

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

## **Diversité bactérienne d'un biofilm impliqué dans la biodégradation du thiocyanate et cyanate**

Par  
Veronique BOUGIE

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
Maître ès science (M.Sc.) en microbiologie appliquée

### **Jury d'évaluation**

Président du jury et examineur interne	Jean-François BLAIS, Ph.D INRS- Eau- Terre- Environnement
Examineur externe	Dominic FRIGON, Ph.D. Université McGill
Directeur de recherche	Richard VILLEMUR, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier
Co-directeur de recherche	Pierre JUTEAU, Ph.D. Cégep de St-Laurent INRS- Institut Armand Frappier



## RÉSUMÉ

La mine d'or principale d'Agnico Eagle, la mine Laronde, située à Cadillac, Québec, produit 7 300 tonnes de minerais par jour et utilise des solutions concentrées de cyanure pour extraire l'or de la roche broyée. L'eau usée résultante doit subir des traitements chimiques et biologiques avant d'être rejetée dans la rivière afin de respecter les normes environnementales. Le cyanure est détruit à l'aide d'un traitement aux peroxydes et l'eau résiduelle contenant du thiocyanate, cyanate et de l'ammoniac est acheminée à une usine de traitement final des eaux (UTFE). Cette usine est constituée de quatre séries de quatre biodisques ayant une biomasse bactérienne diversifiée qui s'y développe à la surface (biofilm). La biomasse trouvée sur le premier biodisques consomme le thiocyanate et le cyanate comme source d'énergie, de carbone ou d'azote et le transforme en dioxyde de carbone, sulfate et ammoniac. L'ammoniac est ensuite transformé en nitrates lors de la nitrification ayant lieu dans les trois derniers biodisques de la série. Malgré le fait qu'il fut démontré à plusieurs reprises que certains microorganismes peuvent dégrader le thiocyanate et cyanate et le bioprocédé mis en place à la mine Laronde fut prouvé efficace, le procédé eu occasionnellement des baisses de performances inexplicables. Un exemple fut les concentrations élevées d'ammoniac résultant à des pertes de performance du système. Il y aurait donc plusieurs avenues à explorer pour but d'optimiser le procédé telles que l'installation d'un système de dénitrification en tête du traitement.

Par l'entremise d'une collaboration des employés de l'UTFE et Pierre Juteau de l'INRS-Institut Armand Frappier, l'objectif général de ce projet est d'optimiser et de mieux comprendre le processus biologique de la dégradation des composés chimiques dans l'effluent minier de la mine Laronde. La contribution du laboratoire de Dr Juteau était d'évaluer la capacité d'une technologie alternative (*Moving Bed Biofilm Reactor* [MBBR]) à dégrader le thiocyanate, cyanate et ammoniac présent dans l'effluent.

Les objectifs spécifiques de ce projet étaient les suivants. En premier lieu, il y a eu l'évaluation de la diversité bactérienne dans les biofilms situés sur les biodisques de l'usine du traitement final des eaux par des techniques de biologie moléculaire. Le second objectif était de déterminer si la dégradation du thiocyanate et du cyanate était principalement due à l'activité d'une population autotrophe ou hétérotrophe. Finalement, à la suite de la mise au point des MBBRs dans le laboratoire de Pierre Juteau, nous avons déterminé la diversité bactérienne dans ceux-ci.

Dans le premier objectif, nous avons comparé les diversités des différentes microflore bactériennes présentes dans chacun des biofilms des biodisques. La majorité des bactéries présentes dans le biodisques dégradant le thiocyanate et le cyanate appartenaient au genre *Thiobacillus*. La diversité bactérienne des trois biodisques impliqués dans la nitrification a permis de noter le changement de la biodiversité avec le changement du genre de nutriment accessible aux bactéries et l'apparition de bactéries nitritantes et nitratantes.

Au second objectif, nous avons pu conclure la présence d'une population bactérienne mixte composée à la fois de bactéries autotrophes et hétérotrophes.

En utilisant la méthode du PCR-DGGE à une seconde reprise, le laboratoire a noté la diversité bactérienne présente sur les supports présents dans les MBBRs à l'échelle de laboratoire de l'INRS-Institut Armand Frappier. Tous les échantillons obtenus ont démontré une forte similarité de la flore bactérienne avec des dominances sporadiques démontrées par les intensités des bandes sur les résultats DGGE. Ceci laisse supposer qu'au contraire des biodisques, la microflore présente sur les supports avait tendance à se maintenir dans tous les réacteurs. À partir de génothèque des gènes de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S et le séquençage de clones représentatifs, cela a permis de déterminer la présence de bactéries affiliées au genre *Thiobacillus*; ce genre représentant encore une dominance chez les bactéries dans les biodisques servant à la dégradation du thiocyanate et cyanate. Les derniers biodisques servant à la nitrification ont permis de noter un changement de la biodiversité avec le changement du type de nutriment accessible aux bactéries (apparition de bactéries nitritantes et nitratantes). Par contre, contrairement aux biodisques, le genre *Thiobacillus* fut présent dans tous les réacteurs.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mes directeurs de recherche, Pierre Juteau et Richard Villemur, de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et d'avoir toujours pu répondre aux multiples questions posées.

Ensuite, je remercie chaleureusement tous les étudiants que j'ai côtoyés lors de ma maîtrise, particulièrement mes collègues de laboratoire ce fut un énorme plaisir de côtoyer des gens aussi passionnés par la science que moi. Leur amitié et leur support m'ont été plus que bénéfiques. Un merci tout particulier à M. Roger Dubuc, pour ses conseils, son temps, sa patience son humour et le temps consacrer à travailler sur les réacteurs.

J'aimerais manifester ma reconnaissance envers l'équipe de travail de la mine Laronde située à Cadillac.

Finalement, je désire souligner l'encouragement et le support de ma famille, sans elle je n'aurais pas pu arriver à cette étape.

RÉSUMÉ.....	I
REMERCIEMENTS .....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS .....	XI
1. Introduction.....	1
2. Revue Bibliographique .....	5
2.1. Techniques d'extraction d'or .....	5
2.1.1. Caractéristiques de l'or .....	5
2.1.2. La cyanuration.....	5
2.1.3. Le cyanure et le thiocyanate .....	6
2.2. La mine Laronde, Cadillac Québec .....	7
2.2.1. Historique et réalisation.....	7
2.2.2. Travaux effectués à la mine.....	7
2.2.3. Traitements de l'effluent minier .....	10
2.3. L'usine des traitements finals des eaux .....	10
2.3.1. Description et emplacement.....	10
2.3.2. Problématique et solution préliminaires .....	13
2.4. Biofilms.....	14
2.4.1. Description .....	14
2.4.2. Utilisation des biofilms dans l'épuration des eaux.....	16
2.5. Les traitements par biodisques .....	17
2.6. Les traitements par « Moving Bed Biofilm Reactor » (MBBR) .....	21
2.7. La dégradation microbienne du thiocyanate et cyanate .....	26
2.7.1. Bactéries autotrophes dégradant le thiocyanate.....	26
2.7.2. Bactéries hétérotrophes dégradant le thiocyanate .....	27
2.8. La nitrification.....	28
2.8.1. Caractéristiques.....	28
2.8.2. La nitrification dans les traitements des eaux.....	31
2.9. La dénitrification .....	33
2.9.1. Caractéristiques.....	33

2.9.2.	Avantages dans un procédé biologique .....	34
3.	Matériels et Méthodes.....	35
3.1.	Description des biodisques à la mine Laronde.....	35
3.2.	Description de la biomasse présente sur les biodisques .....	37
3.3.	Fonctionnement du traitement présent à l'UTFE .....	38
3.4.	Description des MBBR à l'échelle du laboratoire.....	42
3.5.	Installation des réacteurs en mode cuvée à l'échelle du laboratoire .....	47
3.6.	Analyse du thiocyanate par colorimétrie .....	50
3.7.	Analyse du thiocyanate par technique HPLC .....	51
3.8.	Description de l'affluent synthétique.....	51
3.9.	Techniques de biologie moléculaire.....	53
3.9.1.	Extraction de l'ADN des biofilms .....	53
3.9.2.	Électrophorèse sur gel d'agarose .....	53
3.9.3.	Réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	54
3.9.4.	Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) .....	54
3.10.	Élaboration d'une génothèque du gène de l'ARN ribosomal 16S.....	55
3.10.1.	Échantillonnage des biofilms.....	55
3.10.2.	Amplification de l'ADN extrait du biofilm par méthode de PCR .....	56
3.10.3.	Ligature et transformation .....	56
3.10.4.	Sélection des clones et extraction plasmidique .....	56
3.10.5.	Séquençage et analyse phylogénique .....	58
4.	Résultats.....	61
4.1.	Caractérisation de la biomasse présente sur les biodisques à l'UTFE.....	61
4.1.1.	Performance de dégradation du thiocyanate et nitrification .....	61
4.1.2.	Détermination de la complexité de la flore bactérienne par PCR-DGGE.....	61
4.1.3.	Identification des espèces à l'aide d'une génothèque de l'ARNr 16S.....	64
4.2.	Identification du comportement de la biomasse des biodisques.....	68
4.3.	Caractérisation de la biomasse présente dans les MBBR .....	71
4.3.1.	Identification des espèces à l'aide d'une génothèque de l'ARNr 16S.....	72
5.	Discussion.....	77
5.1.	Suivi de la flore bactérienne présente à l'UTFE .....	77
5.2.	Analyse des séquences obtenues d'une génothèque 16S .....	78

5.2.1.	Biodisque 1 .....	78
5.2.2.	Biodisque 2 .....	79
5.2.3.	Biodisques 3 et 4 .....	80
5.3.	Identification du comportement de la biomasse dégradant le thiocyanate sur les biodisques .....	82
5.4.	Suivi de la flore bactérienne présente dans les séries MBBR .....	84
5.5.	Analyse des séquences obtenues d'une génothèque 16S .....	85
5.5.1.	MBBR-B1.....	86
5.5.2.	MBBR-B2 et B4 .....	87
5.5.3.	MBBR-A1 et A4 .....	87
6.	Conclusion .....	89
7.	Références.....	91



**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 3.1** Ingrédients pour affluent synthétique p.52

**Tableau 3.2** Amorces utilisées lors de ce projet p.59

**Tableau 4.1** Tableau d'affiliations des espèces retrouvées dans les échantillons prélevés de St1 à St4 p.67

**Tableau 4.2** Tableau d'affiliations des espèces retrouvées dans les échantillons prélevés des réacteurs A1, A4, B1, B2 et B4 p.75

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 2.1</b>	Résumé schématique de la technique de cyanuration employée afin d'extraire l'or du minerai.	p.2
<b>Figure 2.2</b>	Photo représentative de l'emplacement de l'UTFE	p.12
<b>Figure 2.3</b>	Représentation schématique de la formation d'un biofilm par une espèce bactérienne.	p.17
<b>Figure 2.4</b>	Représentation schématique de la constitution d'un biodisque	p.18
<b>Figure 2.5</b>	Représentation d'une installation de biodisques	p.19
<b>Figure 2.6</b>	Moyeu et billes de roulement vieillissent par corrosion et poids des biodisques	p.20
<b>Figure 2.7</b>	Figures démontrant les dommages d'un biodisque causés par l'usure	p.21
<b>Figure 2.8</b>	Représentation schématique démontrant la structure générale des supports	p.22
<b>Figure 2.9</b>	Exemples photographiques de MBBRs en construction	p.24
<b>Figure 2.10</b>	Représentation schématique du fonctionnement des MBBR lors de traitements d'eau usée.	p.25
<b>Figure 3.1</b>	Photo démontrant l'assemblage d'un biodisque à la mine Laronde, Cadillac QC.	p.36

- Figure 3.2** Images démontrant l'influence du système d'aération sur la rotation d'un biodisque lors du traitement de l'eau usée p.37
- Figure 3.3** Représentation cartographique démontrant le cheminement de l'eau usée à partir du bassin No.1 où l'eau est traitée dans une usine de peroxyde pour finalement se rendre à l'usine de traitement biologique (UTFE). p.39
- Figure : 3.4** Schéma représentant l'installation des biodisques à l'UTFE. Quatre séries de quatre biodisques furent installées (11 à 14, 21 à 24, 31 à 34 et 41 à 44). p.40
- Figure 3.5** Graphique démontrant la performance des biodisques de la deuxième ligne de traitement en 2009 p.41
- Figure 3.6** Schéma représentant les séries MBBR construites en laboratoire p.43
- Figure 3.7** Graphique démontrant le potentiel de dégradation du thiocyanate et cyanate par la biomasse présente dans la ligne A p.44
- Figure 3.8** Graphique démontrant le potentiel de dégradation du thiocyanate et cyanate par la biomasse présente dans la ligne B p.45
- Figure 3.9** Image démontrant une série MBBR à l'échelle de laboratoire p.46
- Figure 3.10** Schéma représentant l'installation des réacteurs en cuvée p.48
- Figure 3.11** Photo démontrant l'installation des réacteurs en cuvée utilisés pour l'identification de la biomasse retrouvée sur les biodisques p.50
- Figure 3.12** Schéma représentant le plasmide utilisé lors de l'étape de clonage de l'ADN 16S extrait de la biomasse p.57

**Figure 4.1** Profil de la diversité bactérienne d'une des séries de réacteurs de l'UTFE par PCR-DGGE p.63

**Figure 4.2** Affiliation la plus probable des séquences de l'ARNr 16S de la St1 p.66

**Figure 4.3** Graphique démontrant l'efficacité de dégradation par la biomasse présente dans deux bioréacteurs en mode cuvée p.69

**Figure 4.4** Profil de la diversité bactérienne des réacteurs de 600 mL 1 et 2 par PCR-DGGE p.70

**Figure 4.5** Profil de la diversité bactérienne des 4 réacteurs MBBR des séries A (aérée) et B (anoxique), par PCR-DGGE p.72

**Figure 4.6** Affiliation la plus probable des séquences de l'ARNr 16S des réacteurs MBBR de la série A et B p.73

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

°C :	Degrés Celsius
ADN :	Acide désoxyribonucléique
amp :	Ampicilline
ARNr 16S :	Acide ribonucléique, sous-unité de 16 Svedberg
BSA :	Albumine sérique bovine
DGGE :	Électrophorèse sur gel à gradient d'agents dénaturants
Da :	Dalton
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate (contient une concentration égale de désoxyadénosine triphosphate, désoxyguanosine triphosphate, désoxycytidine triphosphate et désoxythymidine triphosphate)
EDTA :	Acide éthylène-diamine-tétracétique
F :	Pour le nom d'une paire amorce, signifie <i>forward</i> ou 5'→3'
g :	gramme
GC (pince) :	Courte séquence d'ADN, sur une amorce, composée exclusivement de guanines et de cytidines
IPTG :	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
L :	Litre
LB :	Luria-Bertani
m,	mètre
M :	Mole
MBBR:	Moving Bed Biofilm Reactor
p/v :	poids/volume
pb :	paire de bases
PBS :	Tampon salin phosphaté
PCR :	Réaction de polymérase en chaîne
R :	Pour le nom d'une paire amorce, signifie <i>reverse</i> ou 3'→5'
RNase :	Enzyme dégradant l'ARN
rpm :	Révolutions par minute
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
TAE :	Tampon Tris-HCl – acide acétique – EDTA
Taq :	Polymérase isolée de la bactérie <i>Thermus aquaticus</i>
TE :	Tampon Tris-HCl – EDTA
TEMED :	Tétraméthyléthylènediamine
TEN :	Tampon Tris-HCl – EDTA – NaCl
UTFE :	Usine de traitement final des eaux
V :	Volt
V3:	Une des régions variables du gène de l'ARNr 16S
v/v :	volume/volume
Xgal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside



## 1. Introduction

L'industrie de l'or est une industrie en pleine expansion due à la grande demande pour ce métal polyvalent. L'or est un des métaux les plus populaires dus à sa texture lisse, reluisante, sa caractéristique malléable, docile et ne s'oxyde pas dans l'air ni dans l'eau. C'est un métal en grande demande dans les domaines de fabrication des bijoux, des sculptures, de l'art décoratif et de plus en plus dans le domaine de la nanotechnologie. Ce métal se retrouve en grains ou en pépite dans le minerai. Leurs gisements sont en veines souterraines ou longeant les cours d'eau. L'extraction d'or à partir de minerai de façon chimique ou physique a pour but d'obtenir ce métal d'une manière rapide, efficace et d'une bonne qualité.

La mine Laronde, située en Abitibi Québec, utilise la technologie de la cyanuration comme méthode d'extraction d'or. C'est l'utilisation de solutions concentrées en cyanure pour solubiliser l'or retrouvé dans les minerais préalablement broyés. Une fois l'or extrait des minerais, il ne reste qu'un jus stérile contenant différents composés de cyanure (forme libre et complexée à différents métaux). La présence de pyrite dans les minerais va causer une formation de thiocyanate (SCN<sup>-</sup>). L'eau usée peut être réutilisée, mais elle doit être jetée en partie pour éviter la perte de l'efficacité lors de la cyanuration due aux complexes de cyanure formés lors de ce procédé. Cette technologie peut créer des problèmes pour l'environnement dus aux grandes quantités de cyanures accumulées. Si les eaux usées ne sont pas entreposées adéquatement, il pourrait y avoir une fuite dans les cours d'eau, ce qui pourrait endommager la faune, la flore et par la suite, la population humaine entourant la mine.

Des méthodes de traitements chimiques et physiques sont habituellement utilisées pour but de traiter les eaux usées. Les traitements les plus utilisés pour détruire le cyanure dans les eaux sont les traitements chimiques employant le dioxyde de soufre et l'air (procédé INCO) ou le traitement aux peroxydes en présence de cuivre (Oleson et coll., 2005). À la suite de la destruction du cyanure, une eau usée contenant du thiocyanate, cyanate et ammoniac est obtenue. Ces derniers composés sont beaucoup moins toxiques pour l'environnement que le cyanure, mais aux concentrations retrouvées dans l'eau ces composés sont reconnus comme étant potentiellement néfastes. De nombreux traitements physiques et chimiques peuvent être utilisés pour détruire les sous-produits de la destruction du cyanure. À la mine Laronde, une usine du

traitement final des eaux fut conçue pour traiter de façon biologique les eaux contenant le thiocyanate, cyanate et l'ammoniac. Il fut démontré depuis longtemps qu'il existe des microorganismes (principalement des bactéries) pouvant oxyder complètement le cyanure et le cyanate pour former du  $\text{CO}_2$  et du  $\text{NH}_4^+$ , et le  $\text{SCN}^-$  en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{SO}_4^{2-}$ . Les sous-produits de ces dégradations comme le  $\text{NH}_4^+$  doivent être transformés en  $\text{NO}_3^-$  par voie de nitrification. À la mine Laronde, l'effluent sortant de l'usine du traitement final des eaux contiendra du  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{SO}_4^{2-}$ , composés qui sont peu toxiques à ces concentrations. L'utilisation de procédé de traitement biologique dans le domaine minier est cependant très rare.

### **Problématique, hypothèse et objectifs du projet**

La mine Laronde de la compagnie Agnico-Eagle située à Cadillac, Québec produit plusieurs tonnes de minerais par jour et utilise une grande quantité de cyanure pour extraire l'or parmi ces minerais. L'effluent résultant subit des traitements chimiques pour détruire le cyanure et biologiques dans le but de dégrader le thiocyanate et d'effectuer la nitrification avant d'être rejetée dans la rivière, afin de respecter les normes environnementales. Le traitement biologique du thiocyanate se fait dans des réacteurs de type biodisque, une technologie initialement utilisée pour l'épuration d'eaux usées municipales. Ce type de bioréacteur employant les techniques de biofilms est toutefois une technologie mécaniquement lourde, résultant à des pertes d'efficacités et des bris majeurs. De plus, la dégradation du thiocyanate résulte à une augmentation de la concentration de l'ammoniac dans l'eau usée, ce qui vient inhiber la nitrification.

Par une collaboration de la mine Laronde et Pierre Juteau de l'INRS-Institut Armand Frappier, l'objectif général de ce projet était d'accroître la compréhension des processus microbiens du procédé, à optimiser l'activité microbienne et à tester un autre type de bioprocédé, soit une série de réacteurs MBBR avec recirculation. Les objectifs spécifiques de ce projet étaient les suivants. Il s'agissait d'abord d'évaluer la diversité bactérienne des biofilms présents dans les biodisques à l'UTFE par une méthode de profilage par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE). Ensuite une génothèque de gènes de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S devait être construite pour identifier la population bactérienne présente dans les biodisques. Dans un second objectif, nous avons voulu savoir si la population bactérienne responsable de la dégradation du thiocyanate et du cyanate était de nature autotrophe ou hétérotrophe. Finalement,



nous avons déterminé la composition bactérienne des MBBRs développés au laboratoire de Pierre Juteau.



## **2. Revue Bibliographique**

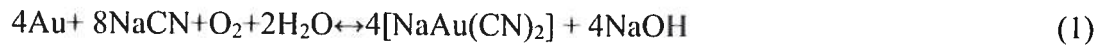
### **2.1. Techniques d'extraction d'or**

#### **2.1.1. Caractéristiques de l'or**

L'or (symbole chimique AU) peut former plusieurs complexes avec des groupements organiques, phosphanes, thiolates ou halides permettant d'être manipulé très facilement (Pyykko, 2004). Une technique courante dans l'extraction d'or est la cyanuration où l'on crée l'anion AU (I) dicyanide. Les minerais contenant l'or peuvent être classés en trois catégories : « free milling », complexe ou réfractaire (La Brooy et coll., 1994). La classe des minerais contenant l'or va influencer le type de procédé d'extraction utilisé. Les minerais « free milling » donnent approximativement un résultat d'extraction d'or > 90 % avec une cyanuration traditionnelle d'environ 20 à 30 heures, avec suffisamment de cyanure ajouté pour créer une concentration finale de 100-250 ppm à un pH de 10 à la fin du procédé (La Brooy et coll., 1994). Les minerais réfractaires d'or sont des minerais résistants aux techniques conventionnelles d'extraction d'or comme la cyanuration. Il faut donc prétraiter la matrice, souvent composée de pyrite, pour rendre les métaux précieux accessibles. Les minerais complexes donnent une récupération d'or économiquement acceptable seulement lors d'implication de grandes concentrations de cyanure et oxygène. Normalement, le prétraitement utilisé lors de l'extraction d'or à partir des minerais est le broyage. Ceci permet de rendre les particules d'or accessible au cyanure. La quantité d'or obtenu à partir de minerais et la solubilisation sont reliées à l'efficacité du broyage.

#### **2.1.2. La cyanuration**

Malgré les inquiétudes envers l'utilisation d'un composé hautement toxique et des quelques autres possibilités offertes (thiourée, thiosulfate, etc.), la solubilisation de l'or par le cyanure (cyanuration) en milieu alcalin est la technique de métallurgie la plus utilisée. L'oxydation de l'or est un pré requis pour sa solubilisation dans la solution alcaline de cyanure (Kondos et coll., 1995). Normalement, l'or est inerte à l'oxydation. En présence d'un agent pouvant former un complexe avec l'or comme le cyanure (CN<sup>-</sup>), l'or forme le complexe cyano  $[Au(CN)_2]^-$  quand oxydé.

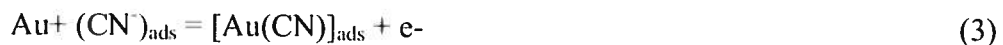


La solubilisation de l'or dans une solution de cyanure a été étudiée par de nombreux laboratoires (Bouffard et Dixon, 2007; Johnson et coll., 2009; Jeffrey et Ritchie, 2000). Par contre, malgré la multitude d'articles publiés à ce sujet, il ne peut pas avoir consensus au sujet du mécanisme précis de cette réaction importante. Un mécanisme de la solubilisation de l'or dans une solution de cyanure fut proposé par MacArthur (MacArthur, 1972):

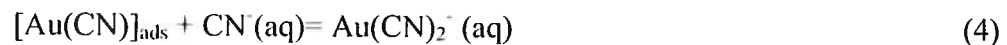
a) l'adsorption du cyanure à la surface de l'or

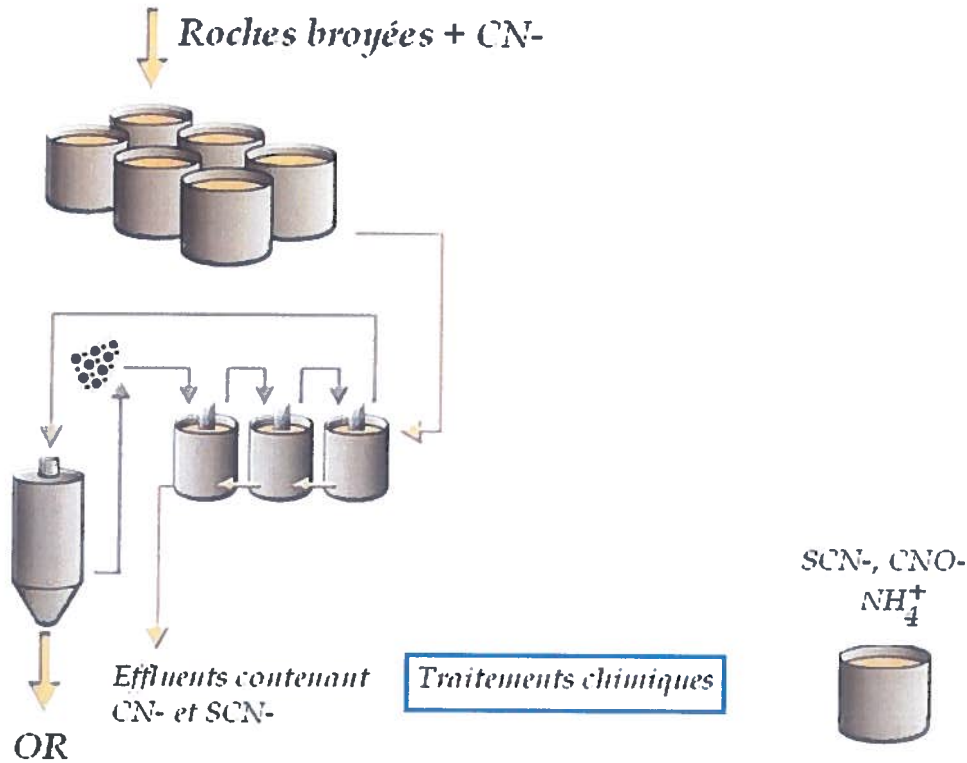


b) l'extraction électrochimique d'un électron :



c) la combinaison de l'intermédiaire adsorbé avec un second ion de cyanure :





**Figure 2.1 : Résumé schématique de la technique de cyanuration employée afin d'extraire l'or du minéral.** Traduit et modifié de [http://www.marthamine.co.nz/ore\\_process.html](http://www.marthamine.co.nz/ore_process.html)

### 2.1.3. Le cyanure et le thiocyanate

Le cyanure est un anion formé d'un atome de carbone ayant une liaison triple à un atome d'azote. Les sels de cet ion et même l'acide cyanhydrique sont extrêmement toxiques pour les mammifères. À l'opposé, les ferrocyanures ne le sont pas et sont utilisés dans l'industrie alimentaire. Les cyanures peuvent être produits naturellement par des bactéries, moisissures, algues et plantes. L'anion thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ), un composé relativement stable, peut aussi être produit naturellement (procédés de détoxification naturels) et lors de la production d'eaux usées lors des procédés industriels tels que les usines de charbon, les synthèses organiques, du placage de métal et l'extraction de métaux précieux. Le thiocyanate est un composé ayant une toxicité plus basse en comparant celle du cyanure. Le thiocyanate peut malgré tout causer des troubles de thyroïde s'il y a exposition chronique à ce composé (Jeong et coll., 2006). De plus, ce composé

peut être toxique à de basses concentrations (58-116 mg/L) pour certains microorganismes, mais il peut être dégradé par des bactéries autotrophes et hétérotrophes.

## **2.2. La mine Laronde, Cadillac Québec**

### **2.2.1. Historique et réalisation**

La mine Laronde, la mine principale de la compagnie Agnico-Eagle, est située à Cadillac (Abitibi Québec) dans la ceinture volcanique archéenne de l'Abitibi, à 650 km au nord de Montréal. Cette mine représente le plus grand gisement aurifère au Canada. En 2008, la mine a produit 216 208 onces d'or, ce qui donne à la mine un total de 4 millions d'onces d'or extrait depuis 1988. Les réserves sont estimées d'être plus de 5.3 millions d'onces. C'est une mine à multi métaux qui extrait des sous-produits comme l'argent, le zinc et le cuivre. À la mine Laronde, nous retrouvons l'exploitation minière souterraine, une usine de traitement, une usine de concassage secondaire et des installations connexes. La production est faite à partir du puits principal appelé le puits Penna ayant une profondeur de 2 250 mètres. Ce puits est de remontée unique et il est le plus profond de son genre dans l'hémisphère occidental. Ce puits permet à la mine de générer jusqu'à 7 300 tonnes de minerais par jour. L'extraction dans le puits se fait par abattage à accès transversal par chambre vide avec remblai cimenté comme support pour éviter l'écoulement.

### **2.2.2. Travaux effectués à la mine**

À l'usine de traitement, nous y trouvons des circuits de flottation du cuivre et du zinc, ainsi qu'un circuit de récupération et raffinage des métaux précieux. À la fin, la mine obtient trois produits : lingots aurifères de métaux précieux (or et argent), concentré de zinc et concentré de cuivre. Depuis 1988, plusieurs modifications ont été apportées à l'usine de concentration pour optimiser l'extraction des métaux précieux et sous-produits. Aujourd'hui, plus de 20 ans après la mise en fonction de l'usine d'origine, l'usine de concentration de la mine fonctionne au-delà des attentes. L'usine comprend un circuit de broyage, un circuit de broyage secondaire (permettant jusqu'à plus de 7000 tonnes par jour d'être traités), un système de flottation du cuivre et du zinc,

une aire d'épaississement/filtration et de stockage des concentrés et finalement un circuit de récupération des métaux précieux. Le dernier circuit comprend la cyanuration, la décantation à contre-courant, la précipitation de l'or à l'aide de poussière de zinc et la destruction du cyanure avant la production des remblais en pâte.

### **2.2.3. Traitements de l'effluent minier**

En raison des nombreux travaux effectués chaque jour, des volumes importants d'effluent sont produits. Encore, certains produits chimiques utilisés pour accomplir les extractions doivent être traités et détruits à fin de se débarrasser ou de réutiliser l'eau. L'eau usée est donc traitée trois fois avant qu'elle soit dépolluée:

1. Traitement aux peroxydes : permet l'oxydation du cyanure en cyanate.
2. Traitement à la chaux : permet la précipitation des résidus de minerais et la neutralisation des eaux acides.
3. Traitements biologiques : dégradation du thiocyanate et cyanate en ammoniac ainsi que la nitrification.

À la suite de l'extraction par cyanure, environ 43 % des résidus sont envoyés vers un premier parc à résidus (parc ouvert) mesurant environ 1 km<sup>2</sup>. C'est par la suite de ces traitements et d'analyses adéquates prouvant que l'eau est dépolluée qu'elle peut être rejetée dans les lacs ou (dans la majorité des cas) réutilisée dans l'usine de concentration.

## **2.3.L'usine des traitements finals des eaux**

### **2.3.1. Description et emplacement**

L'usine du traitement final des eaux (UTFE) est située sur le terrain de la mine Laronde, plus précisément au côté des puits Penna. Cette usine est constituée d'un traitement biologique de type « Rotating Biological Contactor », ou biodisque, où un biofilm responsable de la dégradation des polluants se développe à la surface du mécanisme. L'eau est ensuite acheminée à un décanteur pour séparer les boues biologiques excédentaires se détachant du support des biodisques. Le thiocyanate, le cyanate et l'ammoniac y sont assez concentrés (environ 700, 200 et 50 mg/L) en raison de la recirculation et du procédé d'extraction multimétaux (présence de cuivre et de zinc qui se lient aussi au cyanure, d'où un besoin d'une plus grande quantité de celui-ci). Si l'on compare l'azote de ces composés aux valeurs en azote pouvant être nitrifié dans un effluent municipal (azote ammoniacal et organique), la charge traitée à l'UTFE serait équivalente à celle d'une municipalité de 66 000 habitants. L'UTFE comporte quatre séries de



quatre biodisques. Dans chaque série, le premier biodisque sert à la transformation du cyanate et du thiocyanate en ammoniac. Les trois autres biodisques servent à la nitrification, soit la transformation de l'ammoniac en nitrate. Cette configuration est utile, car la nitrification ne peut pas avoir lieu en présence d'une concentration importante de thiocyanate car la nitrification sera inhibée. D'autre part, la nitrification étant plus lente que la transformation du cyanate et thiocyanate, les 3 biodisques de nitrification permettent la transformation complète de l'ammoniac.

Avec l'arrivée de grandes quantités eaux usées à l'UTFE, il est important de maintenir l'activité optimale dans les biodisques pour éviter le stockage de l'eau. Le stockage d'eau pourrait causer plusieurs inconvénients à la mine tels que l'arrêt de production si la capacité de stockage est atteinte et la possibilité de fuites des bassins pouvant avoir des effets nocifs pour l'environnement. À fin de maintenir cette activité, il y a quelques paramètres d'opérations qui sont importants à maintenir. Les besoins en oxygène des bactéries aérobies sont atteints avec un système d'aération dans l'eau. Les besoins de carbone inorganique sont entretenus avec le maintien de carbonate dans l'eau. L'eau à traiter doit être donc maintenue à une alcalinité minimale (100 mg/L). Il doit y avoir dans l'eau tous les nutriments nécessaires à la survie des bactéries présentes dans le biofilm. C'est pour cela que de l'azote, de l'hydrogène, du soufre, du potassium, du sodium, du calcium et du magnésium en quantités suffisantes sont retrouvés dans les eaux à traiter. Seulement le phosphore (utilisée pour le processus de stockage d'énergie chez les bactéries) doit être ajouté, car il n'est pas suffisamment retrouvé dans les eaux à l'UTFE. Il est important de maintenir les paramètres stables, car les bactéries ne supportent pas les changements drastiques dans leur environnement. Si un changement du procédé est requis, il doit être fait graduellement pour ne pas perturber la microflore installée sur les biodisques. S'il y a un changement drastique dans l'environnement du biofilm, ceci peut venir affecter la performance du biofilm et même tuer certaines espèces. Comme exemple, puisque le métabolisme des bactéries effectuant la nitrification est plus lent et ces bactéries sont plus sensibles à leur environnement elles seront influencées plus rapidement par certains changements et donc la performance de la nitrification sera perturbée.



**Figure 2.2 :** Photo représentative de l'emplacement de l'UTFE avant la construction de deux lignes supplémentaires. Nous y retrouvons le bâtiment abritant le laboratoire, les réservoirs de mélange, les soufflantes, les préparations des réactifs, les cuves en béton contenant les biodisques, le clarificateur, le silo de soude caustique et le réservoir de CO<sub>2</sub>.

Le pH des stades de dégradation du thiocyanate est maintenu entre 7.5 et 8.5 (hiver en bas de 8 et été en haut de 8). Dans la littérature, si le pH est situé entre 7.5 et 8 lors de la nitrification, l'ammoniac est transformé en nitrite et ce composé est transformé rapidement en nitrate.

Un autre paramètre influençant la nitrification ainsi que les autres procédés biologiques lors des stades de dégradation est la température. La température des eaux à traiter à l'UTFE est à 17 °C à l'entrée du système. Lors de l'ajout d'air dans les réacteurs, l'eau est maintenue à une température de 18 à 20 °C. Un système de chauffage a été installé pour éviter les variations de température pouvant nuire à la croissance et performance de la biomasse. De plus, il est important d'indiquer que la température influence également la quantité d'oxygène dans l'eau, c'est-à-dire que le taux de saturation change selon la température (à basse température, la concentration d'oxygène dissous dans l'eau est plus élevée qu'en été).

### 2.3.2. Problématique et solution préliminaires

L'UTFE fut mise en opération en 2003, mais le traitement n'était pas efficace au début pour permettre un rejet au cours d'eau. L'effluent était donc retourné aux bassins d'accumulation. La capacité d'entreposage a d'ailleurs dû être augmentée en agrandissant les cuves à rétention. Le manque d'efficacité était surtout au niveau de la nitrification qui était incomplète. Une collaboration entre Agnico-Eagle et l'INRS-Institut Armand-Frappier (INRS-IAF) a été faite pour analyser le problème. Ceci a permis d'identifier le phénomène d'inhibition par l'ammoniac. En réponse à l'identification d'une cause de la baisse en efficacité du traitement, une modification a été apportée à l'UTFE (recirculation interne pour diluer l'ammoniac au deuxième disque de chaque série).

Cependant certaines conditions causaient encore des baisses en efficacité dans le traitement. Premièrement, il y avait une concentration en ammoniac très élevée dès la sortie du premier biodisque. Ceci était dû au produit de la dégradation du thiocyanate et cyanate. Cette haute concentration (allant jusqu'à 250 ppm) venait inhiber la nitrification qui devait avoir lieu dans les trois derniers biodisques. Seulement le dernier biodisque effectuait une nitrification, mais ce n'était pas suffisant pour respecter les normes des concentrations en nitrites à la sortie de l'affluent. À la suite de la collaboration avec l'INRS-Institut Armand Frappier, une première solution fut apportée : d'ajouter une recirculation à partir de la sortie du quatrième biodisque allant à l'entrée du deuxième biodisque. Ceci a permis une dilution de l'effluent et donc une diminution de la concentration en ammoniac. À ces concentrations, les microorganismes effectuant la nitrification ont pu s'établir et la nitrification était complète. Deuxièmement, il y a des pertes d'efficacité occasionnelles qui sont toujours inexplicables, surtout en hiver. Ce n'est pas la température qui est en cause puisque les biodisques sont chauffées. On a supposé un manque nutritionnel résultant de la précipitation de certains éléments. L'eau est chargée en plusieurs ions et le chauffage hivernal provoque l'entartrage des réacteurs. En plus de causer des problèmes mécaniques, ceci pourrait réduire la disponibilité de certains éléments essentiels. Le laboratoire a vérifié que les agents antitartres utilisés n'inhibaient pas la nitrification à court

terme, mais un effet négatif à long terme n'est pas exclu. Un autre problème concerne le phosphore. Ce dernier est ajouté pour combler les besoins d'énergie pour la croissance des bactéries du bioprocédé. En raison de la salinité élevée dans l'effluent minier, une partie précipite et n'est pas disponible pour les bactéries. La compagnie a donc été obligée d'augmenter la concentration en phosphore à l'entrée des réacteurs. Par contre, les particules de précipité de phosphore ne peuvent pas être entièrement retenues par le décanteur. Pour éviter de dépasser des normes de rejet de phosphore, une étape de précipitation-coagulation à l'alun a été ajoutée. De plus, bien que les biodisques utilisés fussent de dernière génération (submergés à 80 % pour réduire le poids exercé sur le moyeu central), cette technologie pose de sérieux problèmes mécaniques : il y a eu rupture d'un des moyeux et pertes de pointes de tartes (parties additionnelles des biodisques). Finalement, en plus du problème de surdosage du phosphore, plusieurs paramètres ne sont pas optimisés en terme de frais de fonctionnement (ex. : oxygène dissous). Le procédé ne profite pas de l'opportunité d'utiliser une partie du nitrate formé pour métaboliser du cyanate et thiocyanate en conditions dénitrifiantes, ce qui réduirait les coûts d'aération et permettrait une dénitrification partielle (élimination d'une partie du nitrate). Agnico-Eagle désire donc développer un procédé de traitement biologique plus efficace que celui déjà installé.

## **2.4. Biofilms**

### **2.4.1. Description**

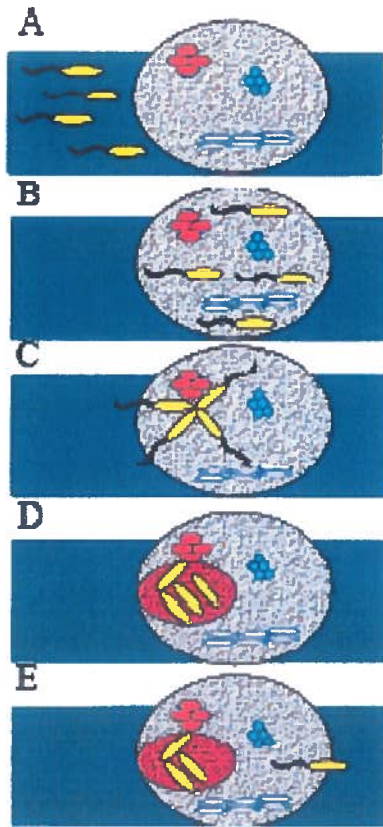
La perception que les bactéries vivent en tant qu'êtres unicellulaires est basée sur les cultures cellulaires pures en laboratoire (Davey et coll., 2000). Étant donné le fait que les colonies bactériennes puissent être isolées afin d'obtenir des cellules pures dans les cultures liquides, cette méthode d'opération est exploitée et utilisée dans plusieurs études d'activité bactérienne. Bien que l'approche traditionnelle des études de bactéries isolées dans des milieux de culture liquides a apporté de nombreuses conclusions sur la pathogénicité et la voie métabolique des certaines souches, la croissance planctonique de cultures pures est rarement retrouvée en milieu naturel (Davey et coll., 2000). En fait, les micro-organismes préfèrent une convenance de vie où la population est ancrée sur un support fixe, communément appelé état sessile, au lieu de l'état planctonique (Filloux et Vallet, 2003). Cet attachement sur un support est

une méthode de survie qui permet une colonisation de l'environnement en question. Lorsque les bactéries s'attachent à une surface stable, elles développent une communauté organisée que William Costerton appela « biofilm » (Filloux et Vallet, 2003). Dans l'environnement, les biofilms sont majoritairement composés d'espèces bactériennes multiples. Jusqu'à récemment, l'insuffisance des techniques d'analyse pour explorer ces communautés *in situ* a entravé les analyses détaillées à leur sujet. Grâce aux avancements des microscopes et des technologies moléculaires, il est maintenant possible d'étudier ces communautés (Watnick et Kolter, 2000). Ces observations directes des habitats naturels ont permis de conclure que la majorité des micro-organismes persévèrent en communauté attachée sur une surface dans l'écosystème du biofilm et non seul dans un état flottant.

Cinq étapes majeures ont lieu pour aboutir à la formation des biofilms (Watnick et Kolter, 2000) (figure 2.3). C'est un processus qui requiert des interactions multicellulaires complexes. Premièrement, les bactéries prennent connaissance des facteurs environnementaux, ce qui cause le rapprochement à une surface qui résulte à un ralentissement de leur mobilité (Davey et coll., 2000). Ces facteurs environnementaux comme l'osmolarité, le pH, l'apport de fer, la tension d'oxygène et la température vont varier selon l'espèce bactérienne. Normalement, dans des milieux aqueux nutritifs, les bactéries vont s'attacher à n'importe quelle surface environnante et dans des milieux dépourvus de nutriments, les bactéries vont plutôt s'attacher à une surface nutritive (Watnick et Kolter, 2000). Par la suite, la bactérie forme une association transitoire avec la surface ou avec d'autres bactéries occupant la surface. Cette association transitoire permet à la nouvelle bactérie de se trouver un endroit idéal pour se loger. Enfin, les biofilms sont construits en forme 3D par la colonisation des milieux environnants. À la suite de la formation des biofilms, les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux formant un labyrinthe de circulation afin de permettre l'acheminement d'oxygène et des nutriments dans les régions dormantes du biofilm et d'autres corridors servent à l'évacuation des déchets. Un gradient d'oxygène et de nutriments s'impose du sommet à la base du biofilm où il existe un microenvironnement anaérobie (Filloux et Vallet, 2003). Ceci vient appuyer l'hypothèse que la fonction métabolique de la bactérie diffère selon son emplacement dans le biofilm. De plus, un emplacement près de la surface du biofilm permet aux bactéries de se disperser et former d'autres biofilms à différents emplacements (Watnick et Kolter, 2000.).

#### **2.4.2. Utilisation des biofilms dans l'épuration des eaux**

La capacité des microorganismes à dégrader des polluants organiques ou éléments toxiques dans les eaux fut étudiée depuis de nombreuses années. Ce qui est nouveau dans la biodégradation est l'expansion et l'utilisation de ce procédé à fin de traiter de grandes quantités d'effluents industriels. Ce qui est attrayant du traitement des eaux usées par biofilm sur support est la promesse d'un traitement économique, d'une facilité d'opération, une technologie compacte et le plus important de nos jours, une technologie sécuritaire pour l'environnement. De plus, les résultats finaux sont moins influencés par la séparation de la biomasse (contrairement aux traitements par boue activée). La concentration de la biomasse à être séparée à la fin du traitement est 10 fois moindre et les techniques de séparation sont plus flexibles (Ødegaard et coll., 2006). Finalement, la biomasse qui est attachée sur un support devient plus spécialisée (plus grande concentration de microorganismes impliqués dans la dégradation) (Ødegaard et coll., 2006).

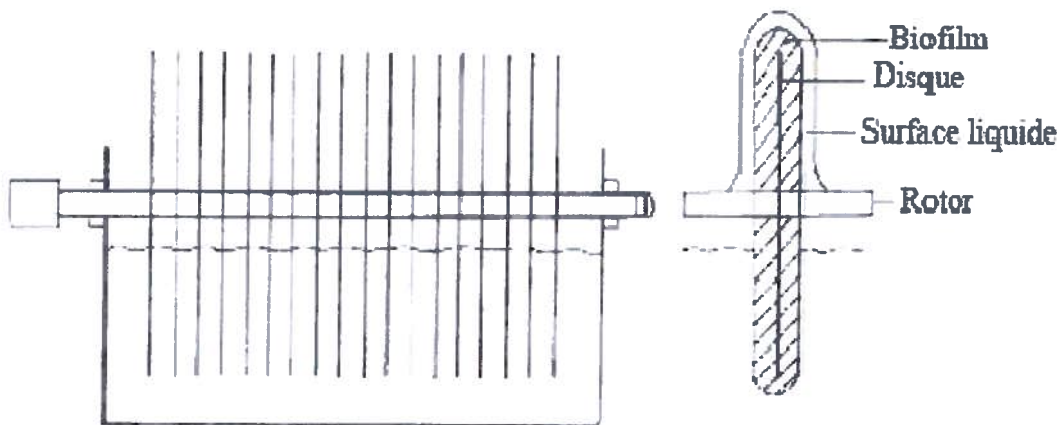


**Figure 2.3:** Représentation schématique de la formation d'un biofilm par une espèce bactérienne. A) le déplacement vers une surface dans un endroit nutritif à l'aide de flagelles. B) l'encrage aléatoire et réversible de bactéries à une surface. C) La migration des bactéries sur la surface afin de former une microcolonie. D) Production d'exopolysaccharides pour former la forme tridimensionnelle du biofilm. E) Lorsque les conditions de l'environnement deviennent défavorables, certaines bactéries peuvent se détacher et nager vers un environnement favorable. Traduit de Watnick et Kolter, 2000.

## 2.5. Les traitements par biodisques

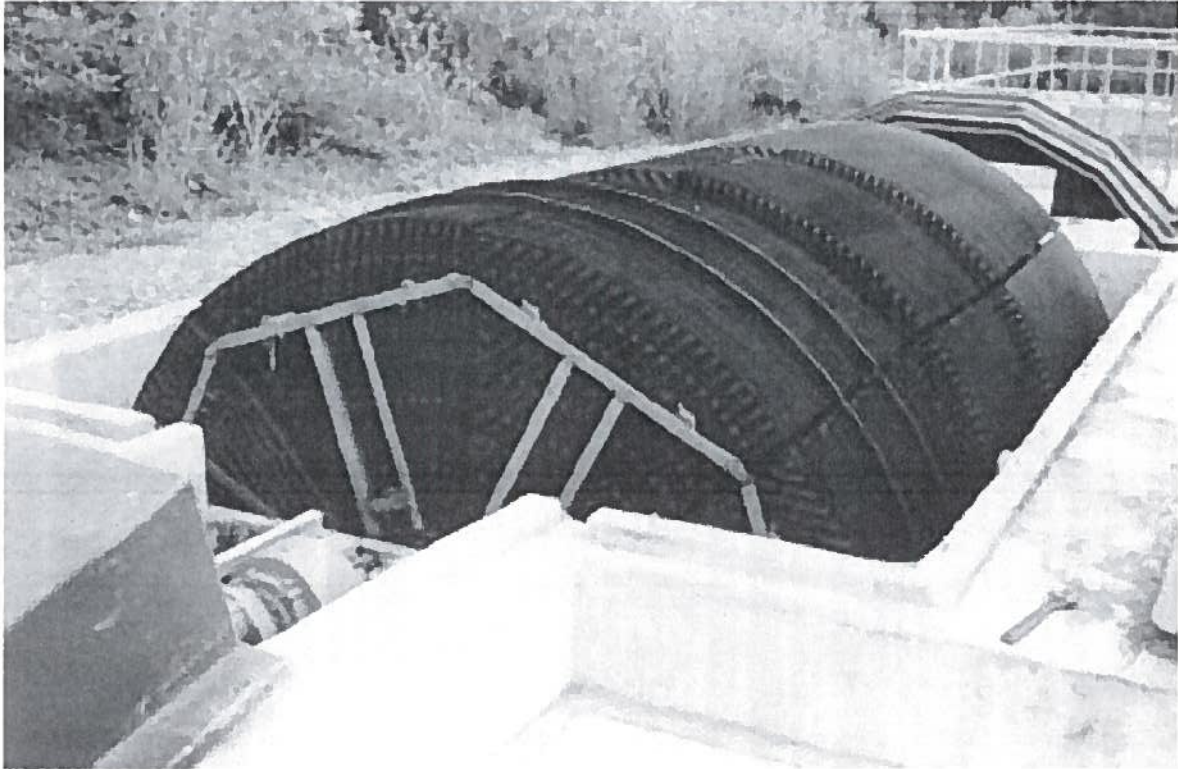
Les biodisques sont grandement utilisés pour traiter les effluents domestiques en Europe et dans les petites villes en Amérique du Nord (Chan, 1979; Mba et coll., 1999) comme ceux de l'industrie laitière et alimentaire. Les biodisques sont munis de plusieurs segments (4 à 12) par disques en plastiques résistants alignés sur un axe horizontal. Les segments individuels sont généralement supportés par un minimum de trois tiges rigides attachées à une structure de support démontré à la figure 2.5 (Mba et coll., 1999). Le disque uni est à la fois exposé à l'air et à l'eau contaminée. L'assemblage du rotor et des disques va ensuite être tourné à faible vitesse (1 à 10 RPM) par un moteur ou par brassage à l'air comprimé (Patwardhan, 2003). Le mouvement rotatif du biodisque influence la formation d'une couche mince d'eau à traiter à la surface des

disques permettant la dégradation des composés par des microorganismes aérobies lorsqu'ils sont exposés à l'atmosphère (Patwardhan, 2003, et Chan, 1979). La paroi sur laquelle les microorganismes ont une croissance naturelle est nommée support. La force de cisaillement causée par la rotation des disques détache la biomasse en excès allouant une croissance constante de biomasse (Patwardhan, 2003). Comme démontré par les figures 2.4 et 2.5, le disque a deux fonctions principales : 1. il fournit une surface de croissance pour la microflore. 2. il facilite le contact air/eau aux microorganismes en formant une couche mince du liquide à traiter sur les parois du biofilm.



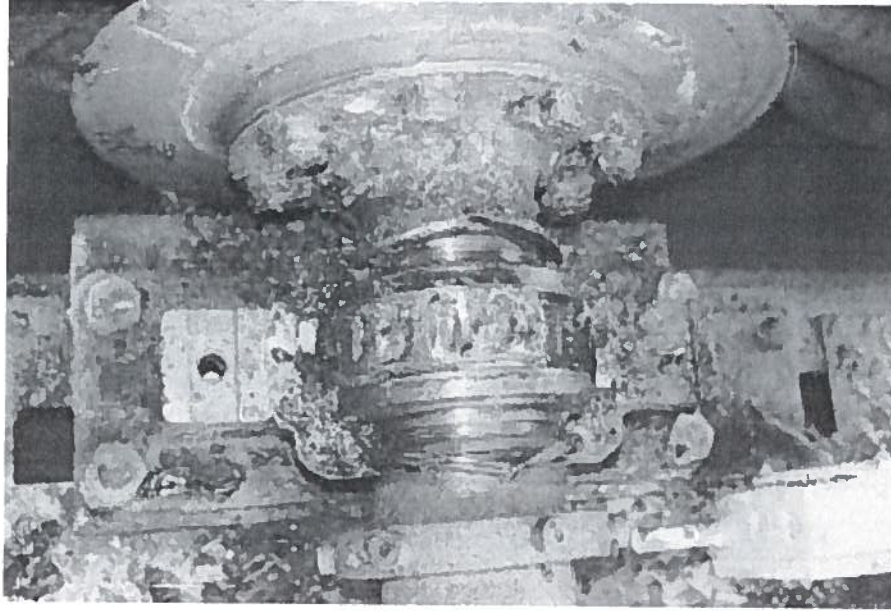
**Figure 2.4. Représentation schématique de la constitution d'un biodisque.** Traduit de Patwardhan, 2003.





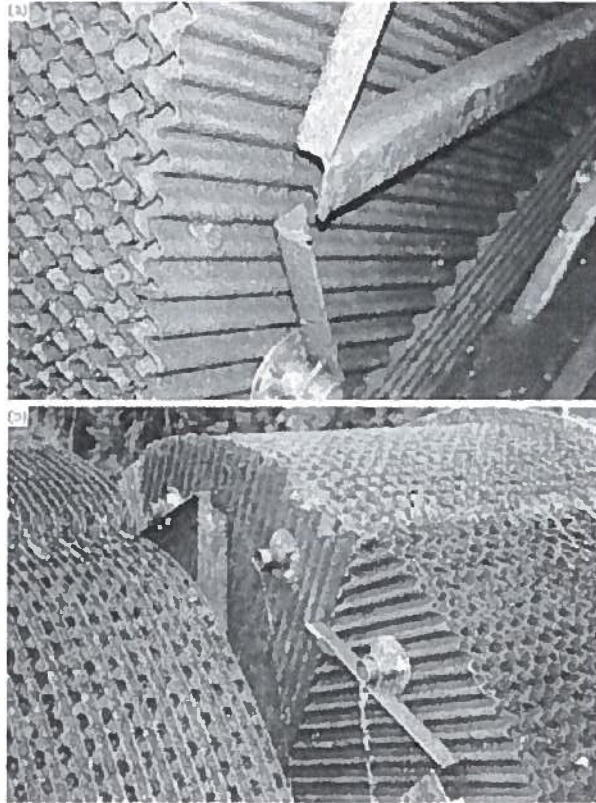
**Figure 2.5.** Représentation d'une installation de biodisques. Patwardhan, 2003.

Des études ont démontré que l'avantage principal du biodisque est la grande surface de contact créée par les disques permettant un traitement adéquat d'une quantité d'eau supérieure à d'autres traitements biologiques comme les traitements par boues activées (Mba et coll., 1999; Patwardhan, 2003). De plus, ces mêmes études ont montré que si les disques sont fabriqués en plastique mince, ceci n'offre presque aucune résistance lors de la rotation dans l'eau, le coût d'énergie de la technologie des biodisques est considérablement bas en comparant avec les traitements de boues activées (Mba et coll., 1999; Patwardhan, 2003).



**Figure 2.6. Moyeu et billes de roulement vieillissent par corrosion et poids des biodisques.** Mba D., et al 1999

Par contre, des études comme celle de Mba et coll. (Mba et coll., 1999) ont démontrées que l'utilisation des biodisques à grande échelle peut entraîner des inconvénients tels que les bris mécaniques dus à une faible conception, à la corrosion lente causée par les produits à traiter ou l'action des microorganismes. Plus de 250 biodisques ont été analysés et la majorité des bris rapportés furent les bris de moyeux ce qui comprend des frais de réparation élevés (figure 2.6) (Mba et coll., 1999). Ce genre de bris mécanique est le plus sévère chez les biodisques dus au coût total de remplacement. Un bris du moyeu résulte à un remplacement total du biodisque, car les panneaux de plastique sont endommagés au-delà de la réparation. Aussi, la rotation du moyeu peut s'arrêter par le fait d'un séchage ou une contamination de la graisse lubrifiante résultant au bris des billes de roulement (figure 2.6-2.7). Une fois qu'une partie de l'unité est fracturée, le stress additionnel créé par cette fracture est redistribué sur la structure entière résultant à l'écrasement du support dû au poids de la biomasse (Mba et coll., 1999). Mba et coll. (1999) ont suggéré d'augmenter la vitesse de mouvement des supports ainsi que leurs surfaces de croissance pour éviter l'accumulation de biofilm formée par des microorganismes dans l'environnement. Pour conclure, la technologie des biodisques est grandement influencée par le bris du moyeu et la « fatigue » des supports. Ces facteurs ne furent pas pris en compte lors de la conception mécanique de cette technologie.



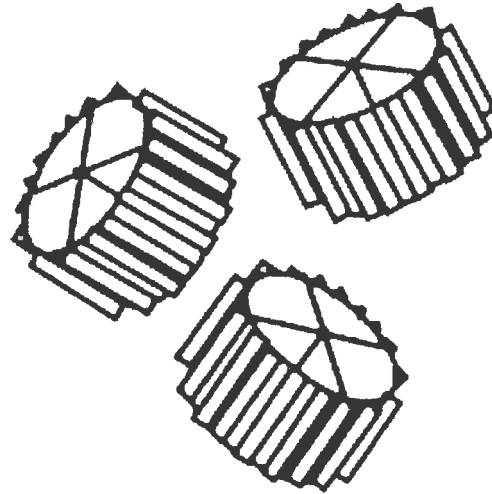
**Figure 2.7.** Figures démontrant les dommages d'un biodisque causés par l'usure. a) Segment du biodisque fracturé. B) Unité de biodisque sévèrement endommagée. Mba D., et al 1999

## 2.6. Les traitements par « Moving Bed Biofilm Reactor » (MBBR)

La technologie MBBR fut conçue en Norvège dans le début des années 1990 afin d'éliminer les désavantages liés aux autres technologies à supports fixes et aux boues activées (Ødegaard, 2006). L'idée des MBBRs était d'obtenir un traitement efficace, en continu et ayant une grande surface de contact. En 2006, plus de 300 usines de traitements des eaux utilisèrent des traitements basés sur les MBBRs dans plus de 22 pays du monde (Ødegaard, 2006). La majorité des traitements utilisant les MBBRs furent conçus afin de traiter des eaux municipales et des eaux usées provenant de petites industries dans le l'intention de retirer l'azote en excès.

L'idée principale des MBBRs est d'avoir un réacteur à biofilm en marche constante, ne pouvant pas être bloqué, n'ayant pas de perte d'efficacité à la fin du procédé et ayant une grande surface de contact des biofilms. Ceci est accompli en allouant la croissance des biofilms (biomasse) sur des petits supports baignant et bougeant avec l'eau à traiter. Le mouvement des supports est causé par l'aération (version aérobique) et un brassage mécanique (version

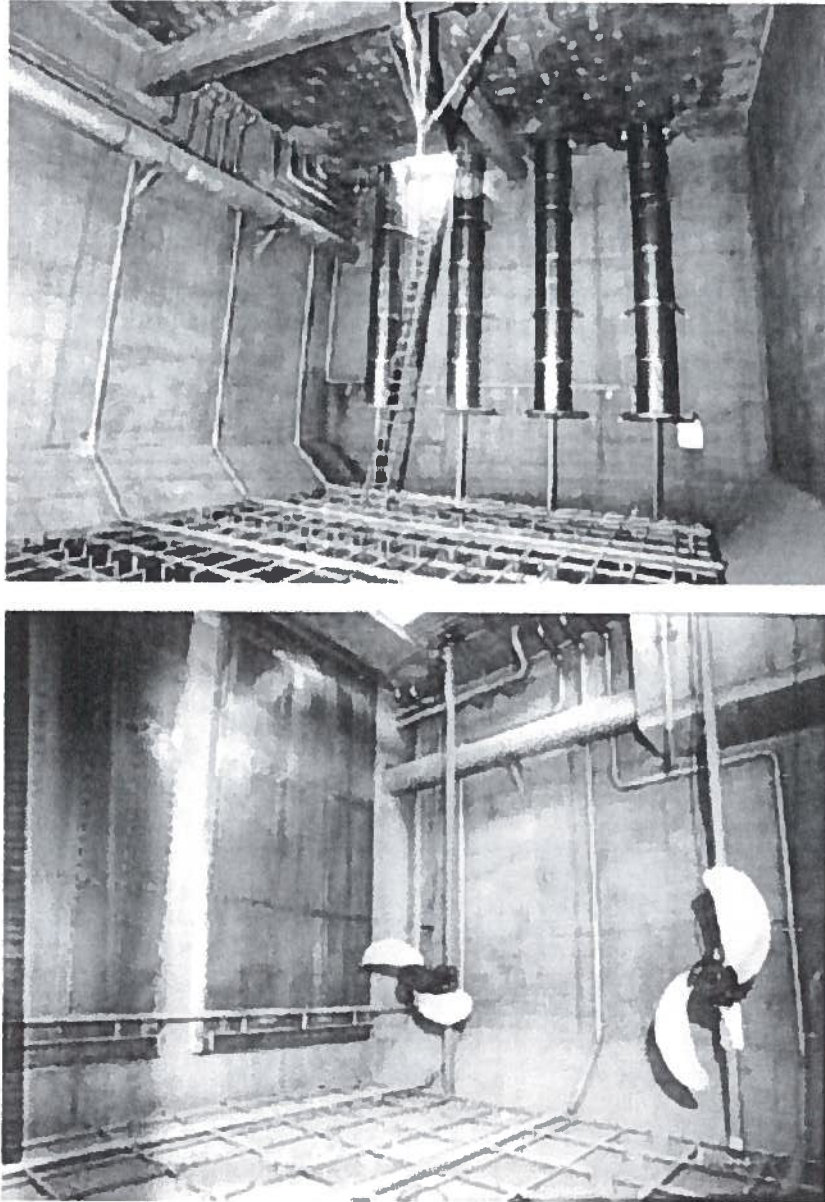
anoxique/anaérobie) vu à l'aide de la figure 2.9. Les supports sont faits à partir de polyéthylène et d'une forme cylindrique ayant des segmentations à l'intérieur et des ondulations sur la surface externe permettant l'accumulation de la biomasse (fig. 2.8). Le diamètre et le nombre de segmentations reposent sur le type de traitement et de biomasse.



**Figure 2.8 :** Représentation schématique démontrant la structure générale des supports. Ødegaard, 2006.

Le montage des MBBRs est conçu en sorte que le volume entier du réacteur est utilisé pour la croissance de la biomasse et donc, en conséquence, la dégradation des composés retrouvés dans l'eau (Ødegaard, 2006). Le montant de supports ajoutés dans les réacteurs de traitements dépend de chaque cas, ce qui donne de la flexibilité à la surface de contact. Il est recommandé que les supports doivent avoir une occupation maximale de 70 % dans le réacteur. Dépendamment du genre de support, ceci correspond à une surface de contact théorique d'environ  $500 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$ . Par contre, puisque la biomasse est plus abondante à l'intérieur des supports qu'à l'extérieur (possiblement causé par la collision entre supports), la surface explicite actuelle est de  $350 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$  (Pastorelli et coll., 1997; Ødegaard et coll. 1994). De plus, il fut démontré qu'une des caractéristiques importantes du bon fonctionnement des MBBRs est la surface de contact du biofilm (Ødegaard et coll., 1999). Ceci vient augmenter la surface de diffusion des composés dans le biofilm. Puisque cette diffusion est importante, l'épaisseur du biofilm actif (biofilm pouvant traiter les composés diffusés) est importante. Puisque la profondeur de diffusion des composés dans le biofilm est normalement moins que  $100 \mu\text{m}$ , le biofilm idéal devrait être mince et répandu sur la surface des supports (Ødegaard et coll., 2006).

Afin d'obtenir ceci, la turbulence dans le réacteur est d'une grande importance. À la fois pour transporter les substrats aux biofilms et de diminuer l'épaisseur des biofilms sur les supports par les forces de cisaillements (Ødegaard, 2006).

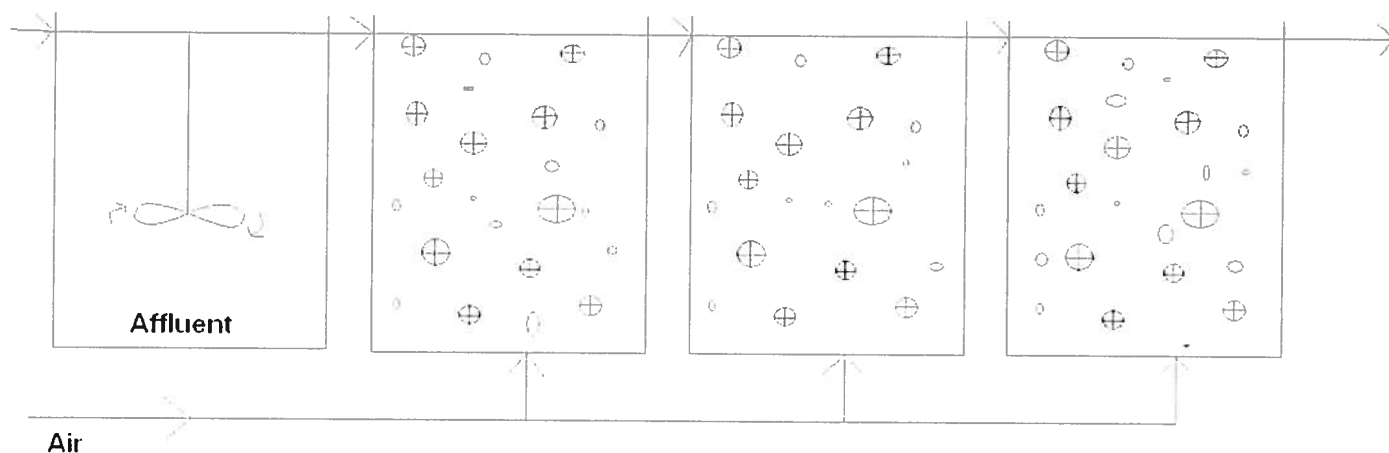


**Figure 2.9.** Exemples photographiques de MBBRs en construction. (a) réacteur aérobie muni d'un système d'aération monté à la verticale; (b) Réacteur anoxique muni de rotor sur moyeux horizontaux. (Ødegaard, 2006)

Selon les études faites par Ødegaard et Pastorelli et al. (Ødegaard, 2006; Pastorelli et coll., 1997), les MBBRs seraient une technologie supérieure due à ces caractéristiques :

- 1— l'utilisation des supports en suspension (biobilles) évite l'incorporation de supports fixés (comme les biofiltres et biodisques) dans les réacteurs à fin de maintenir la biomasse dans les réacteurs appropriés. Donc il y a une meilleure utilisation de l'espace du réacteur lors du traitement des eaux usées;
- 2— l'utilisation des MBBRs diminue le risque de bris mécaniques, dû à la petite taille et au faible poids des supports (figure 2.10); et
- 3 — l'utilisation d'une technologie à biomasse permet de spécialiser la biomasse c'est-à-dire avoir une grande concentration d'organismes utiles au traitement.

La technologie MBBR ne comprend pas de recirculation de la biomasse sur les supports. Seulement la biomasse en suspension sera séparée ce qui est un avantage considérable en comparaison avec les traitements par boues activées. Le fait que les supports sont continuellement submergés et constamment en mouvement dans l'eau usée offre une meilleure sélection des microorganismes dégradant les composés ciblés (Andreottola, 2000).



**Figure 2.10.** Représentation schématique du fonctionnement des MBBR lors de traitements d'eau usée. (Pastorelli et coll., 1997)

## 2.7. La dégradation microbienne du thiocyanate et cyanate

Depuis 1904, la majorité des études effectuées sur la dégradation biologique du thiocyanate ont été faites sous des conditions aérobies (seulement quelques-unes faites sous conditions anaérobies) et ont démontré que plusieurs microorganismes peuvent dégrader ce composé. Généralement, lors de la dégradation biologique du thiocyanate, le composé est utilisé ou transformé en source de carbone ou d'azote. (Happold et al. 1954). La voie oxydative du thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) est la suivante : le thiocyanate est hydrolysé en cyanate ( $\text{CNO}^-$ ) et sulfure. Le cyanate est ensuite hydrolysé en ions d'ammoniac ( $\text{NH}_4^+$ ) et bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) où le sulfite est oxydé en sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Youatt, 1954; Happold et al. 1954). Cette réaction est démontrée à l'aide de l'équation suivante :



### 2.7.1. Bactéries autotrophes dégradant le thiocyanate

Les bactéries autotrophes sont des micro-organismes fixant le dioxyde de carbone pour l'incorporer dans leurs molécules organiques. La majorité des bactéries dégradant le thiocyanate sont autotrophes chimiolithotrophes, c'est-à-dire, bactéries capables d'assimiler le carbone du dioxyde de carbone tout en oxydant des composés minéraux (inorganiques) comme le  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{H}_2$  pour produire à la fois de l'énergie et des électrons. Les espèces bactériennes telles *Thiobacillus thiosparus* (antérieurement connu sous le nom de *Thiobacillus thiooxydans*) ont été isolées à partir de l'effluent d'usine de charbon et utilisent ou transforme le thiocyanate comme source de carbone et d'azote (Happold et al. 1954, Katayama, 1978). Il fut démontré que *T. thiosparus* peut oxyder jusqu'à 50 mM de thiocyanate en dioxyde de carbone, ammoniac et sulfate, où le cyanate et le sulfite sont les intermédiaires primaires (Youatt, 1954; Katayama, 1978). *Thiobacillus denitrificans* fut identifié comme une bactérie autotrophe pouvant utiliser le thiocyanate comme source de soufre (de Kruyff, 1957). Ces deux espèces ont été identifiées comme des organismes pouvant utiliser le thiocyanate comme leur seule source d'énergie en présence de nitrate (Taylor et coll., 1971).



Une enzyme catalysant l'hydrolyse des liens nitriles du thiocyanate résultant la formation du sulfure de carbonyle et l'ammoniac a été purifiée chez *T. thiosparus*, soit l'hydrolase du thiocyanate (Katayama, 1992). De plus, il a été démontré que la souche *Paracoccus* sp. TH1 011 peut utiliser des ions thiocyanates dans le but d'acquérir de l'énergie en conditions dénitrifiantes (Katayama, 1995).

Des espèces du genre *Thioalkalivibrio* (alkaliphile chemolithoautotrophes obligatoire) peuvent croître sur un milieu anaérobie avec le thiocyanate comme unique source d'énergie et le nitrate ou le nitrite comme accepteurs d'électrons. Des espèces du genre *Halomonas* peuvent utiliser le  $\text{SCN}^-$  comme une source d'énergie et le  $\text{CO}_2$  comme leur source de carbone.

### 2.7.2. Bactéries hétérotrophes dégradant le thiocyanate

Les bactéries hétérotrophes sont des bactéries utilisant des molécules organiques réduites comme source principale de carbone et (pour certains genres bactériens) comme source d'énergie. Dans le cas des molécules de thiocyanate, les bactéries hétérotrophes utilisent cette molécule comme source de carbone, de soufre ou d'azote. Pour les bactéries hétérotrophes utilisant le thiocyanate comme source de soufre et d'azote seulement la source de carbone organique peut varier (glucose, acétate, phénol, etc.). Les hétérotrophes utilisant le thiocyanate comme source de carbone et d'énergie ont été isolés sur des milieux contenant le thiocyanate comme source de carbone et ont démontré une affiliation à des souches ne fixant pas le dioxyde de carbone. L'identité des hétérotrophes utilisant le thiocyanate n'est pas certaine, car la majorité des publications ont été basées sur des résultats d'études morphologiques et physiologiques.

*Pseudomonas fluorescens* et *Acinetobacter junii* ont été identifiés comme des espèces pouvant dégrader le thiocyanate et utiliser ce composé comme source de soufre et d'azote (Mason, 1994). Il fut démontré de façon préliminaire qu'un organisme ressemblant à *Pseudomonas stutzeri* était en mesure de dégrader le thiocyanate et l'utiliser comme source d'azote et possiblement de soufre (Straffor et Gallely, 1969). *Pseudomonas putida* a le potentiel de dégrader le thiocyanate comme source de carbone, d'azote et d'énergie, donnant comme sous produits de l'ammoniac et du dioxyde de carbone (Chapatwala et coll., 1998). Lorsque les cellules de cette espèce furent cultivées sous forme immobilisée sur bille d'alginate, jusqu'à 120 mM de thiocyanate ont pu être dégradés contre seulement 4 mM par les cellules non

immobilisées. Ces mêmes espèces furent étudiées en parallèle avec *P. stutzeri* où ces deux candidats pouvaient dégrader le cyanure et thiocyanate lorsqu'ils étaient en hautes concentrations dans les effluents industriels (Grigor'eva, 2006). Il a été aussi démontré que ces deux souches utilisent la voie du cyanate à fin de dégrader le thiocyanate. Il a été démontré qu'un genre bactérien ressemblant à *Arthrobacter* peut tolérer de grandes concentrations de cet ion (Betts, 1979). *Methylobacterium thiocyanatum*, une bactérie methylotrophe facultative isolée dans le sol, à la proximité des racines de *Allium aflatumense*, peut utiliser le thiocyanate comme source d'azote et a une croissance hétérotrophe (Wood, 1998).

La détermination de la composition d'un consortium microbien dégradant le thiocyanate présent dans les déchets miniers de l'Afrique du Sud à l'aide d'outils de biologie moléculaire a permis de détecter la présence de bactéries des genres *Ralstonia* et *Shingomonas* (*Ralstonia eutropha* et *Shingomonas pausimobilis*) et que celles-ci étaient capables d'utiliser le thiocyanate de potassium comme source unique de carbone et d'azote (duPlessis, 2001). Des études utilisant des cultures en mode cuvé et employant des estimations analytiques de la cinétique de cette espèce ont démontré que le thiocyanate est complètement minéralisé après environ une semaine d'incubation où les produits finaux étaient l'ammoniac et le sulfate (Ahn, 2004 et 2005). Des échantillons de sols pris à proximité de la mine d'or Kumjung (Corée du Sud) ont été mis en culture contenant 150 mg/L de thiocyanate de potassium afin d'isoler des souches. Il est démontré qu'il y a dégradation du thiocyanate en 16 jours d'incubation. Ceci indique que les souches utilisent le thiocyanate comme source d'énergie pour croissance, car le thiocyanate était l'unique source de carbone et d'azote (Lee, 2003). Ces souches furent identifiées comme étant étroitement apparentées à l'espèce *Klebsiella*.

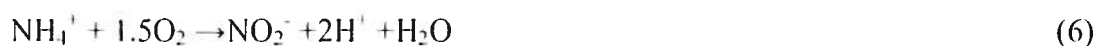
Dans la majorité des études, il a été démontré qu'en utilisant une culture mixte isolée du sol, il y avait une dégradation du thiocyanate lente lors des débuts de l'analyse et une période plus rapide après quelques jours d'incubation avec le composé à traiter. Comme exemple, Lee et coll. (2003) ont démontré que le thiocyanate était dégradé par un consortium microbien à un taux de 9.9 mg SCN/L-j pour les premiers 12 jours puis passait à 32,6 mg SCN/L-j au 13e jour. Ceci suggère que la dégradation du thiocyanate est optimale en référence à la terminaison de la phase exponentielle de croissance. Finalement, il a été démontré qu'une coculture de *Pseudomonas diminuta* et *Acinetobacter johnsonii* dans des conditions hétérotrophes et ayant le thiocyanate

comme seule source de carbone et d'azote pouvait dégrader 1,42 g/l de SCN<sup>-</sup> (Boucabeille, 1994).

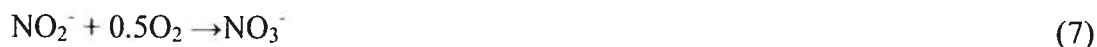
## 2.8.La nitrification

### 2.8.1. Caractéristiques

Le cycle de l'azote est un des cycles les plus importants des écosystèmes terrestres. Ce cycle applique 4 grands procédés microbiologiques : la fixation de l'azote, la minéralisation, la nitrification et la dénitrification. De plus en plus de recherches sont basées sur les deux derniers procédés à fin d'éliminer les composés azotés formés lors de la formation de déchets industriels. Il est important d'éliminer les composés azotés retrouvés dans les effluents industriels, car ces composés peuvent être potentiellement toxiques pour l'écosystème aquatique en causant soit l'élimination de l'oxygène et l'eutrophisation. La nitrification (oxydation aérobie de l'ammoniac) est un procédé microbiologique normalement accompli par des bactéries chimioautotrophes et faites en deux étapes : la première étape étant la nitrification où a lieu l'oxydation de l'ammoniac en nitrite par des bactéries oxydatives d'ammoniac (AOB : Ammonia-oxidizing bacteria). Ces bactéries nitritantes possèdent une enzyme membranaire : ammoniac monooxygénase (AMO) qui catalyse l'oxydation du NH<sub>3</sub> en hydroxylamine. L'hydroxylamine est oxydée en nitrite par l'action de l'hydroxylamine oxydoréductase, une enzyme périplasmique (Kowalchuk et Stephen, 2001; Richardson et Watmough, 1999). Le groupe de bactéries nitratantes (AOB) comprend des espèces du genre *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio* (Harms et coll., 1976; Koops et coll., 1976; Prosser, 1989). Cette première réaction peut être résumée à l'aide de l'équation ci-dessous :



La deuxième étape de la nitrification est l'oxydation du nitrite en nitrate par des bactéries oxydatives de nitrite (NOB). Les bactéries nitritante (NOB) sont affiliées aux genres *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* et *Nitrospina* (Prosser, 1989). L'oxydation du nitrite en nitrate est faite à l'aide d'une enzyme oxydoréductase. Cette enzyme est réversible, car elle peut effectuer une oxydation ainsi que la réduction des nitrites et nitrates (Prosser, 1989).



Les bactéries effectuant la nitrification sont sensibles à de nombreux facteurs environnementaux. Des études ont démontré que la nitrification peut être influencée par les concentrations de substrats, le pH, la température, la concentration de l'oxygène, le genre d'eau polluée, le temps de rétention et la présence de composés organiques (Chérif Ben-Youssef, 2009). Il fut démontré qu'à un pH stable (7.5-8.5) et à une température variant de 20 à 38 °C la nitrification pourra être accomplie jusqu'à l'obtention de nitrates (Young Mo Kim et coll., 2007). Il y a beaucoup d'information dans la littérature sur l'influence de la température ainsi que du pH sur la nitrification, mais les conditions optimales varient de cas à cas. Buswell et coll. (1954) ont reporté que la température optimale pour *Nitrosomonas* était de 30-36°C. Loveless et Painter (1968) ont démontré une température optimale de 34-35°C pour le genre *Nitrobacter* et que le pH optimal pour les bactéries nitrifiantes était de 7.5-8.0. Neufeld et coll. (1986) ont indiqué qu'il y a peu ou aucune croissance sous la température de 5 °C et au-dessus de la température de 45 °C pour les deux genres *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*. Les effets de la température et du pH sur les bactéries nitrifiantes peuvent varier dû aux variations de la composition et de l'état de la biomasse utilisée. Il est important d'avoir une quantité suffisante de nutriments afin de stabiliser la flore nitrifiante dans le procédé biologique. Une source de carbone inorganique est importante à la nitrification (souvent ajouté en forme de bicarbonate) et une quantité suffisante de phosphore est nécessaire pour la croissance bactérienne. En général, 5 mg/l de phosphate est suffisant pour le procédé de la nitrification (Sharma, 1977).

La composition de l'eau à traiter est importante à la nitrification car certains composés toxiques (comme le cyanure) peuvent devenir inhibiteurs à la nitrification à des concentrations minimales. Kim et coll. (2007) ont démontré qu'environ 200 mg/l de thiocyanate semblent diminuer l'efficacité de la nitrification. Ceci pourrait être dû au fait que le thiocyanate était transformé en ammoniac durant sa biodégradation. Kim et son équipe a démontré qu'en ajoutant 500 mg/L de  $\text{SCN}^-$  dans un procédé biologique, 20 mg N/L d'ammoniac est produit suite à la biodégradation de celui-ci. Ceci augmente la concentration en ammoniac et donc influence la capacité de nitrification (Kim et coll., 2009). De plus, il pourrait y avoir compétition pour la source de carbone inorganique entre les bactéries dégradant le thiocyanate et les bactéries

nitrifiantes (Kim et coll., 2009). Finalement, une concentration élevée en ammoniac pourrait venir inhiber la nitrification par le manque de carbone inorganique dans l'effluent (Kim et coll., 2009).

Il fut démontré qu'une concentration en ammoniac excédant 350 mg\L venait diminuer l'efficacité de la nitrification (Kim et coll., 2008). Le temps de rétention peut affecter la qualité de la nitrification. Lorsque le temps de rétention est court, ceci favorise le peuplement de microorganismes ayant une croissance stable et rapide. À une température et un temps de rétention favorable à la croissance de bactéries hétérotrophes ou autotrophes dégradant le thiocyanate, il y avait inhibition des bactéries nitrifiantes (Kim et coll., 2007).

### **2.8.2. La nitrification dans les traitements des eaux**

Depuis plusieurs années la croissance exponentielle de la population mondiale ainsi que des demandes en productions de biens et produits cause des effets secondaires indésirables à l'environnement. Depuis plus d'une trentaine d'années de nombreuses lois furent mises en effets afin de contrôler la production et la décharge des eaux usées produites par dans les secteurs municipaux et industriels. Traditionnellement les règles étaient visées aux traitements des eaux chargées en matière organique causant l'augmentation en DBO et DCO. Même avec les progrès dans les systèmes de traitements des eaux, il y a toujours présence de composés problématiques tels que les composés azotés. Pour traiter ces composés azotés, un système spécifique doit être mis en place. Comme mentionnée ci-haut, la nitrification est souvent inhibée par la présence de matière organique. Afin de contrer l'inhibition de la nitrification, un réacteur sera mis en place avant l'étape de la nitrification pour retirer la matière organique. Les réacteurs de traitements de matière organique vont avoir une grande population d'hétérotrophe et les microorganismes nitrifiants seront retrouvés dans les derniers réacteurs où la matière organique est minimale. Ceci permet d'optimiser les procédés séparément. Comme exemple, Rusten et coll. (1995) ont utilisé un traitement chimique primaire pour but d'éliminer le phosphate et la demande biologique en oxygène (DBO). Ceci est venu réduire le volume de réacteur afin d'obtenir la nitrification. Dans ce cas spécifique, la biomasse effectuant la nitrification était plus petite et donc la nitrification était plus efficace (Odegarrd, 2006).

Il y a plusieurs paramètres principaux à surveiller lors de la nitrification en traitements d'eaux soit: la charge de matière organique, la concentration en ammoniac, le pH, l'âge des boues et la concentration en oxygène. Ces facteurs vont directement influencer l'efficacité de la nitrification. Il est couramment démontré que si le ratio C:N est élevé dans l'environnement où il y a possibilité de nitrification, les bactéries hétérotrophes feront compétition avec les bactéries nitrifiantes pour l'azote libre (Strauss, 2000). Ceci est dû au fait que naturellement, il y a une plus grande présence de bactéries hétérotrophes dans les milieux contenant de la matière organique, et ces bactéries ont une plus grande capacité de consommer les composés pour leurs croissances en comparaison avec les bactéries nitrifiantes. Donc, dans des environnements limités en azote, les hétérotrophes seront les bactéries dominantes et l'azote ammoniacal sera utilisé pour la synthèse cellulaire et donc il n'y aura pas besoin de nitrification (Stauss, 2000). La qualité des composés de carbone organique va également nuire à la nitrification. Si la qualité du carbone organique est grande (facilement assimilable par la communauté hétérotrophe) le résultat sera l'augmentation de croissance des bactéries hétérotrophes et donc l'efficacité de nitrification sera diminuée. Donc, si la qualité du carbone organique est faible (n'est pas facilement assimilée par les bactéries hétérotrophes), la concentration relative de l'azote sera augmentée et favorisera la nitrification dans une eau à traiter.

La majorité des bactéries faisant la nitrification sont chimioautotrophes avec une faible capacité d'utiliser des composés organiques. L'ammoniac, le nitrite et (selon les espèces) l'urée servent de source d'énergie exogène pour ces bactéries. L'ammoniac est un composé qui est trouvé dans les eaux usées non traitées. À de faibles concentrations, l'ammoniac sera transformé en nitrate par les bactéries présentes. Par contre, si la concentration en ammoniac est trop élevée cela devient toxique pour les micro-organismes et il y a inhibition de ce procédé ou une accumulation de nitrite dans l'environnement due à une nitrification incomplète.

La majorité des bactéries nitrifiantes sont aérobies stricts. Selon la stœchiométrie, lors de la nitrification, 4.33 mg d'oxygène est consommé pour chaque mg-N oxydé en nitrate (Grady et coll., 1999). La concentration limite en oxygène dissous dans les réacteurs à boue activés se retrouve entre 0.5 et 4 mg/L (Stenstrom et Song, 1991). Normalement, les systèmes de traitement des eaux sont bien oxygénés et ont suffisamment d'oxygène pour la croissance des bactéries nitrifiantes. Par contre, si nous retrouvons des parties stagnantes, de la corrosion ou des biofilms

dans le système de traitement des eaux, ceci peut mener à la création de microenvironnement anaérobie, un endroit qui ne favorise pas la croissance des bactéries nitrifiantes.

## 2.9. La dénitrification

### 2.9.1. Caractéristiques

La dénitrification est définie comme étant l'oxydation microbienne de matière organique où le nitrite ou nitrate est l'accepteur d'électron et l'azote gazeuse ( $N_2$ ) comme produit final. Les bactéries hétérotrophes faisant la dénitrification sont ubiquitaires c'est-à-dire qu'elles sont présentes dans plusieurs milieux tels que les sols, les milieux aquatiques salés et non salés. La dénitrification aura lieu lorsque trois conditions sont atteintes : il y a une concentration suffisante de nitrite ou nitrate, la concentration de l'oxygène est suffisamment basse et des donneurs d'électrons sont accessibles.

Dans la chaîne de traitements des eaux, la dénitrification est normalement ajoutée comme une troisième étape pour éliminer les nitrates produits lors de la nitrification. Puisque la majorité des bactéries effectuant la dénitrification sont hétérotrophes (besoin de carbone organique), en ajoutant une source externe de carbone (méthanol) ou la matière organique déjà présente, l'efficacité de dégradations des nitrites et nitrates peut être supérieure à 99 % (Maranon, 2007).

La dénitrification peut être aussi effectuée par des bactéries oxydatrice de soufre de type autotrophe. Ces bactéries utilisent une multitude de composés de sulfure ( $S^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ , etc.) afin de réduire le nitrate (Lee, 2008). La dénitrification fait par des bactéries oxydatrice de soufre de type autotrophe à quelques avantages par rapport à la dénitrification hétérotrophe : le soufre est moins dispendieux que le méthanol ou l'éthanol. Il y a aussi une production de boue moins importante lors de la dénitrification autotrophe (Lee, 2008). Des études ont démontrées la présence de *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Thiobacillus versutus* (maintenant connu en temps que *Parococcus*), *Thiosphaera pantotropha* et *Parococcus denitrificans* (Bretta, 2006) dans ces systèmes autotrophes.

### **2.9.2. Avantages dans un procédé biologique**

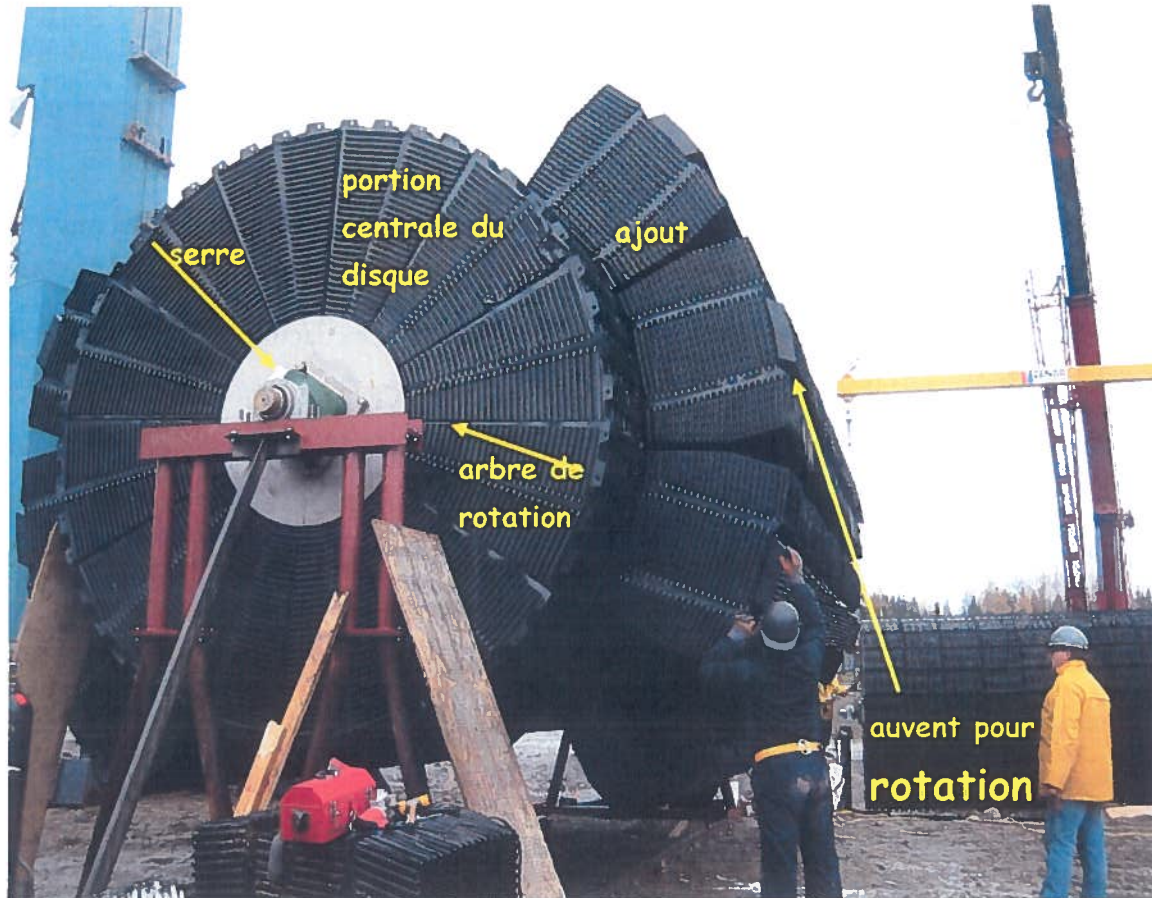
Les avantages de la dénitrification sont nombreux: une meilleure diversité de la microflore présente dans le biofilm, un meilleur rendement dans le traitement des eaux usées et peut permettre la réduction des coûts d'opération (Micheal et coll., 2003). En ajoutant une étape de dénitrification au procédé, la concentration en nitrite et nitrate est grandement réduite à la sortie de l'affluent. De plus, en ajoutant un système de recirculation à la suite des bassins de nitrification, ceci permettrait aux nitrates et nitrites d'alimenter le premier réacteur en condition dénitrifiante, ce qui permettrait aux microorganismes de dégrader la source de carbone organique présente dans l'effluent (Micheal et coll., 2003). Finalement, la dénitrification permet la formation d'un biofilm plus résistant aux forces physiques exercées sur celui-ci lors des traitements biologiques (brassage à l'air, circulation) (Micheal et coll.,2003).



### **3. Matériels et Méthodes**

#### **3.1. Description des biodisques à la mine Laronde**

Les biodisques étudiés étaient en opération depuis 5 ans (janvier 2004) lorsqu'ils ont été échantillonnés dans le but de caractériser la microflore. L'UTFE a débuté son fonctionnement (phase 1) à l'aide de deux lignes d'opérations contenant 4 biodisques chacun soit : 11, 12, 13 et 14, et 21, 22, 23 et 24. Par la suite, la mine souhaitait augmenter sa capacité en ajoutant deux lignes supplémentaires (phase 2) soit 31, 32, 33 et 34, et 41, 42, 43 et 44. Donc, au total, l'UTFE avait 16 biodisques (4 par ligne) pouvant traiter les eaux contaminées. Les biodisques avaient une surface de traitement de 310 000 pieds carrés. La totalité des 4 lignes donnaient une surface de traitement de 4 960 000 pieds carrés. Les biodisques étaient formés de feuilles de polypropylène ayant un diamètre de 12 pieds. Les feuilles ont été soudées (soudure plastique), glissées sur un arbre de rotation et le tout attaché par une serre. Le cœur du biodisque a été attaché à une couronne de secteurs en plastiques (pointe de tarte) et des aubes qui ont servi à la rotation (figure 3.1). Les biodisques (deux par réacteurs) ont été immergés à 80 % dans des cuves de béton contenant l'eau à traiter. Chaque cuve pouvait contenir 200 000 litres d'eau. La quantité totale d'eau pouvant être traitée par les 4 lignes était 3 200 000 litres d'eau contaminée. Les biodisques tournaient à une vitesse de 1 à 1.5 tour par minute par l'action de l'air provenant des diffuseurs (figure 3.2). Chaque premier réacteur était utilisé pour la dégradation du thiocyanate, cyanate en ammoniac. Les trois derniers réacteurs étaient conçus pour performer la nitrification.



**Figure 3.1 :** Assemblage d'un biodisque à la mine Laronde, Cadillac Qc. Les portions de plastique du biodisque sont enlignées sur l'arbre de rotation. Photo : Agnico Eagle

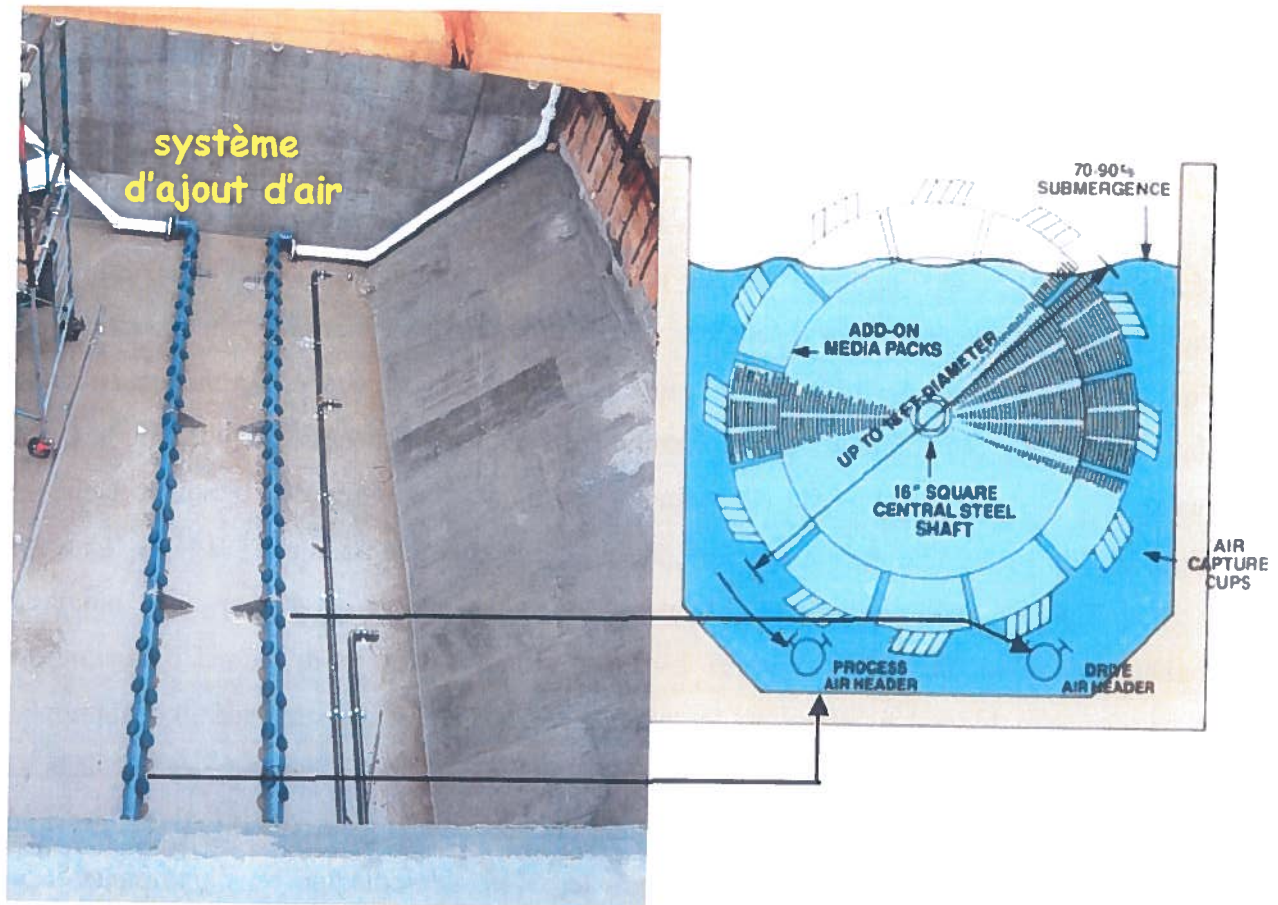


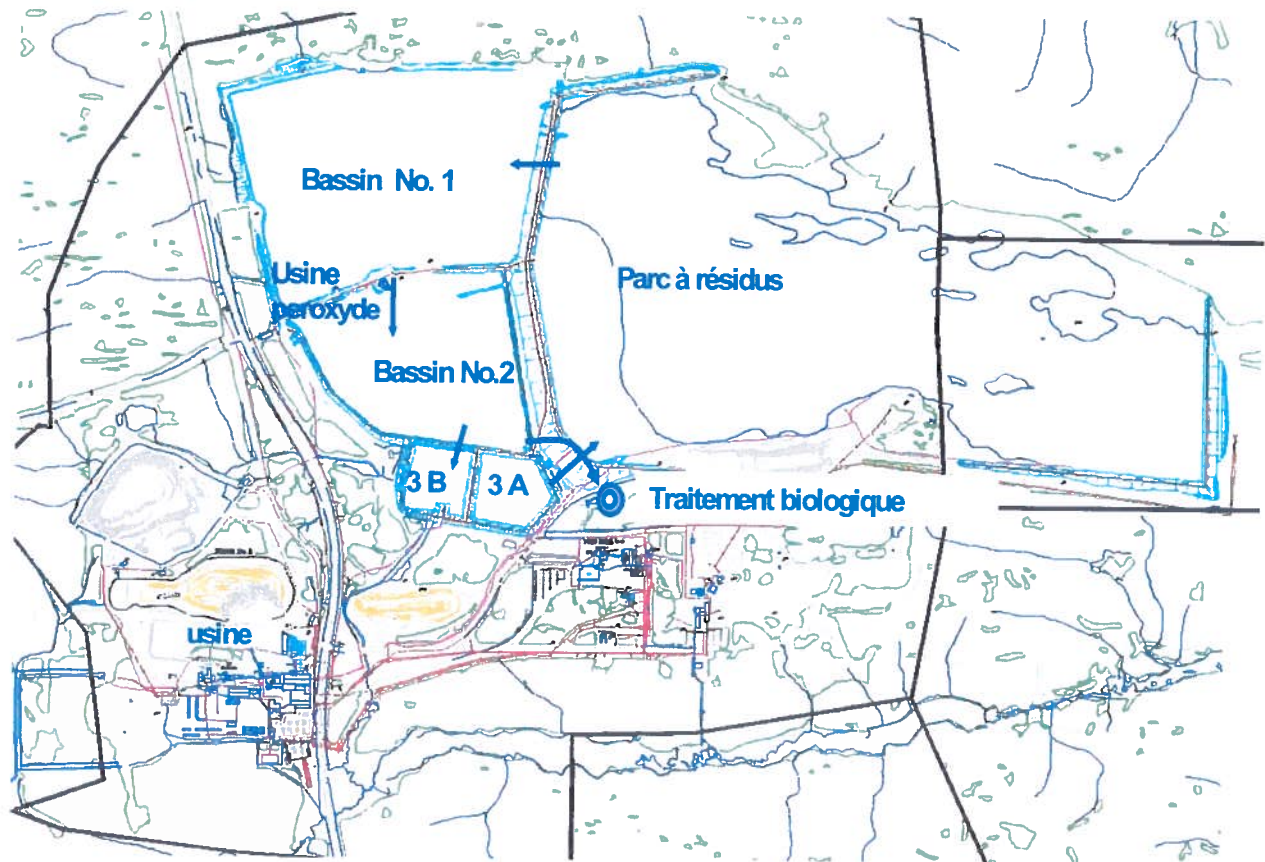
Figure 3.2: Système d'aération sur la rotation d'un biodisque lors du traitement de l'eau usée.

### 3.2. Description de la biomasse présente sur les biodisques

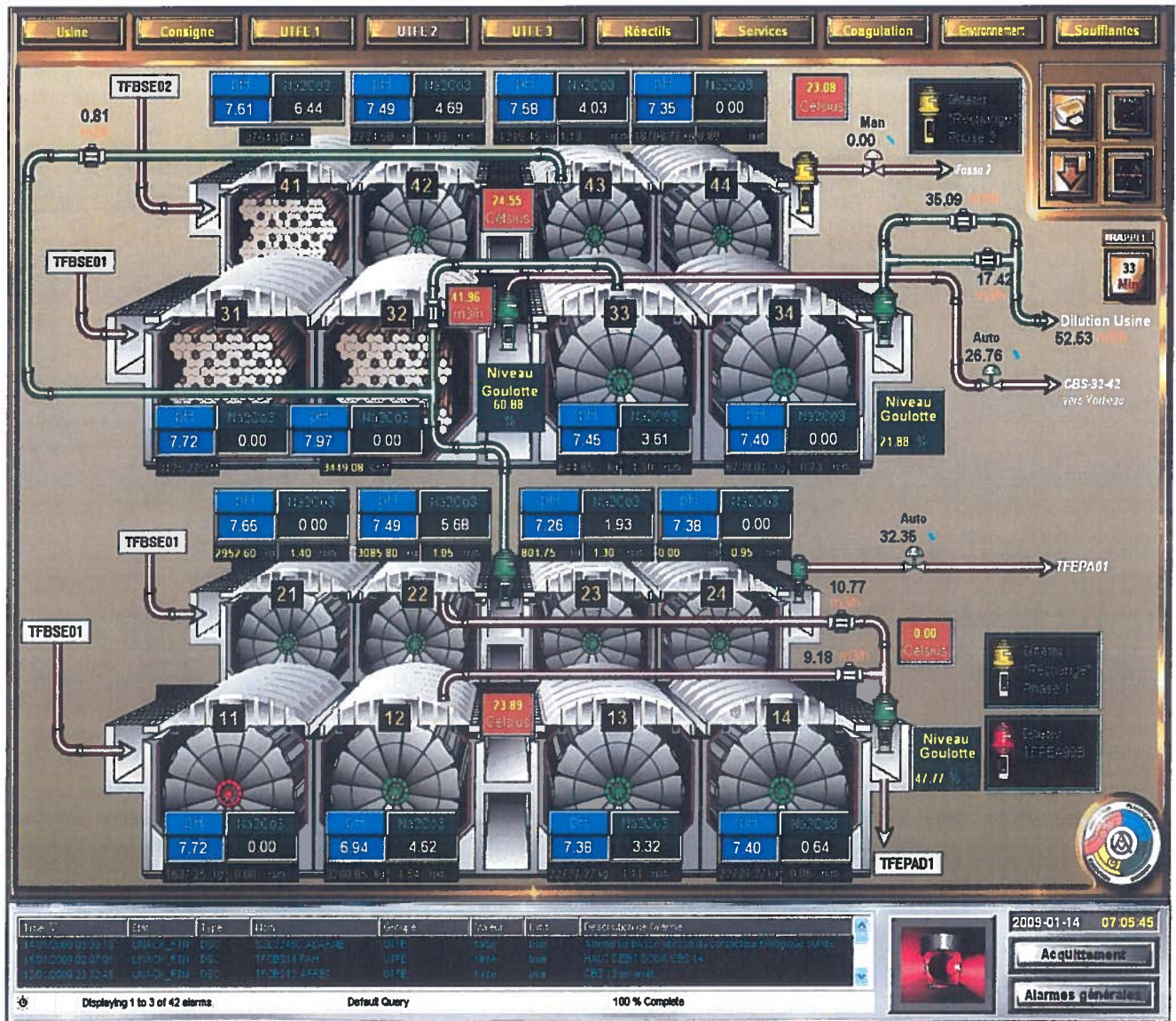
Le biofilm présent sur le premier biodisque s'alimentant de thiocyanate était très épais lorsque la charge de contamination était élevée. Le premier biodisque était celui voyant la plus grande charge de contaminant et donc était plus susceptible à être surchargé de biomasse. Si le biofilm était d'une épaisseur importante, celui-ci pouvait causer des problèmes de transferts de nutriments vers la biomasse et des produits de dégradations vers l'extérieur, donc une perte de performance du traitement. C'est pourquoi la charge maximale de  $\text{SCN}^-$  a été déterminée lors du pilotage et fixée à 2.3 kg de  $\text{SCN}^-/305 \text{ m}^2$  de surface de disque/jour. À l'inverse des premiers biodisques, les biodisques de la nitrification supportaient une biomasse faible et il n'a y eu aucun problème de transfert.

### 3.3.Fonctionnement du traitement présent à l'UTFE

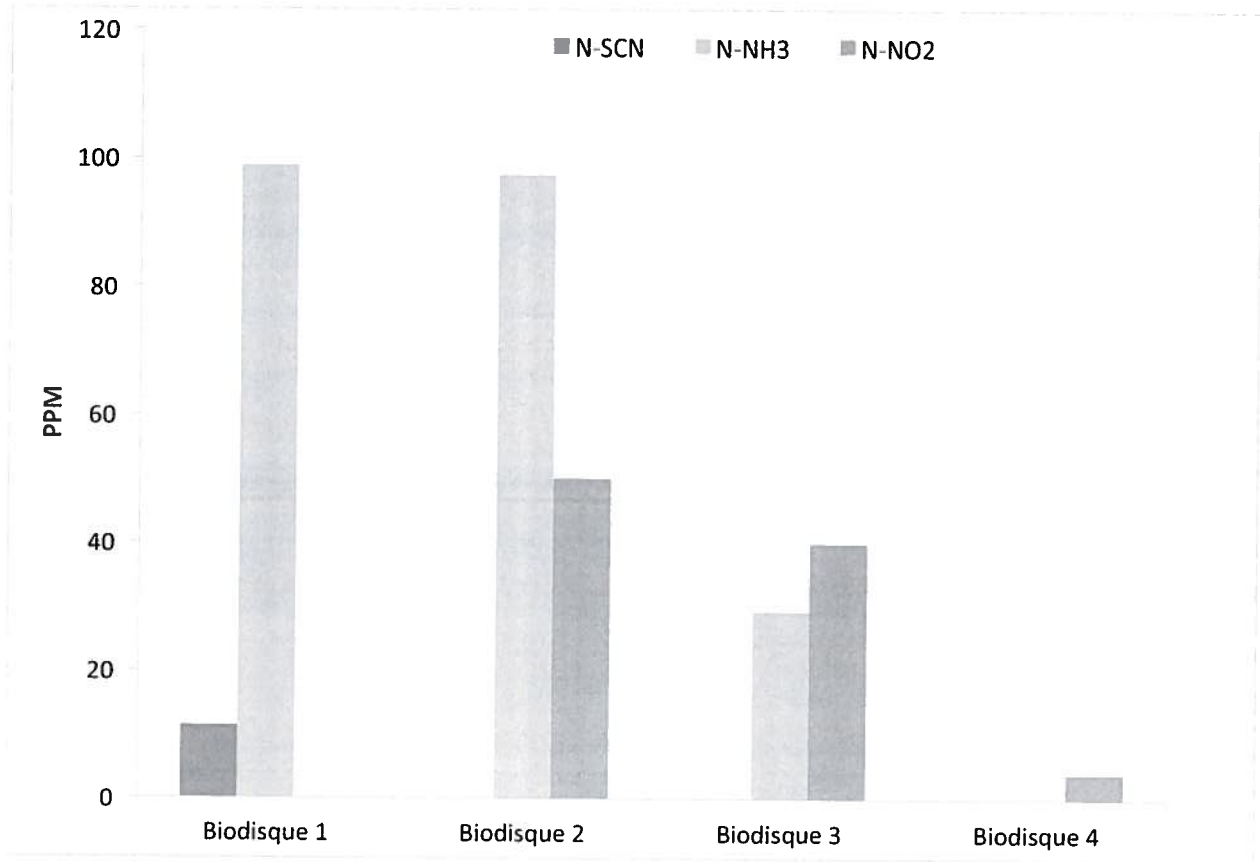
L'eau usée présente dans le bassin 2 a été pompée vers l'UTFE. Durant le pompage, l'eau a été mélangée avec de l'antitarte afin de minimiser l'entartrage de la pompe. L'eau a été acheminée à travers un échangeur de chaleur afin de diminuer les variations de température lors de l'alimentation. Une concentration de 1.5 mg/L d'acide phosphorique a été ajoutée au réservoir d'alimentation afin de maintenir la concentration du phosphore nécessaire à la survie de la biomasse. De plus, de l'hydroxyde de sodium a été ajouté à l'entrée des lignes et à chaque réacteur afin de garder une alcalinité minimum et de garder le pH dans une plage de 7,5 à 8,5 lors de la dégradation des composés. L'eau usée arrivait au premier disque où la biomasse dégradait la quasi-totalité du thiocyanate. L'eau usée passait ensuite au second biodisque qui était un disque à biomasse mixte où le thiocyanate résiduel a été dégradé et l'ammoniac (provenant de la dégradation du thiocyanate) était aussi transformé. L'eau usée entrait dans un dalot central où en principe les deux lignes ont été mélangées (phase 1 et phase 2 respectivement). L'eau usée passait ensuite dans les 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> biodisques où l'ammoniac et les nitrites ont été transformés. Les eaux usées des deux phases ont été récupérées dans un dalot final d'où elles ont été acheminées vers le clarificateur pour enlever les matières en suspension. Finalement, la surverse (partie liquide) du clarificateur a été envoyée au bassin 3A ou à la fosse 2, et la souverse (biomasse morte) a été envoyée au parc à résidus (figure 3.3).



**Figure 3.3 :** Représentation cartographique du cheminement de l'eau usée à partir du bassin No.1 où l'eau est traitée dans une usine de peroxyde pour éventuellement se rendre à l'usine de traitement biologique (UTFE).



**Figure 3.4 :** Schéma représentant l'installation des biodisques à l'UTFE. Quatre séries de quatre biodisques furent installées (11 à 14, 21 à 24, 31 à 34 et 41 à 44). Les séries 11 et 21 furent munies de biodisques pour chaque réacteur. Les biodisques des séries 31, 32 et 41 ont été remplacés par des biobilles afin de vérifier l'efficacité d'une installation MBBR pour traiter l'eau usée de la mine Laronde. La circulation ainsi que la recirculation de l'eau contaminée sont illustrées par les flèches rouges. Photo provenant du programme de contrôle des biodisques à l'UTFE.

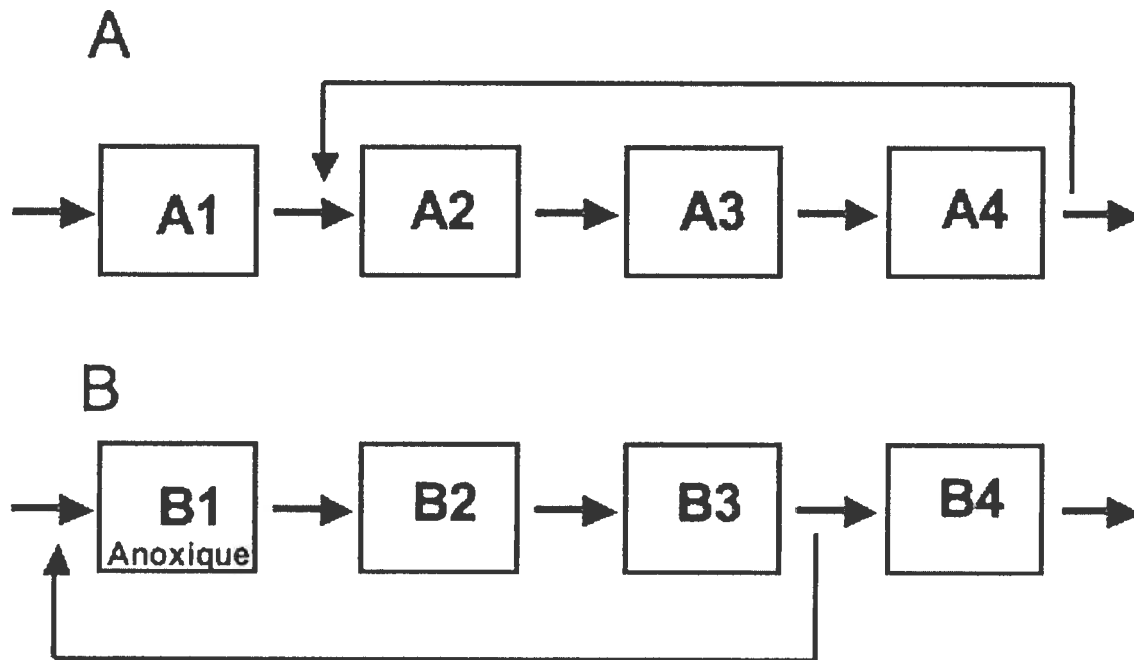


**Figure 3.5:** Performance des biodisques de la deuxième série de traitement en 2008, après l'installation de la ligne de recirculation et lors de la prise d'échantillons pour la caractérisation de la biomasse. L'absence de nitrites à la fin de la ligne de traitement indique que la nitrification était complète. Il est démontré sur l'axe des Y la concentration résiduelle des produits à la sortie des réacteurs.

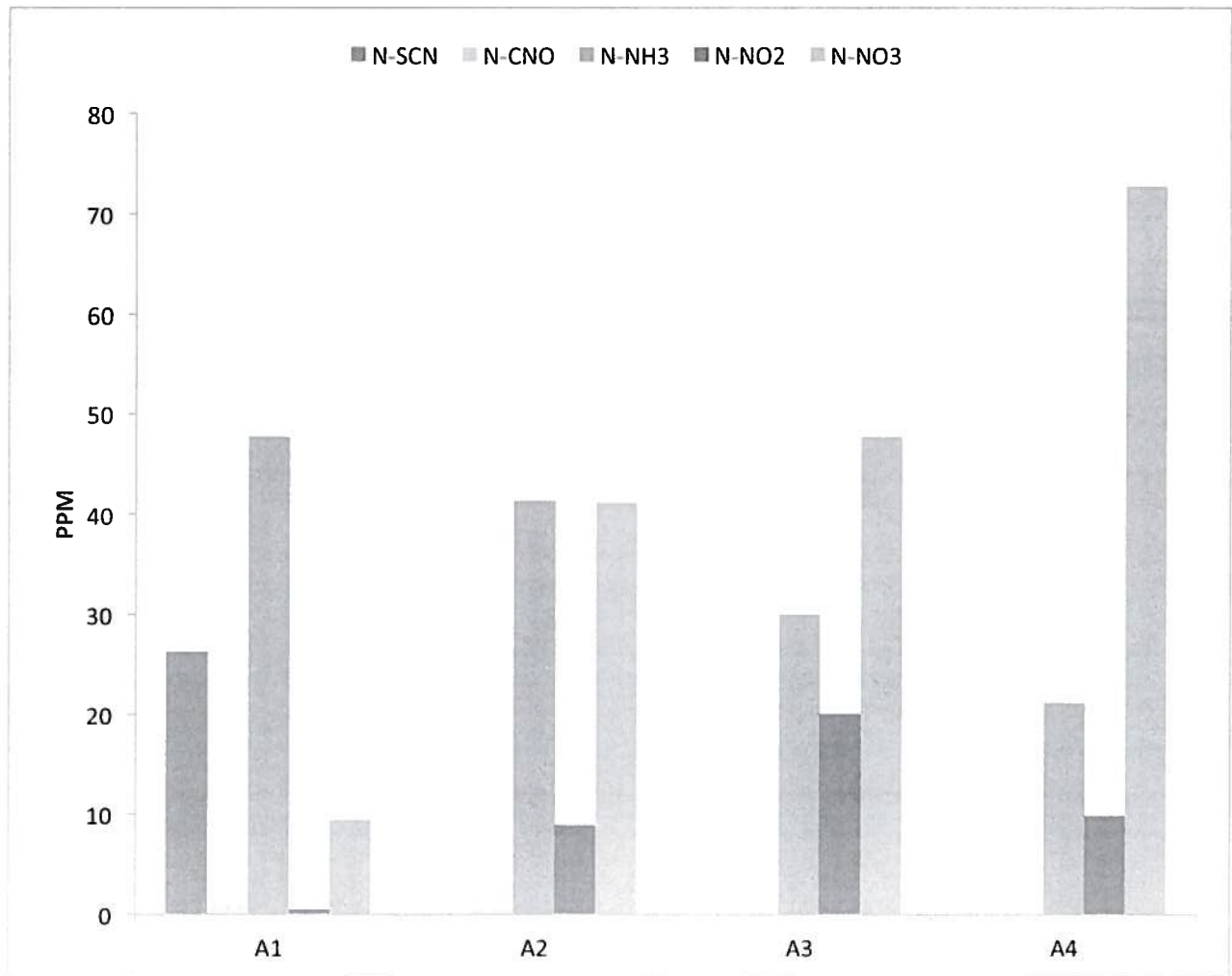
### **3.4.Description des MBBR à l'échelle du laboratoire**

Les réacteurs MBBR à l'échelle du laboratoire ont été démarrés en format de 7 litres. Chaque série MBBR (A et B) comportait 4 stations (A1 à A4 et B1 à B4) (Figure 3.6). Le matériel utilisé était des morceaux de polypropylène opaque pour les cotés des réacteurs et le devant en fibre de verre afin de voir l'intérieur. Deux séries ont été construites : une (A) recréant le procédé présent à l'UTFE où la station A1 était aérée et servait à la biodégradation du thiocyanate et cyanate en ammoniac, et les stations A2 à A4 servant à la nitrification. Une recirculation a été intégrée et était la même que celle de l'UTFE soit de la fin de la station A4 au début de la station A2 afin de diluer la concentration d'ammoniac dans l'effluent minier. La série B était constituée d'une station (B1) ayant une condition anoxique permettant la dégradation du thiocyanate et cyanate en condition de dénitrification. La deuxième station (B2) servait à la dégradation du thiocyanate résiduel, et les deux dernières stations ont servi à la nitrification. La recirculation a été différente de la série A dans le but de fournir la station B1 avec des ions nitrites et nitrates. La recirculation a été ajoutée à la sortie de la station B3 allant à la tête de la station B1. Les débits de recirculation ont été les mêmes que les débits d'alimentations de l'affluent synthétique. En juin 2008, il y a eu une mise à l'échelle des réacteurs pour le but de diminuer l'encombrement des supports et de permettre une meilleure circulation dans les réacteurs. La mise en échelle a été faite dans des réacteurs de 30 L pouvant accueillir 18 L d'affluent. Les recirculations ont été les mêmes ainsi que les débits (Figure 3.6).

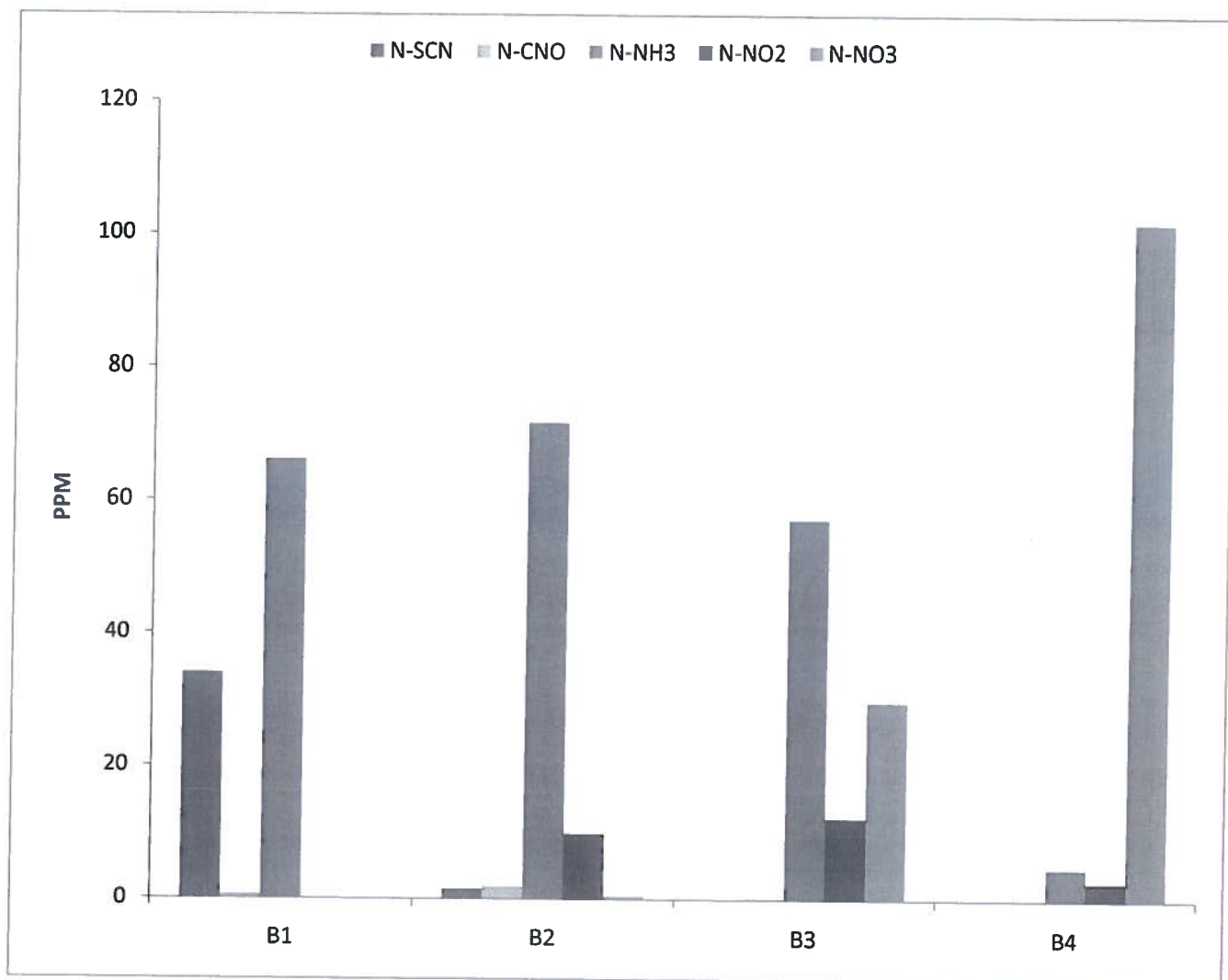




**Figure 3.6 :** Schéma représentant les séries MBBR construites en laboratoire. A) Série représentant les biodisques à la mine Laronde. L'entrée de l'affluent se fait dans le réacteur A1 et circule jusqu'à la sortie du réacteur A4. La recirculation est installée à partir de la sortie du réacteur A4 jusqu'à l'entrée du réacteur A2. B) Série établie afin de vérifier le potentiel de biodégradation du thiocyanate dans un environnement anoxique pour promouvoir la dénitrification. Comme pour la série A, l'affluent circule du premier au dernier réacteur (1 à 4). Par contre, la recirculation a été établie afin d'alimenter le réacteur B1 de nitrate et nitrite servant à la dénitrification.



**Figure 3.7:** Performance du MBBR de la série A lors de l'échantillonnage de la biomasse. Le thiocyanate est éliminé à la première étape (A1). Le graphique montre la diminution de l'ammoniac et l'augmentation des nitrates ce qui démontre que la nitrification était active. Il est démontré sur l'axe des Y la concentration résiduelle des produits à la sortie des réacteurs.



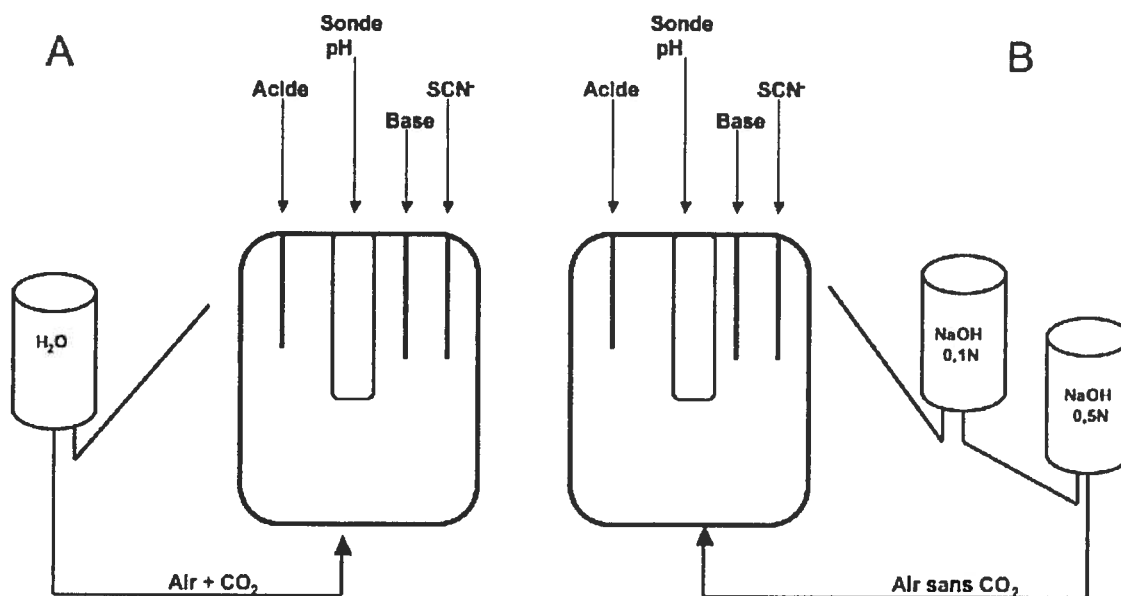
**Figure 3.8:** Performance du MBBR de la série B lors de l'échantillonnage. Le thiocyanate est éliminé à la première étape (B1 et B2). Le graphique montre la diminution de l'ammoniac et l'augmentation des nitrates ce qui démontre que la nitrification était active. Il est démontré sur l'axe des Y la concentration résiduelle des produits à la sortie des réacteurs.



**Figure 3.9:** Photo du MBBR de la série B. Des récipients d'un volume de 30 L furent installés sur une paillasse de laboratoire. Un système de circulation et recirculation fut posé reliant chaque MBBR par de la tubulure flexible. Des sondes à pH furent installées à la base de chaque récipient afin d'évaluer à temps réel le pH dans chaque réacteur. Finalement l'aération et le mélange des supports dans les réacteurs furent faits par l'entremise d'une pompe à air installé au fond de chaque réacteur (à l'exception du réacteur anoxique où un mélange mécanique fut fait).

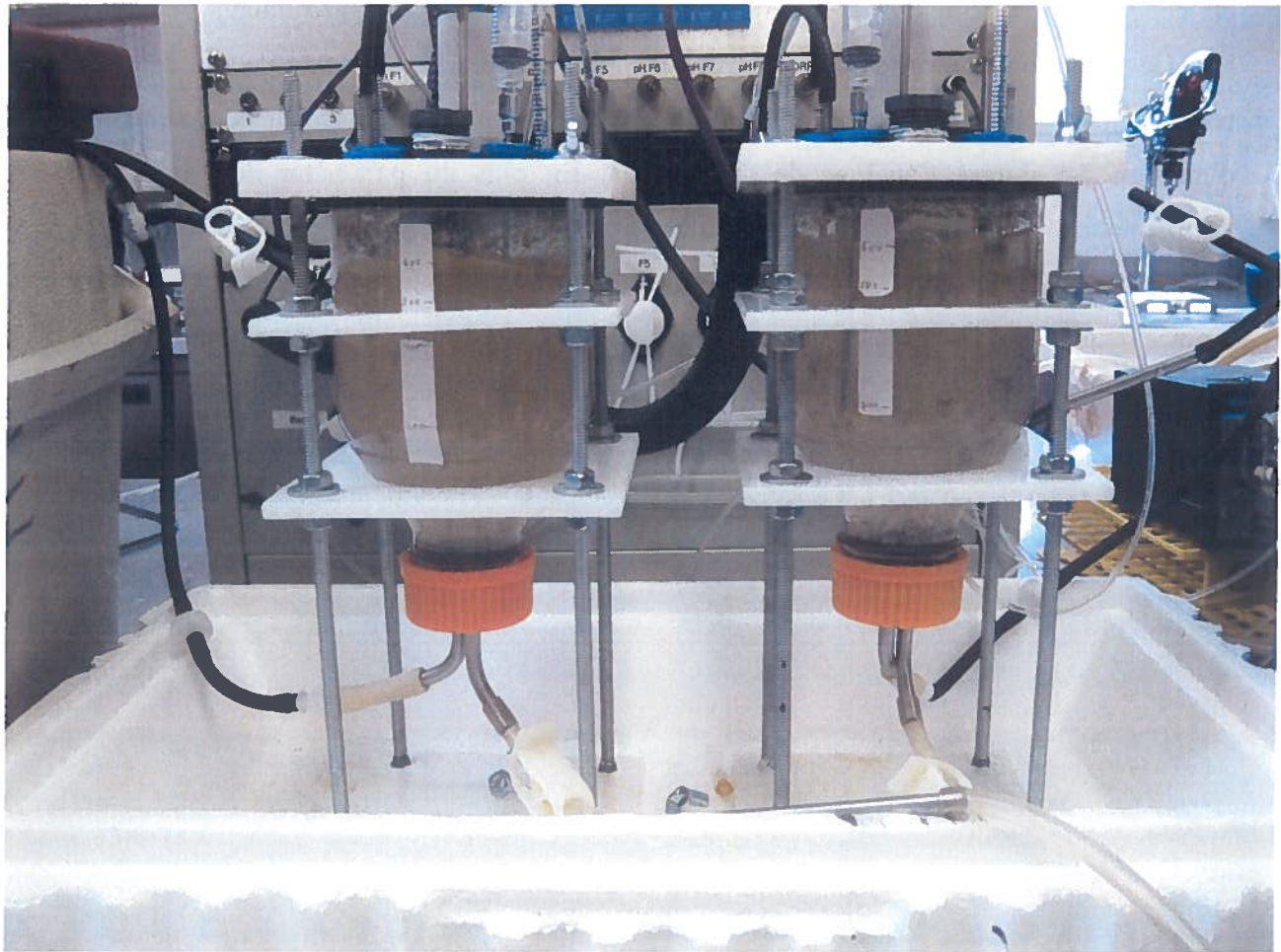
### **3.5. Installation des réacteurs en mode cuvée à l'échelle du laboratoire**

Deux réacteurs d'une capacité de 600 mL ont été conçus afin d'étudier la faculté de la biomasse retrouvée sur le premier biodisque (premier réacteur de la série 2) d'effectuer la dégradation du thiocyanate en mode cuvée en conditions variantes. Deux bouteilles d'un litre ont été coupées et la partie ayant le goulot a été utilisée pour former l'enceinte des réacteurs (figure 3.11). Les bouteilles ont été encaissées dans un boîtier fait avec 3 plaques en plastique étanche afin de sécuriser les réacteurs. La première plaque de plastique (couvrant le trou de la bouteille) était munie de trous permettant l'insertion de tubes afin d'introduire les éléments nécessaires pour le bon fonctionnement des réacteurs. Deux tubes ont été insérés pour l'ajout de l'acide et la base afin de contrôler le pH des milieux de culture. Une sonde de pH a été ajoutée afin de faire le suivi du pH du milieu, ainsi que des tubes pour l'ajout du thiocyanate lors de l'alimentation, un thermomètre afin de suivre la température des réacteurs et d'une seringue afin de retirer des échantillons du milieu de culture pour l'évaluation de la dégradation du thiocyanate. Le trou du goulot a été bloqué avec un bouchon en caoutchouc muni de trous permettant l'apport d'air afin de brasser la biomasse et un tube servant à l'évacuation des déchets (figure 3.11).



**Figure 3.10** : Schéma représentant l'installation des réacteurs en cuve. Pour but d'effectuer un mélange de la biomasse dans les réacteurs, des entrées d'air à la base des réacteurs furent installées. L'air entrant dans le réacteur A fut passé dans une bouteille contenant de l'eau permettant l'humidification de l'air ce qui empêcherait le séchage éventuel du milieu de culture. De plus, l'air contenait le CO<sub>2</sub> nécessaire à la croissance autotrophe. L'air entrant dans le réacteur B fut passé dans deux bouteilles contenant de l'hydroxyde de sodium agissant comme trappe à dioxyde de carbone, empêchant ainsi l'ajout de CO<sub>2</sub> dans le réacteur et favorisant la croissance hétérotrophe. Des entrées pour l'ajout du thiocyanate, l'acide et la base ainsi que la sonde à pH furent ajoutés au couvercle des réacteurs permettant l'ajout des produits et le suivi du pH.

Le programme utilisé afin de contrôler les paramètres et l'alimentation du thiocyanate a été conçu par l'entremise d'un programme de LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, É-U.). Ce programme informatique a permis de faire un suivi sur la température et le pH et de contrôler ce dernier. Des paramètres stricts ont été incorporés dans le but de maintenir un pH d'environ 7,5 durant l'analyse de dégradation. En plus du paramètre de contrôle de pH, l'alimentation et le temps de repos ont pu être contrôlés. Le programme a été déterminé de sorte que 100 mg/L de thiocyanate (5 mL) était injecté toutes les 8 heures de repos. La biomasse a été ajoutée dans les deux réacteurs en suspension de 5 mL. Le brassage se faisait par injection d'air. Dans un des réacteurs, le CO<sub>2</sub> a été enlevé en passant l'air dans deux bouteilles d'hydroxyde de sodium (première de 0,1N et second de 0,5N). L'effluent dans les réacteurs était le même que décrit dans le tableau 2 et 2.1. La solution de thiocyanate a été faite avec de l'eau du robinet.



**Figure 3.11** : Photo des réacteurs en cuvée utilisés pour l'identification de la biomasse retrouvée sur les biodisques. Source Veronique Bougie.

### **3.6. Analyse du thiocyanate par colorimétrie**

Afin d'analyser la dégradation du thiocyanate à l'échelle du laboratoire, le thiocyanate a été dosé à l'aide d'une méthode de colorimétrie au nitrate ferrique (Standard Methods, 1999). Des volumes d'environ 1,5 mL de milieu contenant la biomasse en suspension ont été prélevés par seringues et filtrés sur filtre de 45  $\mu\text{m}$  pour assurer la séparation de la biomasse et des composés. Les échantillons ont été traités à l'acide nitrique afin de baisser le pH à 2 et de favoriser l'interaction du thiocyanate et du réactif employé. Par la suite une solution de nitrate



ferrique a été mélangée à l'échantillon et le mélange a été immédiatement analysé par spectrophotomètre à UV-Vis à une longueur d'onde de 460 nm (Clesceri L.S et al. 1998).

### **3.7. Analyse du thiocyanate par technique HPLC**

Pour but d'augmenter la vitesse d'analyse des composés retrouvés dans l'affluent et l'effluent des MBBR en laboratoire, une méthode employant l'HPLC de DIONEX : une chromatographie ionique avec une détection par conductivité fut conçue. Cette méthode analyse les anions (ions chargés négativement). La méthode fut montée pour séparer et quantifier (à l'aide de courbes standard) les anions Cl, NO<sub>2</sub>, CNO, NO<sub>3</sub>, CO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub> et SCN. La méthode fut conçue par Roger Dubuc en laboratoire et employant l'auto-échantillonneur TSP modèle AS 3500. Des échantillons de 1 mL contenant de la biomasse en suspension fut récoltés des réacteurs MBBR du laboratoire. La biomasse fut séparée des échantillons par centrifugation. Un volume de 20uL de solution allant de 1 à 1000 ppm (20 ng à 20 ug de chaque anion) fut injecté en mode « full loop », a un débit 1 mL/ min dans un cycle d'analyse de 45 minutes. La phase mobile comprenait du NaOH isocratique à 5 mM pendant 5 minutes, un gradient ascendant de NaOH de 5 à 15 mM en 15 minutes, gradient ascendant de NaOH de 14 à 40 mM en 1 minute, NaOH isocratique à 40 mM pendant 5 minutes, gradient descendant de NaOH de 4 à 5 mM en 5 minutes et NaOH isocratique à 5 mM pendant 5 minutes. La période de prise de données par logiciel PeakNet version 5.21 fut d'une durée de 40 minutes.

### **3.8. Description de l'affluent synthétique**

L'affluent synthétique a été créé en laboratoire afin de recréer les conditions à l'UTFE de la mine LaRonde. Cet affluent a permis la croissance et l'enrichissement des microorganismes pouvant dégrader le thiocyanate, cyanate et l'ammoniac. Le protocole de préparation a été conçu afin d'éviter tout précipité lors de la préparation. Il n'a pas été nécessaire de stériliser les solutions préparées (tableau 2).

**Tableau 3.1 : Ingrédients pour affluent synthétique**

## Solution minérale 1000X

Eau MQ	1 L
HCl	Suffisamment pour descendre le pH à 3-4
CuCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	161 mg
ZnCl <sub>2</sub>	13 mg
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	50 mg
NiCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	196 mg
Na <sup>2</sup> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	180 mg
Na <sub>2</sub> Se <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	16 mg
AlCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O	116 mg

## Solution « A » Affluent synthétique 10x

Eau du robinet	100 mL
Sln minéraux 1000X	1 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	211 mg
NaSCN	1007 mg
KCNO	165 mg
CaCO <sub>3</sub>	250 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22 mg
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -5H <sub>2</sub> O	32 mg
C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> FeNO <sub>7</sub>	3 mg (ammonium ferric citrate (Iron III))
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1650 mg

Le pH de l'affluent a été alors ajusté 7.0-7.2 avec de l'hydroxyde de sodium 5N.

### **3.9. Techniques de biologie moléculaire**

#### **3.9.1. Extraction de l'ADN des biofilms**

L'ADN a été extrait de la biomasse des biodisques de l'UTFE représentant les quatre stages de la dépollution des eaux et des MBBR. Pour réaliser cette étape, la biomasse a été mise en tube de centrifugation (environ 500  $\mu$ L) et 250  $\mu$ L de solution TEN (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM pH 8,0) et 10  $\mu$ L de SDS 20 % a été ajouté aux tubes. Afin de d'extraire l'ADN de la biomasse, 250 mg de billes de silices stériles ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés sur glace pendant 1 minute et le tout a été traité au pulvérisateur (*Fast prep-24, Sample preparation system, M.P. Biomedicals, Irvine, California, USA*) à un cycle de 30 secondes à la vitesse 6 et 2 cycles de 20 secondes à la vitesse 4, tout en incubant 5 minutes sur glaces entre les cycles de broyage. La phase supérieure des tubes a été transférée dans des tubes à centrifugation stériles et 1 volume d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamyl (25 :24 :1) a été ajouté aux tubes. Le tout a été mélangé par vortex 2 minutes et finalement centrifugé à 13 000 rpm pour une durée d'une minute. La phase supérieure a été transférée dans un nouveau tube à centrifugation afin de précipiter l'ADN extrait avec 2 volumes d'éthanol 95 % et  $\frac{1}{4}$  de volume d'AcNH<sub>4</sub> 10 N à -20 °C pendant au moins 30 minutes. Une centrifugation de 15 minutes à 13 000 rpm a été faite pour but de récupérer le culot d'ADN et un lavage des culots a été effectué avec 250  $\mu$ L d'éthanol 70 %. Par la suite d'une évaporation de l'éthanol résiduel, l'ADN a été dissous dans 50  $\mu$ L d'eau Milli Q. L'intégrité et la concentration des échantillons d'ADN ont été vérifiées par spectrophotométrie par des densités optiques variant de 230 à 340 nm.

#### **3.9.2. Électrophorèse sur gel d'agarose**

À la suite de chaque extraction d'ADN ainsi que des amplifications PCR, une vérification par électrophorèse sur gel d'agarose a été effectuée afin d'analyser l'intégrité de l'ADN. Les pourcentages d'agarose (*Invitrogen, Grand Island, NY, É-U*) dans le gel variaient de 0,5 à 2 % selon la longueur du produit d'ADN obtenu. Le tampon de migration ainsi que celui utilisé pour dissoudre l'agarose était le tampon TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, acide acétique 40 mM (*Fisher Scientific*), EDTA 1 mM 8.5).

Lors de la vérification, 5  $\mu$ L de produit d'ADN ont été déposés dans un puits. Un tampon de chargement a été utilisé afin de s'assurer la qualité de migration. Le tampon était constitué de glycérol 30 % v/v (*Fisher Scientific*), 0,25 % p/v xylène cyanol (*Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada*) et 0,25 % p/v bleu de bromophénol (*Sigma-Aldrich*). Le marqueur utilisé était l'ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme *StyI* (*Fermentas Life Science, Burlington, On, Canada*). Les gels ont été colorés dans une solution de bromure d'éthidium (*Sigma-Aldrich*) ayant une concentration approximative de 10  $\mu$ g/mL. À la suite d'un rinçage avec de l'eau, les gels ont été visualisés sous rayons ultraviolets dans un appareil *Alphamager™3400* (*Alpha Innotec Corporation, San Leandro, CA, É.-U.*).

### **3.9.3. Réaction de polymérase en chaîne (PCR)**

L'amplification des gènes de l'ARNr 16S par PCR (« polymerase chain reaction »), a été effectuée utilisant l'appareil AB applied Biosystem, Gene Amp, PCR system 2700. Chaque mélange réactionnel de 50  $\mu$ L contenait 5  $\mu$ L du tampon de PCR 10X, 1  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 1  $\mu$ L de l'amorce 1 diluée à 10 pmol, 1  $\mu$ L de l'amorce 2 diluée à 10 pmol, 1  $\mu$ L de BSA 20  $\mu$ g/ $\mu$ L, 0,5  $\mu$ L de Taq ADN polymérase et 38  $\mu$ L d'eau Milli Q stérile. Sous une hotte stérile, 2  $\mu$ L d'ADN (50 – 100 ng) ont été ajoutés au mélange. Le programme de température de la PCR a été programmé pour avoir une période initiale de 3 minutes à 94 °C, une seconde de 3 minutes à 55 °C et ensuite 30 cycles de 45 secondes à 72 °C, 45 secondes à 94 °C, 45 secondes à 55 °C pour enfin terminer avec une période finale de 10 minutes à 72 °C. La production d'amplicons par la PCR a été vérifiée grâce à une migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 %. Un courant de 90 volts a été appliqué sur le gel pendant une période de 45 minutes.

### **3.9.4. Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)**

Les gels ont été faits à partir d'une solution de polyacrylamide (acrylamide : bis N,N'-méthylène-bis-acrylamide ; 37,5 : 1) (*Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, É.-U.*) à 40 % filtrée sur 0,45  $\mu$ m (*Fisher Scientific*). Le gel à 0 % de dénaturant contenait 8 % de la solution de polyacrylamide dans un tampon TAE 1X, solution passée sur un filtre de 0,45  $\mu$ m. Le gel à 100 % de dénaturants contenait 8 % de la solution de polyacrylamide, 40 % (v/v) de formamide (*Fisher Scientific*) déionisé et 7M d'urée (*Bio-Rad Laboratories*) dans du tampon TAE 1X.

solution filtrée sur 0,45 µm. Ces solutions ont servi à faire les solutions avec le gradient désiré pour le gel. Elles ont été dégazées sous vide pendant 15 minutes afin de garantir une polymérisation uniforme des gels. Avant de couler un gel, 5 µL de persulfate d'ammonium (*Bio-Rad Laboratories*) 10 % (p/v) par mL de solution de gel et 0,5 µL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (*Bio-Rad Laboratories*) par mL de solution de gel ont été ajoutés pour initier la polymérisation du gel.

Pour déterminer le volume de produit de PCR fait avec les amorces 341F-GC et 534R (tableau 3.1) à charger dans le gel, le programme AlphaImager™3400 (*Alpha Innotech Corporation*) a été utilisé. Ainsi, le volume d'ADN à charger (entre 25 et 40 µL) a été relativisé en fonction de l'intensité de la bande de produits de PCR obtenue par électrophorèse sur gel d'agarose. L'électrophorèse a été effectuée dans un tampon TAE 1X à 60 °C et 100 V pendant 16 heures. Les gels ont été colorés et visualisés tels que décrits à la section 3.7.2.

### **3.10. Élaboration d'une génothèque du gène de l'ARN ribosomal 16S**

#### **3.10.1. Échantillonnage des biofilms**

Les biofilms en croissance sur les biodisques à l'UTFE ont été échantillonnés en février 2008 à l'aide d'une macro spatule. Dans le cas d'une faible quantité de biofilm, celui-ci a été récolté avec l'aide d'un papier absorbant. Les instruments ont été collés sur les disques et la biomasse a été récoltée à l'aide de la rotation des biodisques.

La biomasse présente sur les supports dans les MBBR du laboratoire était très faible et en grande majorité, en suspension dans l'affluent. Afin de prélever suffisamment de biomasse à partir des supports, 10 supports ont été sélectionnés à des endroits aléatoires dans le réacteur et la biomasse présente à l'intérieur des supports sélectionnés a été grattée. Pour ce qui est des réacteurs en cuvette, la biomasse fut récoltée à la fin des cycles de dégradation (72 heures). Deux microtubes de 1.5 mL furent remplis de biomasse et centrifugés afin d'éliminer le milieu de culture résiduel. La biomasse récupérée a été entreposée dans un tube et gardée à 4 °C jusqu'à l'extraction d'ADN employant la méthode mentionnée dans la section 3.5.1.

### **3.10.2. Amplification de l'ADN extrait du biofilm par méthode de PCR**

L'ADN a été extrait des échantillons en janvier 2008 (biodisque) et 2009 (MBBR) soit les échantillons de chaque réacteur de la série 2 (biodisque) et A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3 et B4 (MBBR) ainsi que les réacteurs en cuvée selon la méthode décrite à la section 3.6.1.1 et 3.6.1.2. Ensuite, une amplification PCR avec les amorces pA et pH (tableau 3) a été faite selon la méthode décrite à la section 3.5.3. Les produits PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.0%.

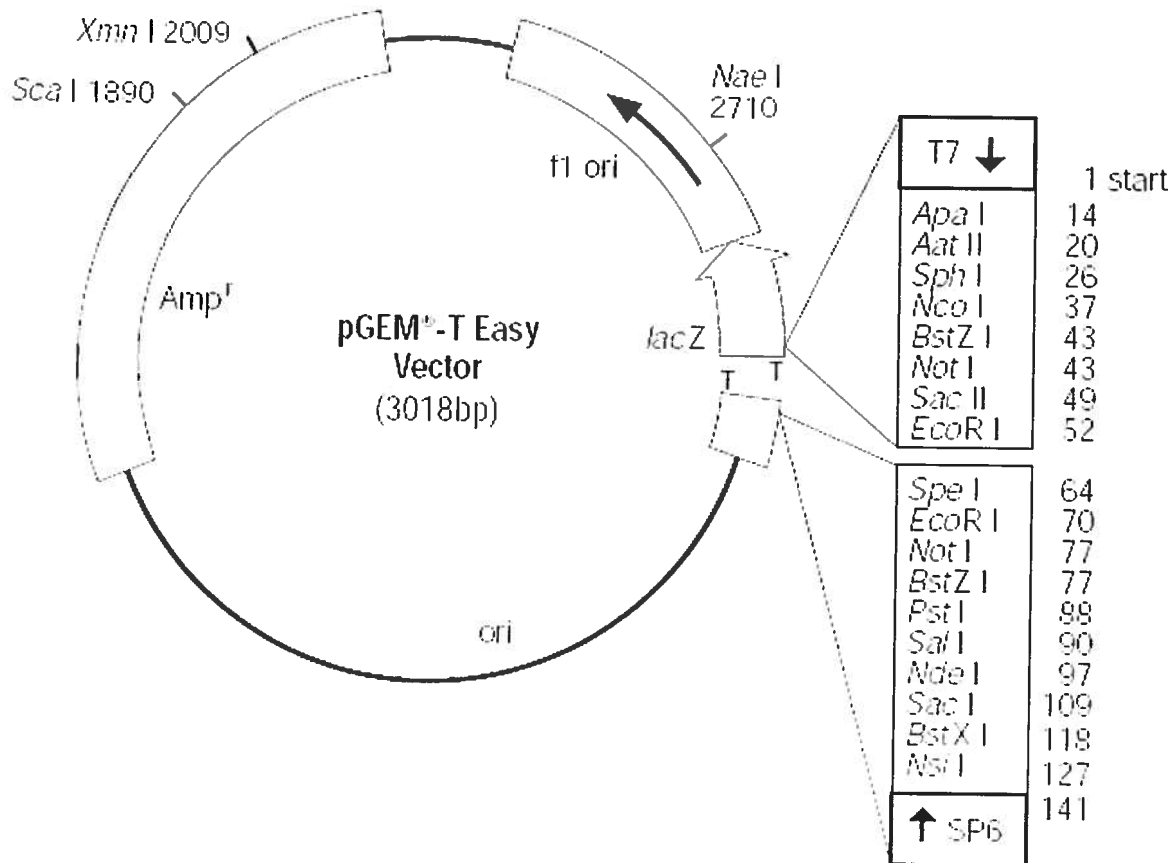
### **3.10.3. Ligature et transformation**

La ligature s'est fait avec le vecteur plasmidique pGEM-T Easy Vector Systems selon les instructions du manufacturier (*Promega*) (figure 3.13). Les produits PCR obtenus à partir de la technique mentionnée dans la section 3.6.2, ont été déposés dans des tubes de 0,5 mL stérilisés contenant la mixture suivante : 5  $\mu$ L de 2X Rapid Buffer T4 ligase, 1  $\mu$ L de pGem Vector, 1  $\mu$ L de T4 DNA ligase (*Promega*). Six  $\mu$ L de produit de PCR ont été utilisés afin d'assurer un bon ratio d'ADN : vecteur. À la suite d'une incubation d'une heure à température de 37 °C, les tubes ont été placés à 4 °C pour une période de 16 heures.

### **3.10.4. Sélection des clones et extraction plasmidique**

Afin d'accumuler le maximum de colonies blanches (transformants contenant l'insert d'ADN 16S), 5 à 6 géloses ont été utilisées par clonage. Pour construire la génothèque de clones des biodisques, 100 colonies blanches et une colonie bleue ont été sélectionnées pour représenter le biodisque 1 et 50 colonies blanches pour les biodisques 2, 3 et 4. Les colonies sélectionnées ont été repiquées en milieu liquide LB (3 mL) dans le but d'extraire les plasmides. Après une culture d'environ 16 heures à 37 °C avec agitation, 1,5 mL de la culture ont été transférés dans un microtube et centrifugés à 13 000 rpm pendant 1 minute afin de récupérer la culture bactérienne. Les culots ont été dispersés dans 100  $\mu$ L du tampon TE (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM). Par la suite, 100  $\mu$ L d'une solution de lyse (NaOH (*Fisher Scientific*) 0,2M SDS 1%) ont été ajoutés au mélange et le tout a été mélangé par inversion environ 10 fois. Finalement, 150  $\mu$ L

d'acétate de potassium 3M pH 5,5 ont été ajoutés et les microtubes ont été mélangés 5 fois par inversion.



**Figure 3.12 :** Schéma représentant le plasmide utilisé lors de l'étape de clonage de l'ADN 16S extrait de la biomasse. Le point d'insertion ainsi que les gènes de sélections aidant au criblage y sont indiqués.

Les tubes ont été centrifugés pendant 5 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant a été transféré dans un nouveau microtube afin de suivre un traitement au phénol : chloroforme : isoamyl (25 :24 :1) afin de provoquer la séparation des protéines et des acides nucléiques. Ce traitement a été répété selon la qualité physique du produit (il était attendu que le produit soit incolore et dépourvu de particules). Un traitement au chloroforme : isoamyl (24 :1) a été effectué afin d'assurer que toutes traces de phénol aient été

enlevées des produits d'ADN. Finalement, l'ADN a été précipité dans 2 volumes d'éthanol 95 % pendant 30 minutes à -20C. Après une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm et une évaporation de l'éthanol résiduel, les plasmides ont été dissous dans 50 µL d'eau MilliQ. Les extractions des colonies blanches ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (3.5.2) contre les extractions des colonies bleues pour but de s'assurer que les colonies blanches soient porteuses d'un insert dans leurs plasmides.

### **3.10.5. Séquençage et analyse phylogénique**

Les plasmides extraits démontrant la bonne taille par électrophorèse sur gel d'agarose ont été envoyés au Centre d'Innovation Génome Québec (Montréal, QC, Canada) pour que les inserts soient séquencés. Une amplification PCR avec les amorces SP6 et T7 (tableau 3.1) a été faite sur les clones car ces amorces flanquaient l'insert dans les plasmides.

Les séquences obtenues par Génome Québec ont été analysées et corrigées avec les logiciels *Chromas Lite* version 2.01 <http://www.technelysium.com.au> et *Geneious* (<http://www.geneious.com/>). Des alignements ont été générés par le logiciel *BioEdit*, *Clustal W* <http://www.ebi.ac.uk/> et *Geneious* (<http://www.geneious.com/>). Les séquences révisées ont pu être comparées à celles retrouvées dans les banques de données du logiciel Nucleotide BLAST disponible sur le site du *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Seules les séquences ayant une homologie supérieure à 95 % furent retenues.



**Tableau 3.2** : Amorces utilisées lors de ce projet

Amorce	Région ciblée	Séquence	Fragment attendu (pb)	T(°C) hybridation	Concentration utilisée dans une PCR (nM)	Référence
341F-GC <sup>a</sup>	Eubactéries région V3 du gène codant pour l'ARNr 16S	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	~200	55	200	
534R <sup>a</sup>		5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'				
SP6 <sup>a</sup>		5'-AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'				
T7 <sup>a</sup>	Inserts du plasmide utilisé pour la génomique	5'-TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	dépend de l'insert	55	200	pGEM®-T Easy Vector (Promega)

a : Cycle utilisé : 1) 5 minutes à 94 °C et 5 minutes à 55 °C ; 2) 30 cycles de 45 secondes à 72 °C, 45 secondes 94 °C et 45 secondes à 55 °C ; 3) élongation de 10 minutes à 72 °C.



## **4. Résultats**

### **4.1. Caractérisation de la biomasse présente sur les biodisques à l'UTFE**

#### **4.1.1. Performance de dégradation du thiocyanate et nitrification**

Après nombreuses années d'opération et d'améliorations (installation du système de recirculation en 2005), l'UTFE a pu atteindre un taux de dégradation dans les normes. À l'aide de figure 3.5, il a été démontré qu'avec les améliorations apportées aux systèmes biodisques les performances de dégradation du thiocyanate et cyanate sont devenues stables et le thiocyanate et cyanate n'était plus détecté à la sortie de l'effluent. L'étape de la nitrification fut problématique en 2005, avec des concentrations moyennes en ammoniac de 211 mg/m<sup>3</sup>/h au deuxième biodisque et en nitrites de 94 mg/m<sup>3</sup>/h au dernier biodisque. En 2009 les changements apportés aux systèmes des biodisques ont amélioré la performance de la nitrification. La concentration en ammoniac au deuxième biodisque était d'une moyenne de 44 mg/m<sup>3</sup>/h et la concentration des nitrites était d'une moyenne de 2 mg/m<sup>3</sup>/h.

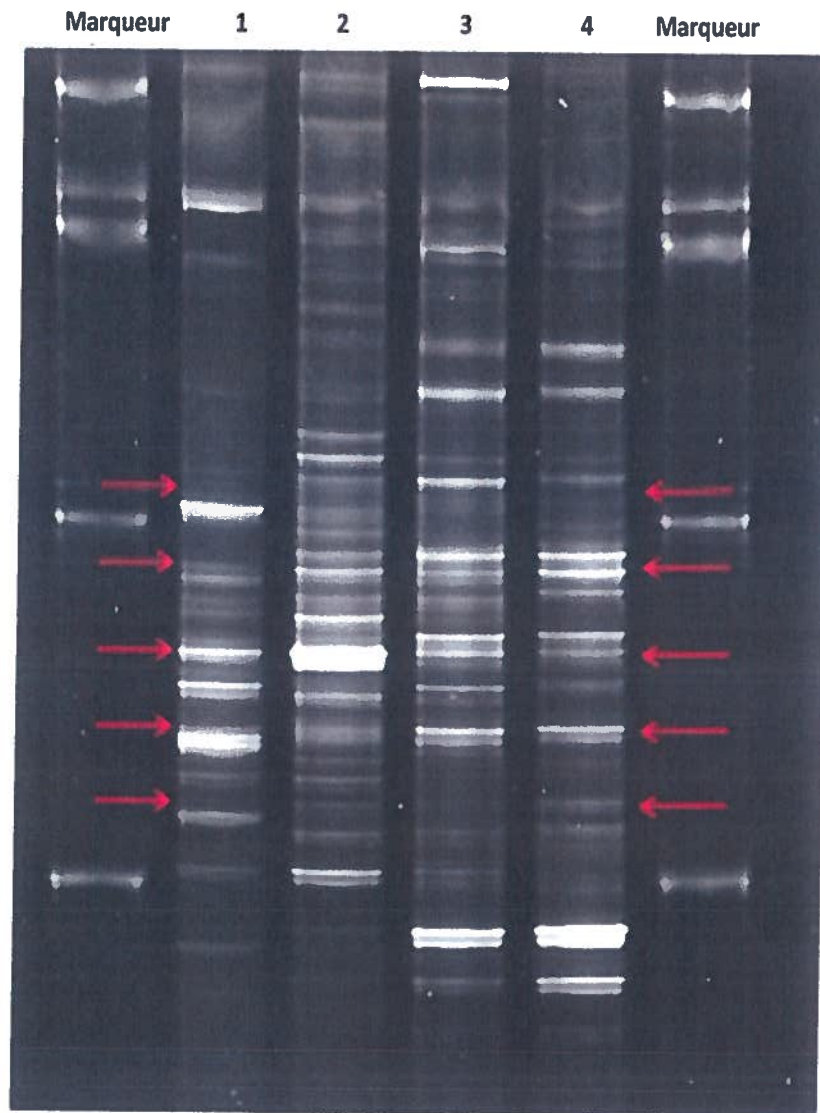
#### **4.1.2. Détermination de la complexité de la flore bactérienne par PCR-DGGE**

Lors du printemps 2008, 4 échantillons de biofilms des biodisques de la deuxième série ont été collectés à l'usine de traitement final des eaux (UTFE) situé à la mine Laronde (Cadillac, QC) et envoyé par courrier prioritaire au laboratoire de l'institut. Il est important de souligner que l'échantillonnage a été fait par une technicienne travaillant à l'UTFE et non par des membres du laboratoire à l'INRS-Institut Armand Frappier. La technique d'échantillonnage n'a donc pas pu être suivie de près. Les biofilms furent récoltés à la surface accessible des biodisques soit à la partie exposée à l'atmosphère (figure 3.2). Aucun biofilm ne fut récolté de la partie submergée ni des agrégats en suspension. Le biofilm du premier biodisque de la seconde série, dédié à la biodégradation du thiocyanate et cyanate, était d'une couleur terreuse et d'une consistance très épaisse. Les biofilms provenant des deuxième, troisième et quatrième biodisques effectuant la nitrification, étaient beaucoup plus pâles et d'une consistance plus liquide. De plus, lors de la réception des biofilms, il fut constaté par le laboratoire que la biomasse de ces biodisques était

plus dispersée et moins compacte. Cette constatation a été corroborée par l'échantillonneur à l'UTFE.

La complexité de la flore bactérienne a été évaluée par PCR-DGGE. Ainsi, l'ADN de chaque échantillon a été extrait et une partie des gènes de l'ARNr 16S a été amplifiée par PCR. Les amplicons de même longueur ont été séparés par DGGE. Lors de la migration dans le gradient dénaturant, les ADN se dénaturent en fonction de leur séquence. Il s'en suit, à partir du mélange de séquences, un profil de migration où chaque bande correspondrait, en théorie, à une espèce bactérienne, représentant ainsi une image de la complexité bactérienne des biofilms

Le profil de migration des 4 échantillons était complexe avec plusieurs bandes par échantillons (Figure 4.1). Ceci indique que la diversité bactérienne était élevée dans tous les biofilms. Nous avons constaté peu de similitudes entre les profils des deux premiers biodisques, et avec ceux des deux derniers biodisques. Dans ces derniers, les profils étaient similaires.



**Figure 4.1** : Profil de la diversité bactérienne des biodisques de la 2eme série de l'UTFE par PCR-DGGE. Des échantillons de biomasse des biodisques 1, 2, 3 et 4 ont été prélevés le 3 mars 2008 et l'ADN extrait. Une partie des gènes de l'ARNr 16S a été amplifiée et migrée sur un gel DGGE. Le gel était constitué d'un gradient d'agents dénaturants (urée et formamide) de 30 % (haut) à 70 % (bas). Les bandes du marqueur sont, du haut vers le bas, constituées de l'ADN de *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans*. Les flèches rouges indiquent des bandes similaires pour les 4 stations.

#### 4.1.3. Identification des espèces à l'aide d'une génothèque de l'ARNr 16S

Une génothèque de l'ARNr 16S a été construite pour chacun des échantillons récoltés au mois de janvier 2008 des biodisques 1, 2, 3 et 4 de la deuxième série. Un total de 250 clones ont été sélectionnés aléatoirement, soit 100 pour le biodisque 1 et 50 pour chacune des trois autres (Tableau 4.1). Les clones ont été directement envoyés pour le séquençage de leur insert. Les séquences ont été comparées avec les banques de données pour déterminer l'affiliation la plus probable au genre bactérien. Le seuil d'homologie des séquences devait être supérieur à 95 % pour que les séquences soient considérées affiliées à une espèce. Les affiliations furent établies par rapport à des souches caractérisées et publiées

En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones du biodisque 1, nous avons constaté que plus de 50 % de ceux-ci étaient affiliés au genre *Thiobacillus* (*Thiobacillus denitrificans* numéro d'accèsion Genbank: HQ586057) et 18 % à des bactéries oxydatrices du soufre tel *Rhodocyclaceae bacterium*, *Thiovirga sulfuroxydans* et *Thiothrix* sp. (Figure 4.2; Tableau 4.1). Les autres séquences composaient 25 % des clones et étaient apparentées aux genres *Sphingopyxis*, *Saccharothrix* et *Chloroflexi*.

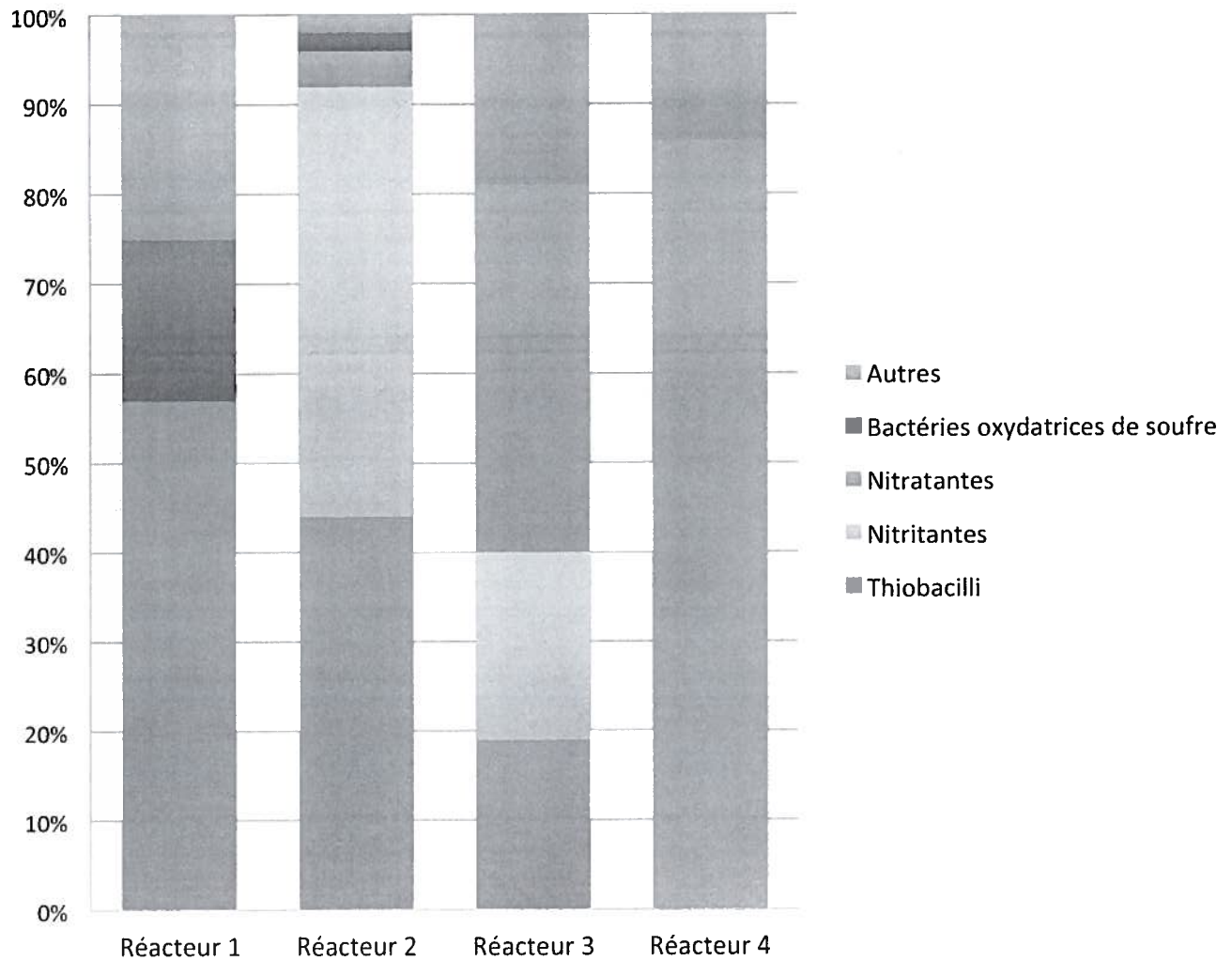
En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones de la biodisque 2, nous avons constaté que plus de 44 % de ceux-ci étaient affiliés au genre *Thiobacillus*, 48 % à des bactéries nitritantes telles que les genres *Nitrospira* et *Nitrosomonas*, 4 % étaient affiliés aux bactéries nitrifiantes dont le genre *Nitrobacter*, 2 % à des bactéries tel *Rhodocyclaceae bacterium* et *Mezorhizobium* sp. (Figure 4.2; Tableau 4.1).

En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones de la biodisque 3, nous avons établi que plus de 19 % de ceux-ci étaient affiliés au genre *Thiobacillus*, 21 % à des bactéries nitritantes dont le genre *Nitrosococcus*, 41 % étaient affiliés aux bactéries nitrifiantes comme les genres *Nitrobacter* (*Nitrobacter Winogradski* numéro d'accèsion Genbank : HQ586058) (Figure 4.2; Tableau 4.1).

En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones de la biodisque 4, nous avons remarqué que plus 86 % étaient affiliés aux bactéries nitrifiantes comme les genres *Nitrobacter* (Figure 4.2; Tableau 4.1).

Avec l'évolution du traitement dans les réacteurs, il y a une diminution du genre *Thiobacillus* et une apparition des bactéries nitritantes et nitrifiantes (Figures 4.2). Cette répartition sera analysée d'une façon plus complète dans la section Discussion.

## Diversité microbienne dans les biodisques de l'UTFE



**Figure 4.2:** Affiliation la plus probable des séquences de l'ARNr 16S des biodisques 1-4 de la série 2. Les séquences analysées avaient environ une longueur de 1500 paires de bases. L'affiliation a été faite avec le programme *Nucleotide BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) avec la banque de données d'ADN au NCBI.



**Tableau 4.1:**

Affiliations les plus probables des séquences 16S des échantillons prélevés des biodisques 1-4 de la série 2

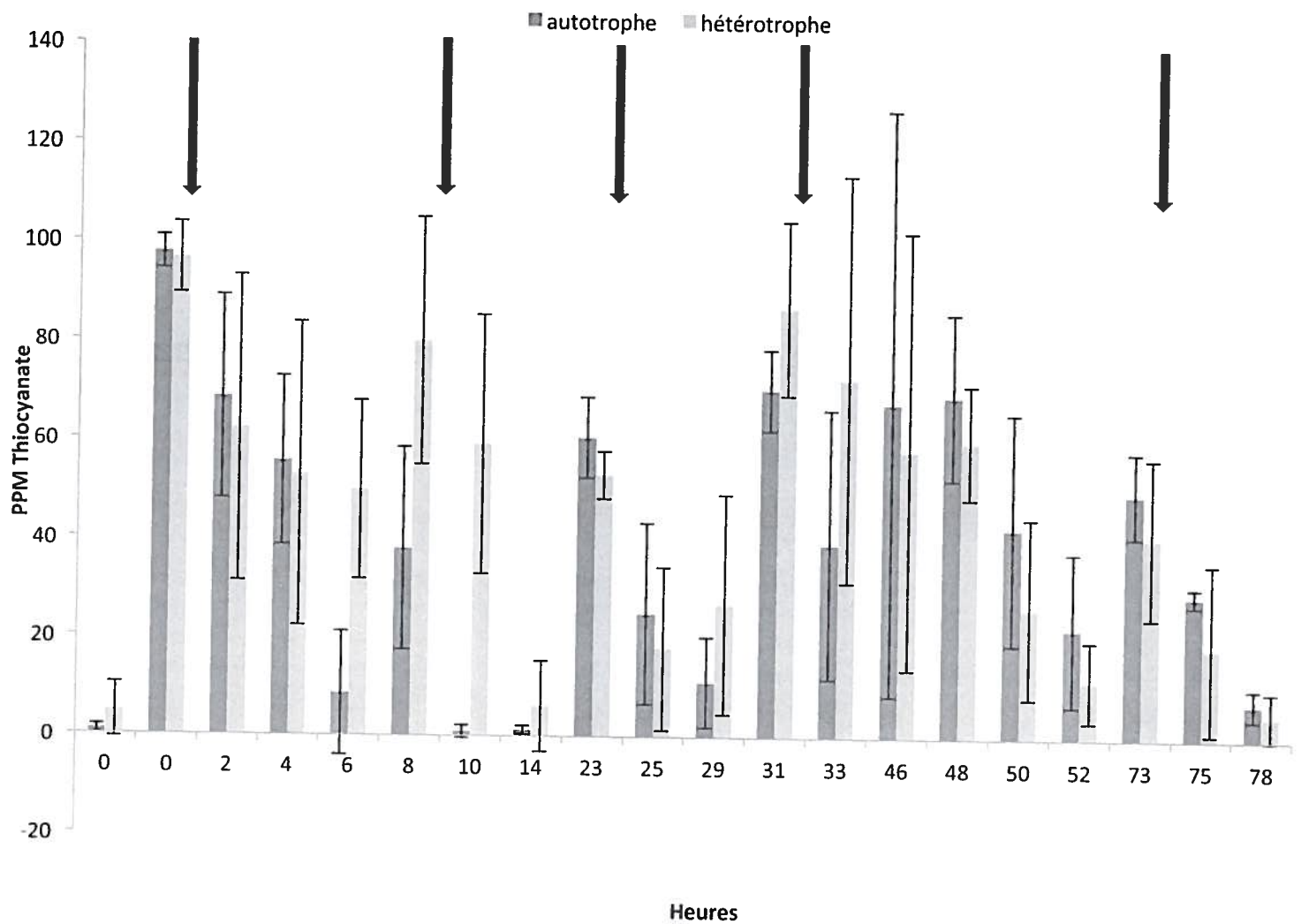
Origine d'échantillons :	Réacteurs 1-4 de la série 2			
Affiliation	1	2	3	4
<b>Proteobacteria</b>				
<b>Alphaproteobacteria</b>				
<i>Mesorhizobium</i> sp.	0	1	4	0
<i>Nitrobacter</i> sp.	0	3	10	7
Sphingomonadales				
<i>Sphingopyxis</i> sp.	3	0	0	0
<b>Betaproteobacteria</b>				
Burkholderiales				
<i>Simplicispira</i> sp.	7	0	0	0
<i>Acidovorax</i> sp.	5	0	0	0
<i>Nitrococcus</i> sp.	0	0	9	0
<i>Nitrosomonas</i> sp.	0	16	7	0
Rhodocyclaceae	8	0	0	0
<i>Thiobacillus</i> sp.	28	13	4	0
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	22	6	4	0
<b>Gammaproteobacteria</b>				
<i>Dokdonella</i> sp.	7	0	4	4
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	1	0
<i>Thiovirga</i> sp.	3	0	0	0
<i>Thiothrix</i> sp.	3	0	0	0
<b>Actinobacteria</b>				
<i>Saccharothrix</i> sp.	3	0	0	0
<b>Chloroflexi</b>	5	2	0	0
<b>Nitrospirae</b>	0	8	7	27
<b>Autres</b>	4	0	0	4
Total des Clones	98	49	50	43

## 4.2. Identification du comportement de la biomasse des biodisques

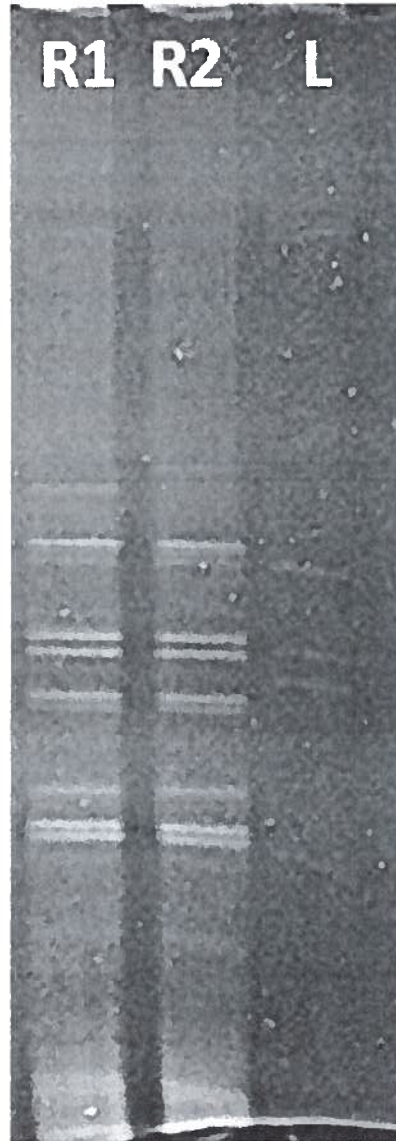
Afin d'identifier l'identité dominante dans le consortium bactérien retrouvé sur le premier biodisque à l'UTFE, deux réacteurs de 600 mL en mode cuvé furent inoculés avec la biomasse du biodisque de la série 2 collectée en janvier 2008. Un des réacteurs a été mis en présence d'air dépourvu de CO<sub>2</sub> (trappe à CO<sub>2</sub>) pour déterminer si des bactéries hétérotrophes étaient dominantes dans le biofilm. Le second réacteur contenait du CO<sub>2</sub> (air ambiant) pour identifier si les bactéries autotrophes étaient majoritaires dans le consortium. En injectant du thiocyanate dans les réacteurs et en échantillonnant à des intervalles déterminés, une courbe de dégradation a pu être formée pour déterminer une condition favorisant la dégradation biologique de ce composé.

Nous avons pu constater que les deux types de populations bactériennes étaient présents dans le biofilm (Figure 4.6). Toutefois, le réacteur contenant du CO<sub>2</sub> (autotrophes) a démontré une dégradation plus rapide du thiocyanate. Après seulement 2 heures, la biomasse présente dans ce réacteur avait déjà entamé la biodégradation en diminuant de plus de 20 ppm la concentration du thiocyanate, pour être presque complètement dégradée en 6 heures. Pour ce qui est du réacteur sans CO<sub>2</sub>, approximativement 50 % du thiocyanate a été dégradé en 6 heures. À la deuxième injection du thiocyanate, la biomasse dans le réacteur autotrophe (avec CO<sub>2</sub>) avait encore augmenté la vitesse de dégradation du thiocyanate en dégradant le composé en 2 heures. Avec les ajouts subséquents du thiocyanate, l'efficacité de dégradation du thiocyanate par les deux réacteurs tendait à être la même.

Lorsque les essais de biodégradation du thiocyanate furent terminés, une extraction de l'ADN de la biomasse fut entamée pour évaluer la différenciation des biomasses lors de l'expérience. Le profil de la flore bactérienne a donc été déterminé par PCR-DGGE (Figure 4.7). Ce profil était très similaire entre les deux biomasses, suggérant ainsi que les conditions de cultures n'ont pas induit de changement important dans la flore bactérienne.



**Figure 4.3 :** Efficacité de dégradation du thiocyanate par la biomasse présente dans deux bioréacteurs en mode cuvée. La biomasse provient du biodisque 1 de la mine Laronde. Le réacteur en cuvée nommé « autotrophe » avait un brassage par air et le réacteur « hétérotrophe » avait un brassage par air sans CO<sub>2</sub>. Les flèches indiquent les moments d'alimentation de thiocyanate dans les réacteurs.

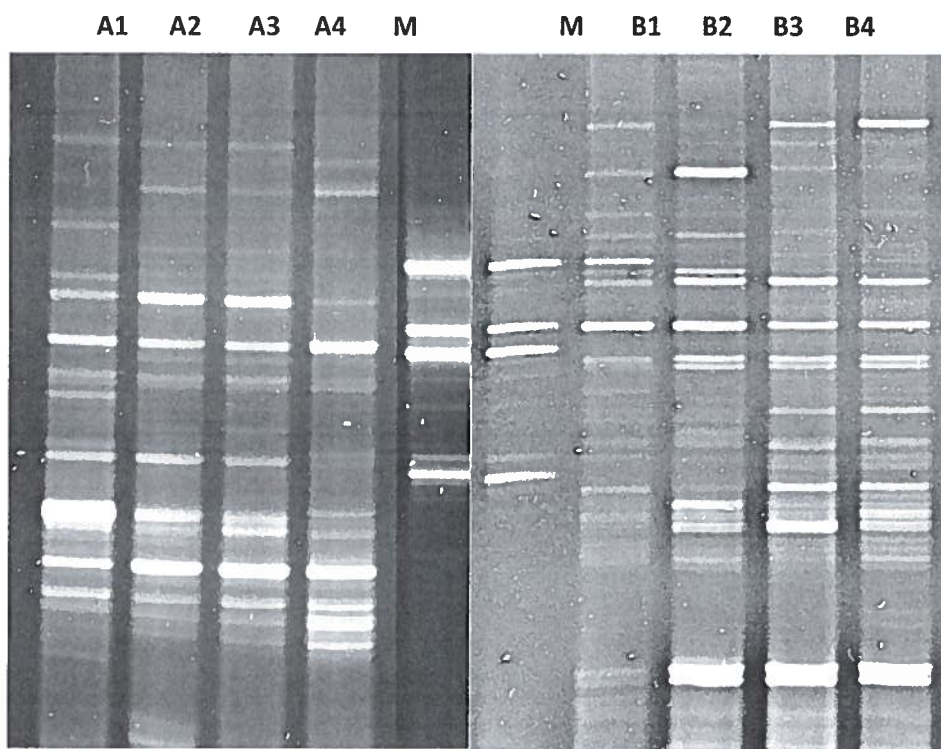


**Figure 4.4:** Profil de la diversité bactérienne des réacteurs en cuvée par PCR-DGGE. Des échantillons de biomasse ont été prélevés de chaque réacteur et l'ADN extrait. Une partie des gènes de l'ARNr 16S a été amplifiée et migrée sur un gel DGGE. Le gel était constitué d'un gradient d'agents dénaturants (urée et formamide) de 30 % (haut) à 70 % (bas). M, Marqueurs: voir la légende de la figure 4.1. Puits 1: Réacteur autotrophe (R1). Puits 2: Réacteur hétérotrophe (R2) Puits 3 : échelle (L).

### **4.3. Caractérisation de la biomasse présente dans les MBBR**

La biomasse récoltée au printemps 2008 a été utilisée pour ensemençer deux séries de réacteurs de type MBBR en laboratoire (voir section 3.8.1.). La biomasse du biodisque 1 (dégradation du thiocyanate) a été ensemençée dans les biodisques A1 et B1, celle du biodisque 2 dans A2 et B2, du biodisque 3 dans A3 et B3, et du biodisque 4 dans A4 et B4. Les trois derniers réacteurs de chaque série étaient dédiés pour la nitrification de l'ammoniac généré par la dégradation du thiocyanate dans le premier réacteur de chaque série. Les réacteurs furent mis en marche pour quelques mois afin d'acclimater la biomasse au nouvel environnement et supports. À la suite de la période d'adaptation, la biomasse fut récoltée.

La prise d'échantillon de la biomasse a été déterminée selon la performance des deux séries MBBR (figures 3.8 et 3.9). La complexité de la flore microbienne de chaque réacteur a été évaluée par PCR-DGGE (Figure 4.8). Nous avons constaté que le profil de migration des échantillons de la série A sont relativement similaire, avec quelques différences mineures. Nous avons constaté également une similarité dans les profils des réacteurs de la série B. Toutefois, le profil type de chaque série était différent.



**Figure 4.5 :** Profil de la diversité bactérienne des 4 réacteurs MBBR des séries A (aérée) et B (anoxique) par PCR-DGGE. Des échantillons de biomasse ont été prélevés le 6 janvier 2009 de chaque réacteur et l'ADN extrait. Une partie des gènes de l'ARNr 16S a été amplifiée et migrée sur un gel DGGE. Le gel était constitué d'un gradient d'agents dénaturants (urée et formamide) de 30 % (haut) à 70 % (bas). Marqueurs: voir la légende de la figure 4.1.

#### 4.3.1. Identification des espèces à l'aide d'une génothèque de l'ARNr 16S

Des génothèques des gènes de l'ARNr 16S ont été construites à partir de la biomasse prise en hiver 2009 des réacteurs B1, B2 et B4, et également avec les réacteurs A1 et A4. Un total de 257 clones furent sélectionnés aléatoirement, et leur insert séquencé (tableau 4.3). Comme l'analyse par PCR-DGGE a démontré une similarité de la répartition des espèces dans les réacteurs B et également dans les réacteurs A, nous n'avons pas échantillonné les réacteurs B3, A2 et A3.

En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones du réacteur B1, nous avons constaté que 40 % de celles-ci étaient affiliées au genre *Thiobacillus* et 12 % à des bactéries oxydatrices du soufre tel que *Rhodocyclaceae bacterium* et *Thiovirga sulfuroxydans* (Figure 4.9; tableau 4.3). Vingt-huit pour cent des séquences étaient apparentés à des espèces bactériennes dénitrifiantes telles que *Thiobacillus denitrificans* et *Azospira* sp. Il est important de noter que les séquences affiliées à *Thiobacillus denitrificans* ne sont pas incluses avec les séquences affiliées au genre *Thiobacilli* pour déterminer le pourcentage de bactéries dénitrifiantes dans le milieu du réacteur.

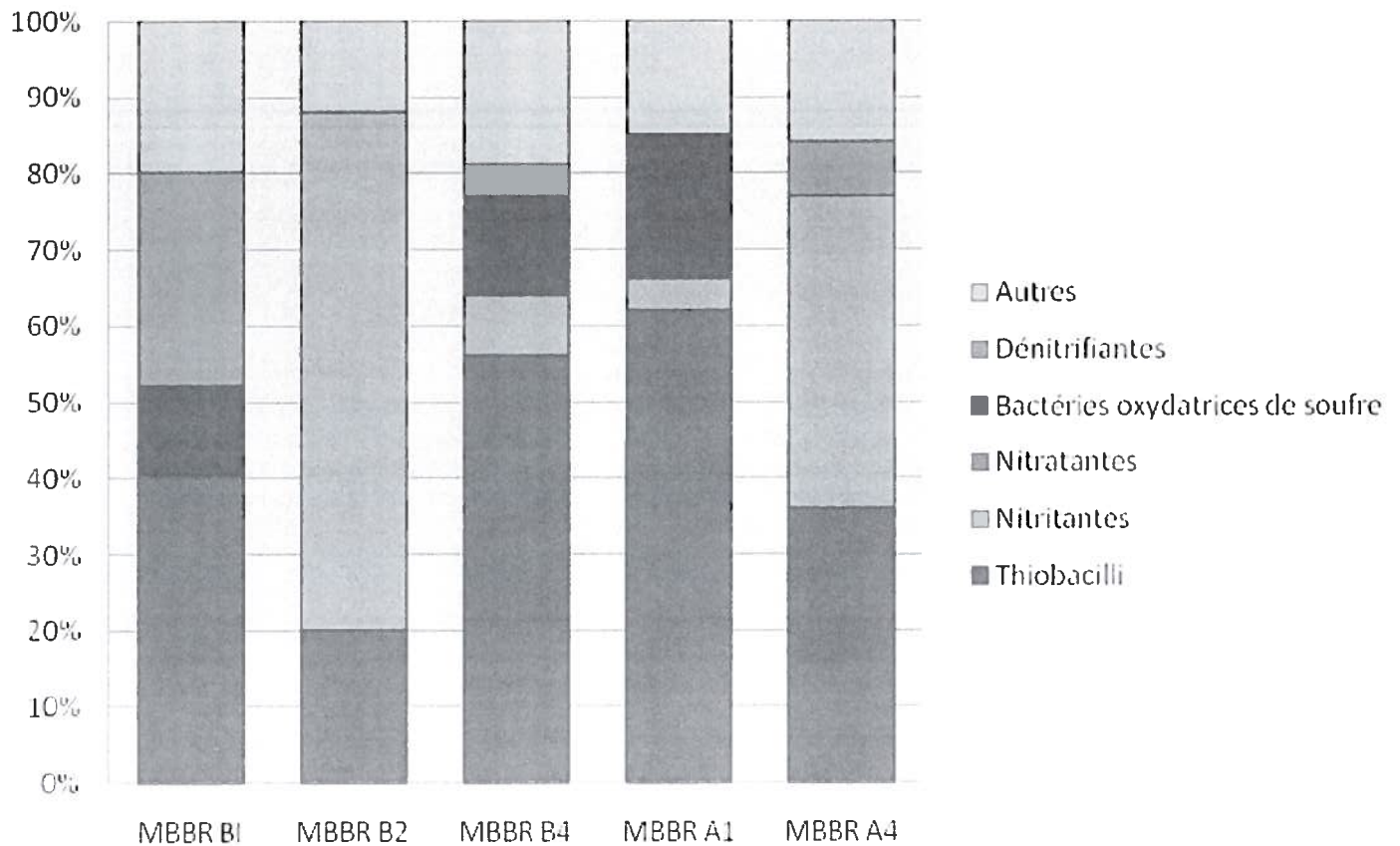
En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones du réacteur B2, nous avons constaté que plus de 68 % de celles-ci étaient affiliées au genre *Sphingomonas* (numéro d'accèsion Genbank: JF304797), et 20 % affiliées au genre *Thiobacillus* (Figure 4.6; Tableau 4.3).

En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones du réacteur B4, nous avons établi que plus de 56 % de celles-ci étaient affiliées au genre *Thiobacillus*, 13 % à des bactéries oxydatrices de soufre telles que *Sulfurospirillum* sp (numéro d'accèsion Genbank: JF304793), et 8 % étaient affiliées aux bactéries *Nitrosomonas* sp. (Figure 4.6; Tableau 4.3).

En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones du réacteur A1, nous avons constaté que 62 % de celles-ci étaient affiliées au genre *Thiobacillus*, 19 % à des bactéries oxydatrices du soufre tel que *Thiovirga sulfuroxydans*, et 4 % étaient affiliées aux bactéries *Nitrosomonas* sp. (Figure 4.6; Tableau 4.3).

En comparant les résultats de séquençages obtenus pour les clones du réacteur A4, nous avons constaté que 36 % de celles-ci étaient affiliées au genre *Thiobacillus* et 41 % étaient affiliées aux genres *Nitrotoga*, *Xanthomonas* et *Sphingomonas* (Figure 4.6; Tableau 4.3).

## Diversité microbienne dans les MBBR en laboratoire



**Figure 4.6 :** Affiliation la plus probable des séquences des gènes l'ARNr 16S des réacteurs MBBR de la série A et B. Les séquences analysées avaient environ une longueur de 1500 paires de bases. L'affiliation a été faite avec le programme *Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* avec la banque de données d'ADN au NCBI.



**Tableau 4.3:** Affiliations les plus probables des séquences 16S des échantillons prélevés des réacteurs A1, A4, B1, B2 et B4

Origine d'échantillons :	MBBR aéré			MBBR anoxique			
	A1	A4	*A1+A4	B1	B2	B4	*B1+B2+B4
<b>Proteobacteria</b>							
<b>Betaproteobacteria</b>							
<i>Thiobacillus</i> sp.	28	28	50.5	13	9	22	30.1
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	3	0	2.7	6	1	5	8.2
Rhodocyclaceae	8	4	10.8	9	1	5	10.3
<i>Nitrosomonas</i> sp.	1	4	4.5	0	0	1	0.7
<i>Nitrotoga</i> sp.	0	4	3.6	0	0	0	0.0
<i>Azospira</i>	0	0	0	8	0	0	5.5
Burkholderiales							
<i>Simplicispira</i> sp.	1	0	0.9	4	3	0	4.8
<i>Acidovorax</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0.7
<b>Gammaproteobacteria</b>							
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	3	2.7	0	1	0	0.7
<i>Dokdonella</i> sp.	0	0	0	0	1	1	1.4
Xanthomonadales							
<i>Thermomonas</i> sp.	0	3	2.7	2	0	1	2.1
<i>Xanthomonas</i> sp.	1	5	5.4	0	0	0	0.0
<b>Alphaproteobacteria</b>							
Sphingomonadales							
<i>Sphingomonas</i> sp.	1	4	4.5	0	35	3	26.0
<b>Firmicutes</b>							
Clostridiales							
	3	0	2.7	2	0	3	3.4
Autres	5	5	9.0	4	1	4	6.2
<b>Total des clones</b>	51	60		49	52	45	

\*Pourcentage des clones retrouvés dans les génothèques des réacteurs A1 et A4, et B1, B2 et B4.



## 5. Discussion

Le but du projet mené par l'UTFE et le laboratoire de Pierre Juteau était d'acquérir de l'information sur la dégradation biologique du thiocyanate, cyanate présent dans l'effluent minier à la mine Laronde, Cadillac, Québec afin d'optimiser le procédé biologique installé ultérieurement. L'analyse du contenu bactérien des biofilms responsables à la biodégradation du thiocyanate et la nitrification a permis au laboratoire d'identifier la complexité de la microflore dans le traitement biologique en question. L'utilisation de techniques en biologie moléculaire donc le but était identifier la microflore responsable de dégrader le thiocyanate sans sources de carbone telles que le phénol ou cyanure fut une première pour ce genre d'étude. Des études plus poussées pourront élucider les mécanismes de biodégradation de ce composé.

### 5.1. Suivi de la flore bactérienne présente à l'UTFE

En analysant par PCR-DGGE les échantillons récoltés de la surface des biodisques d'une des séries de bioréacteurs traitant l'effluent minier de la mine Laronde en janvier 2008, le laboratoire a voulu examiner si la diversité de la flore bactérienne subissait un changement lors de l'évolution du bioprocédé. Nos résultats ont montré une évolution de la biodiversité présente dans chacune des réacteurs (figure 4.1). Le réacteur 1, représentant la microflore sur le biodisque responsable de la biodégradation du thiocyanate et cyanate, contenait une diversité bactérienne élevée représentée par la présence de plusieurs bandes. Les échantillons des réacteurs 2, 3 et 4 ont montré des profils différents. Cela était attendu puisque la source de nutriments présents était différente dans ces réacteurs. Lors de la biodégradation du thiocyanate et cyanate présent dans le premier réacteur, il y a eu production de bicarbonate, sulfates et d'ammonium. Dans le second réacteur, il y avait présence d'une quantité résiduelle de thiocyanate et une quantité importante d'ammoniac (voir figure 3.6 et 3.7). Ceci a certainement influencé la constitution du biofilm présent dans le réacteur 2. La biomasse présente sur les deux derniers biodisques avait plusieurs similarités. Dans ces deux réacteurs, il y a eu accumulation de nitrites et nitrates due au processus de la nitrification.

## 5.2. Analyse des séquences obtenues d'une génothèque 16S

Quoique très instructif sur l'évolution du système, les profils DGGE ne nous renseignent pas sur les bactéries responsables de la dégradation spécifique du thiocyanate. Ceci a été accompli par l'analyse des génothèques de l'ARNr 16S de la biomasse présente dans les réacteurs.

### 5.2.1. Biodisque 1

Les séquences apparentées au genre *Thiobacillus* représentaient plus que la moitié des clones (57 %). Tous les membres de ce genre utilisent des composés contenant du soufre comme le thiosulfate comme accepteur d'électron et le dioxyde de carbone comme source de carbone. Ce sont des organismes Gram négatif, ne formant pas de spores, en forme de bâtonnets et majoritairement non mobiles. Ce sont des bactéries retrouvées dans des environnements divers, telles les boues de traitements des eaux usées, les zones terrestres ou aquifères contaminées. La première espèce de *Thiobacillus* à avoir été identifiée est *Thiobacillus thioparus*, une espèce utilisant le thiosulfate pour sa croissance où la production du sulfate était directement proportionnelle à la croissance de la culture. C'est une espèce aérobie stricte ayant une croissance rapide dans un milieu minéral contenant du thiosulfate à un pH 7 et à une température de 30 °C (Vishniac et Santer, 1957.). Cette espèce isolée en eaux fraîche et salée produit une matière visqueuse où les colonies y sont contenues. Leur production de la matière visqueuse pourrait contribuer à maintenir la structure du biofilm présent sur le biodisque (Vishniac et Santer, 1957). Happold démontra que *T. thioparus* a la capacité de croître autant sur un milieu contenant du thiosulfate que sur un milieu contenant 0.2 ppm de thiocyanate. Cette bactérie peut transformer le thiocyanate en source d'énergie, d'azote et de carbone. Youatt démontra également à l'aide de cette souche que le thiocyanate fut hydrolysé en cyanate et sulfure et ensuite oxydé en sulfure et sulfate. Le cyanate fut ensuite hydrolysé en ammoniac et dioxyde de carbone (Happold et coll., 1958, Youatt, 1954). Si on y retrouve une grande concentration de ces bactéries dans un milieu, celui-ci aura une couleur orange ou rouge indiquant la présence de cytochrome c. Ceci pourrait expliquer en partie la coloration lors des

extractions d'ADN à partir des biofilms provenant de la mine Laronde. Une autre raison serait des traces d'hydroxydes ferriques (une forme de fer trivalent insoluble dans l'eau) retrouvés dans le biofilm. *Thiobacillus denitrificans* utilise le nitrate en tant qu'accepteur d'électron sous conditions anaérobies. Cette bactérie sulfureuse fut observée en premier par Beijerinck en 1904. À l'aide de l'analyse des gènes ARN 16S extrait de la biomasse, il fut démontré qu'il y avait présence en grande quantité de ces bactéries dans le biofilm. Ceci pourrait expliquer l'accumulation d'ammoniac à la fin du premier réacteur de traitement avant l'installation de la recirculation. Ce qui est intéressant à mentionner est que les espèces couramment citées lors des études de biodégradation du thiocyanate sont plutôt des espèces hétérotrophes telles que *Pseudomonas* ou *Acinetobacter*. Contrairement à la littérature, l'étude phylogénique faite lors de ce mémoire a démontré que *Thiobacillus* sp. est l'espèce la plus retrouvée dans les réacteurs où il y avait du thiocyanate. Puisque cette étude est la seule à employer des techniques de biologie moléculaire pour identifier la microflore responsable de la dégradation du thiocyanate, il serait intéressant de poursuivre les études pour déterminer plus précisément quelles espèces font la dégradation du thiocyanate dans le traitement biologique de l'UTFE.

### 5.2.2. Biodisque 2

Nous avons constaté qu'il y avait toujours la présence de *Thiobacillus* sp. dans ce réacteur. Ceci pouvait s'expliquer par la présence de thiocyanate résiduelle dans la seconde cuve. Les séquences apparentées *Thiobacillus denitrificans* étaient la plus abondante. Ce genre de bactérie effectue la dénitrification autotrophe en consommant les ions de nitrates et en oxydant des composés de soufre ( $S^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ) pour sa croissance. Avec la recirculation ajoutée à la série de traitement (débutant à la fin du réacteur 4 et en déversant au début de la cuve 2), cette étape a apporté une grande quantité de nitrate et est venue diluer les concentrations élevées en ammoniac. Ceci était probablement propice au développement de *T. denitrificans* dans le biofilm retrouvé dans ce réacteur. Zhang et son équipe a démontré que cette bactérie dénitrifiante avait la capacité d'éliminer 75 % des nitrates (~700 mg  $NO_3^-$ -N/L) dans les milieux étudiés après 12 jours d'opération (Zhang et coll., 2009). Leur présence est donc utile dans le milieu, car il diminuerait ainsi la concentration de nitrates à la sortie de l'effluent (Zhang et coll., 2009). Des

séquences apparentées à des bactéries nitritantes du genre *Nitrosomonas* étaient également présentes. La majorité des bactéries nitritantes font partie de la sous-classe bêta des Proteobacteria. Ces bactéries sont normalement connues pour utiliser l'ammonium comme substrat pour l'oxydation en nitrite pour de l'énergie et d'utiliser le dioxyde de carbone comme source de carbone (Suzuki et coll., 1974; Arp et coll., 2002). Il fut démontré que le taux d'oxydation de l'ammoniac par le genre *Nitrosomonas* était influencé par le pH et la concentration de l'ammoniac (Suzuki et coll., 1974). Ceci pourrait expliquer la problématique antérieure de la nitrification incomplète lors du traitement biologique sans étape de recirculation. La présence du genre *Nitrosomonas* dans le biofilm serait une bonne indication d'une présence de bactéries nitritantes.

### 5.2.3. Biodisques 3 et 4

Lors de l'analyse des biodisques 3 et 4, la majorité des clones identifiés étaient apparentés aux genres *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* et *Nitrospira*. Le genre *Nitrobacter* appartient à la sous-classe alpha des Proteobacteries. *Nitrobacter winogradskyi*, l'espèce type, est une bactérie nitrifiante qui fut antérieurement identifiée en tant que bactérie chimioautotrophe obligatoire. Plusieurs essais ont démontré que cette bactérie ne pouvait pas faire croissance dans un milieu sans nitrites (Pope et coll., 1969). Des études plus récentes ont démontré que cette même espèce pourrait être chimioautotrophe facultative pouvant utiliser une source de carbone organique comme matériel de croissance lors de l'absence de nitrites (Delwiche et Finstein, 1965; Ida et Alexander, 1965; Smith et Hoare, 1968). Plusieurs études additionnelles ont toutefois démontré la capacité de *Nitrobacter* de croître de façon hétérotrophe (Bock 1976, 1983; Kalthoff et coll., 1979). Par contre, ces études ont été faites sur une base strictement morphologique et physiologique, dans des conditions de cultures variant entre 27 °C et 30 °C et à un pH de 7.4-7.6 (Ida et Alexander, 1965; Harris et coll., 1988; Smith et Hoare, 1968). Ces conditions ne sont pas retrouvées dans notre système et pourraient expliquer en partie la perte de performance lors de la nitrification.

Une autre partie des clones était apparentée au genre *Nitrospira*, un genre bactérien appartenant en partie aux Proteobacteries de la sous-classe delta. Par contre, de nouvelles études ont démontré que certaines espèces affiliées au *Nitrospira* font partie d'un nouveau

phylum *Nitrospira* (Ehrich, et coll., 1995; Teske et coll., 1994,). Comme *Nitrobacter*, *Nitrospira* est un genre retrouvé dans différents milieux parmi l'environnement comme la rhizosphère, les milieux aquatiques, des sédiments et des eaux contaminés par des rejets agricoles. Il est de plus en plus démontré que le genre *Nitrospira* est l'espèce dominante lors de la nitrification (Juretschko et coll., 1998; Okabe et coll., 1999; Schramm et coll., 1998; Wagner et coll., 1996). Contrairement à *Nitrobacter*, les genres *Nitrospira* ont la capacité de s'adapter dans des conditions où il y a des concentrations limitées en nitrite et oxygène. Puisque plusieurs systèmes de traitements d'eaux usées souffrent de plusieurs complications et pertes de performances lors de l'étape de la nitrification, il serait utile d'étudier ce genre bactérien dans le but de stabiliser cette étape cruciale de la nitrification lors des traitements d'eaux modernes.

Comme ont démontré les résultats de séparation de bandes sur le DGGE, il y a eu une évolution dans la biomasse présente dans chacun des réacteurs à l'UTFE. Ces résultats sont supportés par l'affiliation des séquences retrouvées dans nos génothèques 16S. Nous avons vu que la majorité des clones présents dans le biofilm du premier réacteur était formée du genre *Thiobacillus* et nous avons vu que la proportion de ce genre diminue avec l'acheminement de l'eau usée dans les réacteurs subséquents. Celles-ci ont vu l'apparition des bactéries impliquées dans la nitrification apparentées aux genres *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* et *Nitrospira*. Nous avons vu l'apparition de bactéries nitritantes au début de cette étape (*Nitrosomonas*) et par la suite l'apparition des bactéries oxydatrices de nitrite ou nitratantes (*Nitrospira*).

Nos génothèques ont révélé une grande présence d'espèces environnementales non identifiées dans les réacteurs, suggérant la présence de bactéries hétérotrophes ou autres bactéries impliquées dans le processus. Finalement, comme discuté dans la section 3.10, la prise d'échantillons n'a pas été suivie de près par un membre du laboratoire. Cette étape a été faite par des employés de la mine et donc, nous n'avons pas pu contrôler la représentabilité de ceux-ci. En utilisant un support massif comme un biodisque la biomasse sera répandue sur une grande surface. De plus l'épaisseur du biofilm peut varier selon certains critères (atmosphère, force de cisaillement). Il est connu que la concentration et la disponibilité des nutriments vont aussi influencer l'épaisseur et la composition du biofilm. Une étude sur l'impacte de la prise des échantillons à certains endroits dans le réacteur et sur le biodisque aurait pu être utile pour bien identifier s'il y a un changement de la composition du biofilm par rapport aux prises

d'échantillons. La technique d'échantillonnage de l'UTFE fut gardée, car nos résultats démontrent un changement significatif des biofilms par rapport à l'acheminement de l'effluent dans les réacteurs de traitement.

### **5.3. Identification du comportement de la biomasse dégradant le thiocyanate sur les biodisques**

Nous avons conçu des bioréacteurs en mode cuvée pour déterminer si la flore microbienne du biofilm du réacteur I au l'UTFE était composée de microorganismes autotrophes ou hétérotrophes. Rappelons que ce réacteur était responsable de la dégradation du thiocyanate et cyanate. La concentration de thiocyanate entrant dans le réacteur I à la mine était de 400 et à 700 mg/L SCN<sup>-</sup>. Par conséquent, cette biomasse était déjà adaptée à de grandes concentrations de thiocyanate et ceci explique la rapidité à dégrader 100 mg/L de thiocyanate ajouté dans le bioréacteur sans période de latence. Nos résultats ont démontré que les deux types de bactéries coexistaient dans le biofilm. Lorsque la biomasse a été exposée à des conditions autotrophes, celle-ci dégradait plus rapidement le thiocyanate ajouté que la biomasse exposée à des conditions hétérotrophes, suggérant que la communauté autotrophe dans le biofilm était plus importante que les bactéries hétérotrophes. Ceci pourrait venir du fait que la communauté autotrophe serait déjà en présence de leur source de carbones (CO<sub>2</sub>) donc serait plus apte à dégrader le thiocyanate comme source d'énergie. Si nous nous fions aux résultats obtenus de l'analyse de la génomique, la majorité des clones obtenus de la biomasse du réacteur I étaient du genre *Thiobacillus*, bactéries autotrophes pouvant dégrader le thiocyanate et thiosulfate (Happold., 1954).

Dans les conditions hétérotrophes, nous avons observé qu'une période d'adaptation (d'environ 17 heures) avant que la biomasse atteigne le taux de dégradation de celle cultivée en conditions autotrophes. La croissance en conditions hétérotrophes demande une source de carbone plus complexe que le dioxyde de carbone, soit une source de carbone organique. Happold a aussi mentionné que le genre *Thiobacillus* subissait une lyse cellulaire rapide lors de leur croissance et donc il y aurait une libération d'acides aminés et de facteurs de croissance dans le milieu permettant aux bactéries hétérotrophes de croître dans le surnageant du milieu (Happold, 1958). La lyse des bactéries autotrophes causée par le manque de dioxyde de carbone pourrait fournir des éléments de croissance aux bactéries hétérotrophes et en



conséquence aider celles-ci à faire croissance dans le milieu et donc consommer le thiocyanate comme source de carbone, de soufre ou d'azote. Ceci expliquerait également le temps de latence avant que ces éléments soient disponibles.

Les résultats des génothèque ont démontré toutefois la présence majoritaire de bactéries autotrophes du biofilm du réacteur 1. Donc, d'où proviennent ces bactéries hétérotrophes? Certaines possibilités pourraient expliquer cette situation. La première serait que les méthodes d'échantillonnages et d'identifications des clones n'étaient pas représentatives de la composition du biofilm, et les résultats étaient donc plus qualitatifs que quantitatifs. De plus, le dénombrement des clones d'une génothèque 16S n'est pas représentatif de l'action des bactéries. Des tests sur les métabolismes et des suivis sur l'assimilation du thiocyanate devront être effectués afin d'identifier les acteurs principaux de la biodégradation du thiocyanate et cyanate dans ce biofilm. La deuxième possibilité serait que la population hétérotrophe présente dans le milieu produirait du dioxyde de carbone lors de leur consommation du thiocyanate. Ceci permettrait aux bactéries autotrophes toujours présentes dans le biofilm de croître avec cette source de carbone et consommer le thiocyanate. Comme mentionné par Happold, s'il y a une lyse cellulaire de bactéries, donc une production de biomasse morte, ceci pourrait en conséquence alimenter la biomasse avec les composés libérés dans le milieu tel que le CO<sub>2</sub>. Ceci pourrait expliquer la période de latence de dégradation du thiocyanate lors de l'accumulation de la biomasse morte et l'accélération de dégradation lorsqu'il y a suffisamment de composés dans le milieu pour alimenter la biomasse en croissance. À l'aide de thiocyanate marqué au <sup>14</sup>C, Stratford (1994) a démontré qu'une population hétérotrophe était capable de produire du dioxyde de carbone. Il a été démontré que le produit majoritaire de la dégradation hétérotrophe du SCN<sup>-</sup> ayant le <sup>14</sup>C était le dioxyde de carbone. Comme démontré à l'aide du résultat du DGGE à la figure 4.7, les profils de la biomasse résidente dans les réacteurs sont identiques. Ceci supporte l'hypothèse que la période de latence de biodégradation du thiocyanate dans le second réacteur, lors du début des expériences pourrait s'expliquer par la période d'adaptation de la part des bactéries autotrophes lors de la production de CO<sub>2</sub> par les bactéries hétérotrophes.

Nous avons constaté qu'après 3 jours de mise en marche des réacteurs, l'activité de dégradation du thiocyanate par la biomasse a diminué. Le fait que les réacteurs étaient en mode cuvé a peut-être causé l'accumulation de produit de dégradation tel que le sulfate, le soufre,

l'ammoniac et le dioxyde de carbone dans le milieu. Il fut observé par Happold (1954), de Kruyff (1957) et Youatt (1954) que lors de la biodégradation du thiocyanate, il y a une accumulation de sulfate, de soufre, d'ammoniac et de dioxyde de carbone dans le milieu (Happold et coll., 1954; de Kruyff et coll., 1957; Youatt, 1954). L'accumulation d'ammoniac dans le milieu causerait l'inhibition de l'activité des microorganismes et donc en conséquence la dégradation du thiocyanate. Afin de mieux étudier le comportement de la biomasse et d'identifier si elle adopte un comportement autotrophe ou hétérotrophe lors de la dégradation du thiocyanate à long terme, il serait impératif d'effectuer les mêmes essais dans un mode où le milieu serait en circulation pour but d'éviter l'inhibition par substrat.

#### **5.4.Suivi de la flore bactérienne présente dans les séries MBBR**

Lors de l'essai de la dégradation du thiocyanate en laboratoire, deux séries furent installées afin de vérifier le potentiel de biodégradation du  $\text{SCN}^-$  en différentes conditions. La série MBBR-A reproduisait les conditions retrouvées à la mine Laronde, soit le premier réacteur (A1) servait à la dégradation du thiocyanate et les trois derniers réacteurs (A2-A4) servaient à la nitrification. La série MBBR-B fut conçue pour vérifier l'hypothèse du laboratoire soit que la biomasse aurait la capacité de dégrader le thiocyanate en conditions dénitrifiantes sans ajout de carbone. Le premier réacteur (B1) était anoxique, servant à la dégradation du thiocyanate, le second réacteur (B2) aéré a servi à la dégradation résiduelle du thiocyanate et les derniers réacteurs (B3-B4) ont servi à la nitrification. En imposant une étape de dénitrification dans un système de traitement des eaux à haut débit, ceci peut devenir problématique (Hallin et coll., 1996). Lorsque l'étape de la dénitrification est à la fin du traitement, l'affluent acheminé dans le réacteur ne contient pas une source d'énergie suffisante pour compléter la dénitrification à un taux acceptable (Hallin et coll., 1996) et une source de carbone organique comme le méthanol doit y être ajoutée (Maranon et coll., 2007). Par contre, Maranon et coll. (2007) a ajouté un système de recirculation du dernier réacteur au premier afin de fournir des nitrates aux bactéries dénitrifiantes. Lors de cette étude, un système à trois étapes la dégradation du thiocyanate a eu une efficacité de 80-98.3%. Par contre, il y avait une source de carbone provenant du phénol dans l'affluent. Le traitement biologique du thiocyanate en condition dénitrifiante sans source de carbone additionnel fut pour

la première fois suivi lors de cette expérience. Les résultats préliminaires (figure 3.8) démontrent que l'étape de la dénitrification utilisant une recirculation du dernier réacteur au premier est une technique efficace et avantageuse ne demandant pas d'ajout de sources de carbone externes.

Les analyses des profils bactériens par PCR-DGGE ont démontré qu'il n'y avait pas une grande différence de la biodiversité présente dans chacun des réacteurs des séries A et B (figure 4.8). Le réacteur A1 impliqué dans la biodégradation du thiocyanate et cyanate contenait une grande diversité microbienne représentée par une présence de plusieurs bandes. Le profil du réacteur A1 était très similaire de celui des réacteurs A2, A3 et A4. Le mode de recirculation les changements d'environnements et le temps d'acclimatation pourraient expliquer l'uniformisation de la biomasse dans les réacteurs. Il est important de mentionner que des bris mécaniques, obstructions des conduits, précipitations de l'affluent et autres événements sont venus perturber la microflore dans les MBBR. Il est fort probable que ces derniers événements ont joué un rôle dans la formation des biofilms et le fait que les profils DGGE ne sont pas propres à leurs réacteurs comme il est démontré dans le DGGE des réacteurs de l'UTFE. Si la biomasse n'est pas en ordre d'emmagasiner les nutriments nécessaires pour la croissance cellulaire, le biofilm ne sera pas stable sur les supports et la biomasse sera en suspension dans le milieu,

Le même constat a été fait dans la série B. Le profil bactérien des 4 réacteurs est assez uniforme probablement dû également au mode de recirculation. Malgré un inoculum commun au départ pour les deux séries, le profil bactérien des séries A et B est différent, reflétant la différence dans le mode d'opération des deux systèmes.

### **5.5. Analyse des séquences obtenues d'une génothèque 16S**

Comme pour les biofilms présents sur les biodisques, le séquençage des gènes de l'ARNr 16S des 250 clones (50 par réacteur) sélectionnés et criblés de notre génothèque a permis de classer les séquences obtenues en 8 catégories (selon le réacteur MBBR) appartenant à différents niveaux taxonomiques (tableau 4.3). Les résultats obtenus des analyses d'ARNr 16S des biofilms dans les réacteurs MBBR ont des similarités avec les résultats des génothèques obtenues à partir des échantillonnages des biofilms présents sur les biodisques à l'exception de quelques points.

### 5.5.1. MBBR-B1

Lors des études phylogéniques, nous avons retrouvé parmi les clones analysés l'espèce *Thiobacillus denitrificans*, une bactérie ayant une croissance autotrophe sous condition anaérobie qui effectue la dénitrification. L'homologie des séquences était d'un pourcentage supérieur à 96 %. Cette espèce est connue pour utiliser le thiosulfate comme donneur d'électron et le nitrate comme accepteur d'électron puisque la recirculation est faite de la 3<sup>e</sup> cuve, il y a un apport de nitrates qui stimule la dénitrification. Il est donc naturel que cette espèce ait été en grand nombre dans le réacteur B1, car les conditions étaient propices à sa croissance. Par contre, il serait important de savoir si *T. denitrificans* utilise le thiocyanate lorsqu'il y a absence de thiosulfate comme source d'énergie. Taylor et son équipe a démontré que *T. denitrificans* n'était pas en mesure de croître dans un milieu anaérobie contenant du thiocyanate d'ammonium (Taylor et coll., 1971). Il est possible que cette espèce ne fût pas responsable de la dégradation du thiocyanate mais elle utilisait les produits de sa dégradation. Le pourcentage d'homologie mentionné ci-haut ne peut confirmer l'espèce. Il se peut que l'espèce soit apparentée à *T. denitrificans* et peut effectuer la dégradation du thiocyanate en conditions dénitrifiantes. Depuis les résultats de cette étude, un changement fut apporté pour améliorer la dégradation du thiocyanate en condition de dénitrification. La recirculation fut changée de la 3<sup>e</sup> cuve à la 4<sup>e</sup> afin d'acheminer plus de nitrate à la première cuve pour alimenter les bactéries présentes dans le consortium. Après une période d'adaptation, il serait intéressant de recommencer l'étude phylogénique afin d'évaluer si le changement de la ligne de recirculation influence la composition de la microflore.

### 5.5.2. MBBR-B2 et B4

Dans le réacteur B2 (réacteur aéré traitant le thiocyanate résiduel), une diminution du nombre d'espèces de la famille *Thiobacillus* a été observée. Ce phénomène a également été remarqué lors de l'évaluation génétique des biodisques de la mine Laronde. La diminution serait probablement due au changement du genre de nutriments disponible au biofilm. Par contre, dans le réacteur B4, il y a eu une augmentation du genre *Thiobacillus*. Ceci pourrait indiquer que ce genre n'est pas directement responsable de la dégradation du thiocyanate et utilise les sous produits comme le thiosulfate comme source d'énergie. Une autre raison de l'apparition de *Thiobacillus* sp. dans le réacteur B4 serait les difficultés d'adaptation de la microflore due aux fluctuations du débit et concentration de l'affluent. De tels événements influencent grandement l'établissement d'une nouvelle microflore et alors aurait causé la suspension du biofilm dans l'effluent au lieu d'une croissance sur les supports, et donc sa dispersion dans le système.

La majorité des clones 16S du réacteur B2 était apparentée au genre *Sphingomonas*. Ce genre bactérien se retrouve en grande quantité dans les eaux municipales, des lacs, rivières les eaux usées et dans les boues activées (Koskinen et coll. 2000; White et coll., 1996). *Sphingomonas* sp. pourrait être une espèce retrouvée dans les eaux usées de l'UTFE car c'est une bactérie résistante à plusieurs désinfectants, à des produits chimiques toxiques et survie à des températures basses (Laskin et White, 1999). Certaines sont connues pour produire des exopolysaccharides (Denner et coll., 2001). Il y aurait possibilité que ce genre serait important dans un biofilm pour le maintien de l'intégrité du biofilm mature.

### 5.5.3. MBBR-A1 et A4

Contrairement au réacteur B1, il n'y avait pas présence de bactéries dénitrifiantes dans le réacteur A1 puisque celui-ci était aéré. La majorité des clones 16S identifiés était affiliée au genre *Thiobacillus*. De plus, il y avait présence de bactéries nitrifiantes. Ceci pourrait s'expliquer par la recirculation qui uniformise le système. Ceci est un bon exemple qui démontre que ce n'est pas tous les microorganismes qui font la même tâche dans un biofilm. Le biofilm peut être

constitué de plusieurs espèces, mais ce ne sont pas toutes qui font la dégradation du thiocyanate dans les premiers réacteurs et la nitrification dans les dernières.

Il y avait la présence aussi du genre *Nitrosomonas*, une bactérie autotrophe pouvant oxyder l'ammoniac en nitrites afin d'obtenir l'énergie pour la biosynthèse (Arp et coll., 2002). *Nitrosomonas europaea* est l'espèce la plus communément isolée des boues activées et est connue pour utiliser le dioxyde de carbone comme source de carbone servant à sa croissance (Arp et coll., 2002; Aleem, 1965; Wagner et coll., 2002). Ce genre de bactérie serait retrouvé dans les réacteurs MBBR car il y avait présence des nutriments nécessaires à leur gain d'énergie et un apport de carbone suffisant pour leur croissance.

## 6. Conclusion

À l'aide de la méthode du PCR-DGGE, nous avons constaté le caractère complexe de la flore bactérienne présente dans les biofilms étudiés à l'usine des traitements finaux des eaux (biodisques) et dans les bioréacteurs à l'échelle de laboratoire (MBBR). Dans la totalité des biofilms, il y avait une forte diversité de la flore bactérienne avec quelques dominances démontrées par une augmentation de l'intensité des bandes sur DGGE. Le séquençage des gènes de l'ARNr 16S des clones représentatifs de notre génothèque nous a permis de classer les bactéries présentes dans le biofilms des traitements en 8 catégories. Le genre *Thiobacillus*, bactéries autotrophes, représentait la majorité de la population présente sur les biodisques chargés de la biodégradation du thiocyanate et cyanate. Il a pu être observé, que la constitution des biofilms était changée lors d'une longue période d'adaptation à des environnements comprenant, des nutriments différents. Ceci a été démontré à l'aide de la caractérisation des biofilms présents sur les biodisque de l'UTFE. Les populations des biofilms furent différentes selon le biodisque analysé. Les résultats furent similaires pour les biofilms chargés de la dégradation du thiocyanate, le cyanate et la nitrification dans les MBBRs. Le genre *Thiobacillus* fut dominant dans les réacteurs désignés à la dégradation du thiocyanate et cyanate. Par contre, contrairement aux biodisques, ce genre fut aussi retrouvé dans tous les réacteurs.

À partir de la biomasse récoltée à l'UTFE, des essais sur le comportement de la microflore dégradant le thiocyanate furent faits à l'échelle du laboratoire. Il fut démontré à l'aide de courbes de dégradations que la population du biofilm fut majoritairement plus efficace à dégrader le thiocyanate en conditions favorisant la croissance autotrophe.





## 7. Références

- Ahn J-H, Kim J., Lim J., Hwang S.** (2004) Biokinetic evaluation and modeling of continuous thiocyanate biodegradation by *Klebsiella* sp. *Biotechnol. Prog.* 20: 1069-1075
- Ahn J-H, Lee S., Hwang S.** (2005) Growth kinetic parameter estimation of *Klebsiella* sp. utilizing thiocyanate. *Process Biochemistry* 40:1363-1366
- Aleem M.I.H** (1965) Energy-linked reduction of pyridine nucleotides in the chemoautotrophe, *Nitrosomonas europaea*. *Biochimia et Biophysica Acta* 216-224
- Andreottola G, Foladori P., Ragazzi M., Tatano F.** (2000) Experimental comparison between MBBR and activated sludge system for the treatment of municipal wastewater. *Water Science and Technology* 41(4): 375-382
- Armitage J.P.** Understanding the development and formation of biofilms. Department of biochemistry, University of Oxford.
- Arp D.J., Sayavedra-Soto L.A.** (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation but *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol* 178: 250- 255
- Betts P.M, Rinder D.F, Fleeker J.R** (1979) Thiocyanate utilization by an *Arthrobacter*. *Can journal of Microbiology* 25: 1277-1282
- Bock E.** (1976) Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. *Arch Microbiol.* 108: 305-312
- Bock E., Sundermeyer-Klinger H., Stackebrandt E.,** (1983) New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol.* 136: 281-284
- Boucabeille C, Bories A, Ollivier P** (1994) Degradation of thiocyanate by a bacterial coculture. *Biotechnology letters* 16(4): 425-430
- Bouffard S.C., Dixon D.G.** (2007) Evaluation of kinetic and diffusion phenomena in cyanide leaching of crushed and run-of-mine gold ores. *Hydrometallurgy* 86: 63-71
- Buswell A. M., Shiota T., Lawrence N., et Van M.I.** (1954). Laboratory studies on the kinetics of the growth of *Nitrosomonas* with relation to the nitrification phase of the BOD test. *Appl. Microbiol.* 2: 21

**Chan R. T.** (1979) Use of the rotating biological contactor for appropriate technology wastewater treatment. Water Resources Program. 1-75.

**Chapatwala K.D. et al.,** (1998) Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology so: 28-33

**Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D.** (1998) Standard Methods for Examination of Water & Wastewater (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association

**Davey M.E. and O'Toole G.A.** (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and molecular biology reviews. 64(4) 847-867.

**De Kruyff C.D., Van Der Walt J. P. & Schwartz H. M.** (1957) The utilization of thiocyanate and nitrate by *Thiobacilli*. J. Microbiol. Serol. 23:305.

**Delwiche C.C., Finstein M.S.** (1965) Carbon and energy sources for the nitrifying autotroph *Nitrobacter*. Journal of Bacteriology 90(1): 102-107

**Denner, E. B. M., Kampfer, P., Busse, H.-J. & Moore, E. R. B.** (1999). Reclassification of *Pseudomonas echinoides* Heumann 1962, 343AL, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas echinoides* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 49: 1103-1109.

**Ducey T. F. Vanotti M.B., Shriner A.D., Szogi A.A., Ellison A.Q.** (2010) Characterization of microbial community capable of nitrification at cold temperature. Bioresource technology 101: 491-500

**du Plessis, Barnard P, Muhlbauer R.M, Naldrett K** (2001) Empirical model for the autotrophic biodegradation of thiocyanate in an activated sludge reactor. Letters in Appl Microbiology 32: 103-107

**Ehrich S., Behrens D., Lebedeva E., Ludwig W., Bock E.** (1995) A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. Arch. Microbiol 164 :16-23

**Filloux, A., Vallet, I.** 2003. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. Médecine Science 19: 77-83.

**Ghose M.K** (2002) Complete physico-chemical treatment for coke plant effluents. Water Research 36: 1127-1134

**Granato M, Gonçalves M. M. M, Villas Boas R.C, Sant'Anna Jr G.L** (1996) Biological treatment of a synthetic gold milling effluent. Environmental Pollution 91 (3): 343-350

- Grigor'eva N.V, Avakyan Z.A, Tourova T.P, Kondrat'eva T.F, Karavaiko G.I** (1999) The search for and study of microorganisms that degrade cyanides and thiocyanates. *Microbiology* 68 (4): 393-399
- Hallin, S., M. Rothman, and M. Pell.** 1996. Adaptation of denitrifying bacteria to acetate and methanol in activated sludge. *Water Res.* 30:1445-1450
- Happold F.C, Jonhstone K.I, Rogers H.J, Youatt J.B** (1954) The isolation and characteristics of an organism oxidizing thiocyanate. *Journal of general microbiology* 10: 261-266
- Harms, H., Koops, H. P. & Wehrmann, H. (1976).** An ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosovibrio tenuis* nov. gen. nov. sp. *Arch Microbiol* 108:105-111.
- Ida S., Alexander M.,** (1965) Permeability of *Nitrobacter agilis* to organic compounds. *Journal of Bacteriology* 90(1): 151-156
- Jeffery M. I., Ritchie I. M.** (2001) The leaching and electrochemistry of gold in high purity cyanide solutions. *Journal of the electrochemical society* 148(4) D29-D36
- Jeong Y.S, Chung J.S** (2006) Biodegradation of thiocyanate in biofilm reactor using fluidized-carriers. *Process Biochemistry* 41: 701-707
- Jeong Y, Park B.-G, Chung J.S** (2005) High performance biofilm process for treating wastewater discharged from coal refining plants containing nitrogen, cyanide and thiocyanate. *Water science and technology* 52 (10): 325-334
- Johnson C.A., Grimes D.J., Leinz R. W., Rye R. O.** (2009) Cyanide speciation at four gold leach operation undergoing remediation. *Environmental science and technology* 42(2): 1038-1044
- Juretschjo S. Timmermann G., Schmid M., Schleifer K-H., Pommerening-Röser A., Koops H-P., Wagner M.,** (1998) Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria an dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8): 3042-3051
- Katayama Y, Kuraishi H** (1978) Characteristics of *Thiobacillus thioparus* and its thiocyanate assimilation. *Can. Journal of Microbiology* 24: 804-810
- Katayama Y, Hiraishi A, Kuraishi H** (1995) *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with the emendation of the genus. *Microbiology* 141: 1469-1477

**Katayama Y, Narahara Y, Inoue Y, Amano F, Kanagawa T. Kuraishi H (1992)** A thiocyanate hydrolase of *Thiobacillus thioparus*. *The journal of biological chemistry* 267(13): 9170-9175

**Kim, Y.M., Park, D., Lee, D.S., Park, J.M., (2007)** Instability of biological nitrogen removal in a cokes wastewater treatment facility during summer. *J. Hazard. Mater.* 141: 27–32.

**Kim, Y.M., Park, D., Lee, D.S., Park, J.M., (2008)** Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *J. Hazard. Mater.* 152: 915–921.

**Kim Y.M., Park D., Lee D.S., Jung K.A., Park J.M., (2009)** Sudden failure of biological nitrogen and carbon removal in the full-scale pre-denitrification process treating cokes wastewater. *Bioresource Technology* 100: 4340-4347

**Kim S-J, Katayama Y (2000)** Effect of growth conditions on thiocyanate degradation and emission on carbonyl sulfide by *Thiobacillus thioparus* TH115. *Water research* 34 (11): 2887-2894

**Kondos P.D., Deschênes G., Morrison R.M. (1995)** Process optimization studies in gold cyanidation. *Hydrometallurgy* 39: 235-250

**Koops, H. P., Harms, H. & Wehrmann, H. (1976).** Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp. *Arch Microbiol* 107: 277-282.

**Koskinen R. Ali-Vehmas T., Kämpfer P., Laurikkala M., Tsitko I., Kostyal E., Atroschi F., Salkinoja-Salonen M. (2000)** Characterization of *Shingomonas* isolates from Finnish and Swedish drinking water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology* 89: 687-696

**Kowalchuk, G. A. & Stephen, J. R. (2001).** Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual review of microbiology* 55, 485-529.

**Laskin A.I. and White, D.C. (1999)** Special issue on the genus *Sphingomonas*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23, 231-408

**La Brooy S.R., Linge H.G., Walker G.S. (1994)** Review of gold extraction from ores. *Minerals Engineering* 7(10): 1213-1241

**Lee C., Kim J., Chang J., Hwang S., (2003)** Isolation and identification of thiocyanate utilizing chemolithotrophs from gold mine soils. *Biodegradation* 14: 183-188

**Loveless J.E. et Painter H.A. (1968)** The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of a *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge. *J. Gen. Microbiol.* 52: 1–14

- MacArthur, D.M.,** (1972) A study of gold reduction and oxidation in aqueous solutions. *Journal of Electrochemistry Society.* 199: 672-677
- Maranon E., Vazquez I., Rodriguez L., Fernandez Y.** (2008) Coke wastewater treatment by a three-step activated sludge system. *Water Air Soil Pollution* 192: 155-164
- Mason F, Harper D, Larkin M** (1994) The microbial degradation of thiocyanate. *Biochemical Society Transactions* 22: 423S.
- Mba D., Bannister R. H., Findlay G. E.,** (1999) Mechanical redesign of the rotating biological contactor. *Water Research.* 33 (18): 3679-3688
- Neufeld Greenfield J., Rieder B.** (1986) Temperature, cyanide and phenolic nitrification inhibition. *Water research* 20(5): 633-642
- Ødegaard H.** (2006) Innovation in wastewater treatment: the moving bed biofilm process. *Water science and technology.* 53(9) : 17-33
- Ødegaard H. Rusten B., Westrum T.** (1994) A new moving bed biofilm reactor- applications and results. *Water Science Technology* 29(10-11): 157-165
- Okabe S., Satoh H., Watanabe Y.** (1999) In situ of nitrifying biofilms and determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology* 65(7): 3182-3191
- Oleson J.L., Lin H.K., Walsh D.E.,** (2005) Modeling of SO<sub>2</sub>/air cyanide destruction process. *Minerals & Metallurgical Processing.* 22(4): 199
- Pastorelli G. Andreottola G., Fraja Frangipane E. Pascalis F., Gurrieri G., Rozzi A.** (1997) Pilot-plant experiments with moving-bed biofilm reactors. *Water Science Technology* 36(1): 43-50
- Patwardhan A.W.** (2003) Rotating biological contactors: a review. *Industrial & Engineering Chemistry research.* 42: 2035-2051
- Pope L.M., Hoare D.S., Smith A.J.,** (1969) Ultrastructure of *Nitrobacter agilis* grown under autotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Bacteriology* 97(2): 936-939
- Prosser, J. I. (1989).** Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in microbial physiology* 30, 125-181.
- Pykkö P.** (2004) Theoretical chemistry of Gold. *Angewandte Chemie Int.* 43: 4412-4456
- Richardson, D. J. & Watmough, N. J. (1999).** Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current opinion in chemical biology* 3:207-219.

- Rusten, B., Hem, L. and Ødegaard, H.** (1995). Nitrogen removal from dilute wastewater in cold climate using moving bed biofilm reactors. *Water Environ. Res.*, 67(1):65–74.
- Schramm A., Beer D., Wagner M., Amann R.,** (1998) Identification and activities in situ of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* spp. And dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9): 3480-3485
- Sharma B., Ahler R.C.** (1977) Nitrification and nitrogen removal. *Water Research* 11: 897-925
- Smith A.J., Hoare D.S.** (1968) Acetate assimilation by *Nitrobacter agilis* in relation to its “obligate autotrophy”. *Journal of Bacteriology* 95(3):844-855
- Sorokin D.Y, Tourova T.P, Antipov A.N, Muyzer G, Kuenen J.G** (2004) Anaerobic growth of the haloalkaliphilic denitrifying sulfur-oxidizing bacterium *Thiobacillus thiooxidans* sp. nov. with thiocyanate. *Microbiology* 150: 2435-2442
- Stafford D.A., Gallely A.G.** (1969) The utilization of thiocyanate by a heterotrophic bacterium. *Journal of Gen. Microbiol* 55: 285-289
- Stratford J., Dias A. E.X.O., Knowles C. J.** (1994) the utilization of thiocyanate as a nitrogen source by a heterotrophic bacterium: the degradative pathway involves formation of ammonia and tetrathionate. *Microbiology* 140: 2657-2662
- Suzuki I** (1974) Mechanisms of inorganic oxidation and energy coupling. *Annual review Microbiology* 28: 85-102
- Taylor B.F. Hoare D.S.,** (1971) *Thiobacillus denitrificans* as an obligate chemolithotroph. *Arch. Mikrobiology.* 78: 193-204
- Teske A., Alm E., Regan J.M., Toze S., Rittman B.E., Stahl D.A.,** (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 176(21): 6623-6630
- Vicente J, Diaz M** (2003) Thiocyanate wet oxidation. *Environmental Science technology* 37: 1452-1456
- Vishniac W. et Santer M.** (1957) The Thiobacilli. *Journal of Bacteriology* 21: 195-209
- Watnick, P., Kolter, R.** 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriology* 182: 2675-2679.
- Wagner M., Rath G., Koops H.P., Flood J., Amann R.** (1996) *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science Technology* 34(1-2): 237-244

**Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H., (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. Antonie Van Leeuwenhoek 81:665–680.**

**White D.C, Sutton S.D., Ringelberg D.B., (1996) the genus *Shingomonas*: physiology and ecology. Environmental Biotechnology 7:301-306**

**Wood A.P. Kelly D.P., McDonald I.R., Jordan S.L., Morgan T.D., Khan S., Murrell J.C., Borodina E. (1998) A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. Arch Microbiol 169: 148-158**

**Youatt J.B (1954) Studies on the metabolism of *Thiobacillus thiocyanoxidans*. Journal of general microbiology 11: 139-149**

**Zhang Z., Lei Z., He X., Zhang Z., Yang Y., Sugiura N. (2009) Nitrate removal by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on poly(vinyl alcohol) carriers. Journal of Hazardous Materials 163: 1090-1095**

