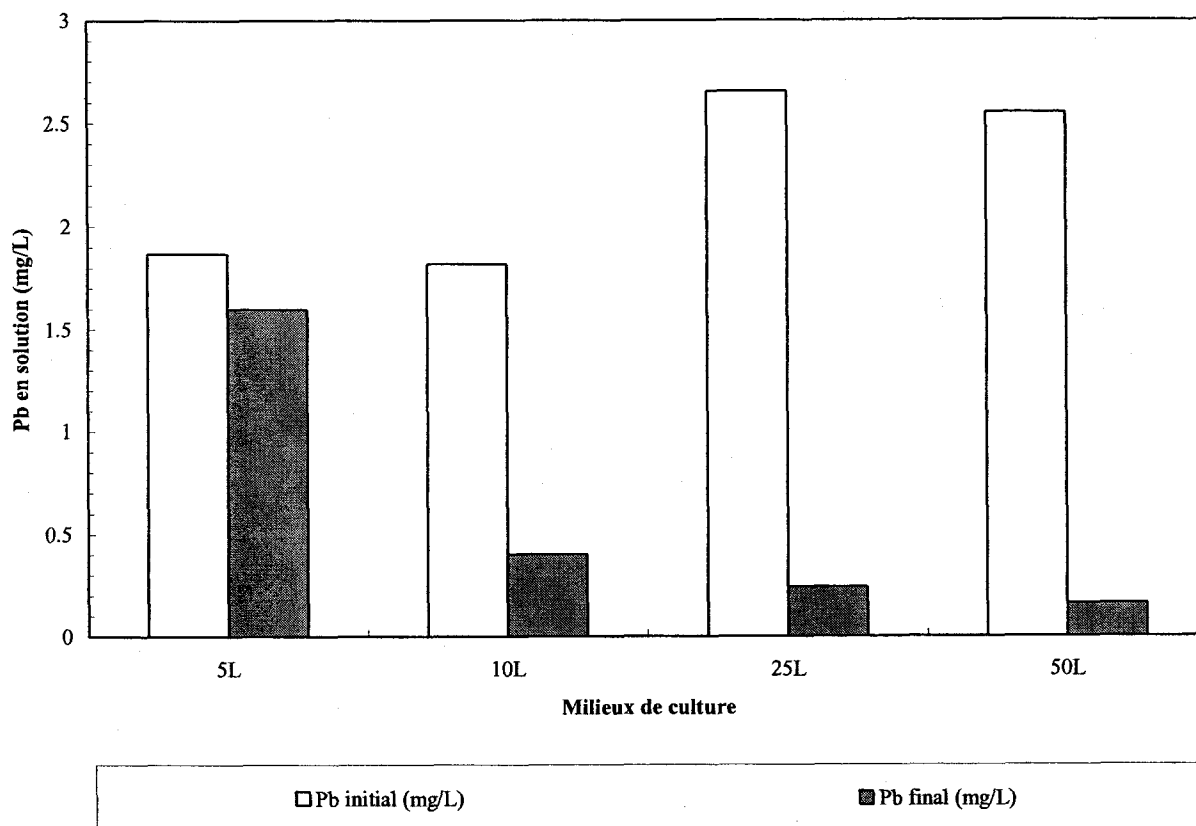


Figure 17 Mesures initiales et finales du plomb en solution après une période de biolixiviation de 30 jours avec quatre concentrations différentes de surnageant de centrifugation de lisier de porc

5,5 Lixiviation des métaux après une période d'acclimatation d'un an

5,5,1 Effets engendrés par la procédure de lavage du concentré de sulfures

L'étape de préparation du concentré de sulfures, c'est à dire le lavage à l'acide, a pour but l'enlèvement des éléments nutritifs qui y sont associés. Cette étape permet l'obtention d'un contrôle négatif constitué d'eau distillée, de concentré de sulfures (10 % v/v) et de l'inoculum (5 % v/v), issu du milieu synthétique. L'absence d'oxydation des sulfures métalliques dans ce milieu de culture est déterminée par la lecture du POR. Lorsque cette valeur demeure stable autour de 400 mV au cours de la période d'incubation, les sulfures ne sont pas oxydés, ce qui

peut être observé aux Figures 9, 10 et 11. Selon cette information et les données présentes au Tableau 9, il est possible de conclure qu'une concentration de 25,2 mg/L d'ammoniaque, 8,06 mg/L d'ortho-phosphate et 45,2 mg/L de COD sont insuffisantes pour permettre la croissance sans limitation des bactéries ferro-oxydantes.

L'étape du lavage à l'acide solubilise aussi une certaine quantité de métaux. Le Tableau 13 présente la quantité des métaux enlevés par ce traitement. Seule une diminution importante de la concentration en calcium, en nickel et en zinc est observée. La concentration en calcium passe de 3770 mg/L avant le lavage à 249 mg/L, après le lavage. La diminution est donc de 93 %. La concentration en nickel est de 31,6 mg/L avant le lavage et est réduite à 21,3 mg/L, ce qui représente une diminution de 32,6 %. Selon ces mêmes données, un pourcentage d'enlèvement du zinc de 27 % est mesuré puisque la valeur passe de 8620 mg/L à 6290 mg/L. Un faible pourcentage d'enlèvement du cadmium est observé, cet élément se retrouve à une concentration de 31,4 mg/L avant le lavage et cette valeur est réduite à 23,7 mg/L après le lavage. Le pourcentage de solubilisation est donc de 24 %. La solubilisation du cuivre et du manganèse est de 14 % et 11 % respectivement. Pour tous les autres métaux, la solubilisation est inférieure à 10 %.

Tableau 13 Pourcentages d'enlèvement des métaux dans le concentré de sulfures métalliques après le lavage

Éléments	Composition du concentré de sulfures (mg/L)		Sol. (%)
	Avant lavage	Après lavage	
Ca	3770	249	93,4
Cd	31,4	23,7	24,5
Cu	3000	2580	14,0
Mn	243	215	11,5
Ni	31,6	21,3	32,6
Zn	8620	6290	27,0

5,5,2 Lixiviation des métaux

Afin de déterminer s'il y a une différence importante au niveau de la solubilisation des métaux suite à la période d'acclimatation de onze mois, des mesures de solubilisation ont été effectuées à partir de cultures acclimatées et les résultats obtenus sont comparés aux résultats de la section précédente. Le Tableau 14 présente les valeurs de solubilisation du cuivre, du fer et du zinc du concentré de sulfures (préalablement lavé), dans les différents milieux de culture testés. La solubilisation du cuivre dans les différents milieux est difficile à expliquer. Les résultats obtenus (entre 11,9 % et 15,3 %) sont inférieurs aux résultats mesurés précédemment (entre 36,3 % et 42,6 %) avec les milieux équivalents et la solubilisation dans le contrôle négatif est la plus importante. Vu l'absence de croissance microbienne dans le contrôle négatif, et l'importante valeur de solubilisation cuivre, il est possible de croire que le traitement du concentré de sulfures à l'acide (lavage acide), ait eu pour effet de solubiliser le cuivre au cours de la période d'incubation. Néanmoins, de plus faibles valeurs de solubilisation de ce même métal dans les milieux ayant supporté la croissance microbienne apparaissent. Ces résultats pourraient être expliqués par la présence, en grande quantité, de matière organique, à laquelle le cuivre en solution peut être adsorbé et ainsi former des complexes insolubles. En effet, selon Petronio *et al.* (1993) le cuivre peut se lier à la fraction humique présente en grande concentration dans les effluents entraînant la formation de sels, de complexes ou de chélates réfractaires à la lixiviation.

Les valeurs de solubilisation du fer (entre 30,2 % et 79,9 %) s'accordent bien avec les explications fournies dans la section précédente pour les milieux équivalents (entre 32,3 % et 55,5 %) et les valeurs sont plus élevées. Une solubilisation chimique entre en jeu pour le contrôle négatif et entraîne en solution 10,3 % du fer, la solubilisation biologique étant presque nulle. Le contrôle positif, dans lequel l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique était la plus importante solubilise près de 79,9 % du fer. Ce résultat est imputable à l'effet combiné du pouvoir oxydant bactérien, du pouvoir oxydant du Fe^{3+} et de l'acidification du milieu. Le surnageant de centrifugation de boues de papetières et le filtrat de boues d'épuration possèdent des valeurs équivalentes de solubilisation du fer, soit 32,7 % et 30,2 %. À l'intérieur du milieu constitué du surnageant de centrifugation de lisier de porc, dans lequel le POR maximal était plus important, une valeur de solubilisation du fer de 38,2 % est mesurée.

Des valeurs équivalentes de solubilisation du zinc sont obtenues dans chacun des milieux de culture (entre 21,4 % et 27,3 %). Toutefois, ces valeurs sont légèrement inférieures aux valeurs mesurées précédemment pour les milieux équivalents (entre 28,6 % et 34,9 %). Pour ce qui est du contrôle négatif, ce résultat peut être expliqué, comme mentionné pour le cas du cuivre, par le procédé de lavage acide qui a eu pour effet de dissocier certains complexes réfractaires à la solubilisation chimique. Pour les autres milieux, la même explication peut être apportée. Néanmoins, comme la lixiviation chimique semble entraîner la solubilisation de 20,2 % du zinc dans le contrôle négatif et que l'on considère que cette valeur reste la même pour chacun des milieux, un faible rendement de solubilisation est alors associé à la lixiviation biologique, soit entre 1,2 et 7,1 %. Ce qui porte à croire, une fois de plus, que de fortes concentrations en matière organique seront néfastes au maintien en solution de certains métaux.

Tableau 14 Valeurs de solubilisation du cuivre, du fer et du zinc dans les différents milieux après un mois d'incubation

Milieux	Métaux (mg/L)					
	initial		final		sol. (%)	
Solubilisation du cuivre						
100 % ED	9,11	±0,45	54,1	±10,2	22,5	±4,3
100 % MS	12,0	±0,7	36,8	±2,6	15,3	±1,1
100 % BP	11,2	±0,6	35,0	±0,4	14,6	±0,2
25 % BE	10,6	±1,6	31,7	±2,4	13,2	±0,1
5 % L	9,45	±0,38	28,5	±1,1	11,9	±0,5
Solubilisation du fer						
100 % ED	261	±19	3400	±441	10,3	±1,3
100 % MS	788	±27	24400	±6100	79,9	±18,5
100 % BP	727	±105	10800	±400	32,7	±1,3
25 % BE	862	±21	9970	±1360	30,2	±4,1
5 % L	365	±31	12600	±1300	38,2	±4,0
Solubilisation du zinc						
100 % ED	70,3	±8,4	267	±11	20,2	±0,8
100 % MS	85,7	±21,8	360	±34	27,3	±2,6
100 % BP	82,6	±13,8	316	±12	23,9	±0,9
25 % BE	68,4	±27,4	282	±22	21,4	±1,7
5 % L	56,9	±8,9	291	±6	22,0	±0,5

5,6 Cinétique de croissance microbienne

Il est intéressant, dans le cadre de cette expérience, de connaître les rendements de croissance des bactéries ferrooxydantes dans les trois effluents organiques testés, en comparaison à celui obtenu dans le milieu synthétique. Étant donné l'intime relation entre le nombre de bactéries et la concentration en fer ferrique, cette dernière peut être utilisée afin de déterminer le taux de croissance bactérienne (k) (Leduc *et al.*, 1993). Le taux d'oxydation du fer ferreux en fer ferrique des bactéries ferrooxydantes dans chacun des effluents organiques sera calculé à partir des formules suivantes (Prescott *et al.*, 1995) :

$$N_t = N_0 * 2^n \quad [21]$$

où N_t représente le nombre de cellules après un temps t ;

N_0 représente le nombre de cellules de la population initiale;

et n représente le nombre de génération à l'intérieur du temps t .

En prenant les logarithmes en base 10 des deux membres de l'équation 21, la valeur de n peut être obtenue :

$$n = \frac{(\log_{10} N_t - \log_{10} N_0)}{\log_{10} 2} \quad [22]$$

Le nombre de cellules étant proportionnel à la concentration en fer ferrique on peut écrire :

$$N_t = \alpha * [Fe^{3+}]_t \quad [23]$$

$$N_0 = \beta * [Fe^{3+}]_0 \quad [24]$$

où α et β représentent des constantes de proportionnalité.

L'équation 22 devient :

$$n = \frac{\left((\log_{10} [Fe^{3+}]_f - \log_{10} [Fe^{3+}]_0) + \log_{10} \frac{\alpha}{\beta} \right)}{\log_{10} 2} \quad [25]$$

en supposant que le rapport α / β tend vers 1, il vient que :

$$n = \frac{(\log_{10} [Fe^{3+}]_f - \log_{10} [Fe^{3+}]_0)}{\log_{10} 2} \quad [26]$$

La formule suivante est appliquée afin d'obtenir la constante de vitesse moyenne (k) ou autrement dit, le taux d'oxydation :

$$k = \frac{n}{t} \quad [27]$$

Le temps de génération (g) est l'inverse de la constante de vitesse moyenne (k) soit :

$$g = \frac{1}{k} \quad [28]$$

Le Tableau 15 présente les temps de génération et les taux de croissance calculés au cours de cet essai. Des taux de croissance et des temps de génération différents témoignent d'une différence au niveau de la composition du milieu de culture comme par exemple une différence de concentration au niveau de la présence de composés toxiques ou au niveau de la facilité d'assimilation des nutriments.

Tableau 15 Taux de croissance, temps de génération et concentration maximale en fer ferrique obtenu par les bactéries ferrooxydantes dans les différents effluents organiques en comparaison à celui obtenu dans le milieu 9K

Milieux de culture	Taux de croissance (h^{-1})	Temps de génération (h)	$[\text{Fe}^{3+}]$ (mg/L)
BP	0,07	15,1	7630
BE	0,05	18,4	9240
L	0,05	19,6	12400
MS	0,05	19,4	21900

Les temps de génération mesurés dans les milieux constitués du filtrat de boues d'épuration municipales et de surnageant de centrifugation de lisier sont semblables (18,4 et 19,6 heures respectivement) et s'accordent bien avec la valeur obtenue dans le milieu synthétique (19,4 heures). Ce résultat montre que l'effet inhibiteur associé à des concentrations élevées en COD a un impact uniquement au niveau de la durée de la période de latence et non au niveau de la cinétique de croissance bactérienne. Les concentrations finales de fer en solution plus élevées sont donc le résultat d'une période de latence plus courte, en d'autres termes, d'une période allouée à la solubilisation des métaux plus longue. Le temps de génération le plus court soit 15,1 heures, est obtenu avec le milieu constitué de boues de papetières. Ce milieu ne semble pas toxique mais une faible concentration en ions ferriques est mesurée à la fin de la période d'incubation. De plus, la période stationnaire de croissance est courte et une grande mortalité apparaît après la dixième journée (Figure 9). Selon les données du Tableau 12, ces résultats ne sont pas attribuables à un manque en éléments nutritifs essentiels. La concentration en ammoniacque et en ortho-phosphates est équivalente ou supérieure à celles des milieux constitués de boues d'épuration et de lisier de porc et la concentration en COD est trois fois supérieure à celle de ces deux derniers milieux.

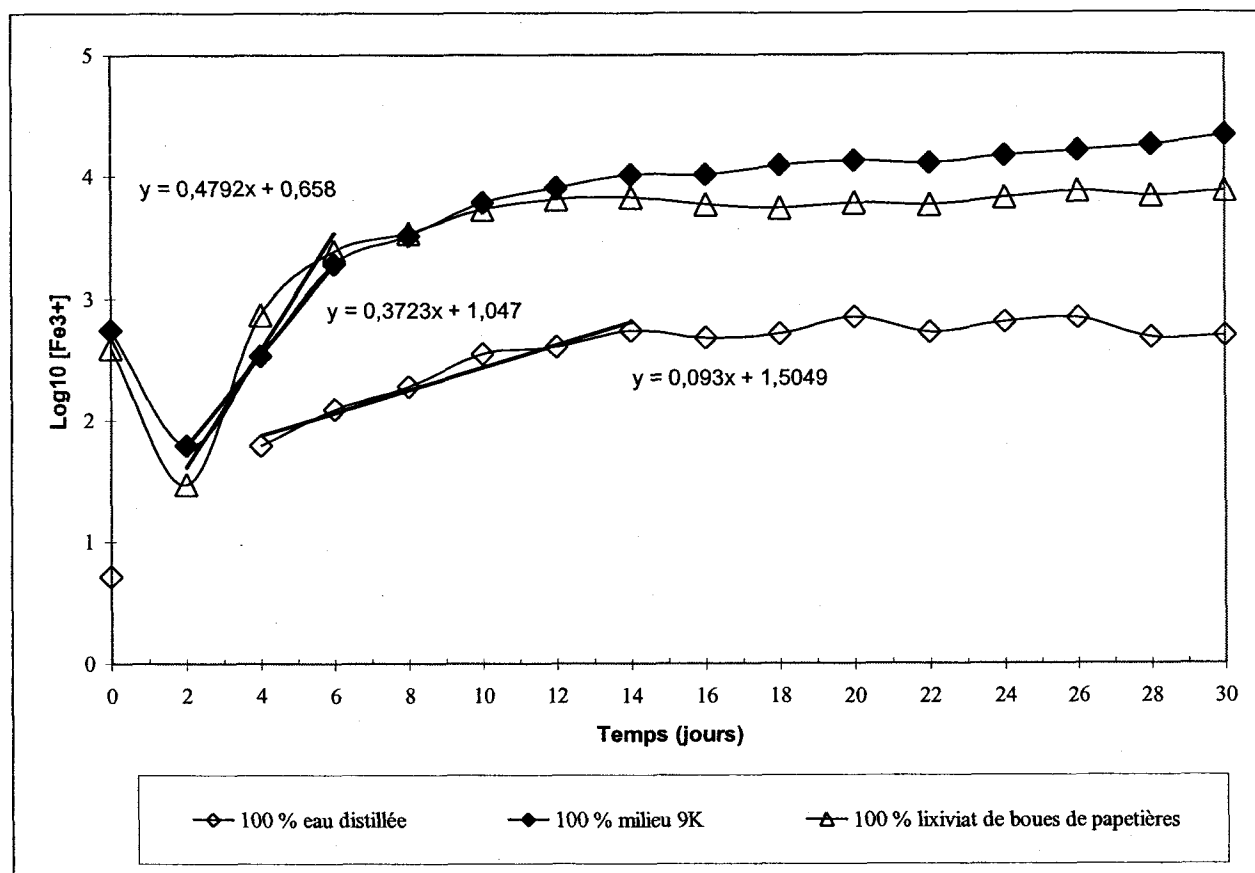


Figure 18 Évolution du logarithme de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base de filtrat de boues de papetières

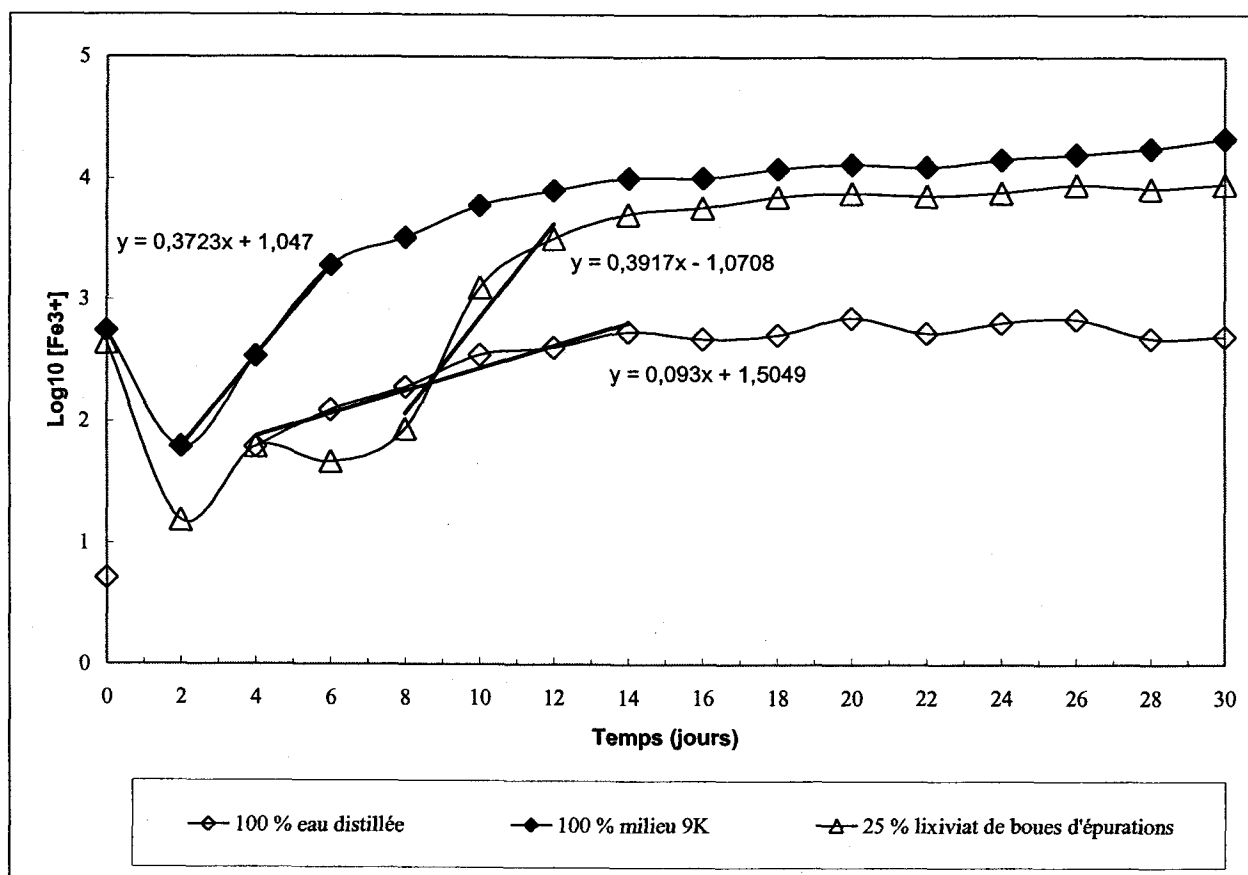


Figure 19 Évolution du logarithme de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base de filtrat de boues d'épuration

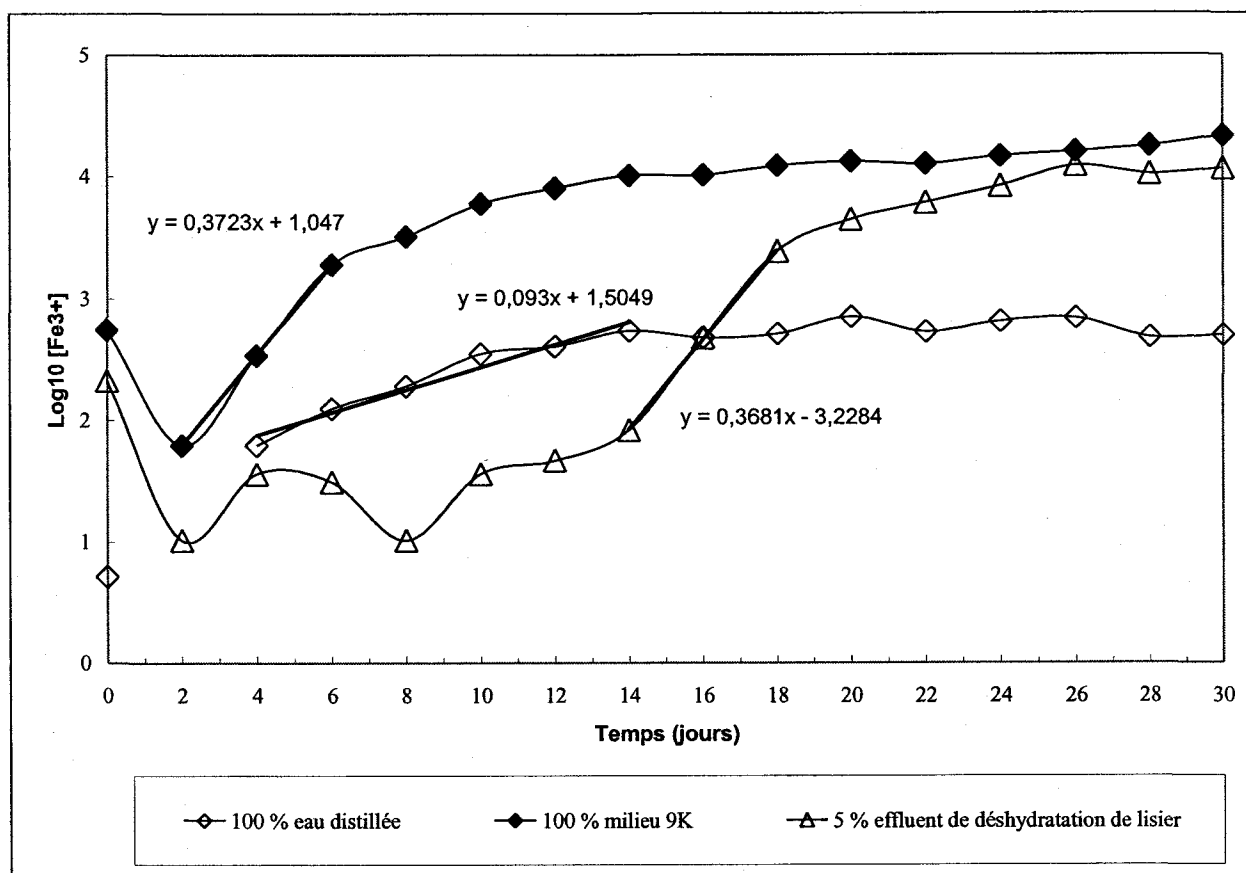


Figure 20 Évolution du logarithme de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base d'effluent de déshydratation de lisier

Une autre méthode de calcul de la cinétique d'oxydation à l'intérieur des réactions de biolixiviation peut être utilisée afin de confirmer les valeurs obtenues précédemment. Selon Monod (cité par Rossi, 1990), pour une expérience se déroulant en réacteur fermé (culture en « mode cuvée »), la cinétique de croissance microbienne est de premier ordre. La vitesse de croissance bactérienne est proportionnelle à la vitesse de consommation du substrat (Lundgren *et al.*, 1964).

$$r = \frac{\partial [Fe^{3+}]}{\partial t} = k [Fe^{3+}] \quad [29]$$

où r représente la vitesse de formation du fer ferrique;

k est la constante de vitesse;

et $[Fe^{3+}]$ représente la concentration du fer ferrique au temps t .

En intégrant cette équation, la formule suivante est obtenue :

$$\ln [Fe^{3+}] = k * t + cte \quad [30]$$

Ce qui représente l'équation d'une droite de pente k . En représentant graphiquement les valeurs de $\ln [Fe^{3+}]$ pour chacune des conditions, c'est à dire 100 % milieu synthétique, 100 % surnageant de centrifugation de boues de papetières, 25 % effluent de déshydratation de boues d'épuration, 5 % surnageant de centrifugation de lisier de porc et 100 % eau distillée, on obtient une droite qui permet de déterminer le taux de croissance bactérienne (k).

Tableau 16 Taux de croissance, temps de génération et concentration maximale en fer ferrique obtenu par les bactéries ferrooxydantes dans les différents effluents organiques en comparaison à celui obtenu dans le milieu 9K

Milieus de culture	Taux de croissance (h^{-1})	Temps de génération (h)	[Fe ³⁺] (mg/L)
BP	0,07	13,6	7630
BE	0,04	26,6	9240
L	0,04	28,3	12400
MS	0,04	28,0	21900

Des temps de génération systématiquement plus élevés sont obtenus avec cette méthode de calcul. Toutefois, les observations relatives aux cinétiques restent les mêmes que celles faites à la section précédente.

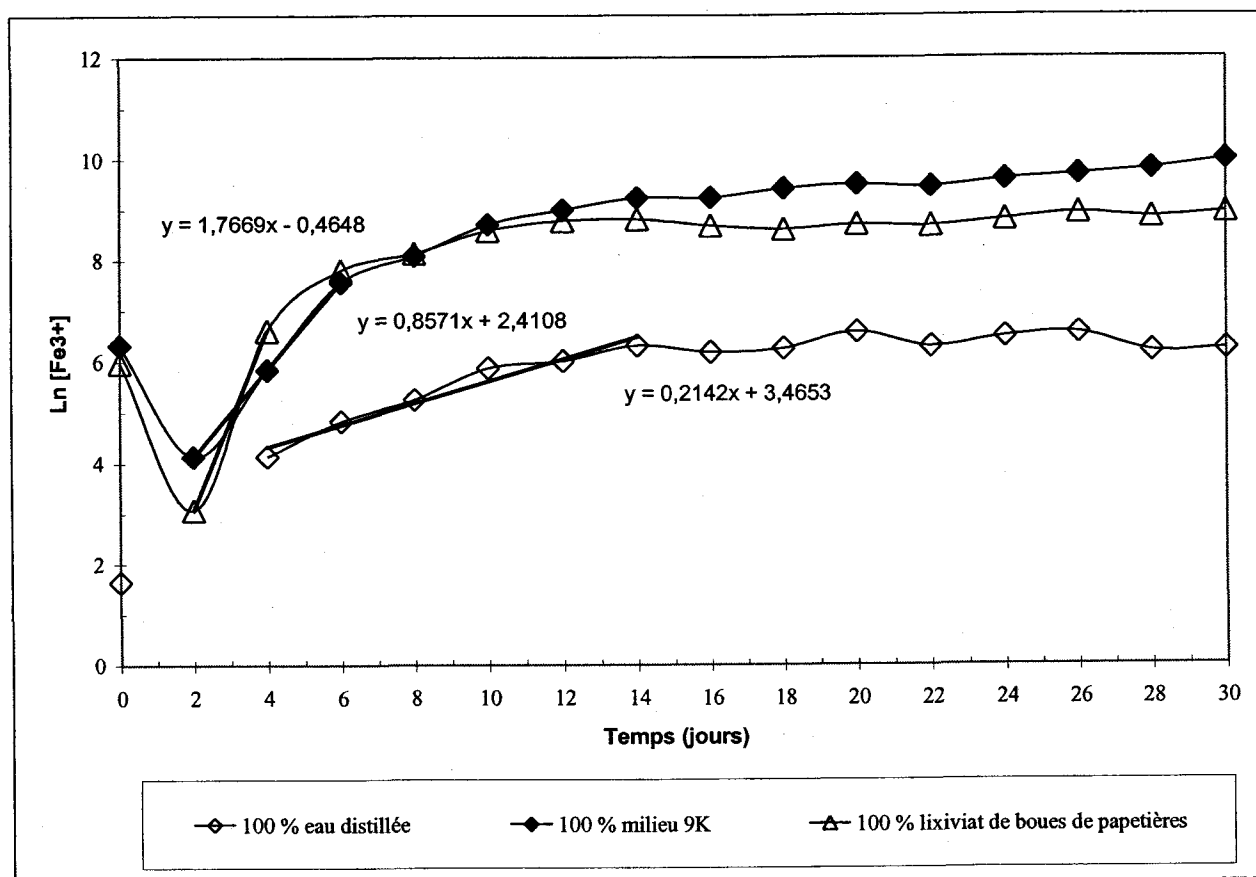


Figure 21 Évolution du logarithme Népérien de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base d'un filtrat de boues de papetières

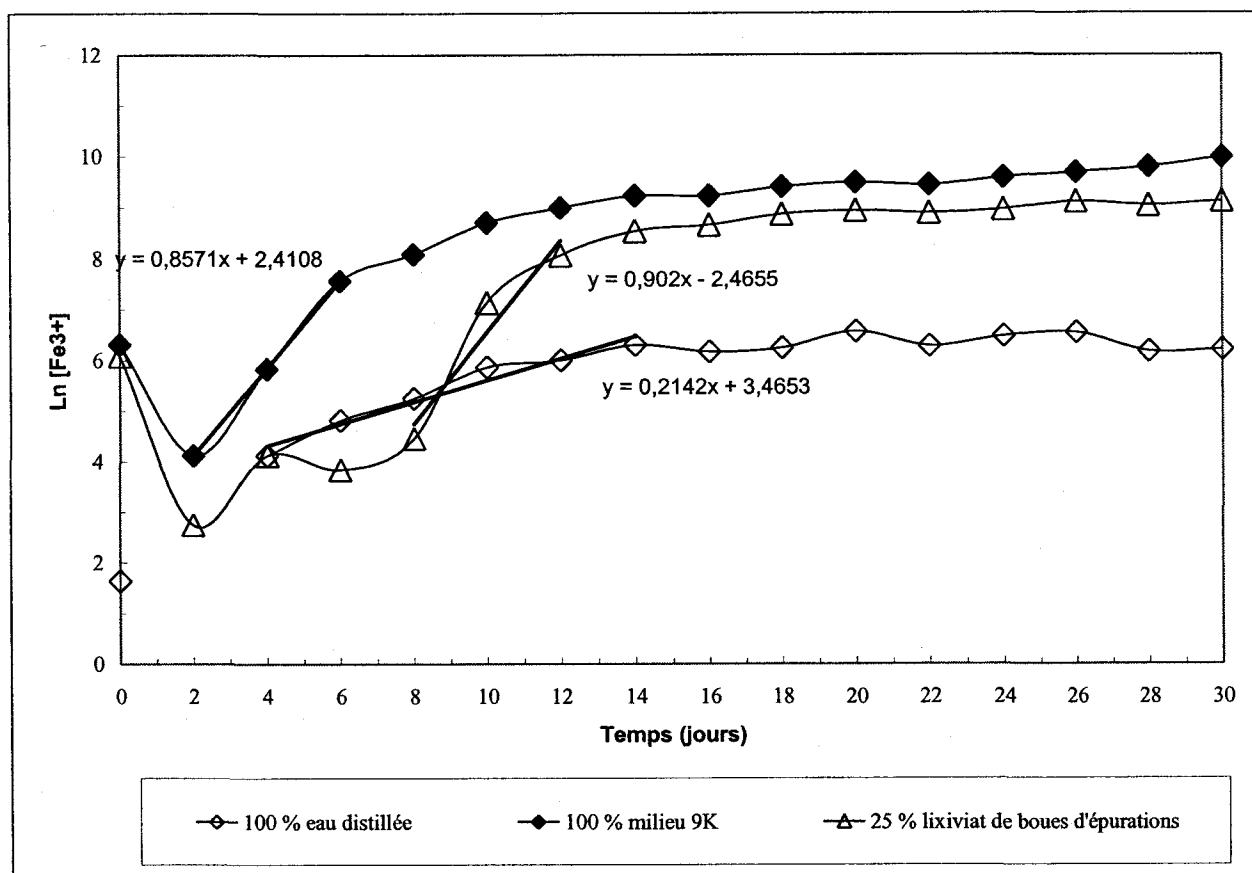


Figure 22 Évolution du logarithme Népérien de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base d'un filtrat de boues d'épuration

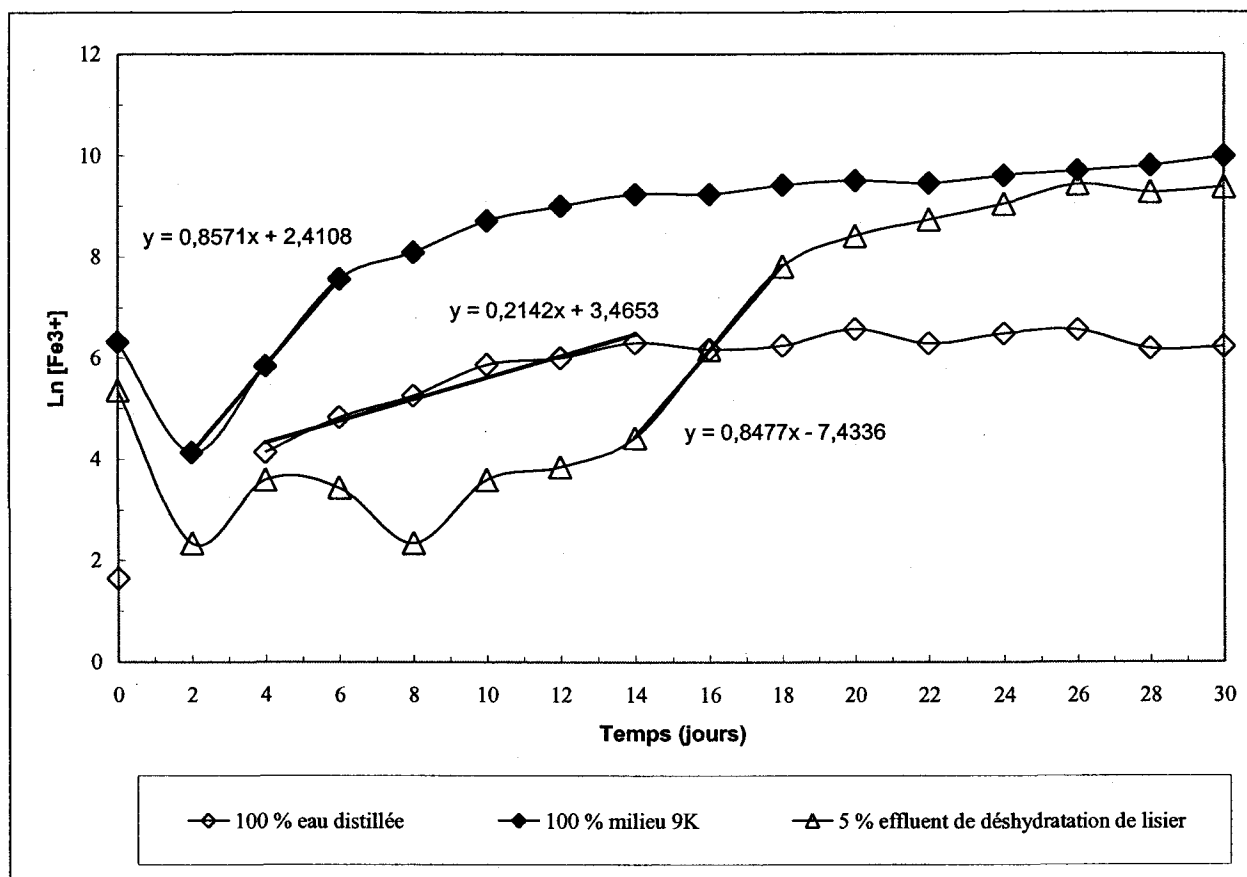


Figure 23 Évolution du logarithme Népérien de la concentration en fer ferrique dans le temps pour le contrôle négatif, le contrôle positif et pour la culture à base d'un effluent de déshydratation de lisier

Il est intéressant de comparer les valeurs obtenues dans le cadre de ce travail, avec celles citées par d'autres chercheurs, sous d'autres conditions expérimentales. Frattini et ses collaborateurs (2000), ont étudié l'effet de certains composés organiques (glucose, cellobiose, acide galacturonique, etc.) sur l'oxydation du fer ferreux par cinq différentes souches de thiobacilles. Les temps de génération observés variaient entre 6 et 39 heures. Comme dans le cas de ce présent projet de recherche, ces auteurs ont noté que plusieurs facteurs influencent cette valeur comme par exemple, la souche bactérienne ou la concentration et le type de composés organiques testés.

Takami *et al.* (1996), ont étudié la cinétique de croissance de *Thiobacillus ferrooxidans* en présence de concentrations variables de glucose et en présence de milieu synthétique 9K contenant 8 g/L de fer ferreux. Les conditions opératoires utilisées dans cette expérience étaient les mêmes que celles utilisées dans ce présent projet de recherche soit, des cultures en mode cuvée, en agitation sous une température constante de 30°C. Les résultats mettent en évidence l'interrelation entre la concentration de glucose et le taux de croissance microbienne. Les valeurs des taux de croissance obtenus variaient entre 0,04 et 0,07 h⁻¹ et la valeur optimale a été obtenue avec une concentration de glucose de 1 g/L.

5,7 Observation et caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile

5,7,1 Conditions opératoires

L'augmentation de la valeur du potentiel d'oxydoréduction dans les milieux de cultures à base de milieu synthétique et à base de surnageant de centrifugation de boues de papetières (Figure 24), suit sensiblement le même profil que décrit dans le chapitre précédent. C'est à dire que la période de latence se situe entre 2 et 4 jours et les valeurs de POR maximales atteintes sont de l'ordre de 624 mV et 538 mV pour le milieu synthétique et le milieu constitué de surnageant de boues de papetières respectivement. La croissance dans le milieu constitué de surnageant de centrifugation de lisier de porc est apparue après 18 jours de latence. Le POR maximal atteint est de 568 mV et la phase stationnaire ne semble pas encore apparue après l'arrêt de la culture soit, 28 jours. Un temps de latence de l'ordre de 26 jours est élevé pour le milieu à base de filtrat de déshydratation de boues d'épuration municipales. Cet effet peut être dû à la composition des boues utilisées. La composition des boues de la Communauté Urbaine de Québec est variable au cours du temps.

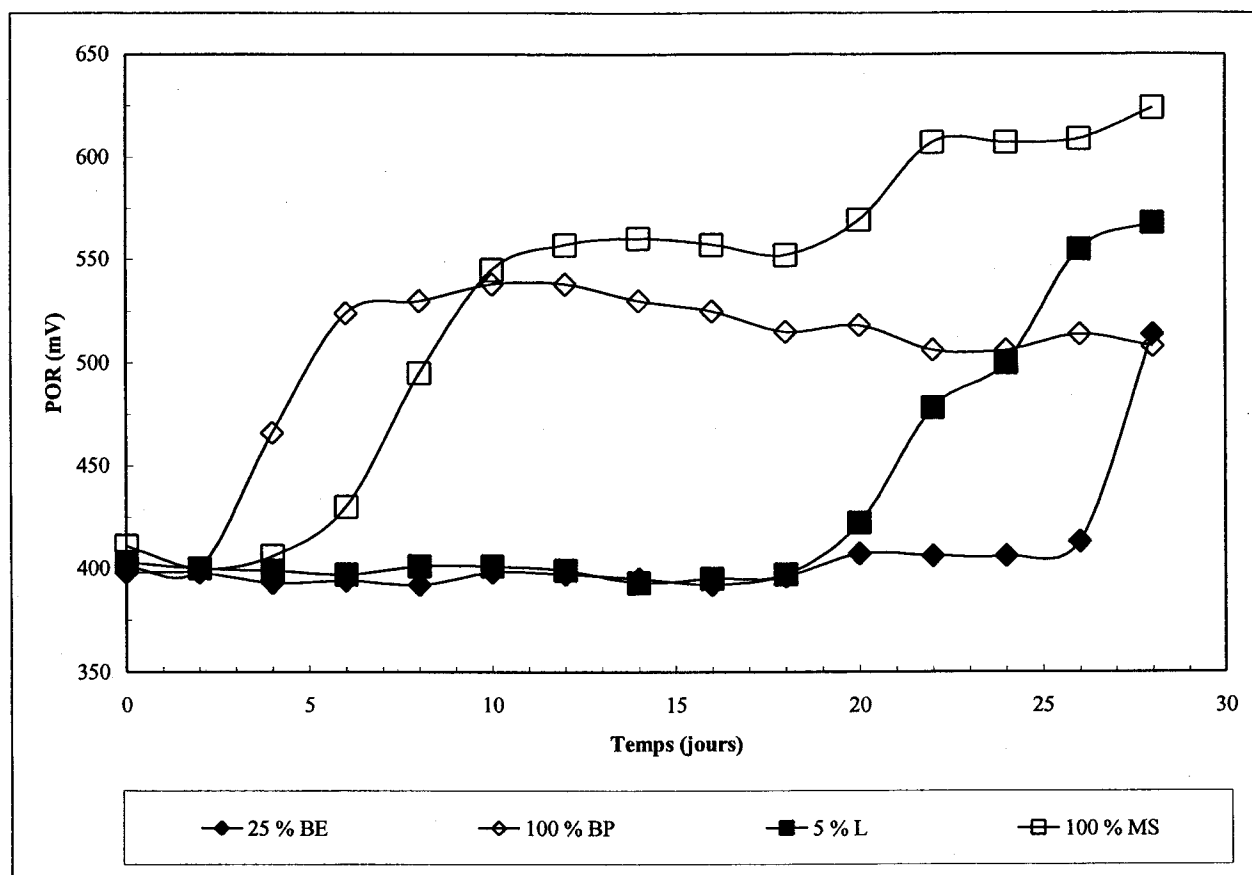


Figure 24 Évolution du POR dans le temps pour les trois milieux constitués d'effluent organique en comparaison à celui obtenu avec le milieu à base de milieu synthétique

5,7,2 Caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile

La détermination de l'existence d'une population hétérotrophe acidophile a été faite dans les quatre milieux de culture utilisés pour la biolixiviation du concentré de sulfures. Le Tableau 17 présente les variations des décomptes microbiens effectués à partir des quatre milieux liquides. Une augmentation de la population semble généralement observée, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Gamache *et al.* (2001). En effet, cette étude de caractérisation de la microflore hétérotrophe acidophile impliquée dans un procédé simultané de biolixiviation et de digestion des boues d'épuration démontre une diminution lente et continue des populations

hétérotrophes non-acidophiles mais au contraire, une augmentation du nombre de microorganismes hétérotrophes acidophiles, suite à la baisse du pH.

Tableau 17 Dénombrement de la microflore hétérotrophe acidophile présente dans les milieux de culture liquide préparés avec les effluents organiques et le milieu synthétique

Milieu	Microorganismes ($\times 10^4$ UFC/mL)				pH initial	pH final
	jour 0	jour 7	jour 14	jour 28		
100 % MS	0	0,744	1,39	14,5	1,90	1,15
100 % BP	0	0	1,05	9,43	2,10	1,38
25 % BE	0	0	0	4,43	2,11	1,80
5 % L	0	0	1,72	22,6	2,08	1,42

La détermination de la présence et le calcul des concentrations des organismes hétérotrophes acidophiles a été faite en utilisant préférentiellement les résultats obtenus des milieux gélosés GTS-2,5. En effet, ceux-ci semblent permettre plus facilement la croissance de colonies que les milieux solides préparés à l'aide des effluents organiques autoclavés. La présence de précipités suite à la stérilisation est remarquée dans les milieux solides constitués du filtrat de déshydratation de boues d'épuration, du surnageant de centrifugation de boues de papeteries et de lisier de porc. Ce précipité peut résulter de la formation d'un complexe entre les sels de phosphates et les ions calcium ou magnésium (Mayrand, 1998). Une distribution des éléments nutritifs moins homogène apparaît alors dans le milieu, ce qui se traduit probablement par une croissance moindre.

Les résultats obtenus sur les milieux GTS-2,5 suggèrent qu'il y a présence d'organismes hétérotrophes acidophiles dans la culture faite à base de milieu synthétique, dès la première semaine. Une concentration de $0,744 \times 10^4$ UFC/mL a été calculée. Cette observation est

corrélée avec l'apparition des conditions oxydantes dans cet Erlenmeyer dès la cinquième journée et une baisse notable du pH. Toujours sur la base des colonies apparaissant sur le milieu GTS-2,5, aucun autre milieu liquide ne semble supporter la croissance d'organismes hétérotrophes à ce moment de la période d'incubation. Dès le début de la deuxième semaine, les milieux constitués de surnageant de centrifugation de boues de papetières et de lisier de porc semblent, à leur tour, supporter la croissance des organismes hétérotrophes. Les concentration d'organismes hétérotrophes acidophiles varient entre $1,05 \times 10^4$ et $1,72 \times 10^4$ UFC/mL. Les conditions oxydantes sont apparues dans le milieu fait de surnageant de boues de papetières (depuis le jour 2), mais non dans le milieu à base de surnageant de centrifugation de lisier de porc. Au jour 28, c'est à dire au début de la quatrième semaine d'incubation des milieux liquides, une population d'hétérotrophes acidophiles est apparue dans le milieu constitué de filtrat de déshydratation de boues d'épuration. Une population d'organismes hétérotrophes acidophiles est donc présente à l'intérieur de chacun des milieux. Toutefois, des concentrations différentes sont mesurées et varient entre $4,43 \times 10^4$ et $22,6 \times 10^4$ UFC/mL. Les conditions oxydantes sont apparues dans le milieu 5 % L après 19 jours d'incubation et dans le milieu 25 % BE après 26 jours.

Une augmentation des conditions oxydantes, une augmentation de la concentration des métaux en solution et une diminution de la concentration en COD ne semble pas influencer à la baisse ces populations. Au contraire, l'apparition de la croissance de ces dernières semble lente dans certaines conditions, lorsque la concentration en COD est élevée. Deux semaines sont nécessaires avant l'apparition des populations dans les milieux constitués de surnageant de centrifugation de boues de papetières et de lisier de porc et quatre semaines pour le milieu à base de filtrat de boues d'épuration.

L'analyse des résultats obtenus est simplifiée par l'obtention d'un seul type de colonies, sur tous les milieux observés. En effet, dès le début de la croissance des organismes hétérotrophes acidophiles en milieu solide, une colonie portant les caractéristiques morphologiques suivantes est obtenue de façon constante (Tableau 18).

Tableau 18 **Caractéristiques morphologiques des colonies
obtenues sur milieu GTS-2,5 après 120 heures
d'incubation à 30°C**

Caractères	Observations
Grosueur	1-4 mm
Forme	Ronde
Contour	Fibrillaire
Élévation	Ombiliquée
Couleur	Grise
Caractéristique optique	Opaque
Consistance	Filamenteuse - sèche
Texture	Filamenteuse

Ces observations primaires permettent de conclure que l'organisme hétérotrophe associé à *T. ferrooxidans* dans ce procédé de biolixiviation est une moisissure. Une caractérisation des paramètres morphologiques de cet organisme a permis de mettre en évidence le genre auquel il appartient soit, *Cladosporium* sp.

Puisque la moisissure observée est la même dans chacun des milieux liquides et puisque les moisissures du type *Cladosporium* sp. sont des organismes présents dans les environnements extrêmes sous forme végétative ou sous forme sporulée, d'autres tests doivent être effectués afin de déterminer si la provenance de ces organismes est issue des effluents organiques ou du concentré de sulfures entreposé. Dans le but de répondre à cet objectif et dans le but de démontrer la stérilité du protocole expérimental utilisé, un échantillon du concentré de sulfures mélangé à de l'eau distillée (10 % p/v) a été stérilisé par autoclavage et inoculé sur milieu GTS-

2,5, puis incubé à 30°C pour une période de 120 heures. La même manipulation a été effectuée avec un échantillon non autoclavé.

Aucune colonie n'est apparue sur ces milieux. L'absence de croissance peut être attribuée soit à une période d'incubation insuffisante pour permettre la germination des spores de *Cladosporium* sp. soit à l'absence de spores dans le concentré de sulfures. L'incubation fut prolongée pour une seconde période de 120 heures, sans toutefois obtenir de nouveaux résultats. Ces résultats nous permettent de croire que la moisissure est issue des effluents organiques.

CHAPITRE 6 – CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

La croissance des bactéries ferroxydantes a été observée dans les trois milieux de culture testés, soit un surnageant de centrifugation boues secondaires de papetières, un filtrat de déshydratation de boues mixtes d'épuration municipales et un surnageant de centrifugation de lisier de porc, sans ajout de sels nutritifs. Toutefois, de fortes concentrations en carbone organique inhibent la croissance des organismes. Le temps de latence variant de 2 à 25 jours est fonction de la concentration en COD et de la nature des composés organiques. Une concentration en COD égale ou inférieure à 350 mg/L n'a pas d'influence sur la croissance en présence de surnageant de centrifugation de boues de papetières. Une concentration en COD supérieure à 180 mg/L et 500 mg/L inhibe la croissance bactérienne en présence de filtrat de boues d'épuration et de surnageant de centrifugation de lisier de porc respectivement. Des dilutions de chacun de ces milieux se sont donc avérées nécessaires. Les conditions optimales de croissance ont été établies et sont les suivantes : 100 % de surnageant de boues secondaires de papetières, 25 % de filtrat de déshydratation de boues mixtes d'épurations municipales et 5 % de surnageant de lisier de porc. Au fil des repiquages, les temps de latence spécifiques associés à une concentration donnée de matière organique dans un milieu de culture avaient tendance à diminuer. Par exemple, pour une culture à base de 5 % de surnageant de centrifugation de lisier de porc, un temps de latence de 18 jours était obtenu au cours de la phase d'acclimatation. En revanche, le temps de latence fut de 14 jours au cours de l'essai de cinétique, soit après la phase d'acclimatation.

Une fluctuation importante de la valeur du pH des milieux de culture est associée à la formation probable de dépôts de jarosite. La tendance générale à l'acidification pour les milieux dans lesquels la croissance est possible, est liée à l'accumulation d'acide sulfurique et de protons.

Les meilleurs rendements de solubilisation du fer, du cuivre et du zinc sont respectivement de 45 %, 43 % et 35 %. Ces valeurs furent obtenues du milieu de culture composé de 100 % de surnageant de centrifugation de boues de papetières. Le milieu de culture composé de 25 % de filtrat de boues d'épuration municipales semble plus performant en ce qui concerne l'extraction des métaux, en comparaison au milieu composé de 5 % de surnageant de centrifugation de lisier de porc. De façon générale, les résultats de solubilisation des métaux obtenus après la phase

d'acclimatation de la biomasse sont inférieurs. Cette observation est attribuée à la procédure de lavage, qui entraîna en solution la fraction métallique facilement solubilisable.

La diminution en carbone organique dissout à l'intérieur des différents milieux de culture au cours de la période d'incubation est associée à la croissance des organismes hétérotrophes acidophiles jouant ainsi un rôle vital en éliminant les composés organiques toxiques aux organismes autotrophes. Un essai réalisé dans le cadre de ce projet de recherche a permis l'isolement et la caractérisation d'une moisissure présente dans chacun des milieux de culture testés. Une identification préliminaire associe l'organisme isolé au genre *Cladosporium* sp.. Cette moisissure est présente dans chacun des milieux à une concentration variant entre 0,74 et $22,6 \times 10^4$ UFC/mL. Les paramètres pouvant faire varier cette concentration sont l'âge de la culture et la nature des composés organiques retrouvés.

Afin de mesurer la performance relative de chacun des milieux de culture testés, la cinétique de croissance de la microflore lixivante fut mesurée au cours de ce projet de recherche. Les résultats obtenus n'indiquent toutefois aucune différence importante entre les différentes vitesses d'oxydation. Néanmoins, la cinétique microbienne semble légèrement plus rapide dans le milieu constitué de 25 % de surnageant de centrifugation de boues de papetières.

La réalisation de ces travaux de recherche avait pour objectif principal la démonstration de la possibilité d'utiliser des déchets organiques comme milieux alternatifs de culture microbienne lors de la lixiviation de résidus miniers sulfureux. L'étape suivante devrait avoir pour objectif la détermination des conditions environnementales sous lesquelles la croissance de la souche microbienne cultivée au laboratoire serait optimale. Des recherches complémentaires devraient aussi être menées dans des réacteurs afin de vérifier, d'une part, l'efficacité de la lixiviation microbienne avec de plus grands volumes et d'autre part, le fonctionnement de ces méthodes de croissance microbienne en mode continu. Le développement de nouvelles technologies de traitement de résidus miniers pourrait être une alternative à la suite de la réalisation de ces travaux préliminaires.

Par ailleurs, des travaux pourraient être menées afin de poursuivre la caractérisation de la moisissure isolée. La détermination d'une espèce encore inconnue est possible vue l'originalité

des manipulations effectuées et le manque d'informations concernant la caractérisation des milieux de culture utilisés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADEWUYI G. et CARMICHAEL G., 1986. Kinetics of oxydation of dimethylsulfide by hydrogen peroxyde in acidic and alkaline medium. *Environ. Sci. Technol.* 20 : 1017-1022.
- ALEXANDER B., LEACH S. et INGLEDEW W.J., 1987. The relationship between chemiosmotic parameters and sensivity to aniona and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 1171-1179.
- APHA, AWWA et WPCF, 1989. *Standard methods for examination of water and wastewaters*. 17th edn, American Public Health Association, Washington, D.C., États-Unis, pp.3-100 à 3-106.
- BACELAR-NICOLAU P. et JOHNSON D.B., 1999. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2) : 585-90.
- BALASHOVA V.V., VEDENINA I.I.A., MARKOSIAN G.E., ZAVARZIN G.A., 1974. *Leptospirillum ferrooxidans* and characteristics of its autotrophic growth. *Mikrobiologiya* 1974 Jul-Aug;43(4):581-5.
- BALLESTER A., GONZALEZ F. et BLAZQUEZ M.L., 1989. Kinetic study of bioleaching of mineral sulphides. Influence of different ions. *Biotechnology in mineral and Metal Processing*, Chapitre 21, AIME, Colorado, États-Unis, pp. 169-74.
- BALLESTER A., GONZALEZ F., BLAZQUEZ M.L. et MIER J.L., 1990. The influence of various ions in the bioleaching of metal sulphides. *Hydrometallurgy* 23 : 221-35.
- BHATTACHARYYA S., CHAKRABARTY B.K., DAS A., KUNDU P.N. et BANERJEE P.C., 1990. *Acidiphilium symbioticum* sp. nov., an acidophilic heterotrophic bacterium from *Thiobacillus ferrooxidans* cultures isolated from Indian mines. *Can. J. Microbiol.* 37 : 78-85.
- BLAIS J.F., TYAGI R.D. et AUCLAIR J.C., 1992a. Bioleaching of metals from sewage sludge by indigenous sulfur-oxidizing bacteria. *J. Environ. Engng.* 118 : 690-707.
- BLAIS J.F., TYAGI R.D. et AUCLAIR J.C., 1992b. Bioleaching of metals from sewage sludge : microorganisms and growth kinetics. *Wat. Res.* 27 (1) : 101-110.
- BLANCARTE-ZURITA M.A., BRANION R.M.R. et LAWRENCE R.W., 1988. Microbiological leaching of chalcopyrite concentrate by *Thiobacillus ferrooxidans*. A comparative study of a conventional process and a catalysed process. Dans : *Biohydrometallurgy Proceedings International Symposium*, NORRIS P.R. et D.P. KELLY, Kew Surrey, Science Technology Letters, pp. 273-285.

-
- BOON M., BRASSER H.J., HANSFORD G.S. et HEIJNEN J.J., 1999. Comparaison of the oxydation kinetics of different pyrites in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans*. Hydrometallurgy 53 : 57-72.
- BOSECKER K., 1997. Bioleaching : metal solubilisation by microorganisms. FEMS Microbiol. Rev. 20 : 591-604.
- BOTKIN D.B. et KELLER E.A., 1995. *Environnemental science, Earth as a living planet*. Chapitre 28, John Wiley et Sons Inc., États-Unis (ISBN 0-471-54548-1).
- BRIERLEY C.L. et BRIERLEY J.A., 1973. A chemoautotrophic and thermophilic microorganism isolated from an acid hot spring. Can. J. Microbiol. 19 (2): 183-188.
- BUTLER J.B. et KEMPTON A.G., 1987. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid media containing heterotrophic bacteria. J. Ind. Microbiol. 2 : 41-45.
- CHARTIER M., MERCIER G., BLAIS J.F., 2001. Partitioning of trace metals before and after biological removal of metals from sediments. Wat. Res. 35 (6) : 1435-1444.
- COLMER A.R. et HINKLE M.E., 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage; a preliminary report. Science 106 : 253-256.
- CURUTCHET G., POGLIANI E., DONATI E. et TEDESCO P., 1992. Effects of iron (III) and its hydrolysis products (jarosites) on *Thiobacillus ferrooxidans* growth and on bacterial leaching. Biotechnol. Lett. 14 (4): 329-334.
- DAVE S.R. et NATARAJAN K.A., 1982. Effects of some flotation reagents on the bio-oxydation of zinc and iron. Trans. I. I. M. 35 (4) : 397-99.
- DROBNER E., HUBER H., RACHEL R., et STETTER K.O., 1992. *Thiobacillus plumbophilus* spec. nov., a novel galena and hydrogen oxidizer. Arch. Microbiol. 157 (3): 213-217
- DUFRESNE S., BLAIS J.F., ROY C. et GUAY R., 1993. Municipal waste water treatment plant sludges : a source of organic carbon-tolerant, sulfur-oxidizing *Thiobacillus* and *Sulfobacillus* strains. *Biohydrometallurgical Technologies*. pp.267-276.
- FOWLER T.A., HOLMES P.R. et CRUNDWELL F.K., 1999. Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. 65 (7) : 2987-2993.
- FRATTINI C.J., LEDUC L.G. et FERRONI G.D., 2000. Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. Antonie Van Leeuwenhoek 77 :57-64.
- GAMACHE M., BLAIS J.F., TYAGI R.D. et MEUNIER N., 2001. Microflore hétérotrophe impliquée dans le procédé simultané de biolixiviation des métaux et de digestion des boues d'épuration. Can. J Civ. Eng. 28 : 158-174.

-
- GEHRKE T., TELEGDI J., THIERRY D. et SAND W., 1998. Importance of extracellular substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. Appl. Environ. Microbiol. 64 (7) : 2743-2747.
- GIMMLER H., DeJESUS J et GREISER A., 2001. Heavy metal resistance of extreme acidotolerant filamentous fungus *Bispora* sp. Microb. Ecol. 42 :87-98.
- GOMEZ J.M. et CANTERO D., 1998. Modelling of ferrous sulfate oxydation by *Thiobacillus ferrooxidans* in discontinuous culture : influence of température, pH and agitation rate. J. Ferm. Bioeng. 86 (1) : 79-83.
- GUAY R. et SILVER M., 1975. *Thiobacillus acidophilus* sp. nov.; isolation and some physiological characteristics. Can. J. Microbiol. 21 : 281-288.
- HARRISON A.P., 1981. *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. Int. J. Syst. Bacteriol. 31 (3) : 327-332.
- HARRISON, A.P., 1984. The acidophilic thiobacili and other acidophilic bacteria that share their habitat. Ann. Rev. Microbiol. 38 : 265-292.
- HARVEY P.I. et CRUNDWELL F.K., 1997. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* : a novel experimental design for «batch» growth and bacterial leaching studies. Appl. Environ. Microbiol. 63 (7) : 2586-92.
- HIROYOSHI N., HIROTA M., HIRAJIMA T. et TSUNEKAWA M., 1999. Inhibitory effects of iron-oxidizing bacteria on ferrous-promoted chalcopyrite leaching. Biotechnol. Bioengng. 64 : 478-83.
- HOLUIGUE L., 1987. CO₂ fixation by mineral-leaching bacteria : characteristics of the ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase of *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Appl. Biochem. 9 : 497-505.
- HÜBER H. et STETTER K.O., 1989. *Thiobacillus prosperus* sp. nov. represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal environment. Arch. Microbiol. 151 : 479-485.
- HÜBER H. et STETTER K.O., 1990. *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 315-322.
- IMAI K., SUGIO T., TSUCHIDA T. et TANO T., 1975. Effects of heavy metals ions on the growth and iron-oxidizing activity of *Thiobacillus ferrooxidans*. Agric. Biol. Chem. 39 : 1349-1354.
- JENSEN A.B. et WEBB C., 1995. Ferrous sulfate oxydation using *Thiobacillus ferrooxidans* : a review. Proc. Biochem. 30(3) : 225-36.
-

-
- KARAMENEV D.G. et NIKOLOV L.N., 1988. Influence of some physiochemical parameters on bacterial activity of biofilm : ferrous iron oxydation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioengng. 31 : 295-299.
- KISHIMOTO N. et TANO T., 1987. Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic mine drainage, sewage, and soil. J. Gen. Appl. Microbiol. 33 : 11-25.
- KREBS W., BROMBACHER C., BOSSHARD P.P., BACHOFEN R. et BRANDL, H., 1997. Microbial recovery of metals from solids. FEMS Microbiol. Rev. 20 : 605-617.
- KUHNE M., IHNEN D., MOLLER G. et AGTHE O., 2000. Stability of tetracycline in water and liquid manure. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. 47(6) : 379-384.
- LACEY D.T. et LAWSON F., 1970. Kinetics of the liquid-phase oxydation of acid ferrous sulfate by bacterium *T. ferrooxidans*. Biotechnol. Bioengng. 12 : 29.
- LANDESMAN J., DUNCAN D.W. et WALDEN C.C., 1966. Oxydation of inorganic sulfur compounds by washed cell suspension of *Thiobacillus ferrooxidans*. Can. J. Microbiol. 12 : 957-964.
- LEDUC L.G., et FERRONI G.D., 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Rev. 14 : 103-120.
- LEDUC L.G., TREVORS J.T. et FERRONI G.D., 1993. Thermal characterization of different isolates of *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Lett. 108 : 189-194.
- LOBOS J.H., CHISOLM T.E., BOPP L.H. and HOLMES D.S., 1986. *Acidiphilium organovorum* sp. nov., an acidophilic heterotroph isolated from a *Thiobacillus ferrooxidans* culture. Int. J. Syst. Bacteriol. 36 (2) : 139-144.
- LU M.C., MATIN A. et RITTENBERG S.C., 1971. Inhibition of growth of obligately chemolithotrophic *Thiobacilli* by amino acids. Arch. Mikrobiol. 79 : 354-366.
- MAYRAND D. et TRUDEL L., 1998. *Laboratoire d'isolement et culture des microorganismes; protocoles de laboratoire*. Notes de cours, Université Laval, Québec, 174 pages.
- MERCIER G., CHARTIER M., COUILLARD D., BLAIS J.F., 1999. Decontamination of fly ash and used lime from municipal waste incinerator using *Thiobacillus ferrooxidans*. Environ. Manag. 24 (4), 517-528.
- NAGPAL S. et DAHLSTROM D., 1992. Effect of carbon dioxide concentration on the bioleaching of a pyrite-arsenopyrite ore concentrate. Biotechnol. Bioengng. 41 : 459-64.
- NAGPAL S., 1996. A structured model for *Thiobacillus ferrooxidans* growth on ferrous iron. Biotechnol. Bioengng. (53) 3 : 310-19.
-

-
- NEMATI M., HARRISON S.T.L., HANSFORD G.S. et WEBB, C., 1998. Biological oxydation of ferrous sulfate by *Thiobacillus ferrooxidans* : a review on the kinetic aspects. *Biochem. Engng. J.* 1 : 171-90.
- NORRIS P.R., 1989. Factors affecting bacterial mineral oxydation : the example of carbon dioxide in the context of bacterial diversity. *Biohydrometallurgy Volume* : 3-10.
- OOLMAN T., 1993. Bioreactor design and scaleup applications in mineral bioleaching. *Biohydrometallurgical Technologies*, vol I, Bioleaching process., pp. 401-15.
- PESIC B., OLIVIER D.J. et WICHLACZ P., 1989. An electrochemical method of measuring the oxydation rate of ferrous to ferric iron with oxygen in the presence of *T. ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioengng.* 33 : 428-439.
- PETRONIO B.M., FORTUNATI A., GENNARO M.C., VANNI A., PETRUZZELLI G. et LIBERATORI A., 1993. Study of the organic matter and leaching process from municipal treatment sludge. *J. Environ. Sci Health A28(2)* : 299-319.
- PRESCOTT L., HARLEY J.P. et KLEIN D.A., 1995. *Microbiologie*, seconde édition. DeBoeck-Wesmael, Bruxelles, France, (ISBN 2-8041-1591-7), 1014 pages.
- PRONK J.T. et JOHNSON D.B., 1992. Oxydation and reduction of iron by acidophilic bacteria. *Geomicrobiol. J.* 10 :153-171.
- RALPH B.J., 1985. Biotechnology applied to raw minerals processing. *Comprehensive Biotechnol.* 4 : 201-234.
- ROJAS-CHAPANA J.A. et TRIBUTSCH H., 2000. Bio-leaching of pyrite accelerated by cysteine. *Process. Biochem.* 35 : 815-824.
- ROSSI G., 1990. *Biohydrometallurgy*. McGraw-Hill Book Company GmbH, Hamburg, Allemagne, (ISBN 3-89028-781-6), 607 pages.
- RUDOLFS W. et HELBRONNER A., 1922. Oxidation of zinc sulphide by microorganisms. *Soil. Sci.* 14 : 459-464.
- SCHIPPERS A., JOZA P.G. et SAND W., 1996. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (9) : 3424-3431.
- SCHÖNBORN W. et HARTMANN H., 1978. Bacterial leaching of metals from sewage sludge. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5 : 305-313.
- SHAFIA F., BRINSON K.R., HEINZMAN M.W. et BRADY J.M., 1972. Transition of chemolithotroph *Ferrobacillus ferrooxidans* to obligate organotrophy and metabolic capabilities of glucose-grown cells. *J. Bacteriol.* 111 : 56-65.

-
- SHOLEH, LEFROY R.D.B. et BLAIR G.J., 1997. Effects of nutrients and elemental sulfur particle size on elemental sulfur oxydation and the growth of *Thiobacillus thiooxidans*. Aust. J. Agricultur. Res. 48 : 497-501.
- SHRIHARI R.K. et GANDHI K.S., 1990. Modelling of Fe²⁺ oxydation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33 : 524-528.
- SILVERMAN M.P. et LUNDGREN D.G., 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yelds. J. Bacteriol. 77 : 642-47.
- SMITH J.R., LUTHY R.G. et MIDDLETON A.C., 1988. Microbial ferrous iron oxidation in acidic solution. J. Wat. Pollut. Control Fed. 60 : 518-30.
- TABITA R. and LUNDGREN D.G., 1971a. Utilization of glucose and the effect of organic compounds on the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 108 : 328-333.
- TABITA R. and LUNDGREN D.G., 1971b. Heterotrophic metabolism of the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 108 : 334-342.
- TAKAMI K, YOU-ICHI S., KEIJI M., et TAKESHIGE T., 1996. Enhancement of specific growth rate of iron-oxidizing bacteria by glucose. Biotechnol. Lett. 18 (4) : 403-406.
- TORMA A.E., 1977. The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical process. Adv. Biochem. Eng. 6 : 1-37.
- TORMA A.E., 1987. Impact of biotechnology on metal extractions. Mineral Processing Extractive Metallurgy Review 2 : 289-330.
- TUNGKAVIVESHKUL T, THIRAVETTYAN P. et TANTICHAROEN M., 1995. Mechanism for bioleaching of zinc silicate residue by organic acid producing microorganisms. Biohydrometallurgical Processing 1 : 385-393.
- TUOVINEN O.H. et KELLY D.P., 1973. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* I. Use of membranes filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparaisn with ¹⁴CO₂-fixation and iron oxydation as mesures of growth. Arch. Microbiol. 88 : 285-298.
- TUOVINEN O.H. et NICHOLAS D.J., 1977. Transition of *Thiobacillus ferrooxidans* KG-4 from heterotrophic growth on glucose to autotrophic growth on ferrous iron. Arch. Microbiol. 114 : 193-195.
- TUOVINEN O.H., KELLY D.P., DOW C.S. et ECCLESTON M., 1978. Metabolic transitions in cultures of acidophilic thiobacilli. Dans : *Metallurgical applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena*. L.E. Murr, A.E. Torma and J.A. Brierley Éditeurs, Academic Press Inc., New-York, États-Unis, pp. 61-81.
-

-
- TUOVINEN O.H., NIEMELA S.I. et GYLLENBERG H.G., 1971a. Effects of mineral nutrients and organic substances on the development of *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioengng. XIII : 517-27.
- TUOVINEN O.H., NIEMELA S.I. et GYLLENBERG H.G., 1971b. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. Antonie Van Leeuwenhoek 37 : 489-496.
- TUTTLE J.H. et DUGAN P.R., 1976. Inhibition of growth, iron, and sulfur oxydation in *Thiobacillus ferrooxidans* by simple organic compounds. Can. J. Microbiol. 22 : 719-30.
- TUTTLE J.H., RANGLES C.I. et DUGAN P.R., 1968. Activity of microorganisms in acid mine water. I. Influence of acid water on aerobic heterotrophs of a normal stream. J. Bacteriol. 95 (5) : 1495-1503.
- VanASWEGEN P.C. et MARAIS H.J., 1999. Advances in the application of the BIOX[®] Process for refractory gold ores. Mineral Metallurgical Processing 16 (4) : 61-68.
- WARKSMAN S.A. et JOFFE I.S., 1922. Micro-organisms concerned with the oxidation of sulfur in soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur oxidising organism isolated from the soil. J. Bacteriol. 7 : 239-256.
- WICHLACZ P.L., UNZ R.F. et LANGWORTHY T.A., 1986. *Acidophilus angustum* sp. nov., *Acidiphilium facilis* sp. nov., and *Acidiphilium rubrum* sp. nov.: acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. Int. J. Syst. Bacteriol. 36 (2) : 197-201.
- ZAVARZIN G., 1972. A heterotrophic satellite of *Thiobacillus ferrooxidans*. Microbiol. (Engl. Transl.) 41 : 323-324.

