



HAL
open science

Détermination des constantes cinétiques de *Acidithiobacillus caldus* par suivis de cultures en bioréacteur, en vue de la modélisation du procédé de biolixiviation

Ombeline Blanger

► **To cite this version:**

Ombeline Blanger. Détermination des constantes cinétiques de *Acidithiobacillus caldus* par suivis de cultures en bioréacteur, en vue de la modélisation du procédé de biolixiviation. Microbiologie et Parasitologie. 2019. hal-02548159

HAL Id: hal-02548159

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02548159v1>

Submitted on 20 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine
Master Microbiologie, orientation
Microbiologie Environnementale et Sanitaire - Faculté des Sciences et Technologies
6^e Année de Pharmacie, filière Industrie (par équivalence)
Faculté de Pharmacie
Année 2018-19

Rapport de stage
Présenté oralement le 18 Septembre 2019 par

Ombeline BLANGER
Détermination des constantes cinétiques de
***Acidithiobacillus caldus* par suivis de cultures en**
bioréacteur, en vue de la modélisation du procédé
de biolixiviation

(Determination of *Acidithiobacillus caldus*'s kinetic data through the monitoring of cultures in stirred tank reactor, for the modeling of the bioleaching process)

Encadrants directs du travail : Eric OLMOS (Professeur, Maitre de stage), Stéphane DELAUNAY (Professeur), en collaboration avec Anne-Gwenaëlle GUEZENNEC (Ingénieure R&D, BRGM Orléans).

Stage réalisé du 4 Mars 2019 au 30 Aout 2019 au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR CNRS-UL 7274, site ENSAIA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 VANDOEUVRE LES NANCY

Remerciements

Je souhaite remercier mon maitre de stage, le Professeur Eric Olmos pour le suivi assuré tout au long de ce stage, ainsi que le Professeur Laurent Falk, Directeur du laboratoire, pour m'avoir accepté comme stagiaire au sein de ce laboratoire. Merci à vous de m'avoir fait confiance en me confiant des missions sur ce projet. Je tiens à remercier également le Professeur Stéphane Delaunay ainsi que Anne Gwenaelle Guezennec, ingénieure R&D au BRGM d'Orléans, Jonathan Chéron et le Docteur Céline Loubière pour avoir co-encadré et également assuré tout le suivi et la formation lors de ce stage.

Je remercie également le Docteur Emmanuel Rondags et Fabrice Blanchard, ingénieur de recherche, pour le support technique sur les bioréacteurs ainsi que Caroline Sion, pour le support technique en microscopie.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour son accueil, sa gentillesse, sa bonne humeur et mes co-stagiaires, camarades de bureau. Je garderais un très bon souvenir de ce stage, que ce soit en manip', en réunion ou bien en pause repas. #Bento

Merci enfin à mes grands-parents pour leur soutien sans failles (après tout « Quand on est bon, on est toujours bon »), à mes parents, mon frère et ma sœur pour leur soutien, qu'il soit matériel ou spirituel.

Je tiens également à remercier mes amis pour leur présence, spirituelle pour certains d'entre eux qui ont tracé leur route dans d'autres villes mais avec lesquels on reste toujours connectés quoi qu'il arrive (STV, Danny...), Charlotte pour nos escapades parisiennes (toujours parfumées à la sauce soja et au wasabi!). Merci également aux copains du Mac qui partagent le même chapeau que moi les mardis soir, et qui m'ont permis de garder un équilibre tout au long de cette dernière année et de continuer à avoir un pied dans la vie étudiante malgré les années qui passent. Nancy va me manquer!

Merci à toutes les personnes qui croient en moi et qui ont saisi mes aspirations.

Table des matières

Remerciements	
Table des matières	
Table des figures	
Table des tableaux	
Abréviations	
I) Introduction	1
1) Introduction générale	1
2) Présentation du laboratoire	2
3) La biolixiviation	3
A) Les bactéries utilisées	3
B) Différentes techniques en industrie	4
C) Le mécanisme	5
D) Différentes voies	6
E) Rôle des exopolysaccharides	7
4) La bactérie <i>Acidithiobacillus caldus</i>	8
5) Notions de cinétique	9
II) Matériels et méthodes	12
1) Souches et milieux	12
2) Propagation en fioles d'Erlenmeyer	12
3) Culture en bio-réacteur mécaniquement agité	13
4) Analyses	15
A) Comptages sur cellule de Thoma	15
B) Valeurs relevées directement sur la console	17
III) Résultats	18
1) Propagation en fioles d'Erlenmeyer	18
A) Observations au microscope	18
B) Suivi de la croissance des bactéries	19
C) pH des fioles d'Erlenmeyer	21
2) Culture en bio-réacteur mécaniquement agité	21
A) Suivi de la croissance	21
B) Volume de soude ajouté	25
C) Potentiel redox	26
D) Saturation en oxygène	28
IV) Discussion	29
Bibliographie	
Convention de stage	
Annexes	
1) Organigramme du laboratoire	
2) Protocoles de préparation des milieux et de repiquage	
3) Protocoles de montage et démontage du réacteur	

Table des figures

Figure 1 : Le LRGP en résumé	2
Figure 2 : Schéma résumant les mécanismes des différentes voies	7
Figure 3 : <i>A. caldus</i> observé au microscope électronique	8
Figure 4 : Représentation graphique du modèle de Monod	10
Figure 5 : Réacteur monté	14
Figure 6 : Platine du réacteur	14
Figure 7 : Logarithme népérien de la biomasse en fonction du temps	16
Figure 8 : Observation d' <i>A. caldus</i> au microscope optique	18
Figure 9 : Grain de soufre observé au microscope à fluorescence après marquage Baclight (Gx400)	19
Figure 10 : Croissance de la culture « Barrie » (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)	19
Figure 11 : Croissance de la souche BRGM1 (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)	20
Figure 12 : Croissance de la souche KU dans différentes conditions (logarithme de la biomasse en fonction du temps)	20
Figure 13 : Croissance dans un réacteur avec 10g/L de soufre (BRGM5) (logarithme de la biomasse en fonction du temps)	21
Figure 14 : Croissance dans un réacteur avec 5g/L de soufre (BRGM1) (logarithme de la biomasse en fonction du temps)	22
Figure 15 : Croissance dans un réacteur avec 2,5g/L de soufre (BRGM2) (logarithme de la biomasse en fonction du temps)	22
Figure 16 : Croissance dans un réacteur avec 0,5g/L de soufre (BRGM3) (logarithme de la biomasse en fonction du temps)	23
Figure 17 : Croissance dans un réacteur avec 0,05g/L de soufre (BRGM4) (logarithme de la biomasse en fonction du temps)	23
Figure 18 : Graphe $\mu = f([S])$ avec estimation du taux maximum de croissance μ_{max}	24
Figure 19 : Evolution du volume de soude ajoutée au cours du temps (en heures)	25
Figure 20 : Potentiel redox (mV) en fonction du temps, réacteur BRGM5	26
Figure 21 : Potentiel redox (mV) en fonction du temps, réacteur BRGM1	27
Figure 22 : Potentiel redox (mV) en fonction du temps, réacteur BRGM2	27
Figure 23 : Potentiel redox (mV) en fonction du temps, réacteur BRGM4	28

Table des tableaux

Tableau 1 : Arbre des repiquages	15
Tableau 2 : Taux de croissance des réacteurs, à différentes concentrations de substrat	24
Tableau 3 : Masse de soufre consommée	26

Abréviations

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières
LRGP : Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
ENSAIA : École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
UMR : Unité Mixte de Recherche
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
ENSIC : Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
SVS : Sciences, Vie et Santé
CO₂ : Dioxyde de carbone
BioProMo : BioProcédés, BioMolécules
OGM : Organisme Génétiquement Modifié
BRGM-KCC : Bureau de Recherches Géologiques et Minières – Kasere Cobalt Company
FeS₂ : Pyrite
MoS₂ : Molybdénite
WS₂ : Tungsténite
CuFeS₂ : Chalcopyrite
ZnS : Sphalérite
PbS : Galénite
MnS₂ : Hauérite
FeAsS : Arsénopyrite
EPS : ExoPolySaccharide
RPA : Réacteur Parfaitement Agité
ISC : Inorganic Sulfur Compounds
sox : Sulfur Oxidation
sor : Sulfure Oxygenase Reductase
sdo : Sulfure DiOxygenase
tth : TetraThionate Hydrolase
hdr : HeteroDisulfide Reductase
DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
BSS : Basal Salt Solution
 μ : Taux de croissance
[S] : Concentration en soufre
 μ_{\max} : Taux maximum de croissance
 K_s : Constante de saturation
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

I) Introduction

1) Introduction générale

La biolixiviation consiste en la récupération de métaux d'intérêt (or, cobalt...) à l'aide de microorganismes. Les métaux sont récupérés sous forme soluble provenant de matrices à faible teneur comme des sols (minerais) ou des déchets (informatique par exemple), puis extraits par électrolyse. On peut aussi utiliser ce concept pour la dépollution d'eaux de sorties d'usines (Kaksonen, 2018)¹.

C'est une technique, déjà utilisée pendant l'Antiquité et prometteuse à l'avenir et qui présente un enjeu économique et écologique (extraction de métaux de déchets informatiques; ou non récupérables par des techniques classiques) (Cui and Zhang 2008)². En effet, l'augmentation des besoins en métaux, la diminution de leur présence dans les sols, les coûts d'exploitation des minerais à faible teneur et la prise de conscience collective quant à la protection de l'environnement (arsenic et autres substances toxiques relarguées par les méthodes traditionnelles) sont des arguments en faveur de la biolixiviation. Cependant, elle ne peut pas encore totalement remplacer les techniques traditionnelles et il y a des contraintes de coûts et de réglementation notamment sur les substances toxiques. (Morin 2010)³.

En Europe, l'activité minière est encore majoritairement basée sur les techniques classiques de pyrométallurgie. Or, la biolixiviation est une technique d'hydrométallurgie. L'Europe reste très dépendante de l'import, voire même de façon critique selon le BRGM (terres rares extraites et produites principalement en Chine, platinoïdes dont 80% des ressources et de la production mondiales se trouvent en Russie et en Afrique du Sud...)4. Cependant, c'est au Chili, exportateur principal de cuivre, que des opérations d'hydrométallurgie à grande échelle comme Escondida (désert d'Atacama) ont été mises en place pour augmenter la production de cuivre.

Pour ce faire, en biolixiviation, on utilise des consortia de bactéries oxydant le fer et/ou le soufre : *Acidithiobacillus sp.*, ou bien encore les bactéries du genre *Sulfobacillus sp.*, *Leptospirillum sp.*⁵. Le soufre est en effet un des éléments les plus présents sur Terre, souvent sous forme de sulfates et sulfures.

Afin d'optimiser les procédés, il est nécessaire de créer des modèles mathématiques, qui permettent une représentation du système par des équations pour appréhender les phénomènes auxquels on s'intéresse. On peut ainsi mieux les comprendre, les prédire, les optimiser et les contrôler tout en réduisant les coûts en ressources humaines et en matériel (Loustaunau 2015)⁶.

Ce stage s'inscrit dans le cadre du projet MODELIX, en collaboration avec le BRGM d'Orléans (Bureau de Recherches Géologiques et Minières), consistant à construire un modèle hydrocinétique de biolixiviation en réacteur. Pour la partie cinétique du modèle, il est nécessaire d'obtenir les constantes cinétiques des bactéries courantes de biolixiviation. Celles d'*Acidithiobacillus caldus*, une des bactéries principales de la biolixiviation, seront déterminées expérimentalement au cours de ce stage. En effet, peu de données cinétiques sur cette bactérie sont documentées dans la littérature, d'où la nécessité de cette étude.

2) Présentation du laboratoire⁷

Ce stage est réalisé au LRGP (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés) sur un site hébergé à l'ENSAIA (École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires) de Vandœuvre-lès-Nancy. Ce laboratoire est une unité de recherche mixte (UMR7274) entre le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et l'Université de Lorraine qui a été créée en 2010. Il comporte environ 300 personnes (Figure 1) dont 75 enseignants chercheurs et 25 chercheurs permanents (Annexe 1). Il est réparti sur quatre sites : l'ENSAIA, l'ENSIC (Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques), la plate-forme analytique SVS (Sciences, Vie et Santé) ainsi que la ferme expérimentale de la Bouzule à Champenoux.

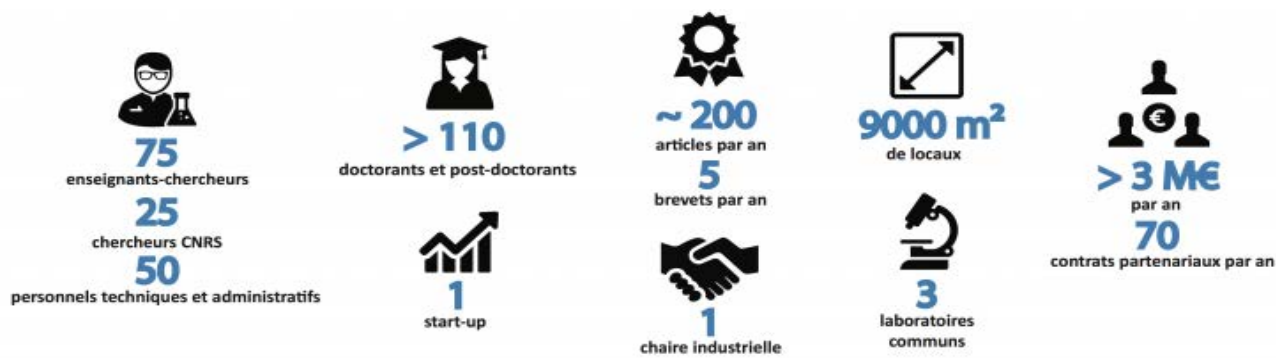


Figure 1 : Le LRGP en résumé (d'après le site du LRGP)

Son objectif consiste en l'étude des procédés dans les domaines de l'hydrométallurgie, la bioraffinerie, l'énergie ainsi que les procédés de valorisation du CO₂ pour développer des connaissances nécessaires à leur conception, leur conduite et leur optimisation. Il est divisé en cinq équipes dont l'équipe BioProMo (BioProcédés, BioMolécules) au sein de laquelle se déroule le stage.

Les objectifs de l'équipe BioProMo concernent l'étude de bioprocédés pour la production de divers produits pour les domaines de la santé publique, de l'environnement et du développement durable autour de trois thèmes : ingénierie des bioprocédés, ingénierie des procédés de bioséparation/ fonctionnalité des molécules et ingénierie numérique multi-échelle des bioprocédés.

3) La biolixiviation

La source d'énergie des bactéries utilisées en biolixiviation est l'oxydation des composés soufrés (bactéries sulfo-oxydantes) et le CO₂ est majoritairement leur source de carbone (*A. caldus* est autotrophe facultative, même si dans notre cas on considère que le CO₂ est une source de carbone). La réaction de biolixiviation est exothermique, et est plus rapide que les réactions chimiques : la catalyse enzymatique peut multiplier d'un facteur d'un million la vitesse de la réaction d'oxydation (D'Hugues 2013)⁸.

Des études sont actuellement menées pour améliorer le procédé (optimisation de design pour améliorer le rendement, sélection des souches bactériennes...). Aucun OGM n'est utilisé mais il n'est pas impossible qu'ils le soient à l'avenir afin d'augmenter les rendements, en effet, des études sont en cours sur de nouvelles souches plus résistantes à de fortes concentrations en sels et en métaux (Gumulya *et al.* 2018)⁹. Cependant, le procédé reste lent (biolixiviation en tas) et coûteuse (biolixiviation en réacteur), d'où son implantation moins importante (Donati *et al.* 2016)¹⁰.

A) Les bactéries utilisées

Les bactéries utilisées en biolixiviation ont été mises en évidence à partir des années 50 par Colmer et Temple¹¹ qui étudiaient la pollution de la rivière Ohio à proximité des mines de

charbon (présence de fortes quantités d'acide sulfurique dues à une oxydation autre que chimique de la pyrite). Elles sont très abondantes dans les zones volcaniques (Ehrlich 2002)¹². Elles sont acidophiles, autotrophes ou mixotrophes, aérobies strictes ou facultatives et tolèrent de fortes concentrations de métaux dissous (jusqu'à des dizaines de grammes par litre). La réaction nécessite un pH acide, et une température modérée à haute (Morin 2010)³.

On les classe en trois groupes selon leur température optimale de croissance : mésophiles (15-45°C), thermophiles modérées (45-60°C) ou thermophiles extrêmes (60-80°C) (Schippers 2007)¹³. Les thermophiles extrêmes n'ont pas besoin de système de refroidissement, en plus d'améliorer considérablement les rendements de la récupération du cuivre contenu dans la chalcopyrite mais ceci nécessite des matériaux spéciaux plus coûteux comme l'inox pour la confection des réacteurs (Donati *et al.* 2016)¹⁰.

On utilise souvent des consortia, indigènes ou artificiels, avec deux types d'oxydation : le fer et le soufre (Edwards *et al.* 2000)¹⁴. Un des consortia du BRGM est le consortia KCC-BRGM, extrait d'un site minier, dont la température optimale de croissance est de 45°C : *Leptospirillum ferriphilum* (oxyde le fer), *Acidithiobacillus caldus* (oxyde le soufre), *Sulfobacillus benefaciens* (oxyde le fer et le soufre), *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (oxyde le fer et le soufre) et *Ferroplasma acidiphilum* (oxyde le fer).

B) Différentes techniques en industrie

Deux techniques existent en industrie : la percolation (statique) ou bien l'agitation (dynamique) (Ehrlich 2002)¹². Les procédés statiques comme la percolation permettent une extraction des gisements pauvres en métaux, ne coûtent pas cher, mais sont très lents (mois, voire années) (D'Hugues 2013)⁸. L'agitation est plus robuste et plus facile à contrôler mais est chère, donc elle est utilisée que pour des métaux de valeur comme l'or, le cobalt ou bien encore le nickel. Les microenvironnements bactériens dans ce cas sont encore méconnus.

La percolation consiste en une solution acide contenant les bactéries qui transite sur le minerai directement issu de la mine. Le minerai est soit concassé (fragmentation réduite) dans des vallons aux parois imperméables (mode *in situ*) et le tout est saturé par une solution acide sous aération. Si l'on utilise le mode "en amas", on verse la solution acide sur un amas de minerai

dont on récupère les métaux par percolation (exemple : Talvivaara en Finlande où l'on récupère depuis 2008 du nickel, du cobalt, du cuivre et du zinc). Enfin, on peut également utiliser le mode en "stalle nettoyée" où le minerai est directement plongé dans une grande quantité de solution acide (augmentation de la surface de contact mais mauvais échanges gazeux, nécessaires à la bonne oxydation des sulfures) (Morin 2010)³. La circulation des solutions lixiviantes, les transferts de gaz et la dynamique des populations sont un verrou technique de cette méthode de biolixiviation (Ehrlich 2002)¹².

Dans les procédés dynamiques, trois types de dispositifs sont utilisés : le RPA (réacteur parfaitement agité, aéré, le seul applicable à une échelle industrielle), le réacteur "air-lift" bi-compartmenté dont un compartiment est aéré, ce qui crée des mouvements de fluide, et où le liquide est pompé vers le haut comparé au précédent réacteur, et enfin la colonne à bulles, aérée⁴. Il faut cependant faire attention à la formation de mousse (Ehrlich 2002)¹². De même, le minéral doit être finement moulu, d'où le coût important (D'Hugues 2013)⁸. Un exemple de procédé dynamique se trouve en Ouganda (Projet KCC du BRGM) pour l'extraction de cobalt d'une pyrite cobaltifère, sous-produit d'une ancienne mine de cuivre. Cette technique reste encore à ses prémices et ne peut pas encore totalement remplacer les techniques traditionnelles à l'échelle industrielle, cependant elle reste très compétitive à petite et moyenne échelle. De même, les contraintes liées aux coûts, aux cours économiques des métaux, la réglementation sur les substances toxiques (cas de l'arsenic pour l'extraction de métaux comme l'or) a une influence directe sur les décisions quant au choix d'une technique (Morin 2010)³.

C) Le mécanisme

Les minéraux sulfurés sont dissous par les protons et les ions Fe^{3+} (Sand *et al.* 1995)¹⁵. Il y a d'abord la mise en solution du métal M ($2\text{Fe}^{3+} + \text{MS} = 2\text{Fe}^{2+} + \text{M}^{2+} + \text{S}_0$), puis l'oxydation bactérienne du fer ferreux Fe^{2+} par bactéries oxydantes du fer ($4\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ = 4\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O}$) (ce qui permet de régénérer le fer(III) requis pour l'attaque abiotique des minéraux) puis l'oxydation bactérienne du soufre ($\text{S}_0 + 3/2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{SO}_4$) par les bactéries oxydantes du soufre.

En effet, le fer ferrique Fe^{3+} attaque les sulfures et oxyde les composés soufrés intermédiaires comme le thiosulfate et les polysulfides mais pas le soufre élémentaire, oxydé uniquement par les bactéries oxydatives du soufre (à noter qu'elles oxydent également des composés intermédiaires comme le tétrathionate) (Schippers *et al.* 1999)¹⁶. Le milieu est acidifié par l'oxydation du soufre élémentaire en acide sulfurique ce qui évite les précipités et permet de régénérer les protons consommés (Rohwerder *et al.* 2003)¹⁷.

Les produits obtenus dépendent des conditions géochimiques de l'environnement, de la disponibilité en oxygène et autres oxydants, du pH, et des espèces bactériennes présentes. La régénération de Fe^{3+} dépend de la présence des bactéries oxydantes du fer et de la présence d'oxygène.

D) Différentes voies

Le mécanisme est dépendant du substrat et comporte deux voies (Figure 2) : celle du thiosulfate et celle des polysulfides (Schippers *et al.* 1999¹⁶, Rohwerder *et al.* 2003¹⁷). L'utilisation d'une voie plutôt que l'autre dépend de la configuration électronique des minéraux, ce qui aura une influence sur leur réactivité avec les protons (solubilité dans l'acide). Par contre, leur configuration cristalline (monosulfure ou disulfure) n'a pas d'influence (Schippers *et al.* 1999)¹⁶.

La voie du thiosulfate est plutôt associée aux minéraux soufrés insolubles dans l'acide (pyrite FeS_2 , molybdénite MoS_2 , tungsténite WS_2 ...) c'est à dire oxydés par extraction des électrons par les ions Fe^{3+} alors que la voie des polysulfides concerne les minéraux solubles dans l'acide comme la chalcopyrite $CuFeS_2$, la sphalérite ZnS , la galénite PbS , l'hauérite MnS_2 ou bien encore l'arsénopyrite $FeAsS$.⁵ Pour les sulfures non solubles, les liaisons chimiques sont rompues qu'après six oxydations successives et libération du thiosulfate dont le produit final d'oxydation sera les sulfates (Schippers *et al.* 1996)¹⁸.

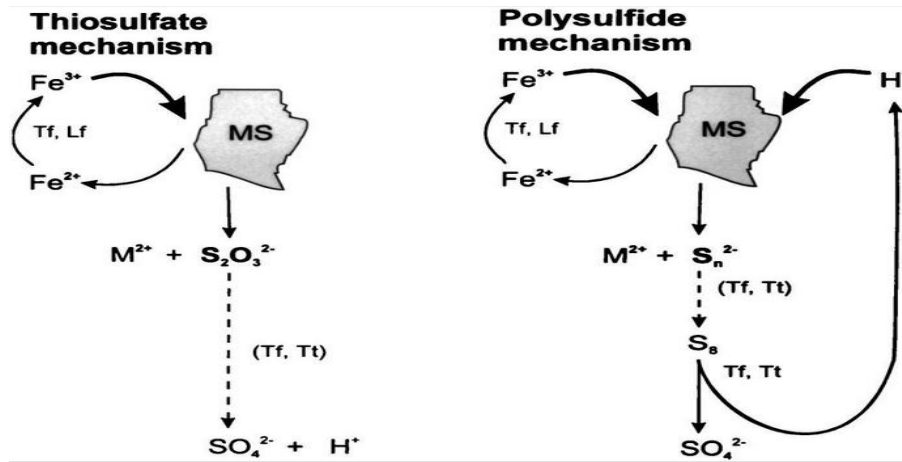


Figure 2 : Schéma résumant les mécanismes des différentes voies (Schippers and Sand 1999)

On distingue un mécanisme direct et un mécanisme indirect (Sand *et al.* 2001)¹⁹. Le mécanisme indirect suppose que la dissolution du minéral est indépendante de l'action des bactéries (oxydation du sol et acidification du milieu due à la formation d'acides organiques, pas de présence physique des bactéries à la surface du minéral et utilisation de transfert d'électrons Fe^{2+}/Fe^{3+} : ce n'est donc pas les bactéries mais les produits de réaction, qui forment des complexes solubles entre les ions métalliques et les acides organiques). Le mécanisme direct suppose que la dissolution du minéral est effectuée par les bactéries en plus de la dissolution chimique (oxydation du fer ferreux et du soufre par les bactéries présentes physiquement à leur surface, sans transfert d'électron)

E) Rôle des exopolysaccharides

L'attachement au substrat serait médié par les exopolysaccharides des bactéries (EPS) pour former un biofilm (Vandevivere and Kirchman 1993²⁰, D'Hugues 2013⁸). Il y a une forte présence de fer dans la couche d'EPS de *A. ferrooxidans* et *L. ferrooxidans* (Gehrke *et al.* 1998)²¹. Ce fer est présent sous forme complexée par deux molécules d'acide uronique, le tout chargé positivement ce qui permet le contact par interaction électrostatique à la pyrite chargée négativement lorsqu'à pH 2 (Blake *et al.* 1994)²². A noter que les bactéries adaptent la composition de leurs EPS selon le substrat sur lequel elles se sont développées. De plus, le contact des bactéries avec le minéral ne serait pas essentiel à la biolixiviation et ne ferait qu'améliorer le rendement (Rawlings 2002)²³.

4) La bactérie *Acidithiobacillus caldus*

La bactérie étudiée au cours de ce stage (Figure 3), à savoir *Acidithiobacillus caldus* (anciennement *Thiobacillus caldus* dans les années 90, le nouveau nom caractérisant mieux son caractère acidophile), est une protéobactérie de l'ordre des Acidithiobacillales, famille des *Acidithiobacillaceae*, genre *Acidithiobacillus* (quatre espèces). Elle a été isolée pour la première fois en 1994 à partir de restes d'activités minières du charbon. C'est une bactérie ubiquitaire des environnements naturels mais on la trouve aussi dans des environnements avec des sulfures anthropogéniques (Mangold *et al.* 2011)²⁴. C'est un petit bacille mesurant 0,4-0,6 x 1-2 µm, avec un génome de presque trois millions de paires de bases, gram négatif avec un flagelle, vivant souvent par paire, modérément thermophile (croissance optimale entre 42 et 45°C, d'où le nom *caldus*), acidophile (croissance optimale à pH 2,5), oxydant le soufre et une large gamme de composés soufrés. Le gradient de pH est grand puisque son pH intracellulaire est de 6,5. Son temps de génération est compris entre 2 et 3 heures.

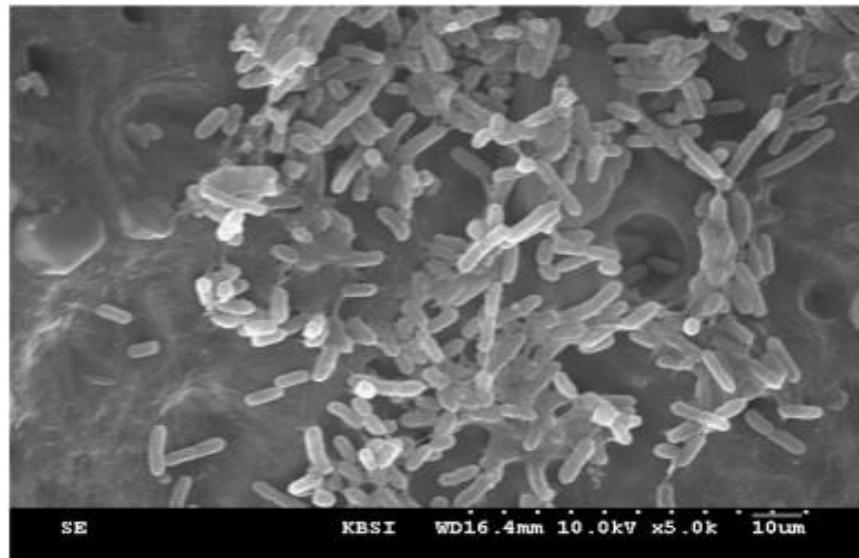


Figure 3: *A. caldus* observée au microscope électronique (Hassan *et al.* 2010)

Au fur et à mesure de la croissance de *A. caldus*, le soufre est donc oxydé selon l'équation $S + 3/2O_2 + H_2O = H_2SO_4$. On l'utilise souvent sous forme de consortium avec des bactéries oxydantes du fer. Les rendements de biolixiviation avec *A. caldus* sont souvent très bons (Okibe *et al.*)²⁵. Il n'utilise pas de matière organique seule (peptone, extrait de levure...) ou de minéraux

inorganiques (sulfate de fer, pyrite...) comme source d'énergie : il faut un ajout de soufre (Zhou *et al.* 2007)²⁶.

La capacité à produire de l'acide sulfurique à travers l'oxydation du soufre montre les deux rôles d'*A. caldus* dans les procédés de biolixiviation, à savoir une acidification continue du milieu qui permet la solubilisation des composants métalliques ainsi que la dissolution de la couche de soufre déposée sur les sulfures, ce qui permet la dissolution des sulfures et laisse le champ libre aux autres bactéries (Dopson and Lindstrom 1999)²⁸. *A. caldus* gagne de l'énergie et des électrons de l'oxydation du soufre élémentaire et des ISC (Inorganic Sulfur Compounds), de l'oxydation abiotique du fer(III) et des minéraux soufrés, pour sa croissance et la fixation du CO₂. Le produit final de la biooxydation des ISC est l'acide sulfurique (Johnson and Hallberg 2009)²⁹.

Le métabolisme du soufre se joue dans quatre régions différentes. La première région est la membrane externe du périplasme, la seconde région est le périplasme avec les voies *sox*, *sdo* (sulfure dioxygénase). Le soufre extracellulaire (cycle octasulfane) est activé et transporté dans l'espace périplasmique sous forme R-SH et est ensuite transporté dans le périplasme où il sera oxydé par *sdo*. La troisième région est la membrane cytoplasmique impliquant des systèmes non-*sox* avec d'autres enzymes d'oxydation du soufre comme *tth* (tetrathionate hydrolase), les flavoprotéines *hdr* (hétérodisulfide réductase), avec un couplage de l'oxydation du soufre avec le transport d'électrons. La quatrième région est le cytoplasme avec le système *sor* (sulfure oxygénase réductase) où le soufre est oxydé et est utilisé comme source d'énergie. C'est un système complexe, pas encore totalement connu, générant des obstacles à la compréhension du mécanisme (Mangold *et al.* 2011²⁴, Chen *et al.* 2012)³⁰.

5) Notions de cinétique

Divers facteurs peuvent avoir une influence sur la cinétique de la réaction (Mossel and Ingram 1955³¹, Mossel *et al.* 1983³²) :

-Facteurs intrinsèques (caractéristiques physicochimiques comme le pH, le milieu (concentration en substrat, oxygène dissous), l'osmolalité)

- Contraintes mécaniques (cisaillement, agitation, homogénéité, compression, turbulence du mélange...)
- Flux de nutriments, de gaz dissous, de chaleur...

Le modèle utilisé au cours de cette étude est le modèle de Monod (Figure 4), classiquement utilisé pour décrire la phase de croissance exponentielle d'une bactérie. Il donne une relation entre le taux spécifique de croissance μ (en h^{-1}) et la concentration en substrat limitant :

$$[S] : \mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_s}$$

K_s (en $g.L^{-1}$) est la constante de demi-saturation et représente la concentration en substrat pour laquelle μ est égal à la moitié du taux maximum de croissance μ_{\max} . Ainsi, elle représente l'affinité de la bactérie pour son substrat. Pour de faibles valeurs de K_s (inférieures à la concentration en substrat), le taux de croissance est proche de sa valeur maximale. La perte de vitesse de croissance est très brutale et n'intervient que lors de l'épuisement complet du substrat. (Loustaunau 2015)⁶.

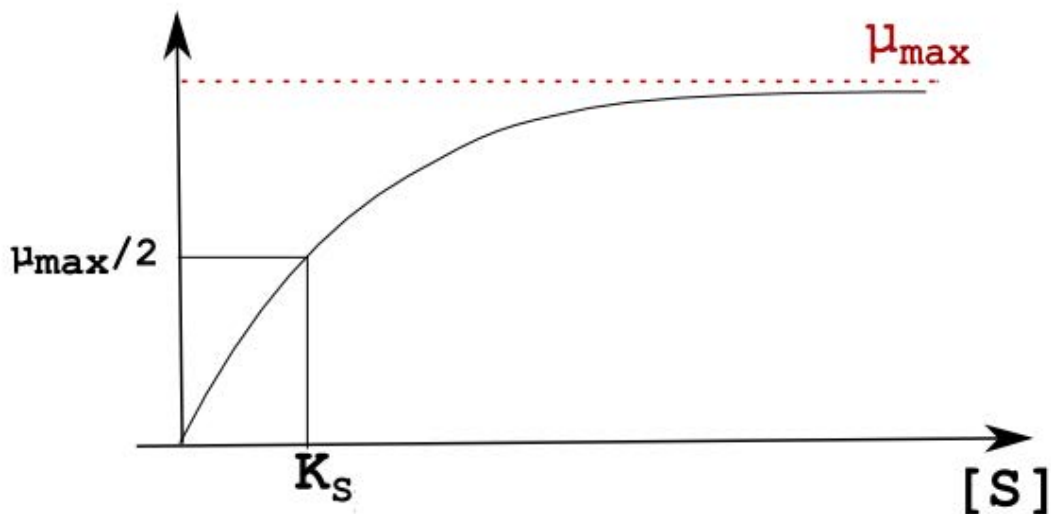


Figure 4 : Représentation graphique du modèle de Monod
(D'après http://www.perrin33.com/genie_ferment/bilan_parametres_xsp_2.php, consulté le 22 Aout 2019)

De nombreux auteurs se sont inspirés de cette loi pour lui apporter des ajustements dans le cas d'inhibitions. Par exemple, des inhibitions peuvent survenir sur une bactérie ferroxydante dues à une trop forte concentration d'ions ferriques (Nurmi *et al.* 2009)³³. De même, la vitesse de consommation du substrat dépend des trois activités principales de la cellule, à savoir la croissance, la production et la formation de réserves énergétiques.

On greffe alors un ou plusieurs termes d'inhibition à la suite de l'équation. (Loustaunau 2015)⁶.

Les données cinétiques d'*A. caldus* étant rares dans la littérature, on cherche donc au cours de ce stage à les obtenir expérimentalement. Ceci permettra d'alimenter les modèles de biolixiviation en cours d'élaboration. Ces données seront obtenues en mesurant régulièrement divers paramètres (biomasse, potentiel redox...) sur des cultures en bio-réacteur mécaniquement agité avec différentes concentrations en substrat, puis grâce à un traitement informatique (notamment en calculant les logarithmes népériens des mesures de biomasse) de ces dernières afin d'en déduire les grandeurs de la loi de Monod.

II) Matériel et méthodes

1) Souches et milieux

Deux souches de *A. caldus* sont utilisées : la souche BRGM1 du consortium du BRGM « BRGM-KCC » (BRGM *Kasese Cobalt Compagny limited*) ainsi que la souche KU de la DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*).

Les milieux utilisés sont les milieux BSS (Basal Salt Solution) pour la souche BRGM1, et 0Km pour un autre échantillon de BRGM1, repiqué au BRGM d'Orléans (nommée « Barrie » dans la suite du rapport car elle provient du Professeur Barrie Johnson de la Bangor University au Pays de Galles), 150a pour la souche KU (puis passée sur milieu 0Km). (Annexe 2)

Ces milieux sont mis à pH acide (entre 1,8 et 2,5), et sont additionnés d'une solution d'éléments traces (sauf 0Km). Le substrat des bactéries, à savoir le soufre élémentaire, est ajouté extemporanément directement dans l'erlenmeyer ou la cuve du réacteur juste avant la mise en culture car il flotte à la surface. Bien qu'on cherche à la faire varier lors des manipulations sur réacteur, la quantité de base de soufre est de 0,5 % m/v pour les erlenmeyers. Le soufre a été préalablement stérilisé par trois autoclavages successifs de 10 minutes à 110°C suivis de 24h de repos à 45°C pour éliminer les sporulées.

2) Propagation en fioles d'Erlenmeyer

La phase de propagation en fiole d'Erlenmeyer sert à augmenter le nombre de cellules, à leur permettre de s'adapter à leur environnement ainsi que d'augmenter le volume de culture disponible pour le passage sur réacteur. En effet, les échantillons dont on dispose de base sont de 5 à 10 mL de culture, et la culture sur réacteur s'effectue sur un volume total de 2 L. De même, les cultures ne sont pas stables dans le temps et ont donc besoin d'être repiquées afin d'assurer leur survie.

On effectue donc des repiquages sur des intervalles de temps réguliers de 10 % de la culture précédente sur du milieu neuf, et on augmente au fur et à mesure le volume des fioles

d'Erlenmeyer. Des prélèvements journaliers sont effectués pour comptage cellulaire. On commence par une culture de 20 mL (2 mL d'inoculum et 100 mg de soufre) jusqu'à des cultures de 75 mL (dont 7,5 mL d'inoculum et 350 mg de soufre) (et même 150 mL pour la souche BRGM1, dont 15 mL d'inoculum et 700 mg de soufre passée sur réacteur). Les repiquages se font au début tous les 3 ou 4 jours puis sont espacés progressivement à un par semaine puis un toutes les deux semaines (Tableau 1) (Annexe 2).

3) Culture en bio-réacteur mécaniquement agité

Le passage sur réacteur s'effectue sur un volume de 2L de culture avec la souche BRGM1, à raison de 200 mL d'inoculum, 1,8 L de milieu OKm et une quantité de soufre qu'on cherche à faire varier. Les concentrations de 0,05 g/L (Réacteur BRGM4), 0,5 g/L (BRGM3), 2,5 g/L (BRGM2), 5 g/L (BRGM1) et 10 g/L (BRGM5) sont testées (Tableau 1). Le réacteur utilisé est un réacteur de marque Applikon (Figures 5 et 6) disposant d'une agitation via deux turbines Rushton à 6 pales. Il est équipé d'une sonde pH de marque Mettler Toledo, d'une sonde à oxygène dissous de marque Applikon et d'une sonde de température. Un bloc condenseur, un système de régulation du froid relié à un cryothermostat, un tuyau avec canule dévissable pour injection et/ou prélèvement, une alimentation en soude reliée à une pompe pour réguler le pH à 2,4, une entrée de gaz sont également présents. L'ensemble est autoclavé avant mise en route 10 minutes à 110°C. Après autoclavage est aussi rajouté une membrane chauffante de marque Applikon pour régulation de la température.

L'agitation est réglée à 700rpm et l'aération à 0,5vvm via un boîtier de marque HiTec modèle Gaz Bronkhorst. Le réacteur est relié à une console de marque Applikon, modèle BioController ADI1030 sur laquelle seront relevées les valeurs de température et de pH (régulées), de soude ajoutée, de saturation en oxygène et de potentiel redox. (Annexe 3)



Figure 5 : Réacteur monté

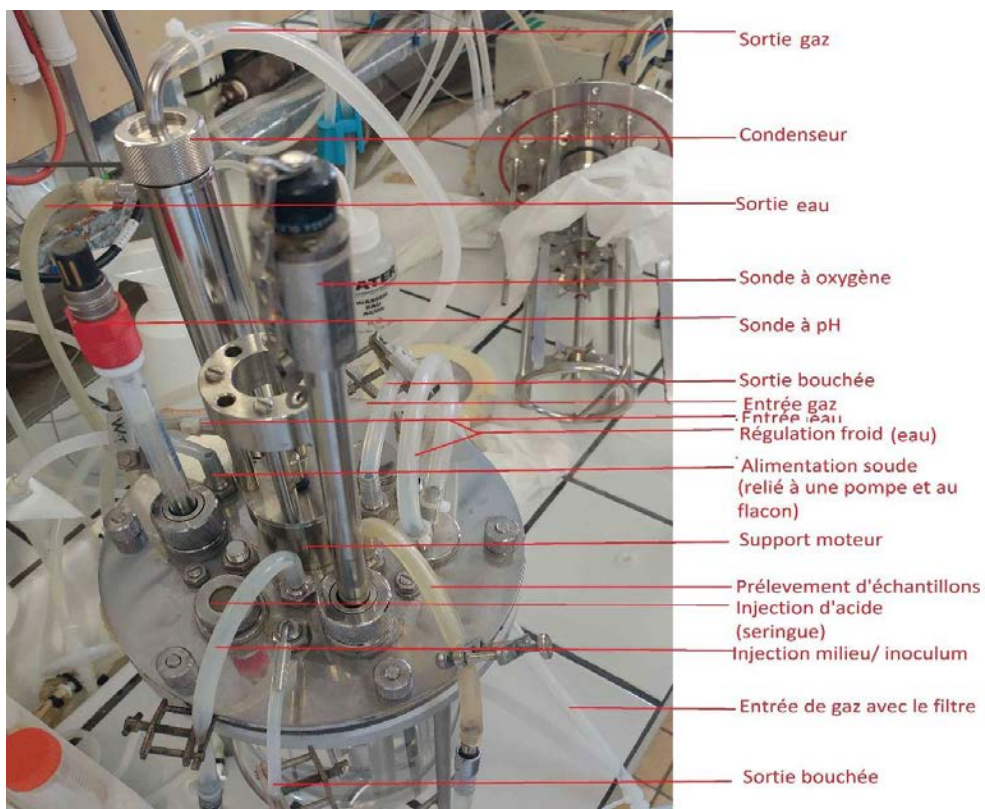
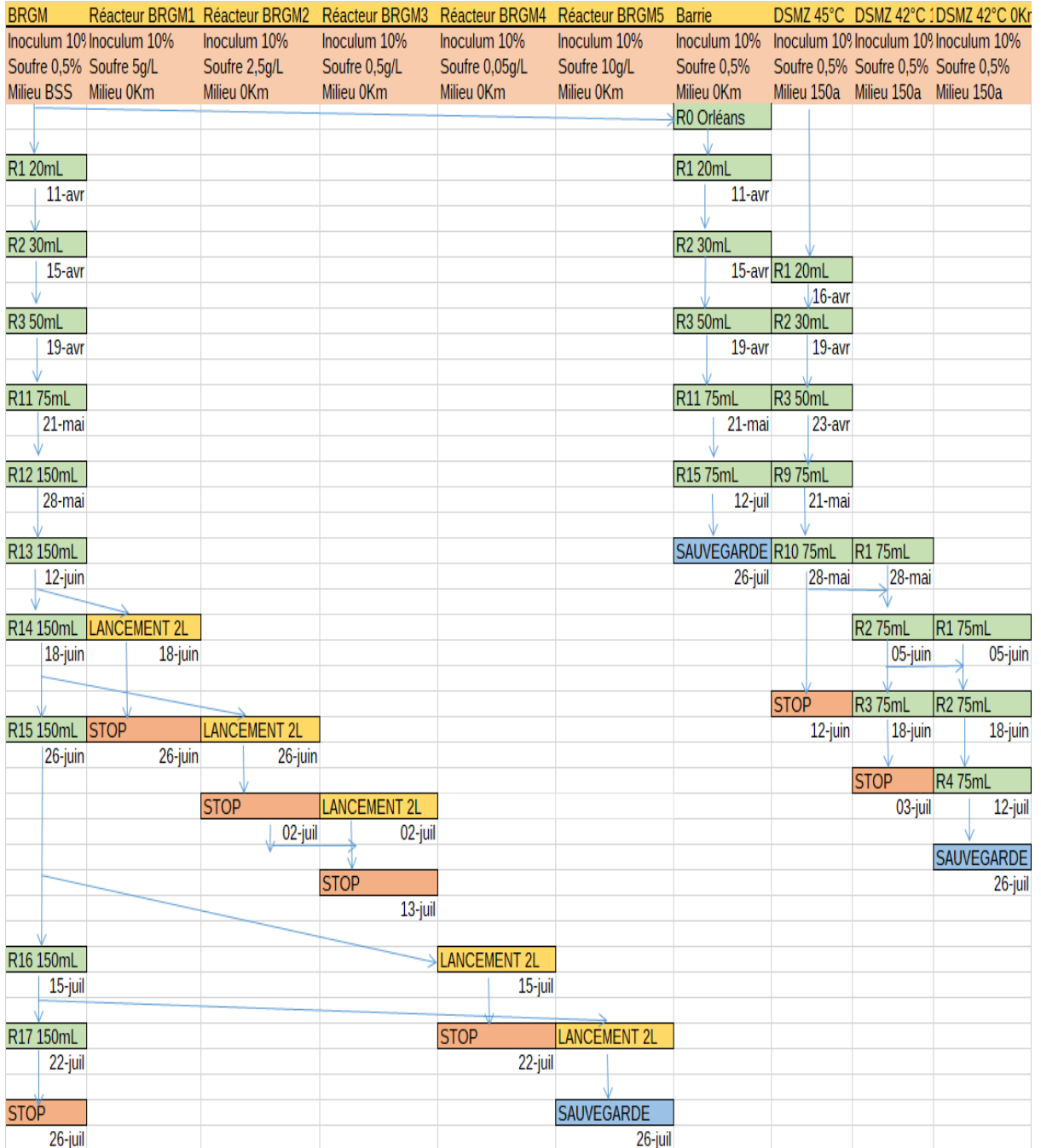


Figure 6 : Platine du réacteur

Tableau 1 : Arbre des repiquages



4) Analyses

A) Comptages sur cellule de Thoma

Pour les fioles d'Erlenmeyer, des prélèvements sont effectués une fois par jour, et pour les réacteurs, on prélève toutes les 2h (pendant les heures d'ouverture du laboratoire). Ce prélèvement est dilué dans de l'eau acidifiée à pH2 (pour éviter de détériorer les bactéries) au

dixième en début de culture et au quarantième en fin de culture, de façon à pouvoir le quantifier plus facilement. Les cellules sont comptées manuellement sur un microscope optique de marque Leica modèle Leitz DMRB, grossissement x400, en utilisant une cellule de Thoma. Le nombre de cellules compté est divisé par 0.004 pour avoir le nombre de cellules par mL et multiplié par la dilution. Les résultats sont consignés et traités dans un fichier tableur accessible en ligne.

La loi de Monod donne une relation entre le taux spécifique de croissance μ (en h^{-1}) et la concentration en substrat limitant. On cherche donc à faire varier la concentration en substrat afin d'obtenir les données cinétiques μ dans différentes conditions, afin d'en déduire le μ_{max} et K_s de la réaction d'oxydation du soufre par *A. caldus*.

Les graphes de la biomasse en fonction du temps puis du logarithme népérien de la biomasse en fonction du temps sont tracés (Figure 7). C'est en effet à partir de ce dernier que l'on peut obtenir μ pour évaluer la croissance cellulaire (pente de la courbe en phase exponentielle de croissance). Les graphes concernant les erlenmeyers ont surtout un but de contrôle, puisque ces erlenmeyers constituent une sauvegarde et un réservoir des souches pour les manipulations.

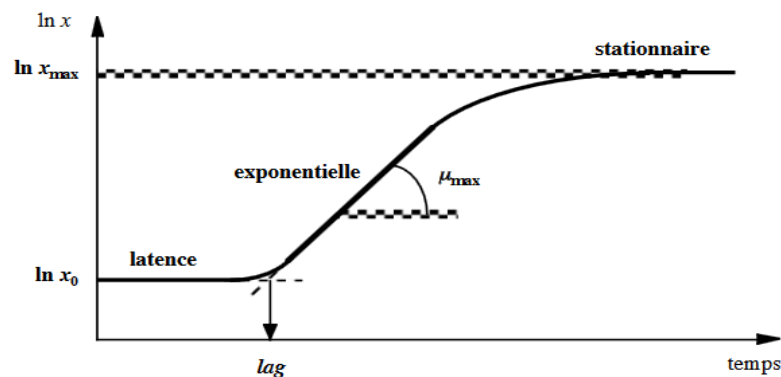


Figure 7 : Logarithme népérien de la biomasse en fonction du temps (d'après Augustin J. C. (2005). Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. mémoire pour l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches de l'université Paris XII Val de Marne.

Pour les réacteurs, une fois plusieurs μ obtenus, on peut par la suite tracer le graphe $\mu = f([S])$ avec $[S]$ la concentration en soufre afin d'obtenir μ_{max} sur l'axe des ordonnées, au niveau de l'asymptote horizontale.

Puis, on peut retrouver une équation de type $y = ax+b$ plus facilement interprétable en inversant les termes de l'équation de Monod afin d'en déduire K_s :

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{[S]+K_s} \text{ devient } \frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \left(\frac{1}{[S]} \times \frac{K_s}{\mu_{max}} \right)$$

Une tentative de marquage fluorescent pour une meilleure visibilité des cellules avec un kit Backlight Live/Dead ThermoFisher Scientific a été effectuée. Pour ceci, 1,5 μ L de chacun des deux composants (iodure de propidium et SYTO9) étaient mélangés à 1 mL de solution bactérienne. Le même microscope est utilisé, en mode épifluorescence. Pour les réacteurs, on réalise également un prélèvement HPLC matin et soir. Ils sont archivés au réfrigérateur pour doser éventuellement l'acide sulfurique comme marqueur supplémentaire de la consommation du soufre. De même, on mesure le pH de façon journalière sur une série de fioles d'Erlenmeyer.

B) Valeurs relevées directement sur la console

Pour les réacteurs, sont relevés directement sur l'écran de la console, sont consignés et traités dans le même fichier tableur le pH, la température, le potentiel redox, le volume de soude ajouté ainsi que la saturation en oxygène.

On peut calculer la masse de soufre m_s et la quantité n_s (en mole) consommées à partir du volume V_{NaOH} de soude ajouté : il faut peser le flacon de soude avant et après la culture. La différence est divisée par la masse volumique de la solution de soude (soude à 1 M de masse volumique 1,04 g/L) pour obtenir V_{NaOH} . La concentration de soude C_{NaOH} étant connue (1 M), on peut obtenir n_{NaOH} ($n_{NaOH} = C_{NaOH} \times V_{NaOH}$).

Sachant qu'il faut une mole de soufre pour faire une mole d'acide sulfurique selon l'équation d'oxydation du soufre ($S+3/2O_2 + H_2O = H_2SO_4$), et deux moles de soude pour neutraliser une mole d'acide sulfurique ($2NaOH + H_2SO_4 = 2H_2O + Na_2SO_4$), la quantité de soufre consommée n_s est égale à la moitié de la quantité de soude consommée n_{NaOH} . Connaissant la masse molaire du soufre (32,07 g/mol), on peut la multiplier par n_s pour en obtenir la masse consommée m_s .

III) Résultats

1) Propagation en fioles d'Erlenmeyer

A) Observations au microscope

Le comptage reste difficile, les bactéries étant très petites, transparentes et l'utilisation de la fluorescence étant impossible (puisqu'on ne verrait plus le quadrillage de la cellule de Thoma) (Figure 8).

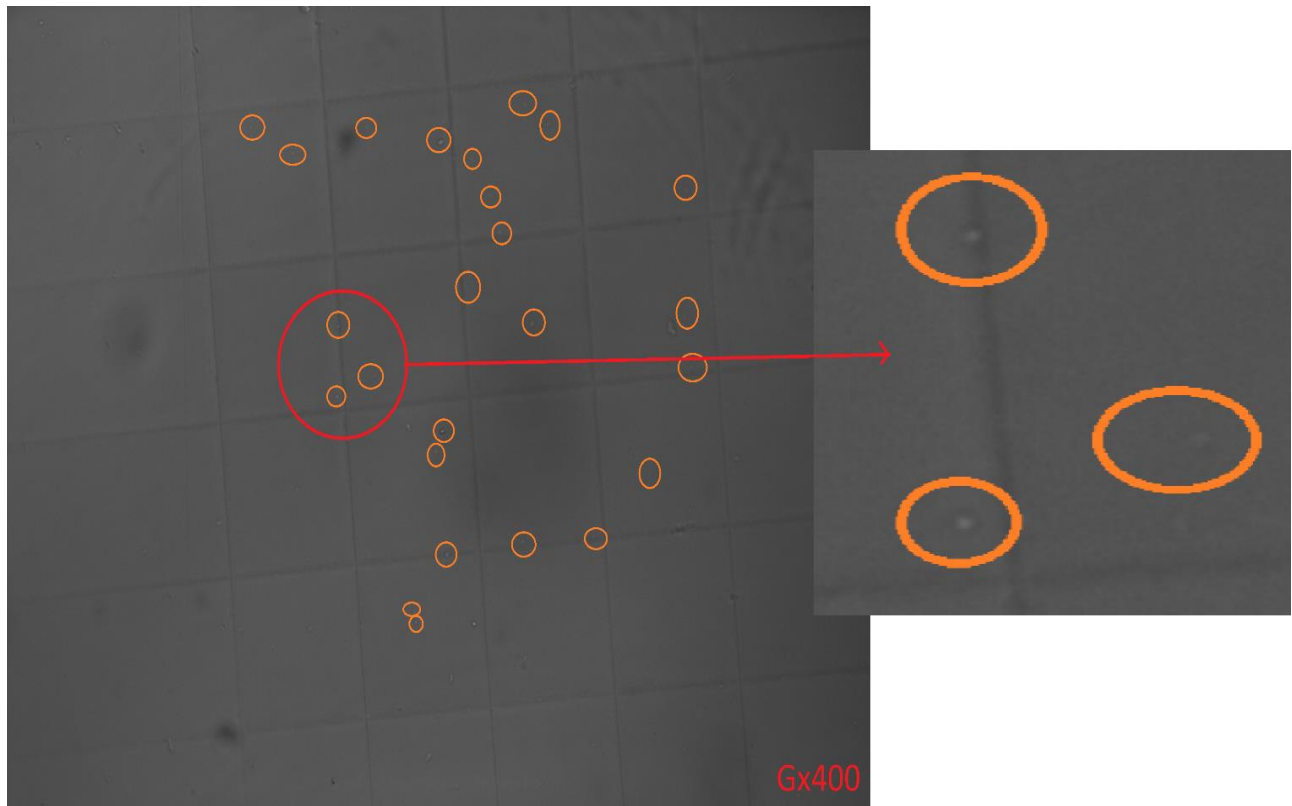


Figure 8 : Observation d'*A. caldus* au microscope optique

La tentative de marquage fluorescent a toutefois mis en évidence la présence d'un important biofilm (Figure 9) sur les grains de soufre, lors d'une observation d'un échantillon de culture en fiole d'Erlenmeyer qu'on avait laissé décanter pour y observer le culot.

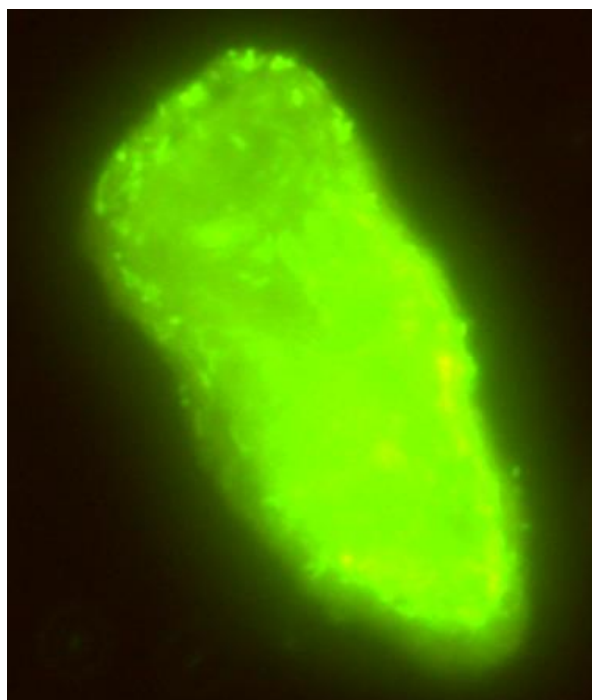


Figure 9 : Grain de soufre observé au microscope à fluorescence après marquage Baclight (Gx400)

B) Suivi de la croissance des bactéries

Une fiole d'Erlenmeyer de culture « Barrie » a été suivi pendant 3 semaines (Figure 10). On ne détecte pas d'anomalies et le taux de croissance maximal est de $3,38 \cdot 10^{-2} \text{h}^{-1}$. Cette valeur est de $1,82 \cdot 10^{-2} \text{h}^{-1}$ pour la souche BRGM1 (Figure 11).

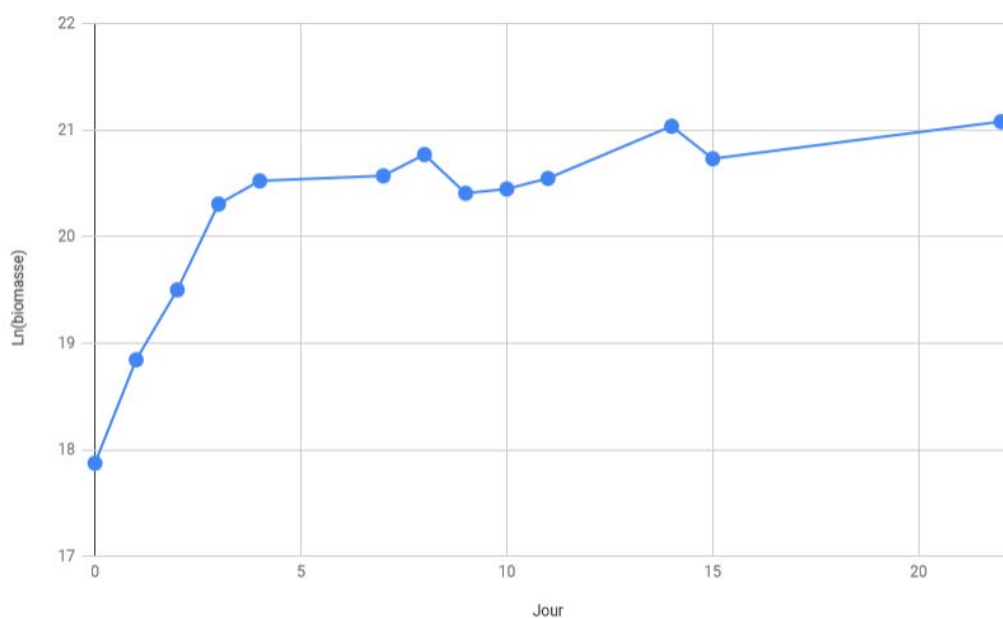


Figure 10 : Croissance de la culture « Barrie » (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)

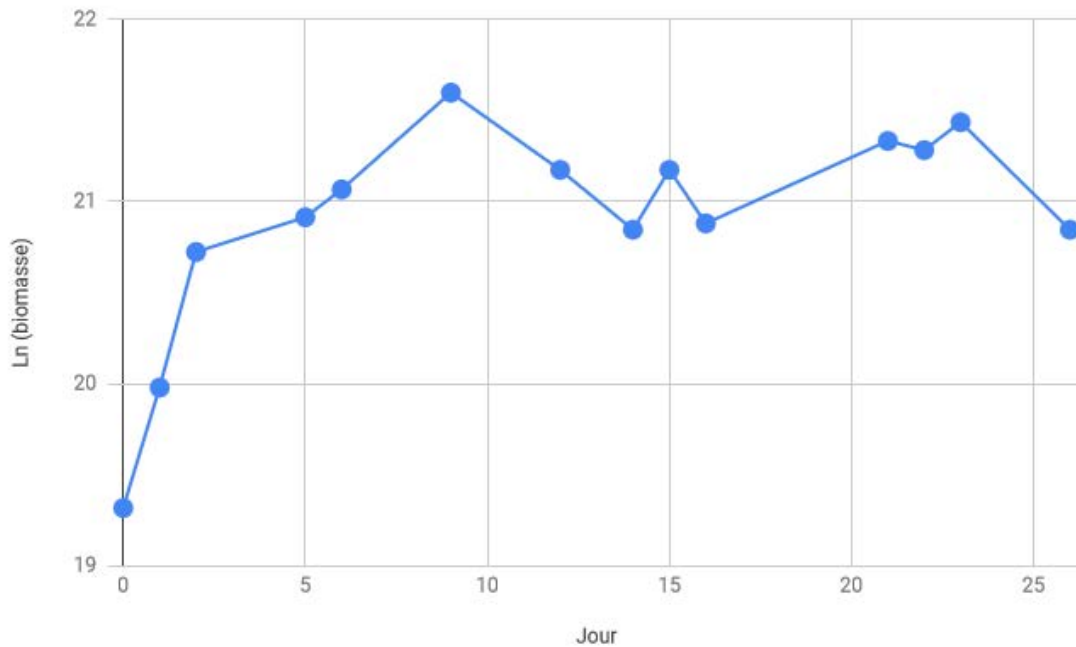


Figure 11 : Croissance de la souche BRGM1 (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)

Concernant la souche KU de la DSMZ, elle est initialement cultivée sur milieu 150a à 45°C. Afin de simplifier les manipulations, nous l'avons passé à 42°C après plusieurs repiquages puis sur milieu 0Km. Il n'y a pas eu d'impact négatif, au contraire, une plus forte croissance a été observée. Le μ à 45°C vaut $2,95 \cdot 10^{-2} h^{-1}$, celui à 42°C vaut $2,56 \cdot 10^{-2} h^{-1}$ et enfin celui sur milieu 0Km $3,90 \cdot 10^{-2} h^{-1}$ (Figure 12).

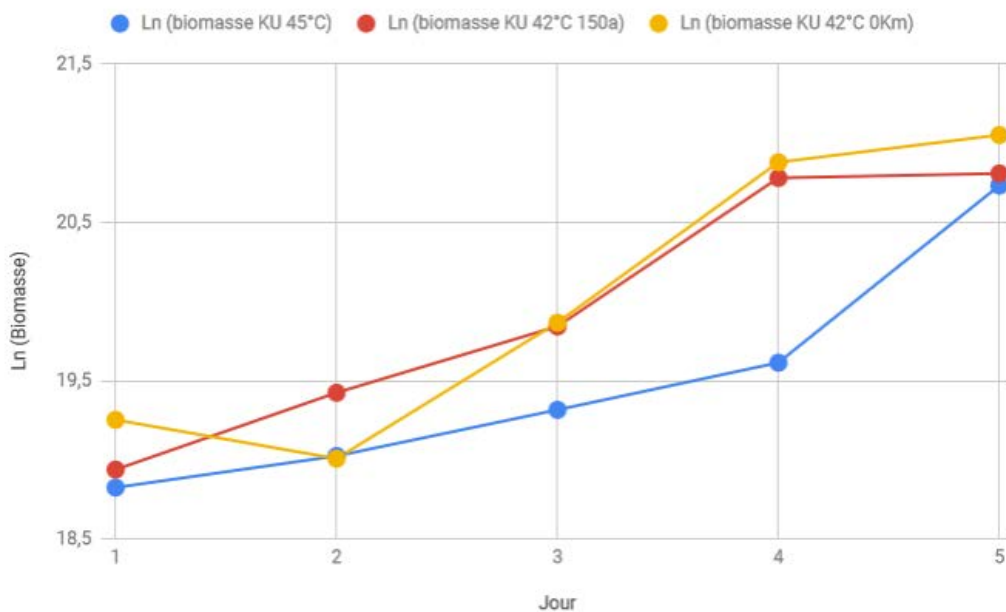


Figure 12 : Croissance de la souche KU dans différentes conditions (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)

C) pH des fioles d'Erlenmeyer

Le pH a été mesuré quotidiennement sur les fioles d'Erlenmeyer. Comme il n'y a pas de régulation du pH contrairement à une culture en réacteur, celui-ci diminue au cours du temps. Pour Barrie et KU, nous étions en phase stationnaire et aucun repiquage n'était prévu lorsque la mesure a été entreprise. Il varie respectivement de 1,09 à 1,03 et de 1,00 à 0,97. Pour BRGM, il varie de 2,02 (24 heures après repiquage) à 1,00, avec stabilisation lors de la phase stationnaire.

2) Culture en bio-réacteur mécaniquement agité

A) Suivi de la croissance

Cinq cultures en réacteur ont été effectuées avec chacun une quantité différente de soufre. Les courbes de biomasse en fonction du temps et de logarithme népérien en fonction du temps sont les suivantes :

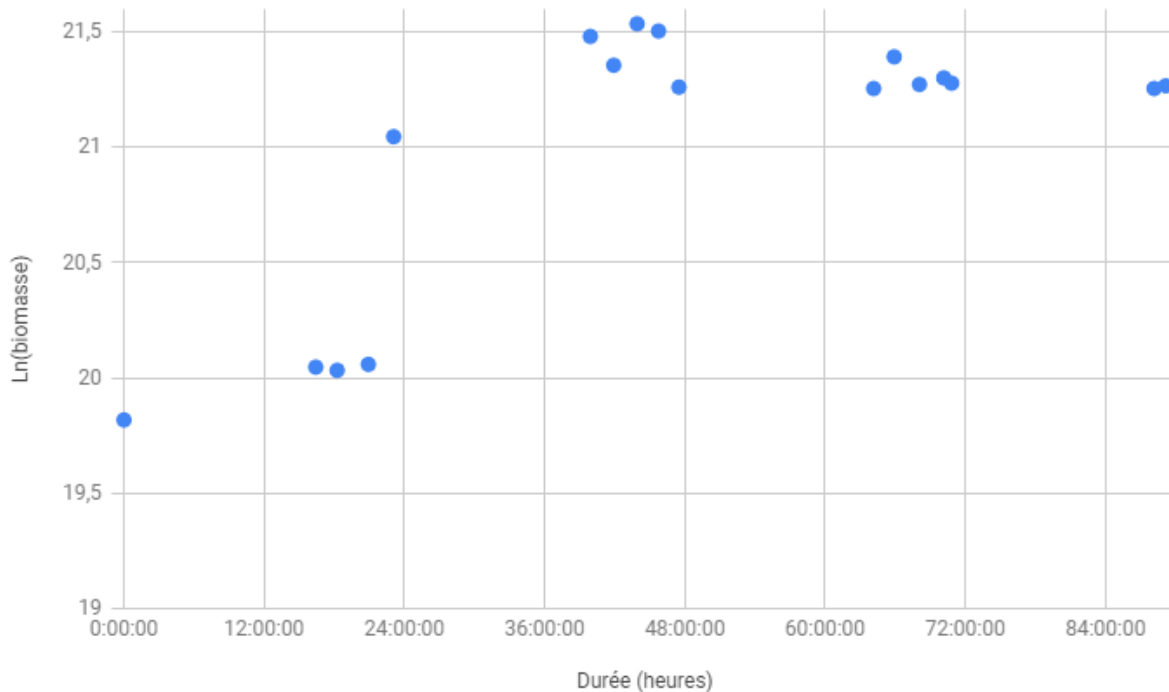


Figure 13 : Croissance dans un réacteur avec 10g/L de soufre (BRGM5) (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)

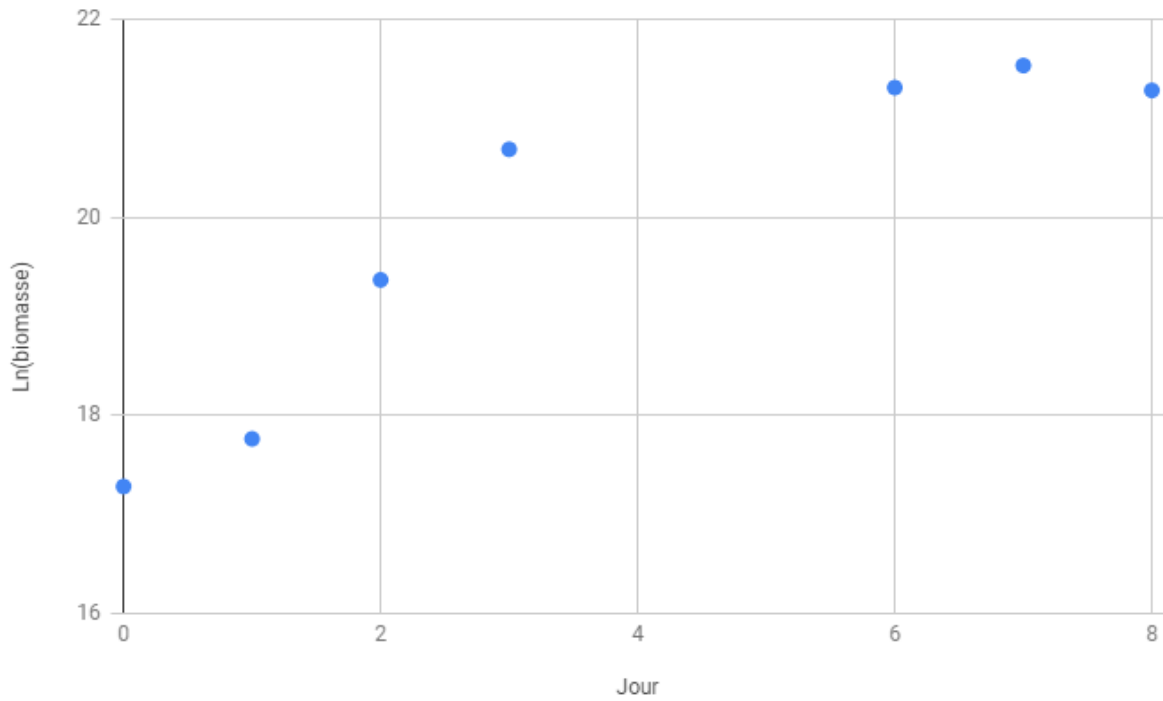


Figure 14 : Croissance dans un réacteur avec 5g/L de soufre (BRGM1) (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)

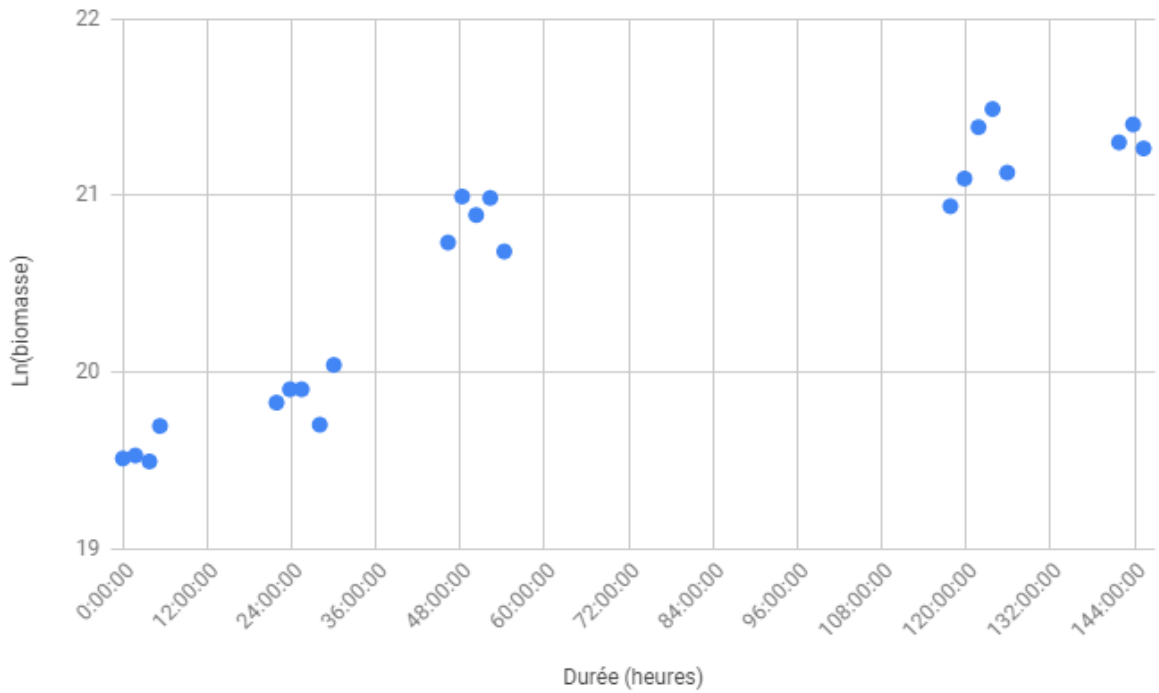


Figure 15 : Croissance dans un réacteur avec 2,5g/L de soufre (BRGM2) (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)

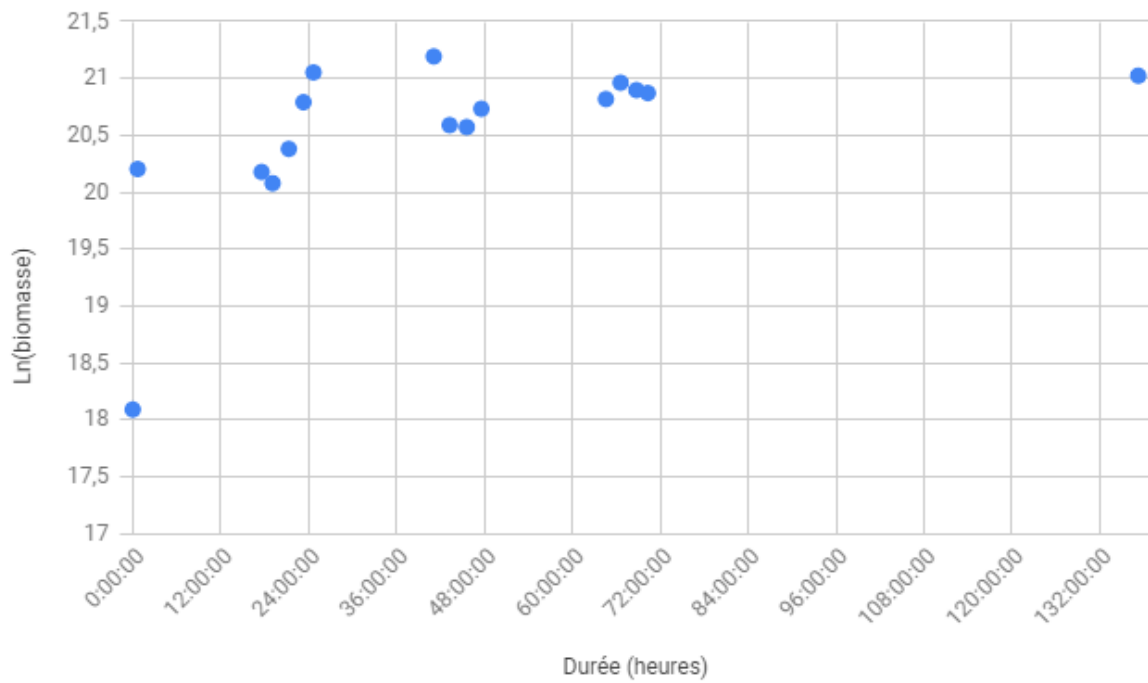


Figure 16 : Croissance dans un réacteur avec 0,5g/L de soufre (BRGM3) (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)

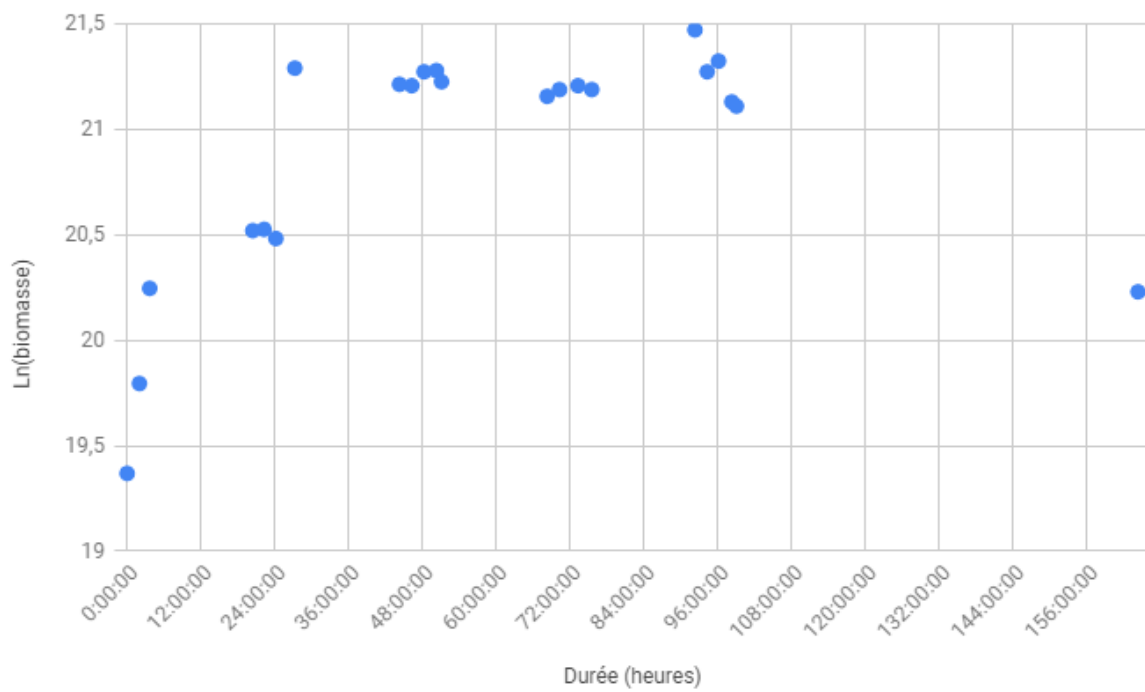


Figure 17 : Croissance dans un réacteur avec 0,05g/L de soufre (BRGM4) (Logarithme de la biomasse en fonction du temps)

Les μ sont répertoriés dans le tableau 2. Ainsi, plus la concentration en substrat, le soufre, est élevée, plus la croissance est forte.

Tableau 2 : Taux de croissance dans les réacteurs, à différentes concentrations de substrat

BRGM5	BRGM1	BRGM2	BRGM3	BRGM4
$\mu = 6,17.10^{-2}h^{-1}$	$\mu = 6,09.10^{-2}h^{-1}$	$\mu = 2,89.10^{-2}h^{-1}$	$\mu = 8,63.10^{-3}h^{-1}$	$\mu = 4,17.10^{-2}h^{-1}$

Le résultat pour le réacteur à 0,05g/L de soufre est aberrant.

De même, les μ des deux premiers réacteurs sont proches l'un de l'autre : le soufre est en excès et on atteint un seuil à partir duquel il n'y a plus de grande influence sur la croissance.

On peut par la suite tracer le graphe $\mu = f([S])$ (Figure 18) avec [S] la concentration en soufre (le μ du réacteur à 0,05 g/L de soufre n'est pas pris en compte) :

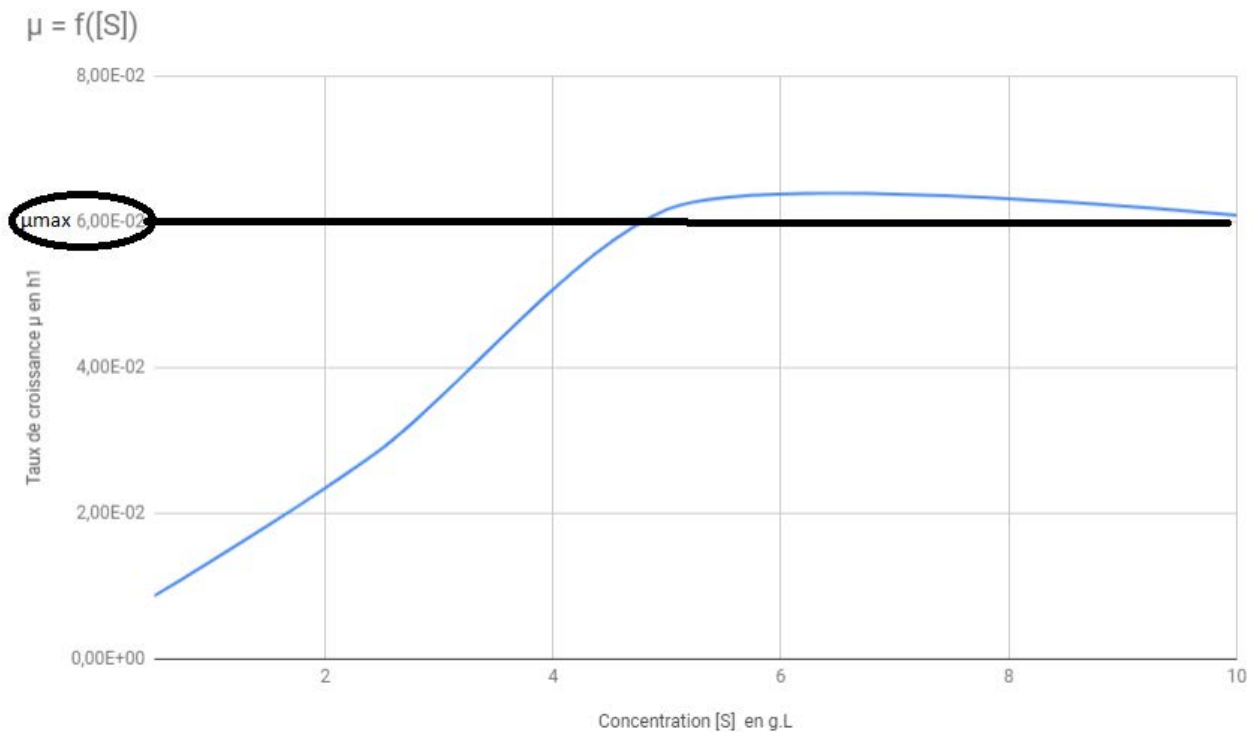


Figure 18 : Graphe $\mu=f([S])$ avec estimation du taux maximum de croissance μ_{max}

Ce graphe permet de récupérer μ_{\max} vaut environ $6,00 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. La constante K_s déduite de l'équation de Monod est de $2,77 \text{ g.L}^{-1}$. Ces valeurs seront celles utilisées dans le modèle dont il est question dans ce projet de recherche.

B) Volume de soude ajouté

L'oxydation du soufre par la bactérie produit de l'acide sulfurique. Afin de maintenir un pH constant, de la soude est injectée. L'évolution du volume de soude injectée (Figure 19) de même que l'augmentation du potentiel redox reflètent donc la quantité d'acide sulfurique produite et donc le métabolisme de la bactérie.

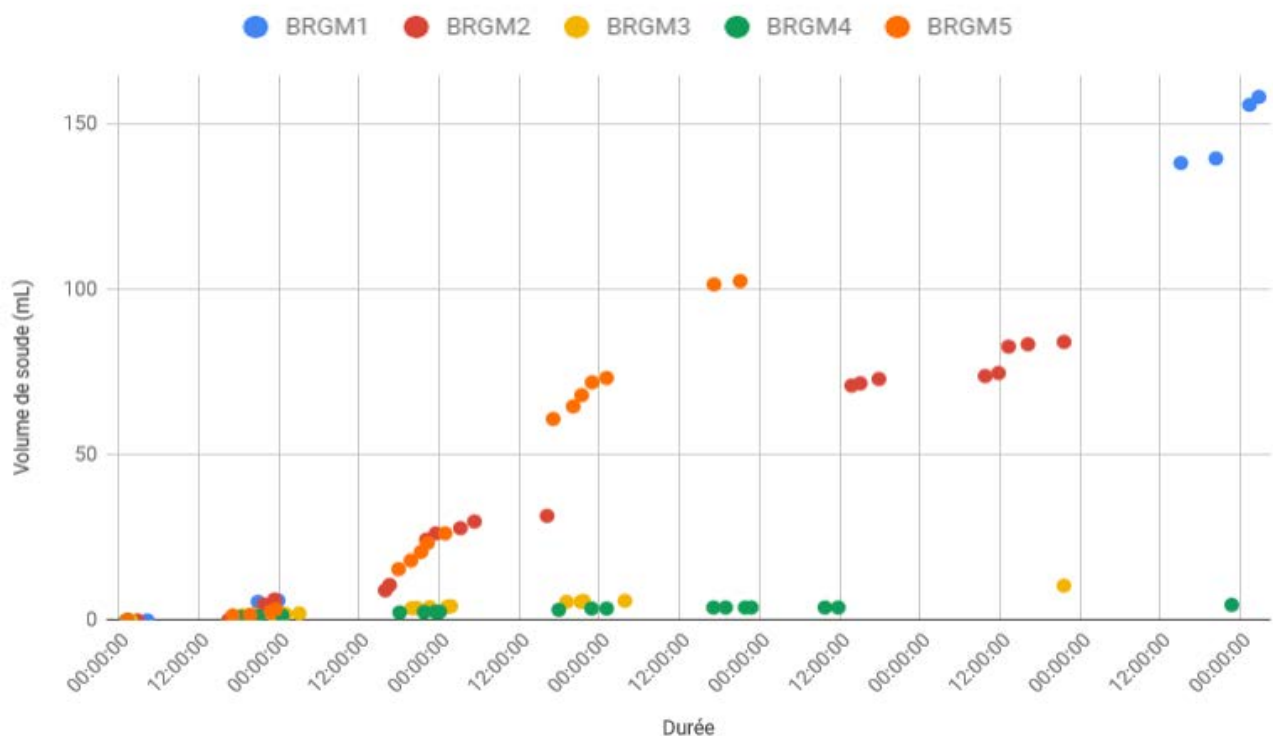


Figure 19 : évolution du volume de soude ajoutée au cours du temps (en heures)

On remarque ainsi que plus la concentration en soufre est élevée, plus on ajoute de soude. On produit donc plus d'acide sulfurique et la croissance est plus forte. Ceci confirme donc les tendances observées sur les graphes de la biomasse en fonction du temps ainsi que son logarithme népérien. Concernant les doutes que l'on avait sur les mauvais comptages du réacteur BRGM4, ils sont ici confirmés : seuls 4,8 mL de soude ont été ajoutés sur toute la culture (une fois passé un pic à 20 mL lors de l'injection de l'inoculum), ce qui confirme une faible croissance.

On peut calculer les quantités de soufre consommées à partir du volume de soude consommée :

Tableau 3 : Masse de soufre consommée

	Soufre consommé				
Réacteur	BRGM5	BRGM1	BRGM2	BRGM3	BRGM4
Masse	3,30g sur 20g	4,73g sur 10g	2,405g sur 5g	0,609g sur 1g	0,077g sur 0,1g
Pourcentage	16,50%	47%	48%	61%	77%

On remarque que plus la masse de soufre est faible, plus le pourcentage de soufre consommée par rapport à la masse introduite augmente (Tableau 3). Les bactéries tentent au maximum d'assurer leur croissance dans ce milieu où leur source d'énergie est limitante. Cependant, pour BRGM5, le pourcentage semble faible : en effet, le soufre a été ajouté en large excès.

C) Potentiel redox

Concernant le potentiel redox, les résultats du réacteur BRGM3 ne figurent pas suite à un dysfonctionnement de la sonde. Après une phase de diminution, on observe une phase de montée correspondant à l'oxydation (Figures 20 à 23).

Potentiel redox (mV) par rapport au temps

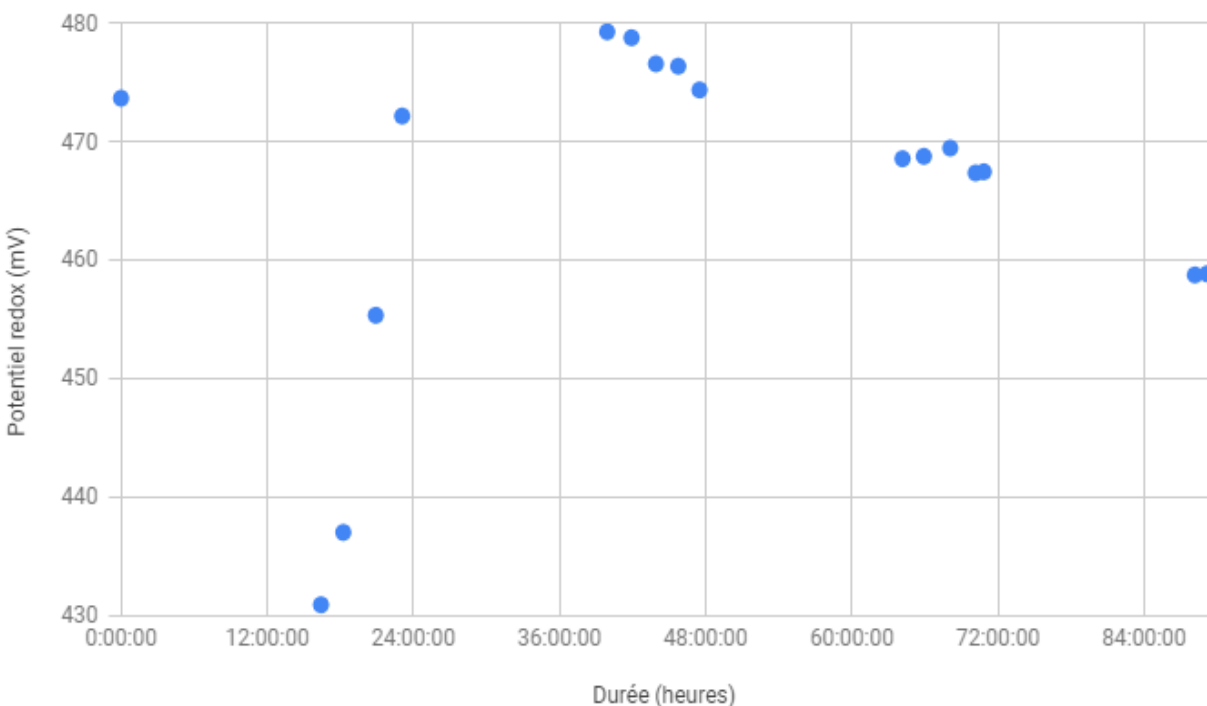


Figure 20 : Potentiel redox (mV) en fonction du temps, réacteur BRGM5

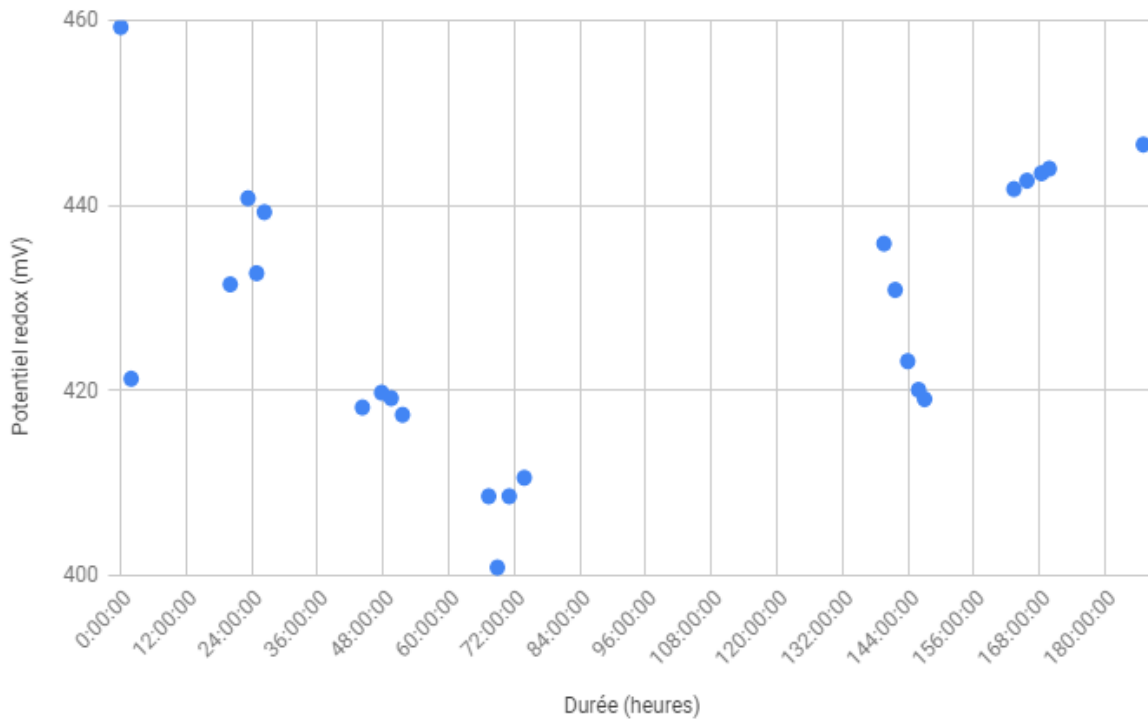


Figure 21 : Potentiel redox (mV) en fonction du temps, réacteur BRGM1

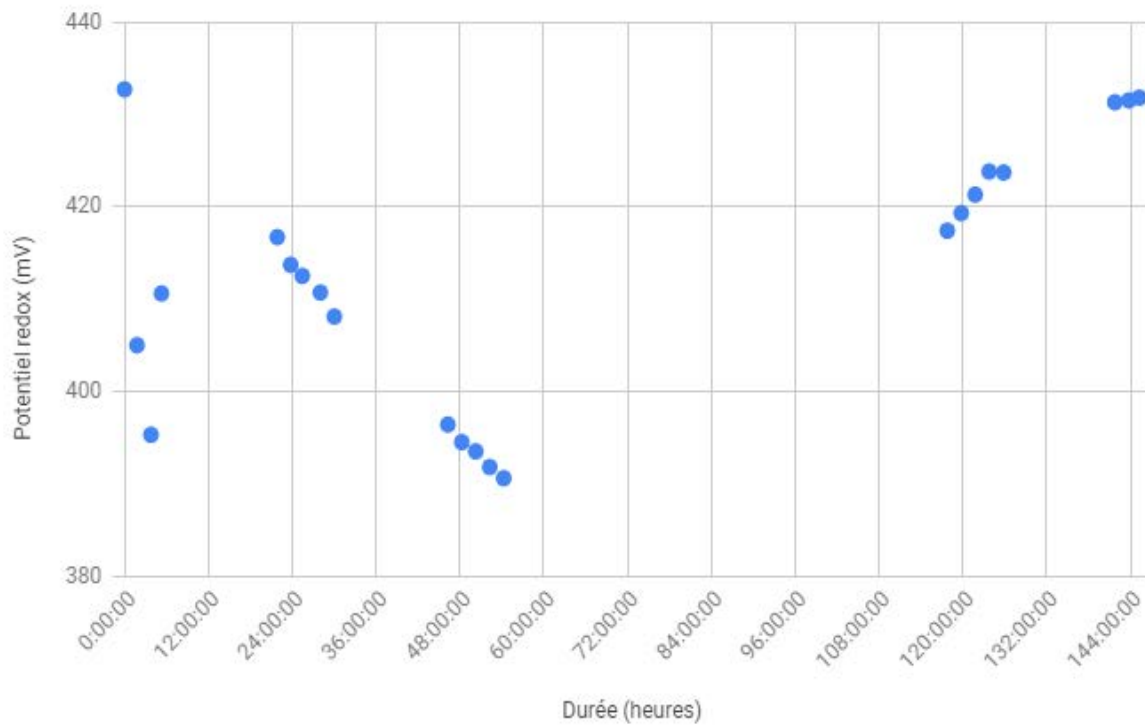


Figure 22 : Potentiel redox (mV) en fonction du temps, réacteur BRGM2

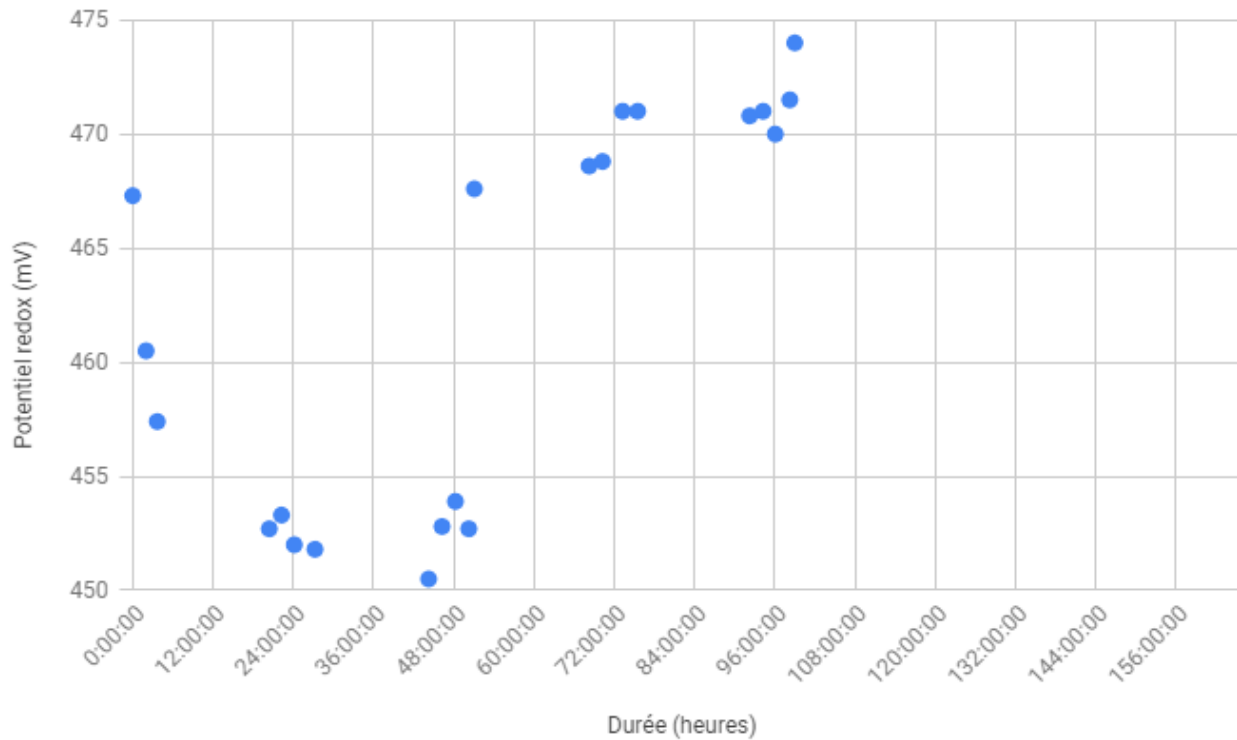


Figure 23 : Potentiel redox (mV) en fonction du temps, réacteur BRGM4

On remarque que les amplitudes entre le début et la fin de la phase d'augmentation du redox (correspondant à la réaction d'oxydation) est plus faible lorsque la concentration en soufre est plus faible. L'activité oxydative est donc plus faible. Cependant, on observe une baisse inexplicable du redox après la phase de montée en ce qui concerne le réacteur BRGM5. La diminution du potentiel redox en première phase peut être due aux différents états par lequel passe le soufre avant d'être transformé en acide sulfurique par la bactérie.

C) Saturation en oxygène

L'évolution de la saturation en oxygène représente la consommation de l'oxygène par la bactérie, afin d'oxyder le soufre en acide sulfurique ainsi que pour satisfaire ses besoins énergétiques (transferts d'électrons de l'oxydation du soufre à la chaîne respiratoire). La sonde ayant eu un dysfonctionnement tout au long des manipulations, que nous n'avons pas réussi à résoudre y compris en la changeant, les résultats ne seront pas présentés dans ce rapport.

Discussion

Le comptage au microscope reste difficile, les bactéries étant très petites, transparentes et l'utilisation de la fluorescence étant impossible (puisque l'on ne verrait plus le quadrillage de la cellule de Thoma). Il faut donc jouer avec la mise au point de façon à pouvoir compter dans toute la profondeur de la cellule de Thoma. Ceci induit donc un biais, et afin qu'il ne varie pas, il est important que ça soit toujours la même personne qui compte. De même, le résultat pour le réacteur à 0,05 g/L de soufre est aberrant. Ayant de plus une chute de biomasse observée le lundi, il serait judicieux de refaire cette manipulation afin de confirmer ou d'infirmer ce résultat, et même d'effectuer le comptage sur un échantillon non dilué. Cet échantillon contient théoriquement une faible quantité de bactéries, le comptage serait plus représentatif et significatif. Ici, il était sans doute trop dilué donc non interprétable correctement.

La tentative de marquage fluorescent a toutefois mis en évidence la présence d'un important biofilm sur les grains de soufre, lors d'une observation d'un échantillon de culture en fiole d'Erlenmeyer. Les échantillons sur lesquels sont effectués les comptages ne prennent pas en compte ce biofilm car il y a très peu de grains de soufre dedans (dilution). De même, il est impossible de pouvoir compter les bactéries manuellement sur un grain de soufre. Il y a donc un biais et les comptages sont sous-estimés. Une solution devra être trouvée à l'avenir. Il faudrait en effet pouvoir décoller les bactéries des grains de soufre pour ensuite pouvoir les compter. L'urée pourrait être utilisée pour cela, la méthode étant assez simple et efficace à mettre en place (Sanawar *et al.*)³⁴.

De plus, les grains de soufre en suspension empêchent toute technique automatisée comme la cytométrie de flux ou bien de simples mesures de densité optique. Toutefois, des techniques de biologie moléculaire comme la PCR pourraient être envisagées afin de pouvoir quantifier l'ADN de façon précise et donc les bactéries. Ou bien, il faudrait effectuer les dosages en HPLC de l'acide sulfurique produit grâce aux vials archivés, cependant, il faudrait pouvoir corrélérer précisément la quantité d'acide produite à la quantité de bactéries présentes de façon à pouvoir déterminer μ .

Concernant le pH, on observe une diminution dans les fioles d'Erlenmeyer : ceci est dû à la formation d'acide sulfurique et au fait que le pH des erlenmeyers ne soit pas à l'optimum pour la bactérie contrairement aux réacteurs où il est régulé par ajout de soude pour neutraliser l'acide produit. On remarque d'ailleurs qu'à la phase stationnaire en erlenmeyer, le pH a tendance à se stabiliser. Ceci est dû à l'épuisement du milieu et à la croissance qui n'augmente plus lors de la phase stationnaire.

La croissance est meilleure en réacteur, milieu continuellement contrôlé (dans le cas où le soufre est en excès) et aéré, contrairement aux fioles d'Erlenmeyer où peut se produire une anoxie partielle, l'aération se faisant moins bien à travers un papier aluminium et du coton, contrairement à un *sparger* de réacteur. Ce phénomène vient s'ajouter à la production d'acide non neutralisée qui peut freiner la croissance dans la fiole. Il faudrait pouvoir mesurer l'oxygène dans les fioles d'Erlenmeyer à l'aide d'une sonde pour confirmer cette hypothèse d'anoxie.

Les μ des deux premiers réacteurs sont proches l'un de l'autre : le soufre est en excès et on atteint un seuil à partir duquel il n'y a plus de grande influence sur la croissance. Dans le réacteur BRGM5, le soufre est tellement en excès que le pourcentage de soufre consommé par la bactérie diminue. On remarque que plus la masse de soufre est faible, plus le pourcentage de soufre consommée par rapport à la masse introduite augmente. Les bactéries tentent au maximum d'assurer leur croissance dans ce milieu où leur source d'énergie est limitante.

Ainsi, pour conclure, les manipulations réalisées au cours de ce stage donnent un bon aperçu de la cinétique d'*A. caldus*, avec un taux spécifique de croissance conforme à ce que l'on peut attendre mais une constante de demi-saturation plus élevée si l'on compare à d'autres bactéries de biolixiviation comme *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*)³⁵. Cependant, des manipulations supplémentaires restent à faire, de façon à avoir une confirmation plus précise de la croissance que par les comptages manuels, ainsi que sur le μ_{\max} , déterminé ici de façon graphique donc plus approximative. De même, aucune mesure de saturation en oxygène n'a pu être correctement entreprise, que ça soit en réacteur ou en fiole d'Erlenmeyer, à cause de dysfonctionnements techniques.

De même, la concentration en substrat est loin d'être le seul paramètre pouvant influencer la cinétique. La littérature documente en effet de nombreux paramètres d'inhibitions de la croissance bactérienne, à partir desquels on a pu déduire de nombreuses variantes de l'équation de Monod (Loustaunau 2015)⁶. C'est par exemple le cas des produits métaboliques comme l'acide sulfurique, l'épuisement du milieu (et donc la concentration en minéraux autres que le soufre), la biomasse en elle-même (utilisation de molécules signal comme celles du *quorum-sensing*). La récupération des données cinétiques d'*A. caldus* pour l'alimentation du modèle est donc loin d'être terminée. De même, ce n'est pas la seule bactérie utilisée en biolixiviation, le travail sera donc également à répéter pour d'autres.

Toutefois, malgré ce côté fastidieux, construire un modèle mathématique du procédé permettra de pouvoir l'optimiser plus rapidement et plus efficacement. Grâce aux outils informatiques, on pourra économiser du temps, du personnel et du matériel consacré aux phases d'essais. Mieux développer le procédé de biolixiviation à l'avenir permettra de s'inscrire dans une démarche de développement durable, de réduire la pollution due aux rejets toxiques des méthodes traditionnelles d'extraction des métaux, de mieux traiter et recycler certains déchets spécifiques comme les déchets électroniques. De plus, l'extraction de métaux comme le cobalt, largement utilisé pour la construction de smartphones et autres appareils multimédias, pose actuellement dans certains cas des problèmes éthiques (exploitation d'enfants, financement d'armes...). La biolixiviation pourrait donc permettre des productions plus vertes mais aussi plus honnêtes et éthiques.

Bibliographie

- 1 A. H. Kaksonen. (2018). Editorial for Special Issue “Microorganisms for Environmental and Industrial Applications. *Microorganisms*. 6(3): 62.
2. J. Cui, L. Zhang. (2008). Metallurgical Recovery of Metals from Electronic Waste: A Review. *Journal of Hazardous Materials*. 158(2-3): 228-256
- 3 D. Morin. (2010). La biolixiviation des minerais sulfurés. *Géosciences, BRGM*. 11: 82-89
- 4 P. Saint-Aubin. (2019). La dépendance aux métaux stratégiques : quelles solutions pour l'économie? Avis du Conseil Economique, Social et Environnemental, Journal Officiel de la République Française, Mandature 2015-2020 – Séance du mardi 22 janvier 2019.
- 5 Rapport du BRGM “Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquides porteurs” (2000) BRGM/rp-50210-fr <http://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-50210-FR.pdf>, consulté le 22 Mars 2019.
- 6 Loustaunau C (2015). Modélisation de la croissance et de la production de thiolutine par *Saccharothrix algeriensis* en fermenteur batch. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse.
- 7 Site du LRGP. <http://lrgp-nancy.cnrs.fr/>, consulté le 25 Juillet 2019.
- 8 Diaporama “La Biolixiviation : des bactéries au service de la production des métaux”, Patrick d'Hugues, BRGM, Colloque Bioprocédés et Bioproduction Environnement – Energie – Santé du 10 Juillet 2013 http://www.cnrs.fr/mi/IMG/pdf/brgm_cnrs_juillet_2014_vf_.pdf, consulté le 23 Mars 2019
- 9 Y. Gumulya, N. J. Boxall, H. N. Khaleque, V. Santala, R. P. Carlson, A. H. Kaksonen. (2018). In a quest for engineering acidophiles for biomining applications: challenges and opportunities. *Genes*. 9(2): 116
- 10 E. R. Donati, C. Castro, M. S. Urbietta. (2016). Thermophilic Microorganisms in Biomining. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(11): 179
- 11 K. L. Temple, A. R. Colmer. (1951). The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*. 62(5): 605-611
- 12 Ehrlich H. L. (2002) *Geomicrobiology*, 4th edition, Dekker, New York
- 13 Schippers A. (2007) Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification (Chap 1). In Donati E. R., Sand W (eds.), *Microbial processing of metal sulfides*. Springer, Dordrecht.
- 14 K. J. Edwards, P. L. Bond, T. M. Gihring, J. F. Banfield. (2000). An archaic iron-oxidizing extreme acidophilic important in acid mine drainage. *Science*. 279: 1796-1799
- 15 W. Sand, T. Gehrke, R. Hallmann, A. Schippers. (1995). Sulfur chemistry, biofilm, and the (in) direct attack mechanism a critical evaluation of bacterial leaching. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42(6): 961-966
- 16 A. Schippers, T. Rohwerder, W. Sand. (1999). Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52(1): 104-110
- 17 T. Rohwerder, T. Gehrke, K. Kinzler, W. Sand. (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: Fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63(3): 239-248
- 18 A. Schippers, P. G. Jozsa, W. Sand. (1996). Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(9): 3424-3431
- 19 W. Sand, T. Gehrke, P. G. Jozsa, A. Schippers. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching: direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*. 59(2-3): 159-175

- 20 P. Vandevivere, D. L. Kirchman. (1993). Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(10): 3280-3286
- 21 T. Gehrke, J. Telegdi, D. Thierry, W. Sand. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(7): 2743:2747
- 22 R. C. Blake II, E. A. Shute, G. T. Howard. (1994). Solubilization of minerals by bacteria: electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite and sulfur. *Applied and environmental microbiology*. 60:3349-3357
- 23 D. E. Rawlings. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology*. 56(2): 65-91
- 24 S. Mangold, J. Valdes, D. S. Holmes, M. Dopson. (2011). Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. 2:17
- 25 N. Okibe, M. Gericke, K. B. Hallberg, D. B. Johnson. (2003). Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4): 1936-1943
- 26 Q. G. Zhou, F. Bo, Z. Hong-bo, L. Xi, G. Jian, L. Fei-fei, C. Xin-hua. (2007). Isolation of a strain of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(9): 1217-1225
- 28 M. Dopson, E. B. Lindstrom. (1999). Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(1): 36-40
- 29 D. B. Johnson, K. B. Hallberg. (2009). Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*. 54: 201-255
- 30 L. Chen, Y. Ren, J. Lin, X. Liu. (2012). *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant. *PLoS ONE*. 7(9): e39470
- 31 D. A. A. Mossel, M. Ingram. (1955). The physiology of the microbial spoilage of foods. *Journal of Applied Bacteriology*. 18(2): 232-268
- 32 D. A. A. Mossel, T. M. G. Bonants-van-Laarhoven, A. M. T. Ligtenberg-Merkus, M. E. B. Werdler. (1983). Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts : an attempt at standardization at the international level. *Journal of Applied Bacteriology*. 54(3): 313-327
- 33 P. Nurmi, B. Özkaya, A. H. Kaksonen, O. H. Tuovinen, J. A. Puhakka. (2009). Inhibition kinetics of iron oxidation by *Leptospirillum ferriphilum* in the presence of ferric, nickel and zinc ions. *Hydrometallurgy*. 97(2009): 137-145
- 34 E. Sanawar, I. Pinel, N. M. Farhat, S. S. Bucs, J. Zlopasa, J. C. Kruithof, G. J. Witkamp, M. C. M. van Loosdrecht, J. S. Vrouwenvelder. (2018). Enhanced biofilm solubilization by urea in reverse osmosis membrane systems. *Water Research X*. 1(2008): 100004
- 35 P. S. Pina, V. A. Oliveira, F. L. S. Cruz, V. A. Leao. (2010). Kinetics of ferrous ion oxidation by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Biochemical Engineering Journal*. 51(2010): 194-197

Convention de stage



Année universitaire 2018/2019

Convention de stage n° 54513 entre

Nota : pour faciliter la lecture du document, les mots "stagiaire", "enseignant référent", "tuteur de stage", "représentant légal", et "étudiant" sont utilisés au masculin.

1 - L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT ou DE FORMATION	2 - L'ORGANISME D'ACCUEIL
<p>Nom : Université de Lorraine Adresse : CS 25233 54052 Nancy Tél : Représenté par (signataire de la convention) : Stéphane FLAMENT Qualité du représentant : Doyen de la Faculté des Sciences et Technologies Composante/UFR : MASTER MICROBIOLOGIE - M2 Adresse (si différente de celle de l'établissement) : Campus Aiguillettes - BP 70239 54506 VANDOEUVRE-LES-NANCY CEDEX Tél : 03 72 74 51 39 Mél :</p>	<p>Nom : CNRS Délégation Centre Est Adresse 17 rue Notre Dame des Peirres Représenté par (nom du signataire de la convention) : Michel J. VAN DER Qualité du représentant : Délégué Régional Service dans lequel le stage sera effectué : LRGP - LABORATOIRE REACTIONS ET GÉNIES DES PROCÉDÉS Tél : 03 72 74 73 00 Mél : Lieu du stage (si différent de l'adresse de l'organisme) : 1 rue grandville 54000 NANCY FRANCE</p>

3 - LE STAGIAIRE
<p>Nom : BLANGER Prénom : Ombeline Sexe : F Né(e) le : 03/05/1993 Numéro d'étudiant : 31110932 Adresse : 3 rue mademoiselle, studio c202 54000 NANCY FRANCE Tél : Portable : 07 69 46 24 84 Mél : ombeline.blanger2@etu.univ-lorraine.fr INTITULÉ DE LA FORMATION OU CURSUS SUIVI DANS L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET VOLUME HORAIRES (ANNUEL OU SEMESTRIEL) : M2-Microbiologie (NANCY) (F1) Nombre d'heures de formation : Plus de 200 heures.</p>

<p>SUJET DE STAGE : Détermination, des constantes cinétiques de Acidithiobacillus caldus par suivi de cultures en bioréacteur en vue de la modélisation du procédé de biolixiviation Dates : du 04/03/2019 au 30/08/2019 Correspondant à 840 heures de présence effective dans l'organisme d'accueil et représentant une durée totale de 5 mois 10 jour(s) et 0 heure(s) - 113j. Commentaire : Laboratoire fermé le 31/05/2019 et du 01 au 16 août 2019 inclus</p>

Encadrement du stagiaire par l'établissement d'enseignement	Encadrement du stagiaire par l'organisme d'accueil
<p>Nom et prénom de l'enseignant référent : JORAND Frédéric Tél : +33 3 72 74 73 80 Mél : frederic.jorand@univ-lorraine.fr</p>	<p>Nom et prénom du tuteur de stage : OLMOS Eric Fonction : Tél : Mél : eric.olmos@univ-lorraine.fr</p>

Caisse Primaire d'Assurance Maladie à contacter en cas d'accident (lieu de domicile de l'étudiant sauf exception) :

Article 1 - Objet de la convention

La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'établissement d'enseignement et le stagiaire.

Article 2 - Objectif du stage

Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle l'étudiant acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue de l'obtention d'un diplôme ou d'une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.

Le programme est établi par l'établissement d'enseignement et l'organisme d'accueil en fonction du programme général de la formation dispensée.

ACTIVITÉS CONFIEES :

Chercheur

Compétences à acquérir ou à développer :

Mise en œuvre de cultures en bioréacteur

Article 3 - Modalités du stage

La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans l'organisme d'accueil sera de **35.00** heures sur la base d'un **Temps Plein**.

Si le stagiaire doit être présent dans l'organisme d'accueil la nuit, le dimanche ou un jour férié, préciser les cas particuliers :

Article 4 - Accueil et encadrement du stagiaire

Le stagiaire est suivi par l'enseignant référent désigné dans la présente convention ainsi que par le service de l'établissement en charge des stages.

Le tuteur de stage désigné par l'organisme d'accueil dans la présente convention est chargé d'assurer le suivi du stagiaire et d'optimiser les conditions de réalisation du stage conformément aux stipulations pédagogiques définies.

Le stagiaire est autorisé à revenir dans son établissement d'enseignement pendant la durée du stage pour y suivre des cours demandés explicitement par le programme, ou pour participer à des réunions ; les dates sont portées à la connaissance de l'organisme d'accueil par l'établissement. L'organisme d'accueil peut autoriser le stagiaire à se déplacer.

Toute difficulté survenue dans la réalisation et le déroulement du stage, qu'elle soit constatée par le stagiaire ou par le tuteur de stage, doit être portée à la connaissance de l'enseignant-référent et de l'établissement d'enseignement afin d'être résolue au plus vite.

MODALITÉS D'ENCADREMENT (visites, rendez-vous téléphoniques, etc.)

Article 5 - Gratification - Avantages

En France, lorsque la durée du stage est supérieure à deux mois consécutifs ou non, celui-ci fait obligatoirement l'objet d'une gratification, sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises et pour les stages relevant de l'article L.4381-1 du code de la santé publique.

Le montant horaire de la gratification est fixé à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L.241-3 du code de la sécurité sociale. Une convention de branche ou un accord professionnel peut définir un montant supérieur à ce taux.

La gratification due par un organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme au cours de la période concernée.

La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement, et le transport.

L'organisme peut décider de verser une gratification pour les stages dont la durée est inférieure ou égale à deux mois.

En cas de suspension ou de résiliation de la présente convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratisé en fonction de la durée du stage effectué.

La durée donnant droit à gratification s'apprécie compte tenu de la présente convention et de ses avenants éventuels, ainsi que du nombre de jours de présence effective du stagiaire dans l'organisme.

LE MONTANT DE LA GRATIFICATION est fixé à ~~56,10~~ ^{56,10} euros Net par mois.

Modalités de versement de la gratification : **Virement bancaire**

Article 5 bis - Accès aux droits des salariés - Avantages

(Organisme de droit privé en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

Le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L.1121-1, L.1152-1 et L.1153-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.

Le stagiaire a accès au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurants prévus à l'article L.3262-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés de l'organisme d'accueil. Il bénéficie également de la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L.3261-2 du même code.

Le stagiaire accède aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L.2323-83 du code du travail dans les mêmes conditions que les salariés.

Article 5ter - Accès aux droits des agents - Avantages

(Organisme de droit public en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

Les trajets effectués par le stagiaire d'un organisme de droit public entre son domicile et son lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret n°2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail.

Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur.

Est considéré comme sa résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.

Article 6 - Régime de protection sociale

Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son régime de Sécurité sociale antérieur. Les stages effectués à l'étranger sont signalés préalablement au départ du stagiaire à la Sécurité sociale lorsque celle-ci le demande.

Pour les stages à l'étranger, les dispositions suivantes sont applicables sous réserve de conformité avec la législation du pays d'accueil et de celle régissant le type d'organisme d'accueil.

6.1 - Gratification d'un montant maximum de 15% du plafond horaire de la Sécurité sociale :

La gratification n'est pas soumise à cotisation sociale.

Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre du régime étudiant de l'article L.412-8 2° du code de la Sécurité sociale.

En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours d'activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins du stage et pour les étudiants en médecine, en chirurgie dentaire ou en pharmacie qui n'ont pas un statut hospitalier pendant le stage effectué dans les conditions prévues au b du 2e de l'article L.412-8, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la Caisse Primaire d'Assurance Maladie ou la caisse compétente (voir adresse en page 1) en mentionnant l'établissement d'enseignement comme employeur, avec copie à l'établissement d'enseignement.

6.2 - Gratification supérieure à 15 % du plafond horaire de la Sécurité sociale :

Les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 15 % du plafond horaire de la Sécurité sociale.

L'étudiant bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L.411-1 et suivants du code de la Sécurité sociale.

En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours des activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie et informe l'établissement dans les meilleurs délais.

6.3 - Protection maladie du stagiaire à l'étranger :

1) Protection issue du régime étudiant français

- pour les stages au sein de l'Espace Economique Européen (EEE) effectués par des ressortissants d'un Etat de l'Union Européenne, ou de la Norvège, de l'Islande, du Liechtenstein ou de la Suisse, ou encore de tout autre Etat (dans ce dernier cas, cette disposition n'est pas applicable pour un stage au Danemark, Norvège, Islande, Liechtenstein ou Suisse), l'étudiant doit demander la Carte Européenne d'Assurance Maladie (CEAM).

- pour les stages effectués au Québec par les étudiants de nationalité française, l'étudiant doit demander le formulaire SE401Q (104 pour les stages en entreprises, 106 pour les stages en universités) ;

- dans tous les autres cas les étudiants qui engagent des frais de santé peuvent être remboursés auprès de la mutuelle qui leur tient lieu de Caisse de Sécurité Sociale Etudiante, au retour et sur présentation des justificatifs : le remboursement s'effectue alors sur la base des tarifs de soins français. Des écarts importants peuvent exister entre les frais engagés et les tarifs français, base du remboursement. Il est donc fortement conseillé aux étudiants de souscrire une assurance maladie complémentaire spécifique, valable pour le pays et la durée du stage, auprès de l'organisme d'assurance de son choix (mutuelle étudiante, mutuelle des parents, compagnie privée ad hoc...) ou, éventuellement et après vérification de l'étendue des garanties proposées, auprès de l'organisme d'accueil si celui-ci fournit au stagiaire une couverture maladie en vertu du droit local (voir 2e ci-dessous).

2) Protection sociale issue de l'organisme d'accueil

En cochant la case appropriée, l'organisme d'accueil indique ci-après s'il fournit une protection Maladie au stagiaire, en vertu du droit local :

OUI : cette protection s'ajoute au maintien, à l'étranger, des droits issus du droit français.

NON : la protection découle alors exclusivement du maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français étudiant.

Si aucune case n'est cochée, le 6.3-1 s'applique.

6.4 - Protection Accident du Travail du stagiaire à l'étranger

1) Pour pouvoir bénéficier de la législation française sur la couverture accident de travail, le présent stage doit :

- être d'une durée au plus égale à 6 mois, prolongations incluses ;

- ne donner lieu à aucune rémunération susceptible d'ouvrir des droits à une protection accident de travail dans le pays d'accueil ; une indemnité ou gratification est admise dans la limite de 15% du plafond horaire de la sécurité sociale (cf point 5), et sous réserve de l'accord de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie sur la demande de maintien de droit ;

- se dérouler exclusivement dans l'organisme signataire de la présente convention ;

- se dérouler exclusivement dans le pays d'accueil étranger cité.

Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, l'organisme d'accueil s'engage à cotiser pour la protection du stagiaire et à faire les déclarations nécessaires en cas d'accident de travail.

2) La déclaration des accidents de travail incombe à l'établissement d'enseignement qui doit en être informé par l'organisme d'accueil par écrit dans un délai de 48 heures.

3) La couverture concerne les accidents survenus :

- dans l'enceinte du lieu du stage et aux heures du stage,
- sur le trajet aller-retour habituel entre la résidence du stagiaire sur le territoire étranger et le lieu du stage,
- dans le cadre d'une mission confiée par l'organisme d'accueil du stagiaire et obligatoirement par ordre de mission,
- lors du premier trajet pour se rendre depuis son domicile sur le lieu de sa résidence durant le stage (déplacement à la date du début du stage),
- lors du dernier trajet de retour depuis sa résidence durant le stage à son domicile personnel.

4) Pour le cas où l'une seule des conditions prévues au point 6.4-1) n'est pas remplie, l'organisme d'accueil s'engage à couvrir le stagiaire contre le risque d'accident de travail, de trajet et les maladies professionnelles et à en assurer toutes les déclarations nécessaires.

5) Dans tous les cas :

- si l'étudiant est victime d'un accident de travail durant le stage, l'organisme d'accueil doit impérativement signaler immédiatement cet accident à l'établissement d'enseignement ;
- si l'étudiant remplit des missions limitées en dehors de l'organisme d'accueil ou en dehors du pays du stage, l'organisme d'accueil doit prendre toutes les dispositions nécessaires pour lui fournir les assurances appropriées.

Article 7 - Responsabilité et assurance

L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garantis au titre de la responsabilité civile.

Pour les stages à l'étranger ou outre-mer, le stagiaire s'engage à souscrire un contrat d'assistance (rapatriement sanitaire, assistance juridique...) et un contrat d'assurance individuel accident.

Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un étudiant.

Lorsque dans le cadre de son stage, l'étudiant utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule et, le cas échéant, s'acquitte de la prime y afférente.

Article 8 - Discipline

Le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil.

Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'établissement d'enseignement. Dans ce cas, l'organisme d'accueil informe l'enseignant référent et l'établissement des manquements et fournit éventuellement les éléments constitutifs.

En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions fixées à l'article 9 de la présente convention.

Article 9 - Congés - Interruption du stage

En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans les organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévues pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-46 du code du travail.

Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés et autorisations d'absence sont possibles.

Pour toute autre interruption temporaire du stage (maladie, absence injustifiée...) l'organisme d'accueil avertit l'établissement d'enseignement par courrier.

Toute interruption du stage, est signalée aux autres parties à la convention et à l'enseignant référent. Une modalité de validation est mise en place le cas échéant par l'établissement. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage.

Un avenant à la convention pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale du stage fixée par la loi (6 mois).

En cas de volonté d'une des trois parties (organisme d'accueil, stagiaire, établissement d'enseignement) d'arrêter le stage, celle-ci doit immédiatement en informer les deux autres parties par écrit. Les raisons invoquées seront examinées en étroite concertation. La décision définitive d'arrêt du stage ne sera prise qu'à l'issue de cette phase de concertation.

Article 10 - Devoir de réserve et confidentialité

Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues pour en faire publication, communication à des tiers sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaut non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.

Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport de stage, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.

Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

Article 11 - Propriété intellectuelle

Conformément au code de la propriété intellectuelle, dans le cas où les activités du stagiaire donnent lieu à la création d'une œuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.
Le contrat devra alors notamment préciser l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

Article 12 - Fin de stage - Rapport - Evaluation

1) Attestation de stage : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre une attestation dont le modèle figure en annexe, mentionnant au minimum la durée effective du stage et, le cas échéant, le montant de la gratification perçue. Le stagiaire devra produire cette attestation à l'appui de sa demande éventuelle d'ouverture de droits au régime général d'assurance vieillesse prévue à l'art. L.351-17 du code de la sécurité sociale.

2) Qualité du stage : à l'issue du stage, les parties à la présente convention sont invitées à formuler une appréciation sur la qualité du stage. Le stagiaire transmet au service compétent de l'établissement d'enseignement un document dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil. Ce document n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.

3) Évaluation de l'activité du stagiaire : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil renseigne une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'enseignant référent (ou préciser si fiche annexe ou modalités d'évaluation préalablement définis en accord avec l'enseignant référent).

4) Modalités d'évaluation pédagogiques : Rapport de Stage, Rapport et soutenance

NOMBRE D'ECTS (le cas échéant) : 30.00

5) Le tuteur de l'organisme d'accueil ou tout membre de l'organisme d'accueil appelé à se rendre dans l'établissement d'enseignement dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'établissement d'enseignement.

Article 13 - Droit applicable - Tribunaux compétents

La présente convention est régie exclusivement par le droit français.

Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

FAIT à Nancy le 8 février 2019

POUR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT **POUR L'ORGANISME D'ACCUEIL**

Visieur du centre, par délégation, **Stephane FLAMENT**
Le Directeur du Secteur Biologie
Faculté des Sciences et Technologies
Monsieur DOMENJOU

Laurent FALK

CENTRE NATIONAL de la RECHERCHE SCIENTIFIQUE
L. FALK
Directeur
LABORATOIRE REACTIONS et GENE DES PROCÉDES NANO

Marie SIMONIDES

La Déléguée Régionale

STAGIAIRE (ou son représentant légal le cas échéant)
Ombeline BLANGER

Marie SIMONIDES

L'enseignant référent du stagiaire

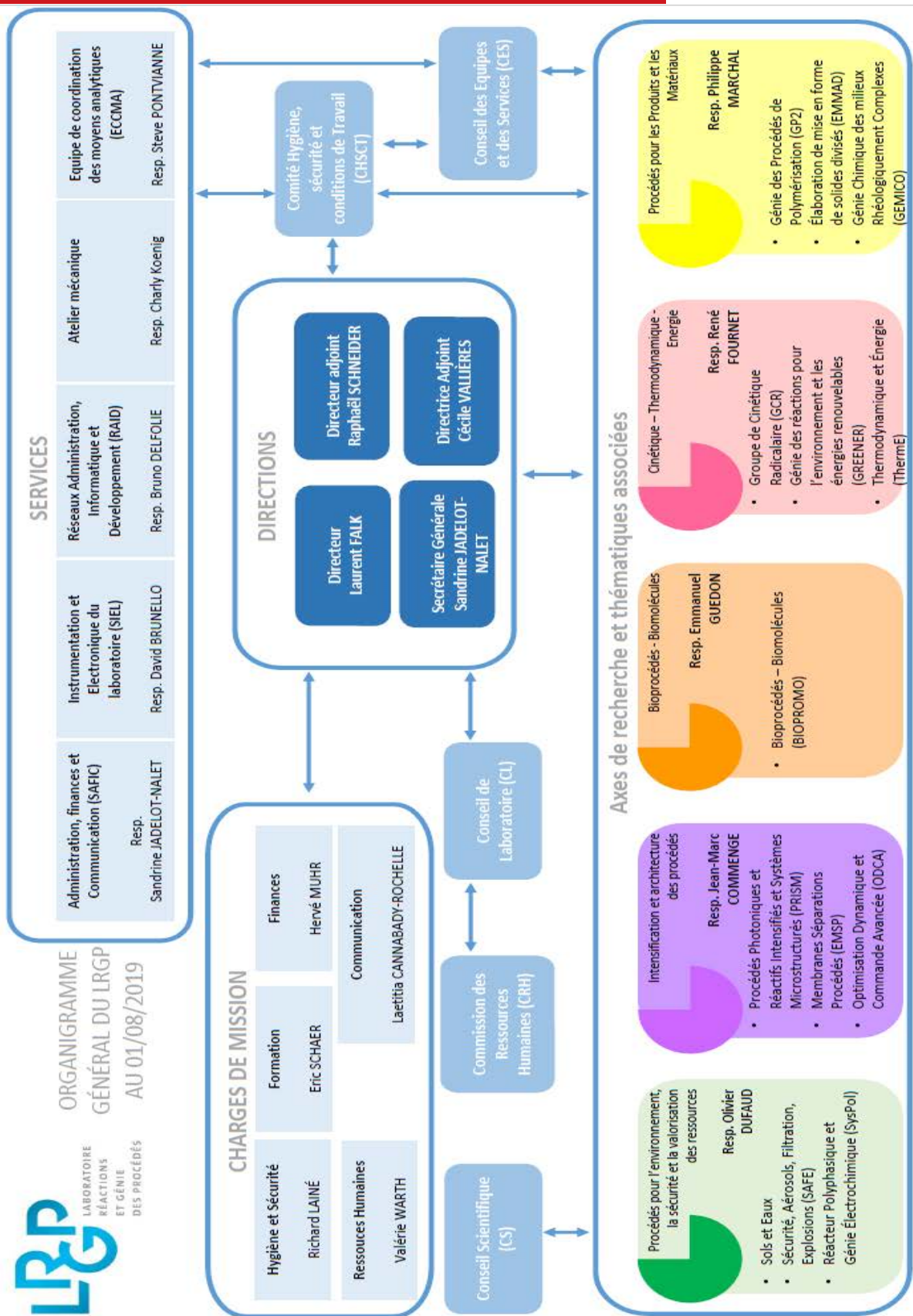
Frédéric JORAND

Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil

Eric OLMOS

Fiches à annexer à la convention : 1) Attestation de stage / 2) Fiche de stage à l'étranger (pour informations sécurité sociale voir site cleiss.fr - pour fiche pays voir site diplomatie.gouv.fr) / 3) Autres annexes (le cas échéant)

Annexe 1 : Organigramme du laboratoire



Annexe 2 : Protocoles de preparation des milieux et de repiquage

PROJET MODELIX LANCEMENT D'UNE CULTURE BACTERIENNE *ACIDITHIOBACILLUS CALDUS*

1. Sécurités à respecter

Les cultures sont réalisées en souche pure et peuvent être contaminées par des bactéries naturellement présentes dans le sol. Il est important d'éviter tout risque de contamination de la souche pure, pouvant entraîner sa perte. De plus, les cultures sont réalisées en milieu très acide (pH = 1). Pour cela, il est nécessaire de respecter certaines sécurités :

- Port de gants neufs,
- Port de lunettes,
- Utilisation de matériel stérilisé,
- Si utilisation de boîtes à cônes, ne pas les laisser ouvertes ou laisser le couvercle face contre pailleasse,
- Eviter de passer le bras au-dessus des échantillons, des solutions ou des cônes,
- Bien refermer les solutions après utilisation.

Faire attention à ne pas contaminer le filtre des micropipettes (si présent).

Les micro-organismes manipulés dans les cultures ne présentent pas de caractères pathogènes reconnu pour l'homme ni de risque de multiplication dans l'environnement naturel compte tenu de leurs caractéristiques particulières.

2. Méthodologie

La méthodologie comprend le lancement d'une culture depuis un échantillon de 5 à 10 mL de culture active, préalablement isolée. La préparation des milieux est variable selon la souche prise en compte.

2.1. Préparation des milieux

2.1.1. Milieu 0Km

Le milieu 0Km est l'un des milieux de base utilisés en biolixiviation au BRGM. Le milieu 0Km est le milieu utilisé pour la croissance de la souche K d'*A. caldus* provenant du BRGM, isolée par Barrie Johnson. La composition de la solution nutritive est la suivante

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,70 g/L
- KOH 0,48 g/L

- $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 0,52 g/L
- H_3PO_4 (85%) 0,80 g/L
- Eau déminéralisée (qsp 1 litre)
- S^0 (qsp 0,5 % m/v)

Afin de disposer d'un stock suffisant, 1L de solution nutritive, concentrée 5 fois, est préparé. Préparer dans un contenant adapté (fiolle jaugé par exemple) :

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 18,50 g
- KOH 2,40 g
- $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 2,60 g
- H_3PO_4 (85%) 4,00 g
- Eau déminéralisée (qsp 1 litre)
- S^0 (qsp 0,5 % m/v)

La solution peut être autoclavée puis stockée à température ambiante (placard). Elle peut être conservée jusqu'à 2 mois. Penser à noter la date de préparation sur la bouteille et la mention « 0Km 5X ».

Préparation d'une solution 1X : préparer 1L de solution 0Km en diluant 200 mL de solution 0Km 5X dans 800 mL d'eau distillée, puis ajuster son pH entre 1,8 et 2. Noter le pH puis autoclaver la solution.

2.1.2. Milieu 150a

Le milieu 150a est le milieu utilisé pour la croissance de la souche KU d'*A. caldus* provenant de la DSMZ. La composition de la solution nutritive est la suivante :

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,00 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4,3\text{H}_2\text{O}$ 0,50 g
- $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 0,50 g
- KCl 0,10 g
- $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$ 0,01 g
- Solution d'éléments trace 10,00 mL
- S^0 (qsp 0,5 % m/v)
- Eau distillée (qsp 1 litre)

La solution d'éléments trace est la suivante :

- $\text{FeCl}_3,6\text{H}_2\text{O}$ 11,00 mg
- $\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$ 0,50 mg
- H_2BO_3 2,00 mg
- $\text{MnSO}_4,\text{H}_2\text{O}$ 2,00 mg
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4,2\text{H}_2\text{O}$ 0,80 mg
- $\text{CoCl}_2,6\text{H}_2\text{O}$ 0,60 mg
- $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 0,90 mg
- Eau distillée (qsp 10 mL)

Dissoudre tous les ingrédients à l'exception de la solution d'éléments trace et du soufre élémentaire S^0 . Ajuster le pH avec du 6N H_2SO_4 (3M) jusqu'à 2,5. Les solutions doivent être stérilisées indépendamment comme ci-après :

- La solution de base par autoclavage
- La solution d'éléments trace par filtration
- Le soufre élémentaire par autoclavage à 110°C pendant 40 minutes durant 3 jours d'affilés et entrecoupés de passages en incubateur à 30°C pendant 24h.

La solution de base et la solution d'éléments trace peuvent être réunies. Puisque le soufre n'est pas miscible dans l'eau, il est préférable de l'ajouter indépendamment à raison de 0,5% (m/v).

2.1.3. Milieu BSS

Le milieu BSS est le milieu utilisé pour la croissance de la souche K d'*A. caldus* provenant du BRGM et reçue au LRGP le 16 Avril 2019 (différente de celle isolée par B,Johnson). La composition de la solution nutritive 50X est la suivante :

- Na₂SO₄ 3,30 g
- (NH₄)SO₄ 22,50 g
- KCl 2,50 g
- MgSO₄ 25,00 g
- KH₂PO₄ 2,50 g
- Ca(NO₃)₂, 4H₂O 0,70 g (le notre est plus hydraté, donc on met 1,50g)
- Solution d'éléments trace 1,00 mL
- S⁰ 5,00 g
- Eau distillée (qsp 1 litre)

La solution d'éléments trace, livrée déjà préparé par le BRGM est la suivante :

- ZnSO₃,7H₂O 10,00 mg
- CuSO₄,5H₂O 1,00 mg
- MnSO₄, 4H₂O 1,00 mg
- CoSO₄,7H₂O 12,00 mg
- Cr₂(SO₄)₃,15H₂O 0,50 mg
- H₃BO₃ 0,60 mg
- Na₂MoO₄, 2H₂O 0,50 mg
- NiSO₄,6H₂O 1,00 mg
- Na₂SeO₄, 10H₂O 1,00 mg
- Na₂WO₄, 2H₂O 0,10 mg
- NaVO₃ 0,10 mg
- Eau distillée (qsp 1L)

Ajuster le pH avec du 6N H₂SO₄ (3M) jusqu'à 2,0.

Les solutions doivent être stérilisées indépendamment comme ci-après :

- La solution de base et d'éléments trace par autoclavage (le vanadate demande plusieurs jours pour se redissoudre après autoclavage)
- Le soufre élémentaire par autoclavage à 110°C pendant 40 minutes durant 3 jours d'affilés et entrecoupés de passages en incubateur à 30°C pendant 24h.

La solution de base et la solution d'éléments trace (1mL) peuvent être réunies. Puisque le soufre n'est pas miscible dans l'eau, il est préférable de l'ajouter indépendamment à raison de 0,5% (m/v).

Préparation d'une solution 1X : préparer 1L de solution BSS en diluant 20 mL de solution BSS 50X dans 980 mL d'eau distillée, puis ajuster son pH entre 1,8 et 2. Noter le pH puis autoclaver la solution.

2.2. Repiquage

Le principe est celui du « repiquage », consistant à inoculer à intervalle de temps régulier, dans un milieu de culture « neuf » contenant les éléments nutritifs et le substrat, la culture bactérienne précédente.

2.2.1. Premier repiquage

Matériel nécessaire :

- 1 erlenmeyer de 50 mL autoclavé (avec coton et aluminium)
- Milieu de culture (0Km, BSS ou 150a)
- Soufre stérile
- 5 à 10 mL de culture active

Préparer 18 mL de solution nutritive (BSS pour la souche BRGM, 0Km pour la souche de Barrie Johnson, 150a pour la souche DSMZ) et les ajouter à l'erlenmeyer de 50 mL autoclavé. Ajouter à la solution 2 mL de culture active (inoculum à 10% v/v) puis 100mg de soufre élémentaire S⁰. Noter au feutre le niveau de milieu.

Incuber à 45°C (pour la souche DSMZ) ou 42°C (pour les deux souches BRGM) sur table d'agitation à 100 RPM. (diamètre orbital à définir)

La croissance devrait devenir évidente après 2-5j de cultures. La croissance est observable par le soufre qui coule au fond de l'erlenmeyer. Il est nécessaire de vérifier tous les jours que le milieu ne s'évapore pas trop par rapport au trait. Une fois la phase exponentielle atteinte, la culture doit être immédiatement repiquée puisque les souches pures d'*A. caldus* ne sont pas stables dans le temps.

2.2.2. Deuxième repiquage

Matériel nécessaire :

- 1 erlenmeyer de 150 mL autoclavé (avec coton et aluminium)
- Milieu de culture 1X (0Km, BSS ou 150a)
- Soufre stérile
- La culture précédente

Préparer 27 mL de solution nutritive (BSS pour la souche BRGM, 0Km pour la souche de Barrie Johnson, 150a pour la souche DSMZ) et les ajouter à l'erlenmeyer de 150 mL autoclavé. Ajouter à la solution 3 mL de culture active (inoculum à 10% v/v) puis 150mg de soufre élémentaire S⁰. Noter au feutre le niveau de milieu.

Incuber à 45°C (pour la souche DSMZ) ou 42°C (pour les deux souches BRGM) sur table d'agitation à 100 RPM. (diamètre orbital à définir)

La croissance devrait devenir évidente après 2-5j de cultures. La croissance est observable par le soufre qui coule au fond de l'erenmeyer. Il est nécessaire de vérifier tous les jours que le milieu ne s'évapore pas trop par rapport au trait. Une fois la phase exponentielle atteinte, la culture doit être immédiatement repiquée puisque les souches pures d'*A. caldus* ne sont pas stables dans le temps. Conserver une sauvegarde du contenu de la culture précédente dans un tube de type Falcon50 et incubée dans les mêmes conditions que la nouvelle.

2.2.3. Troisième repiquage

Matériel nécessaire :

- 1 erlenmeyer de 250 mL autoclavé (avec coton et aluminium)
- Milieu de culture 1X (0Km, BSS ou 150a)
- Soufre stérile
- La culture précédente

Préparer 45 mL de solution nutritive (BSS pour la souche BRGM, 0Km pour la souche de Barrie Johnson, 150a pour la souche DSMZ) et les ajouter à l'erenmeyer de 250 mL autoclavé. Ajouter à la solution 5 mL de culture active (inoculum à 10% v/v) puis 250mg de soufre élémentaire S⁰. Noter au feutre le niveau de milieu.

Incuber à 45°C (pour la souche DSMZ) ou 42°C (pour les deux souches BRGM) sur table d'agitation à 100 RPM. (diamètre orbital à définir) Conserver une sauvegarde du contenu de la culture précédente dans un tube de type Falcon50 et incubée dans les mêmes conditions que la nouvelle. Jeter la sauvegarde précédente.

2.2.4. Quatrième repiquage

Matériel nécessaire :

- 1 erlenmeyer de 500 mL autoclavé (avec coton et aluminium)
- Milieu de culture 1X (0Km, BSS ou 150a)
- Soufre stérile
- La culture précédente

Préparer 90 mL de solution nutritive (BSS pour la souche BRGM, 0Km pour la souche de Barrie Johnson, 150a pour la souche DSMZ) et les ajouter à l'erenmeyer de 500 mL autoclavé. Ajouter à la solution 10 mL de culture active (inoculum à 10% v/v) puis 500mg de soufre élémentaire S⁰. Noter au feutre le niveau de milieu.

Incuber à 45°C (pour la souche DSMZ) ou 42°C (pour les deux souches BRGM) sur table d'agitation à 100 RPM. (diamètre orbital à définir) Conserver une sauvegarde du contenu de la culture précédente dans un tube de type Falcon50 et incubée dans les mêmes conditions que la nouvelle. Jeter la sauvegarde précédente.

2.2.5. Cinquième repiquage

Matériel nécessaire :

- 1 erlenmeyer de 1L autoclavé (avec coton et aluminium)

- Milieu de culture 1X (0Km, BSS ou 150a)
- Soufre stérile
- La culture précédente

Préparer 180 mL de solution nutritive (BSS pour la souche BRGM, 0Km pour la souche de Barrie Johnson, 150a pour la souche DSMZ) et les ajouter à l'erenmeyer de 1L autoclavé. Ajouter à la solution 20 mL de culture active (inoculum à 10% v/v) puis 1g de soufre élémentaire S⁰. Noter au feutre le niveau de milieu.

Incuber à 45°C (pour la souche DSMZ) ou 42°C (pour les deux souches BRGM) sur table d'agitation à 100 RPM. (diamètre orbital à définir) Conserver une sauvegarde du contenu de la culture précédente dans un tube de type Falcon50 et incubée dans les mêmes conditions que la nouvelle. Jeter la sauvegarde précédente.

2.3. SUIVI / CONTRÔLE

Il est nécessaire de suivre les cultures afin de s'assurer de la viabilité des bactéries. Le fait que le soufre élémentaire tombe au fond de l'erenmeyer est déjà un indicateur de biomasse. Le soufre flotte sauf quand il est consommé par les bactéries.

On peut également surveiller la culture grâce à l'utilisation d'une cellule de Toma et d'un microscope optique. La cellule est remplie à ras bord dans ses fentes de culture bactérienne et une lamelle de verre est adhérente dessus par capillarité. On doit pouvoir observer et dénombrer dans le quadrillage de la cellule des bactéries vivantes.

Annexe 3 : Protocoles de montage et démontage du réacteur

Protocole de mise en place et démontage d'un réacteur

1. Avant autoclavage

Le réacteur utilisé est un réacteur APPLIKON de 2L disposant d'une agitation via deux hélices Rushton (6 pales).

1.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture est un milieu minimum 0Km supplémenté de soufre élémentaire S⁰. Pour une inoculation à 10% v/v, on a :

- 1800 mL de 0Km. Soit, pour du 0Km 5X : 360 mL de 0Km et 1440 mL d'eau du robinet,
- 0,5% w/v de soufre élémentaire S⁰, soit 10 g pour 2L. La quantité de soufre inoculée variera en fonction des expériences.

Le milieu 0Km est autoclavable mais le soufre élémentaire est sensible à la température. Ne pas dépasser 110°C.

1.2. Préparation des sondes

Dans notre cas, on utilise deux sondes placées sur les deux gros trous à vis de la platine (cf. Figure 1.) :

- pH = à calibrer à l'aide de la console : F2 Manual, Calibration, F2 pH, Execute, F4 Temperature, rentrer la température, F5 Edit, rentrer le pH de l'étalon (1^e étalon : pH 4,00), F4 Continue, tremper dans l'étalon et lire. Puis on recommence avec le 2^e étalon (pH 1,67).
- Oxygène dissous = il faut remettre de l'électrolyte à l'intérieur. Elle sera calibrée *in situ* quand le réacteur sera à température.

Les sondes doivent être découplées puis protégées avec du papier alu et du coton pour l'autoclavage.

1.3. Préparation du réacteur

Remplir la cuve à l'aide des 1800 mL de milieu 0Km et du soufre élémentaire préparés. Ensuite, mettre en place sa platine du réacteur.

Branchés sur la platine se trouvent (Figure 2.) :

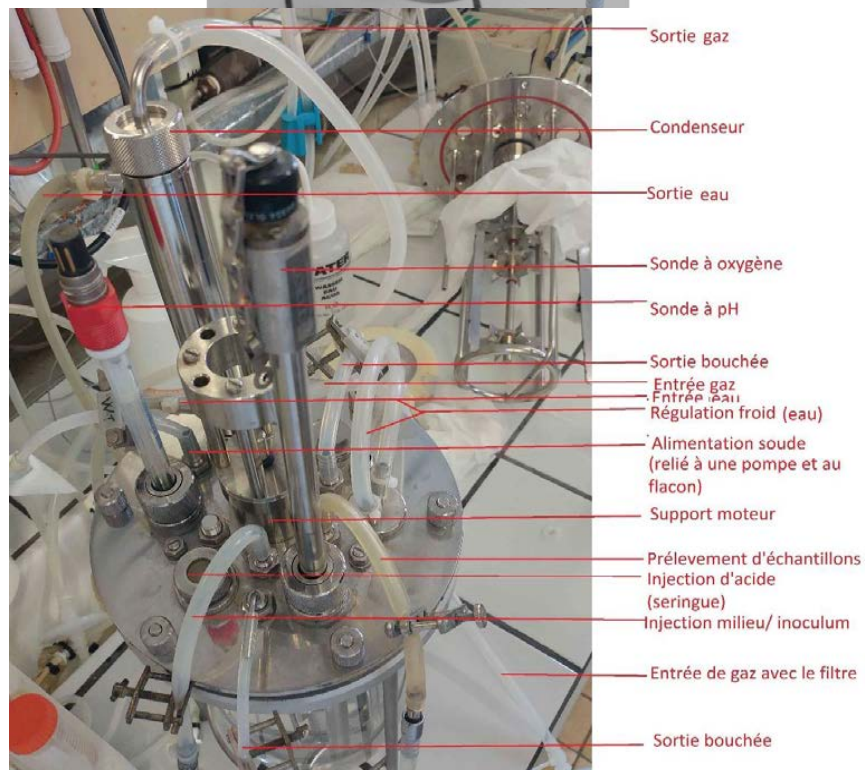
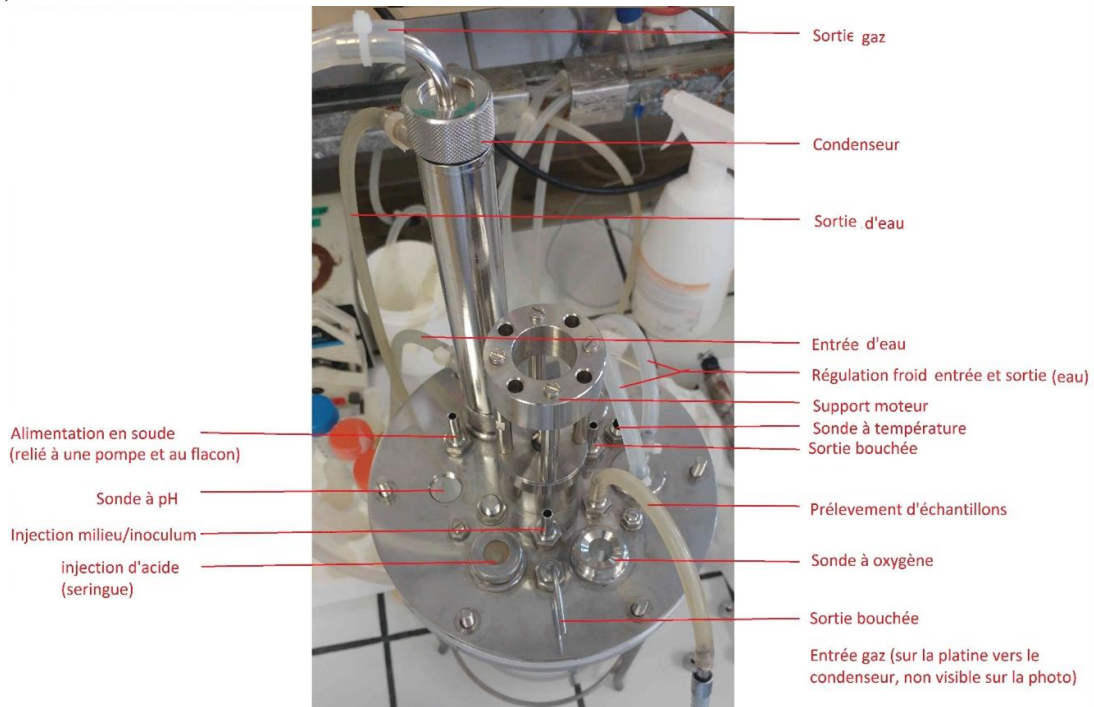
- Un condenseur, avec entrée et sortie d'eau (entrée par le bas), et une sortie de gaz par le haut avec un filtre. Le filtre est à protéger au papier alu pour l'autoclavage.
- Un système de régulation du froid, avec une entrée et une sortie d'eau
- Un tuyau avec canule dévissable pour le prélèvement d'échantillons
- Un autre pour l'entrée de l'inoculum

- Un tuyau d'alimentation en soude, à protéger par un plastique d'emballage de seringue pour l'autoclavage

- Une entrée de gaz avec filtre protégé par papier aluminium

Avant d'autoclaver, il faut boucher toutes les autres sorties avec des raccords noués, mettre des pinces en T sur tous les tuyaux sauf les tuyaux de gaz et d'eau. Bien fixer les tuyaux sur les embouts de la platine quand nécessaires avec des cordons de sécurité en plastiques.

Autoclaver 10 minutes à 110°C le réacteur et la fiole de lancement (protégée de manière similaire).



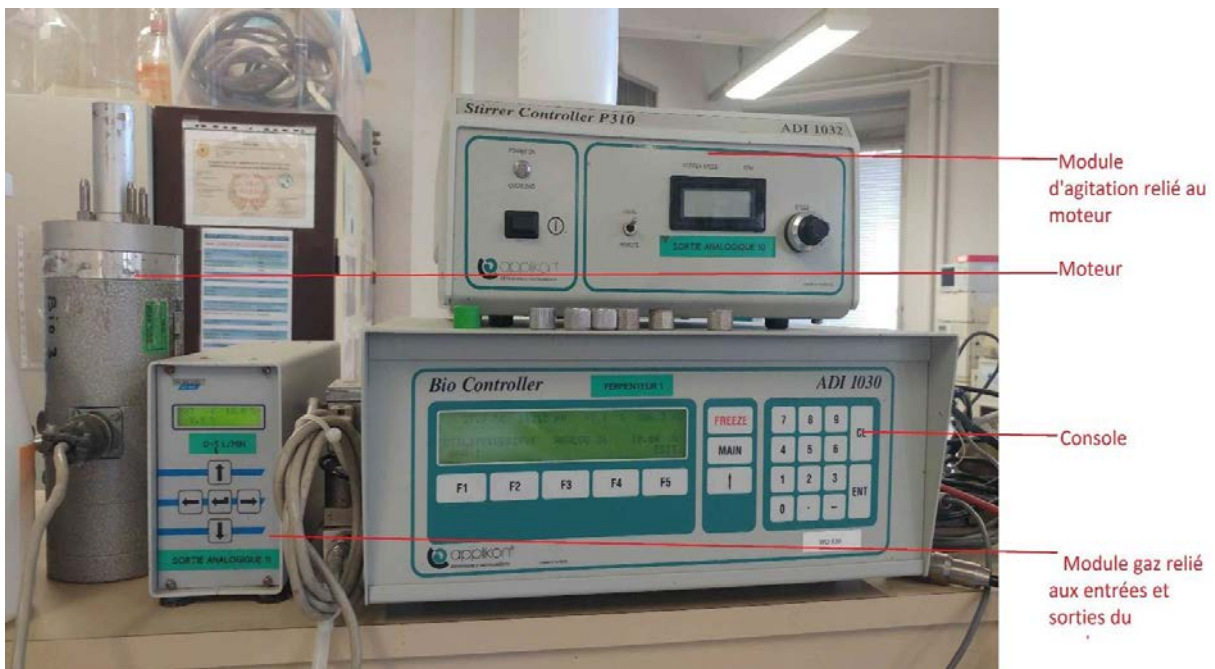
2. Après autoclavage

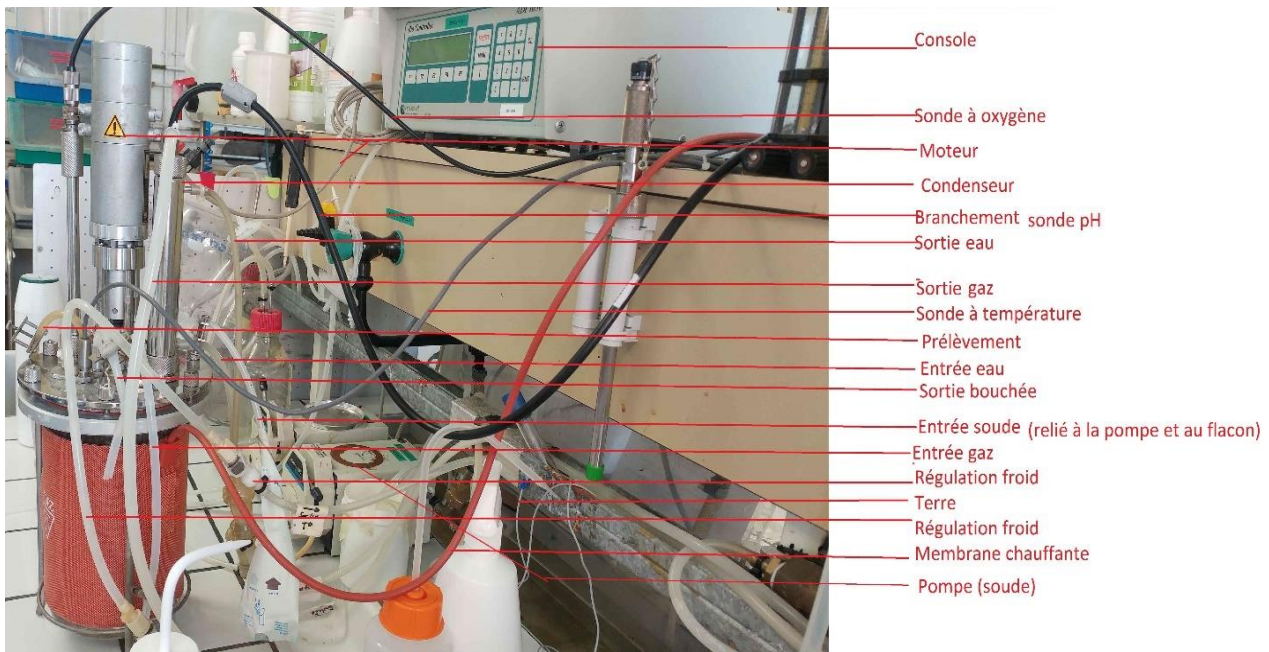
Après autoclavage, enlever les papiers de protection ainsi que le papier alu et les cotons.
Connecter les divers composants du réacteur :

- Les sondes à la console
- Les entrées et sorties de gaz au module gaz calibré sur 0,5L/min (vvm) dans notre cas
- La régulation du froid au réseau d'eau
- Le condenseur à son boîtier (entrée et sortie eau)

De même, on rajoute :

- La membrane chauffante (reliée à la console)
- La sonde à température après avoir rempli son orifice d'eau reliée à la console
- Le moteur relié à son module calibré sur 700rpm dans notre cas
- Une seringue d'acide sulfurique pour éventuelle régulation manuelle au point d'injection (5mL de solution 5M)
- L'entrée de soude à la pompe et au flacon contenant une solution de 20g de soude dans qsp 500mL d'eau distillée. La partie plongeant dans la soude du tuyau est la partie biseautée. Le niveau de soude est marqué au feutre sur le flacon (afin de vérifier le volume final injecté).
- La terre reliée à la platine
- Sécher le filtre en injectant un peu d'air





3. Injection de l'inoculum

L'inoculum est injecté grâce à une fiole de lancement autoclavée, avec une entrée d'air comprimé avec filtre (également protégé par papier alu avant autoclavage) et une sortie pour l'inoculum. Cette sortie sera reliée à la canule prévue à cet effet sur le réacteur.

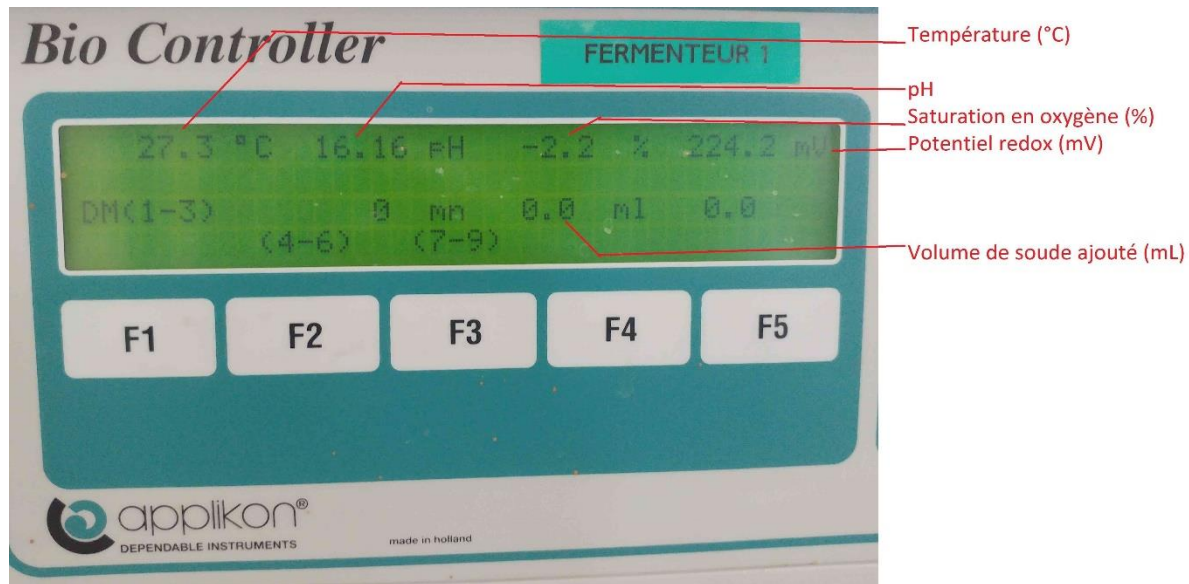


3. Prélèvements

Pour les prélèvements pour analyse microscopique de la biomasse, on utilise une seringue de 10mL sur la canule de prélèvement. Un volume mort de 10mL environ est éliminé. On

garde environ 500µL en tube à essai, qui sera éventuellement dilué. On archive également un vial HPLC au frigo pour éventuelle HPLC future. Le contenu du vial doit être filtré.

Les valeurs à relever régulièrement à l'écran de la console pour la cinétique seront la température, le pH, la saturation en oxygène, le potentiel redox et la quantité de soude injectée.



5. Démontage

Eteindre et enlever le moteur

Eteindre le gaz derrière le boîtier

Désactiver les contrôles de la console (Process> Control> All> Stop)

Enlever la sonde à oxygène, la rincer légèrement, et remettre de l'électrolyte dedans

Enlever les autres sondes et les rincer légèrement

Enlever la terre, la régulation froid, le tuyau de gaz, le bloc condenseur, les canules, les pinces

Vérifier que la pompe est éteinte et débrancher le tuyau de soude et placer l'extrémité dans la bouteille pour éviter que ça coule

Enlever la membrane et vérifier qu'elle ne chauffe plus

Garder 200mL d'inoculum pour ré-ensemencer le prochain réacteur

Laver le réacteur et sa platine au lave-vaisselle en plaçant les extrémités des tuyaux d'air et eau sur les buses pour un bon nettoyage

Résumé

La biolixiviation consiste en la récupération de métaux d'intérêt (or, cobalt...) à l'aide de microorganismes. C'est une technique prometteuse à l'avenir et qui présente un enjeu économique et écologique. Afin d'optimiser les procédés, il est nécessaire de créer des modèles mathématiques pour appréhender les phénomènes auxquels on s'intéresse. Pour la partie cinétique d'un modèle en cours de création au laboratoire, il est nécessaire d'obtenir les constantes cinétiques des bactéries courantes de biolixiviation, comme le taux de croissance μ utilisé dans la loi de Monod, une des principales lois de la cinétique. Lors de ce stage, celles d'*Acidithiobacillus caldus*, dont peu de données sont documentées dans la littérature, seront donc déterminées expérimentalement grâce à des cultures en bio-réacteurs à des concentrations en substrat différentes. Ceci s'effectuera à l'aide de comptages cellulaires ainsi que grâce à des relevés de mesures à l'aide de sondes. On pourra alors tirer des conclusions de l'influence de la concentration en substrat sur le métabolisme de la bactérie.

Bioleaching consists of reuptake of metals of interest (gold, cobalt...) thanks to microorganisms. It's an hopeful method which represents an economical and ecological challenge. In order to optimize processes, it's necessary to create mathematical models to understand phenomena of interest. Concerning the kinetics part of a model, which is in progress at our laboratory, it's necessary to determine the kinetic data of common bioleaching bacteria, like the growth rate μ , used for one of the main kinetic laws, Monod's equation. During this internship, those of *Acidithiobacillus caldus*, of which little data are known in the literature, will be experimentally determined thanks to the monitoring of stirred tank reactor cultures at different substrate concentrations. This will be made thanks to cell counts and probes. It will be possible to conclude about the influence of substrate concentration on the metabolism of the bacteria.

Mots clefs : Biolixiviation, bio-réacteur, cinétique, *Acidithiobacillus caldus*, loi de Monod.