



HAL
open science

Contribution à l'étude de réactions à l'interface bactérie-minéral au cours de la lixiviation de minéraux sulfurés (pyrites) par *Thiobacillus ferrooxidans*

Marie-Antoinette Dziurla

► **To cite this version:**

Marie-Antoinette Dziurla. Contribution à l'étude de réactions à l'interface bactérie-minéral au cours de la lixiviation de minéraux sulfurés (pyrites) par *Thiobacillus ferrooxidans*. Microbiologie et Parasitologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1995. Français. NNT : 1995NAN10416 . tel-01748630

HAL Id: tel-01748630

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748630>

Submitted on 29 Mar 2018

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-theses-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>



FACULTÉ DES SCIENCES
U.F.R. S.T.M.P.
Groupe de Formation Doctorale des Sciences de la Terre

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Géomicrobiologie

par

Marie-Antoinette DZIURLA

Contribution à l'étude de réactions à l'interface Bactérie-Minéral au cours de la lixiviation de minéraux sulfurés (pyrites) par *Thiobacillus ferrooxidans*

soutenue publiquement le 14 décembre 1995 devant la Commission d'Examen :

Membres du Jury

MM. A. HERBILLON, Professeur à l'Université Henri-Poincaré, Nancy I,	Président du Jury
J.L. GARCIA, Directeur de Recherche, ORSTOM, Marseille	Rapporteur
F. THOMAS, Chargé de Recherche, C.N.R.S., Nancy	Rapporteur
D.B. JOHNSON, Senior Lecturer, School of Biological Sciences, University of North Wales, Bangor	Examineur
A. MARCÉ, Ingénieur, Direction Scientifique ADEME, Paris	Examineur
J. BERTHELIN, Directeur de Recherche, C.N.R.S. Nancy	Directeur de thèse
M. BELIÈRES, Ingénieur, Service STM, COGEMA, Velizy-Villacoublay	Membre invité
D. MORIN, Ingénieur, Département Géomatériaux et Géoprocédés, BRGM, Orléans	Membre invité

Avant Propos

Ce travail a été réalisé avec le soutien de l'ADEME représentée par M^r A. Marcé et M^{me} A. Bonnamour, de la COGEMA, du BRGM et de ECOTECH (CNRS), dans le cadre de l'Action de Recherche Concertée "Biotechnologies Minérales". Je leur adresse mes plus vifs remerciements.

Mes plus chaleureux remerciements vont aux trois personnes qui m'ont formée à la recherche :
F. Thomas, Chargé de Recherche au CNRS qui, par ses discussions et ses critiques nombreuses m'a guidée sur le plan scientifique, pour la rédaction de la thèse et m'a également apporté beaucoup sur le plan humain,

M. Monroy, chercheur à l'Université de San Luis Potosi au Mexique qui, au cours de 2 années de thèse passées ensemble, m'a initiée aux techniques de lixiviation et à la connaissance des minéraux. Une véritable collaboration scientifique et une amitié sans limites sont issues de ces travaux,

J. Berthelin, Directeur de Recherche au CNRS qui a su suivre et diriger ce travail tout au long de sa réalisation, et qui m'a aussi accordé une grande autonomie, tout en m'apportant de précieux conseils sur le plan humain.

A. Herbillon, Professeur à l'Université de Nancy I et Directeur du Centre de Pédologie Biologique m'a accueillie dans son laboratoire et m'a honorée de sa présence dans le jury. Je tiens à l'en remercier.

D.B. Johnson, Senior Lecturer, the School of Biological Sciences, University of North Wales, à Bangor, avec qui a été réalisé un projet de post-doctorat, m'a honorée de sa présence dans le jury. Je tiens à le remercier et à lui témoigner toute ma reconnaissance.

A Monsieur J.L. Garcia qui a accepté d'être rapporteur, et à MM. A. Marcé, M. Bélières et D. Morin qui ont accepté de juger ce travail, j'adresse mes plus vifs remerciements.

Je suis également très reconnaissante envers mes amis et collaborateurs du Centre de Pédologie Biologique N. Bousserhine, B.T. Lam, T. Heulin, W. Achouak, O. Berge, M. Bourrain, D. Venditti, Ph. Van den Koornhuysse, J.L. Rajot, I. Weissenhorn, G. Belgy mon voisin de bureau, par qui j'ai peut-être été un peu favorisée pour les dosages ICP, G. Villemin, qui a réalisé avec moi les observations au microscope électronique, M. Bloin, qui a construit les réacteurs de biooxydation, E. Jeanroy, qui a montré beaucoup de patience et m'a accordé beaucoup de son temps pour dactylographier ce manuscrit, C. Mustin, Chargé de Recherches au CNRS et aussi mon prédécesseur dans le cadre de ces études, mes amis du Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Ph. Marion et O. Barrès qui a réalisé les analyses par spectrométrie infra-rouge.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GENERALE	3
CHAPITRE I : ETAT DES CONNAISSANCES : LE MINÉRAL, LA BACTÉRIE ET L'OXYDATION DU MINÉRAL	
I.- LA PYRITE (d'après Mustin 1992)	7
II.- LA BACTÉRIE	9
A.- CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES	9
B.- TEMPÉRATURE ET pH DE CROISSANCE	9
C.- MÉTABOLISME CARBONÉ ET AZOTÉ	10
D.- MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE	11
1.- Génération d'énergie à partir des réactions d'oxydo-réduction	11
2.- Accepteurs et donneurs d'électrons chez <i>T. ferrooxidans</i>	11
3.- Energie produite par l'oxydation du soufre élémentaire et du fer ferreux, en aérobiose	11
4.- Facteurs favorisant l'oxydation du fer ferreux	12
5.- Transport des électrons du fer ferreux vers l'oxygène	13
6.- Réactions d'oxydation du soufre élémentaire	14
a- Bioénergétique de l'oxydation du soufre élémentaire	15
b- Enzymologie de l'oxydation du soufre	18
III.- OXYDATION DE LA PYRITE PAR <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	19
PREMIÈRE PARTIE : ADHÉSION DE <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> SUR LES PYRITES : ESTIMATION DIRECTE ET INDIRECTE ET APPROCHE DES MÉCANISMES.	
CHAPITRE II : ADHÉSION BACTÉRIENNE : CONNAISSANCES ACTUELLES DES MÉCANISMES ET DES MÉTHODES DE MESURE. OBJECTIFS ET DÉMARCHE DE L'ÉTUDE.	
I.- DÉFINITION DE L'ADHÉSION BACTÉRIENNE ET CONNAISSANCES ACTUELLES DES MÉCANISMES D'ADHÉSION	26
A.- DÉFINITION DE L'ADHÉSION	26
B.-CONNAISSANCES ACTUELLES DES MÉCANISMES D'ADHÉSION	26
1.- Approche physico-chimique d'étude du mécanisme d'adhésion	26
a- Théorie DLVO	26
b- Approche thermodynamique de l'énergie interfaciale	29
c.- Limites des théories physico-chimiques	31
2.- Etude du mécanisme d'adhésion : complémentarité de l'approche physico-chimique et des caractéristiques biologiques des microorganismes	31
a- Composition de la membrane bactérienne et caractéristiques de la surface cellulaire (charges, hydrophobie)	31
b.- Vers la compréhension du mécanisme d'adhésion.	33

C.-INTERACTIONS MISES EN JEU AU COURS DE L'ADHÉSION DE <i>T. ferrooxidans</i> AUX SULFURES	34
II.- MÉTHODES D'ESTIMATION DE L'ADHÉSION	35
A.- MÉTHODES INDIRECTES	35
B.- MÉTHODES DIRECTES	36
III.- OBJECTIFS ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	37
A.- RECHERCHE D'UNE MÉTHODE PRÉCISE ET SENSIBLE DE MESURE DE L'ADHÉSION	37
1.- Estimation indirecte de l'adhésion	37
2.- Estimation directe de l'adhésion	37
B.- ETUDE DE L'ADHÉSION AU COURS DE LIXIVIATIONS	38
C.- OBSERVATIONS EN MEB DES PYRITES BIOOXYDÉES	38
D.- CARACTÉRISATION DE LA SURFACE DU MINÉRAL ET DES BACTÉRIES	38
CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES MIS EN OEUVRE POUR ÉTUDIER L'ADHÉSION BACTÉRIENNE.	
I.- LES ACTEURS : BACTERIES, MILIEU NUTRITIF ET PYRITE	43
A.- BACTERIES ET CONDITIONS DE CULTURE	43
B.- LES SULFURES	44
II.- DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL D'ÉTUDE DES BIOLIXIVIATIONS ET DE L'ADHÉSION BACTÉRIENNE	45
III.- MÉTHODES	46
A.- MÉTHODES DE DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES NON ADHÉRENTES	46
1.- Comptage direct au microscope optique, en cellule de Thoma	46
2.- Technique du NPP (Nombre le plus probable) ou MPN (Most Probable Number) en plaques de microtitration	46
3. Milieux solides pour le dénombrement et l'isolement de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	47
a.- Principe de préparation et détermination de la composition des milieux	47
b.- Composition des milieux solides	47
c.- Protocole du dénombrement sur milieu solide	48
d.- Traitement statistique des résultats	49
B.- LA MÉTHODE ELIFA (ENZYME LINKED IMMUNOFILTRATION ASSAY)	49
1.- Principe	49
2.- Matériel et produits utilisés pour la réaction ELIFA	51
a.- Matériel	51
b.- Protocole de préparation des tampons de la réaction ELIFA.	51
3.- Protocole de la réaction ELIFA	52
a.- Dépôt de l'antigène	52
b.- La saturation des sites non spécifiques par la BSA.	52
c.- La réaction Ag-Ac	52
d.- Révélation de la réaction Ag-Ac	52
e.- Détermination du poids de pyrite mis en jeu au cours des réactions ELIFA	53
4.- Lavage des particules minérales avant dépôt	53
C.- ESTIMATION DES BACTÉRIES FIXÉES AU MINÉRAL PAR DÉSORPTION PHYSICO-CHIMIQUE	54

D.- OBSERVATIONS EN MEB DES GRAINS DE PYRITE APRÈS BIOLIXIVIATION	54
E.- MESURE DU POTENTIEL ζ DES BACTÉRIES ET DU MINÉRAL	56
1.-Principe de la mesure du potentiel ζ par électrophorèse (d'après Thomas, 1987)	56
2.- Mode opératoire	57
F.- CARACTÉRISATION DES PHASES SUPERFICIELLES DU MINÉRAL	58
G.- ANALYSES CHIMIQUES DE LA SOLUTION DE BIOLIXIVIATION	58

CHAPITRE IV : RÉSULTATS : MESURE DE L'ADHÉSION ET APPROCHE DES MÉCANISMES

I.- MÉTHODES INDIRECTES	61
A.- DENOMBREMENT DES BACTERIES NON ADHERENTES	61
1.- Précision	61
2.- Dénombrement des bactéries non adhérentes par cellule de Thoma, par la technique du NPP et par dilution sur milieu gélosé	62
a.- Première expérience	62
b.- Seconde expérience	64
B.- EVOLUTION DE L'ADHÉSION BACTÉRIENNE AU COURS DES PREMIÈRES 24 HEURES DE CONTACT	66
1.- Résultats	66
2.- Détermination du taux de recouvrement	66
II.- ESTIMATION DIRECTE DES BACTÉRIES FIXÉES A LA PYRITE, PAR LA MÉTHODE IMMUNOENZYMATIQUE ELIFA	69
A.- DILUTION OPTIMALE DU SÉRUM	69
B.- SENSIBILITÉ DE LA RÉACTION ELIFA POUR LA DÉTECTION DE <i>T. ferrooxidans</i> : RÉACTION DES BACTÉRIES NON ADHÉRENTES - COURBE ÉTALON	70
C.- RÉACTION ELIFA DES BACTÉRIES FIXÉES AUX PARTICULES DE PYRITES	72
1.- Expériences préliminaires	
a.- Réaction des particules minérales stériles et inoculées	72
b.- Proportionnalité de la réaction en relation avec le poids de pyrite	72
2.- Réaction ELIFA sur les particules de pyrite ES et K4 après 23 heures de contact avec les suspensions bactériennes Tf/Fe ²⁺ et Tf/K4	73
a.- Relation DO-quantité de minéral	73
b.- Détermination de la quantité de bactéries fixées	75
III.- ADHÉSION EN CONDITIONS OPTIMALES DE BIOOXYDATION	77
IV.- EVOLUTION DES BACTÉRIES FIXÉES AU COURS D'UNE BIOLIXIVIATION DE PYRITE : MESURE APRÈS DÉSORPTION	78
A.- DESORPTION DES BACTERIES FIXEES À LA PYRITE K2 APRÈS 50 JOURS DE BIOLIXIVIATION EN REACTEUR	79
B.- EVOLUTION DES BACTERIES FIXEES ET SOLUBILISATION MINÉRALE AU COURS D'UNE BIOOXYDATION DE PYRITE ES (FRACTION 32-53 μm).	80
1.- Suivi des bactéries au cours de la biooxydation	80
2.- Suivi de la biooxydation de la pyrite, à l'aide des paramètres chimiques	83
V.- OBSERVATIONS EN MEB DES GRAINS DE PYRITE APRÈS BIOLIXIVIATION	84
A. - ECHANTILLON I PRELEVE AU COURS DE LA PHASE D'AMORCE D'OXYDATION	85

B. -ECHANTILLON II	89
1.- Echantillon II opt prélevé au cours de la phase optimale d'oxydation.	89
2. -Echantillon IIral prélevé au cours de la phase de ralentissement de l'oxydation	93
C.- ECHANTILLON III PRÉLEVÉ AU COURS DE LA PHASE STATIONNAIRE D'OXYDATION (Planches V et VI)	98
1. -Images au MEB	98
2. -Images EDS	98
3. Observations au microscope optique, après coloration au bleu de Toluidine	99
 VI.- PROPRIETES DE SURFACE DES BACTERIES ET DU MINERAL	 105
A.-LE POTENTIEL ζ SUR <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> ADAPTÉ À LA PYRITE K2.	105
B.-ETUDES DE LA SURFACE DE LA PYRITE	106
1.-Mise en évidence des espèces présentes à la surface des pyrites, par spectrométrie infrarouge en réflexion diffuse.	106
a.- Spectres des 2 pyrites à la granulométrie 32-53 μm	106
b.- Spectres des pyrites à la granulométrie 5-20 μm	107
2.-Le potentiel ζ de la pyrite	108
3.-Le potentiel ζ dans le milieu M1	110
C.- DISCUSSION	111
 CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE ET PERSPECTIVES	 113
 DEUXIÈME PARTIE - CHAPITRE V:	
CONTRIBUTION DU CONTACT DIRECT BACTÉRIE-MINÉRAL AU PROCESSUS D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	
I.- INTRODUCTION ET OBJECTIFS	121
II. - CONNAISSANCES ACTUELLES, DES CONSÉQUENCES DE L'ADHÉSION SUR L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE, ET DU RÔLE DU CONTACT BACTÉRIE-MINÉRAL DANS LE PROCESSUS D'OXYDATION DES SULFURES	121
A.- CONSÉQUENCES DE L'ADHÉSION SUR L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE	122
1.- Accumulation de molécules à l'interface solide-liquide et conséquences	122
a.- Conséquences de la concentration de molécules de faible masse moléculaire à la surface d'un support	122
b.- Conséquences de l'interaction de macromolécules avec une surface solide	123
2.- Influence des propriétés physico-chimiques de l'interface sur l'adhésion des bactéries et leur activité	123
a.- Contrôle de la répartition cellulaire à la surface d'un support	123
b.- Modifications indirectes de l'activité bactérienne	123
c.- Modifications directes de l'activité bactérienne	124
B.- ROLE DU CONTACT BACTÉRIE-MINÉRAL DANS LE PROCESSUS D'OXYDATION DE SULFURES	125
III.- DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	126
IV.- MATÉRIEL ET MÉTHODES	127
A.- RÉACTEUR À DEUX COMPARTIMENTS	127
B.- CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	128

C.- MÉTHODES D'ANALYSES	130
1.- Suivi des populations bactériennes	130
2.- Analyses chimiques de la solution de biolixiviation	130
a.- Dosage du fer solubilisé	130
b.- Estimation du Fe ²⁺ par la méthode colorimétrique à l'ortho-phénanthroline	130
3.- Analyses des constituants minéraux présents à la surface des pyrites	131
V.-RÉSULTATS et DISCUSSION	132
A.- INCIDENCE DU CONTACT BACTÉRIE-MINÉRAL SUR LA CINÉTIQUE D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR <i>thiobacillus ferrooxidans</i>	132
1.- Comparaison de l'oxydation de la pyrite avec ou sans contact entre la bactérie et le minéral	132
a.- En l'absence de contact	132
b.- En cas de contact total bactérie-minéral	135
2.- Comparaison de l'oxydation du minéral en cas de "semi-contact", de contact total et absence de contact	139
B.- EVOLUTION DIFFÉRENTIELLE DES PHASES SUPERFICIELLES DE LA PYRITE SOUS L'EFFET DE L'OXYDATION CHIMIQUE ET DES BACTÉRIES EN CONTACT	141
1.- Spectre de la pyrite initiale	142
2.- Spectres obtenus dans le cas d'une oxydation indirecte par action du seul sulfate ferrique	143
3.- Spectres obtenus dans le cas du semi-contact	144
VI.- CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE ET PERSPECTIVES	146

TROISIÈME PARTIE : RÉACTIONS À L'INTERFACE BACTÉRIE-MINÉRAL : RÔLE FONDAMENTAL DE QUELQUES PROPRIÉTÉS DES PYRITES ET DE L'ACTIVITÉ OXYDANTE DE *Thiobacillus ferrooxidans*.

CHAPITRE VI : CONNAISSANCES ORIENTANT CETTE PARTIE DE L'ÉTUDE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX

I.- LES RÉACTIONS DE BIOOXYDATION : RÉACTIONS ÉLECTROCHIMIQUES	153
II.- INFLUENCE DES PROPRIÉTÉS MINÉRALOGIQUES, CRISTALLOCHIMIQUES ET ELECTROCHIMIQUES DES PYRITES SUR LE PROCESSUS DE BIOOXYDATION	155
III.- INFLUENCE DES CARACTÉRISTIQUES DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE SUR LE PROCESSUS DE BIOOXYDATION	157
A.- VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE AVEC LA NATURE DU SUBSTRAT	157
B.- INTÉRÊT DE LA CAPACITÉ DE <i>T. ferrooxidans</i> À OXYDER LE SOUFRE ET SES COMPOSÉS RÉDUITS	159
IV.- OBJECTIFS DE CETTE PARTIE DE L'ÉTUDE	160

CHAPITRE VII : MATÉRIEL ET MÉTHODES MIS EN OEUVRE POUR ÉTUDIER LES RÉACTIONS À L'INTERFACE *T. ferrooxidans*/PYRITES.

I.- SUIVI DES POPULATIONS BACTÉRIENNES	163
II.- MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE D'OXYDATION DU Fe ²⁺ PAR LES BACTÉRIES	163
A.- RÉACTION ENZYMATIQUE : OXYDATION DU Fe ²⁺ PAR LES BACTÉRIES	163
B.- DOSAGE DU Fe ²⁺ PAR LA MÉTHODE À L'ORTHO-PHÉNANTHROLINE	164
C.- DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE Fe ²⁺ PERMETTANT D'OBTENIR LA VITESSE MAXIMALE DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE	165
III.- DOSAGE DES PROTÉINES BACTÉRIENNES PAR LA MÉTHODE DE LOWRY MODIFIÉE, APRÈS LYSE ALCALINE DES BACTÉRIES	165
A.- LYSE ALCALINE DES BACTÉRIES	166
B.- DOSAGE DES PROTÉINES PAR LA MÉTHODE DE LOWRY MODIFIÉE	166
IV.- ANALYSES CHIMIQUES DE LA SOLUTION DE BIOLIXIVIATION	168
V.- ÉTUDE DES PHASES SUPERFICIELLES DU MINÉRAL	168
VI.- ESTIMATION DE LA GRANULOMÉTRIE ET DE LA SURFACE SPÉCIFIQUE DES PARTICULES DE PYRITE	168
A.- ANALYSES GRANULOMÉTRIQUES	168
B.- MESURE DE LA SURFACE SPÉCIFIQUE	169

CHAPITRE VIII : INFLUENCE ET ÉVOLUTION DES PHASES SUPERFICIELLES DES PYRITES - INFLUENCE DE LA TAILLE DES PARTICULES

I.- PROPRIÉTÉS DES PYRITES	173
A.- ETAT DE SURFACE DES PYRITES À LA GRANULOMÉTRIE 32-53 µm	173
B.- GRANULOMÉTRIE	174
II.- INFLUENCE ET ÉVOLUTION DES ESPÈCES MINÉRALES SUPERFICIELLES	176
A.- EVOLUTION DES BACTÉRIES ET DISSOLUTION DES PYRITES AU COURS DU PROCESSUS DE BIOOXYDATION	176
1.- Phase de latence initiale	179
2.- Phase d'amorce de l'oxydation minérale	179
3.- Phase de solubilisation optimale	179
4.- Phase de déclin	180
B.- EVOLUTION DE L'ÉTAT DE SURFACE DES PYRITES AU COURS DU PROCESSUS DE BIOOXYDATION	180
1.- Pyrite ES	180
2.- Pyrite K2	183
C.- DISCUSSION	183
III.- INFLUENCE DE LA GRANULOMÉTRIE DU MINÉRAL	186
A.- TAILLE ET SURFACE SPÉCIFIQUE DES PARTICULES	186
B.- INFLUENCE DE LA TAILLE DES PARTICULES SUR L'OXYDATION DES PYRITES	187
C.- ADHÉSION ET CROISSANCE DES BACTÉRIES	188
D.- OXYDATION DU FER FERREUX ET CROISSANCE DES BACTÉRIES	189

IV.- CONCLUSION	191
CHAPITRE IX : INFLUENCE DE L'ACTIVITE OXYDANTE DE L'INOCULUM BACTERIEN	
I.- COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ DE BACTÉRIES RÉCOLTÉES EN PHASE EXPONENTIELLE ET EN PHASE STATIONNAIRE DE CROISSANCE	195
II.- INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT (S ⁰ , Fe ²⁺ , pyrite) SUR L'ACTIVITÉ OXYDANTE DE <i>T. ferrooxidans</i> ET CONSÉQUENCES SUR LE PROCESSUS DE BIOXYDATION	197
A.- COMPARAISON PRELIMINAIRE DE L'APTITUDE DE <i>T. ferrooxidans</i> A OXYDER UNE PYRITE (K4) APRES CULTURES PREALABLES SUR Fe ²⁺ , S ⁰ ET PYRITE K4	197
B.- CROISSANCE DE <i>T. ferrooxidans</i> ET ACTIVITES OXYDANTES, VIS-A-VIS D'UNE PYRITE ET DE SES COMPOSES DE SURFACE, APRES CULTURE D'ADAPTATION SUR DIVERS SUBSTRATS (S ⁰ , Fe ²⁺ , PYRITE)	200
1. Adhésion et croissance bactérienne	200
2. Solubilisation du fer	201
3. Activité spécifique d'oxydation du Fe ²⁺	203
4. Evolution de l'état de surface du minéral	204
a. Etudes par SIRTf en réflexion diffuse	204
b.- Dosage du soufre à la surface du minéral	207
III.- ADHESION BACTERIENNE A LA FRACTION GRANULOMETRIQUE 10-32 µm	209
IV.- CONCLUSION	211
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	215
BIBLIOGRAPHIE	227
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES	

Introduction générale

Introduction Générale

Ces vingt dernières années, la raréfaction de minerais sulfurés contenant des métaux (or, cuivre, uranium) directement récupérables par traitement physique (broyage, concentration par flottation) et chimique (solubilisation, complexation) a engendré le développement de procédés de biolixiviation. Ce sont des procédés qui mettent en jeu des microorganismes, pour solubiliser les métaux, et ainsi valoriser les minerais à faible teneur (0,2 à 0,3 % pour le cuivre) et les résidus miniers des exploitations classiques (Collinet-Latil, 1989 ; Monroy, 1993).

L'une des bactéries les plus utilisées dans ce type de traitement appartient à l'espèce *Thiobacillus ferrooxidans*. Ces microorganismes acidophiles et chimiolithotrophes produisent leur énergie à partir de l'oxydation du fer (Fe^{2+}) et de composés réduits du soufre (sulfures tels que la pyrite FeS_2 , chalcopyrite CuFeS_2 , sphalérite ZnS , arsénopyrite FeAsS ; soufre élémentaire S^0 , thiosulfates $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). Elles "dissolvent" ces minéraux en produisant, d'une part du Fe^{3+} qui peut à son tour oxyder les minerais sulfurés et permettre l'extraction de métaux, et d'autre part, de l'acide sulfurique, qui favorisent tous deux la dissolution des métaux présents dans les sulfures (Berthelin, 1987).

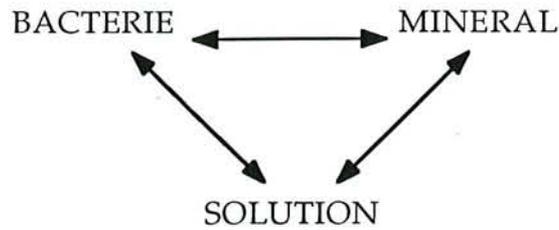
Ces microorganismes contribuent :

- ♦ à augmenter l'extraction d'or à partir de minerais dits réfractaires, dans lesquels le métal est finement disséminé dans une gangue sulfurée (pyrite ou arsénopyrite) qui l'emprisonne et le rend inaccessible au traitement chimique classique comme la complexation par cyanuration. L'utilisation de ces bactéries favorise la dissolution de la gangue sulfurée et la libération de l'or (Monroy, 1993).

- ♦ à augmenter la vitesse de solubilisation des métaux par rapport à un traitement purement chimique. Cet aspect catalytique est dû en partie au recyclage bactérien de l'oxydant chimique qu'est le Fe^{3+} (Konishi *et al.*, 1992).

Ces microorganismes sont également utilisés dans le domaine de la dépollution, dans les procédés de désulfuration de charbons, afin d'éviter les problèmes liés à l'acidification des sites de stockage et à la génération de pluies acides. Toutefois, leur activité n'est pas toujours bénéfique. Elle peut également avoir des conséquences néfastes en provoquant la corrosion de tuyauteries, l'altération de bâtiments dont les ciments renferment du fer et des sulfures. Ces bactéries participent également aux phénomènes de pollution de cours d'eau par les rejets miniers, qui se traduisent par une acidification des eaux et l'augmentation de leur teneur en métaux.

L'ensemble de ces processus met en jeu un système triphasé :



Dans ce système, les microorganismes sont présents aussi bien en suspension dans la solution, qu'à la surface du minéral. L'oxydation de la pyrite est décrite comme un processus mettant en jeu des réactions d'oxydation indirecte ou chimique, par le Fe^{3+} et des réactions d'oxydation directe, par les bactéries fixées sur la surface du minéral ou en suspension (Konishi *et al*, 1992 ; Larsson *et al*, 1993 ; Pistaccio *et al*, 1994). Comme les substrats sont alors des solides, le rôle des bactéries en contact direct avec la pyrite apparaît comme probablement très fondamental. Alors que l'adhésion ou la fixation bactérienne à la pyrite est reconnue, sa mesure précise, son mécanisme, le rôle des bactéries fixées et les réactions à l'interface Bactérie-Minéral sont mal définis (Brierley 1978 ; Konishi *et al*, 1992 ; Mustin, 1992 ; Bailey et Hansford, 1993 ; Monroy *et al*, 1994).

Ce travail a été entrepris pour préciser ces différents points. Les objectifs visent à :

- étudier l'interaction initiale des bactéries avec le minéral que nous qualifierons d'adhésion ou fixation bactérienne,
- déterminer les contributions du contact direct des bactéries au processus d'oxydation de la pyrite,
- élucider certaines des réactions d'oxydo-réduction se produisant à l'interface Bactérie-Minéral.

Le mémoire présentera d'abord, de façon non exhaustive, l'état des connaissances sur le minéral, la bactérie et les réactions d'oxydation de divers substrats. Il sera ensuite divisé en trois parties, présentant chacune l'état des connaissances, le matériel et les méthodes mis en oeuvre et les résultats et discussions spécifiques aux problèmes abordés dans la partie concernée.

La première partie portera sur l'étude de l'adhésion bactérienne et de l'évolution des bactéries fixées au cours de la biooxydation de pyrites.

Dans la deuxième partie, nous établirons les contributions du contact direct au processus de biooxydation.

Dans la troisième partie, nous aborderons la nature et la signification des réactions d'oxydo-réduction mises en jeu à l'interface bactérie-minéral, en s'intéressant plus particulièrement à certaines des propriétés du minéral et à la capacité d'adaptation de la bactérie aux phases minérales superficielles.

Chapitre I

**Etat des connaissances : le minéral,
la bactérie et l'oxydation du minéral**

**Etat des connaissances :
le minéral, la bactérie et l'oxydation du minéral**

I.- LA PYRITE (d'après Mustin 1992)

Cristal de sulfure de fer (FeS_2), la pyrite a le même éclat et la couleur que l'or, d'où son surnom "Or des fous". Malgré ce nom peu flatteur, la pyrite n'est pas toujours sans valeur : sa présence est un indice de la proximité de gisements aurifères, et elle contient parfois, avec le fer, assez de métaux précieux pour constituer un minerai valorisable. Ce minéral fut largement utilisé au Moyen Age et dans les premiers temps de l'industrie chimique comme principale source d'acide sulfurique. Le développement de nouveaux procédés de production d'acide sulfurique et la présence fréquente de pyrite dans de nombreux charbons destinés à la combustion ont progressivement diminué l'intérêt qu'on lui portait. Même dans l'industrie minière, elle est souvent considérée comme un minéral indésirable, qui limite la récupération de composés à forte valeur ajoutée ou l'utilisation de minéraux industriels. Elle oblige les valorisateurs à déployer, pour son élimination, des procédés coûteux (grillage par exemple) et souvent néfastes pour l'environnement (Tableau I.1).

Tableau I.1- Comparaison des traitements classiques et biologiques des minerais d'or réfractaires

Coût	Calcination* des sulfures	Oxydation sous pression	Biolixiviation
Investissement	1,00 (4,37)	0,77	0,57
Opération/an	1,00 (1,58)	0,91	0,95
Récupération Or	1,00 (80%)	1,05	0,95
Températures (°C)	750	210	35
Problèmes opératoires	Production de SO_2 et As [↑] Retraitement des fumées	Emploi O_2 pur Détente gaz	Renouvellement du milieu nutritif Traitement des effluents

* Pris comme référence (Coût réel entre parenthèses en millions de \$ US, Pilote 100 tonnes/jour; d'après McNulty et Thompson, 1990).

Aujourd'hui, les coûts opératoires, les réglementations sur l'environnement, les faibles teneurs en métaux précieux (l'or notamment) et des réserves limitées de minerais ont contraint les industriels et les scientifiques à approfondir leurs connaissances sur la pyrite et les sulfures associés. Pourtant, malgré ces études et l'intérêt croissant que suscite la biolixiviation des minéraux sulfurés, la chimie du soufre et des métaux de transition associés (Fe, Zn, Cu, Pb, ...) pose encore de nombreux problèmes.

Les propriétés physiques

La pyrite cristallise dans le système cubique et présente une hémicédrisme centrée, où les axes de symétrie quadratique disparaissent (Figure I.1.). Contrairement à d'autres sulfures communs, comme la galène (PbS) et la blende (ZnS), le soufre est présent sous la forme disulfure $S-S^{2-}$. La présence à la fois de liaisons ioniques (Fe-Fe et Fe-S) et de liaisons covalentes (S-S) n'est pas sans rappeler l'architecture de certaines métalloprotéines (ferrédoxines).

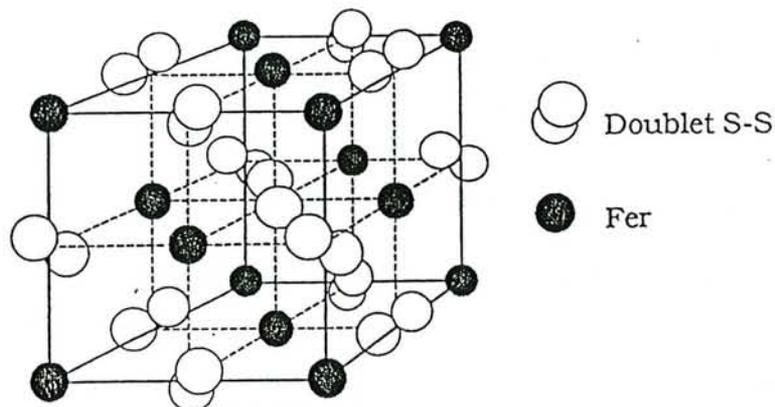


Figure I.1.- Maille élémentaire du réseau cubique de la pyrite.

De part la présence du fer sous la forme Fe^{2+} et du soufre sous la forme S_2^{2-} , qui ne présentent, l'un comme l'autre, aucun moment magnétique dans le cristal, la pyrite possède une susceptibilité magnétique positive très faible, qui peut être négligée.

A côté de compositions chimiques variables comprises généralement entre FeS_2 et $FeS_{1.94}$, de nombreux paramètres sont aussi responsables de la grande diversité des pyrites (Mustin, 1992).

Les pyrites sont de bons conducteurs, dont la résistance électrique dépend, pour un cristal donné, de la direction (dans un facteur 20), et pour une face donnée, du cristal (dans un facteur 1000). Cette complexité de comportement électrique est due à l'occurrence fréquente de deux types de semi-

conducteurs n et p dans les pyrites. Ces propriétés semi-conductrices sont attribuées à la proportion d'impuretés (Pb, Co, Ni, As...) présentes dans le sulfure et du rapport stœchiométrique entre cations métalliques et anions au sein du cristal (Crundwell, 1988). En général, un excès de cations métalliques crée une semi-conductivité de type n et, à l'inverse, un excès d'anions sulfures une semi-conductivité de type p.

II.- LA BACTÉRIE

D'un point de vue microbiologique, les microorganismes de l'espèce *Thiobacillus ferrooxidans* figurent parmi les bactéries acidophiles les plus étudiées : elles sont relativement faciles à isoler et fréquemment présentes dans les rejets miniers.

A.- CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Ce sont des bacilles Gram négatif d'environ 1,5 μm de long et 0,5 μm de diamètre. En fonction de l'état physiologique et des conditions de croissance, ces bactéries peuvent également se présenter sous forme de coques ou même former des "filaments" d'une longueur de plusieurs microns du fait de l'incapacité des cellules à se séparer après division.

B.- TEMPÉRATURE ET pH DE CROISSANCE

Thiobacillus ferrooxidans est une bactérie mésophile capable de se développer entre 15 et 37°C, la température optimale de croissance étant 30°C. Des souches psychrotrophes, capables de se développer entre 2 et 37°C, ont également été isolées .

Le pH optimum de croissance et d'oxydation du fer est voisin de 2,0. Les valeurs extrêmes de pH pour lesquelles un développement bactérien peut se produire sont 1,5-6,0. Les variations reportées dans la littérature sont dues à l'utilisation de souches et conditions expérimentales différentes (Leduc et Ferroni, 1994).

L'une des caractéristiques les plus étonnantes des bactéries acidophiles est leur aptitude à maintenir un gradient de pH entre l'extérieur et l'intérieur des cellules, même dans des conditions de stress ou lorsque les cellules ne sont plus viables. Leur enveloppe cellulaire est comparable à celle des autres bactéries Gram négatif. Elle est constituée d'une membrane externe (ou double couche phospholipidique asymétrique) séparée d'une membrane interne (ou membrane cytoplasmique) par l'espace périplasmique. Les processus énergétiques se produisent au niveau de la membrane interne. Le cytoplasme des bactéries acidophiles, contrairement aux autres bactéries Gram négatif, est chargé positivement par rapport à l'extérieur et au au périplasme ($\Delta\Psi$ ou potentiel

transmembranaire (intérieur-extérieur) > 0). Ce fonctionnement cellulaire peut être schématisé par la figure I.2.

Ce phénomène favorise la sortie des ions H^+ produits au cours du métabolisme bactérien et s'oppose à la différence de pH de part et d'autre de la membrane interne (ΔpH (intérieur-extérieur) > 0), défavorable à l'expulsion de ces ions. Il permet ainsi, de maintenir le pH intracellulaire supérieur au pH extracellulaire, et l'activité bactérienne. Ce phénomène est probablement le résultat de propriétés physiques des cellules. Il pourrait résulter d'un potentiel de diffusion des ions H^+ (phénomène passif contrôlé par l'équilibre électrique) et d'un potentiel de Donnan, dû aux charges des macromolécules cytoplasmiques. Ce phénomène est encore à élucider (Matin, 1990).

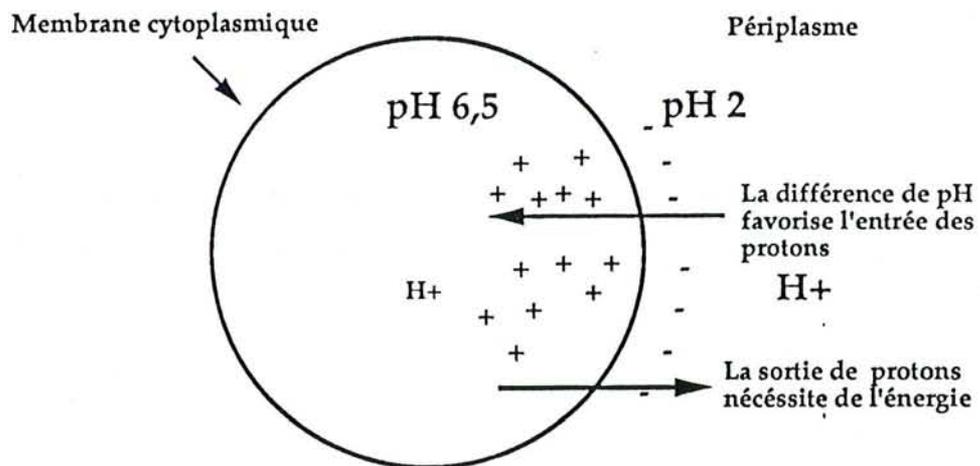


Figure I.2.- Charges et pH de part et d'autre de la membrane cytoplasmique de *Thiobacillus ferrooxidans*.

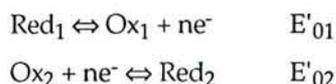
C.- MÉTABOLISME CARBONÉ ET AZOTE

T. ferrooxidans est une bactérie autotrophe stricte, qui produit son carbone organique par le cycle de Calvin, à partir du CO_2 . La source d'azote usuelle est l'ion ammonium ; certaines souches de *T. ferrooxidans* seraient également capables d'utiliser l'azote atmosphérique (Mackintosh, 1978).

D.- MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

1.- Génération d'énergie à partir des réactions d'oxydo-réduction

L'énergie nécessaire à la croissance bactérienne est obtenue par les réactions d'oxydo-réduction qui ont lieu au cours des processus de respiration bactérienne et qui peuvent se résumer de la façon suivante :



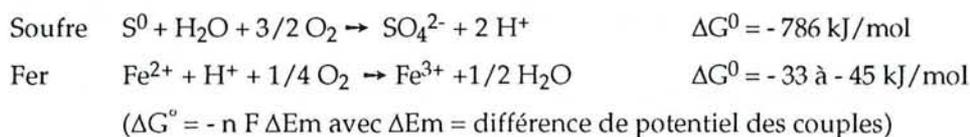
L'énergie produite au cours d'une telle réaction est d'autant plus importante que la différence de potentiel entre les deux couples Ox_1/Red_1 et Ox_2/Red_2 est plus grande.

2.- Accepteurs et donneurs d'électrons chez *T. ferrooxidans*

Les donneurs potentiels d'électrons sont les composés minéraux réduits du soufre (sulfures S^{2-}) présents dans les minéraux sulfurés, le soufre élémentaire (S^0), le thiosulfate $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ et le tétrathionate $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, le fer ferreux (Fe^{2+}), l'hydrogène moléculaire (H_2) et aussi l'acide formique (Kuenen *et al.* 1993). *Thiobacillus. ferrooxidans* a longtemps été décrite comme une bactérie aérobie stricte (accepteur final d'électrons = O_2). Cependant, les études de Das *et al.* (1992) et de Pronk *et al.* (1992) ont montré qu'elle est capable de se développer en anaérobiose, en oxydant le S^0 par réduction dissimilatrice du Fe^{3+} . Ce résultat suggère que *T.ferrooxidans* pourrait être actif dans les zones anaérobies des procédés de lixiviation en tas et dans les déchets miniers. Il reste à déterminer si elle est capable de se multiplier en anaérobiose à partir de sulfures et du Fe^{3+} .

3.- Energie produite par l'oxydation du soufre élémentaire et du fer ferreux, en aérobiose

Les potentiels d'oxydoréduction des couples intervenant dans l'oxydation du Fe^{2+} et du S^0 , en aérobiose sont réunis sur la figure I.3. Les différences de potentiel sont plus importantes entre le soufre élémentaire et l'oxygène qu'entre le fer ferreux et l'oxygène. Par conséquent, l'oxydation du S^0 apparaît énergétiquement plus favorable que celle du Fe^{2+} ; une mole de S^0 fournit effectivement 20 fois plus d'énergie que l'oxydation d'une mole de fer (Mustin, 1992) :



L'énergie disponible au cours des réactions d'oxydation du fer correspond à une différence de potentiel faible (- 350 mV), soit $\Delta G^0 = -33$ à -45 kJ/mol Fe^{2+} . L'énergie nécessaire à la synthèse d'une mole d'ATP, selon la réaction $\text{ADP} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{ATP}$ étant de $+33$ à $+44$ kJ/mol, il paraît nécessaire d'oxyder deux moles de Fe^{2+} pour produire une mole d'ATP (Ingledew, 1982).

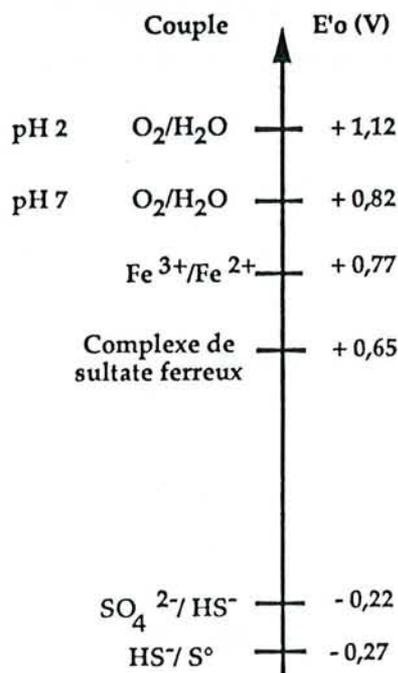


Figure I.3.- Potentiels d'oxydoréduction des couples impliqués dans l'oxydation de Fe^{2+} et du soufre élémentaire en aérobiose chez *Thiobacillus ferrooxidans*.

4.- Facteurs favorisant l'oxydation du fer ferreux

Bien que la production d'énergie au cours de l'oxydation du fer ferreux soit faible, cette oxydation est favorisée par (Blake II *et al.*, 1992) :

- l'acidité du milieu, qui augmente le potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$,
- la présence de sulfates. Des expériences de cinétique rapide montrent que les réactions d'oxydation du Fe^{2+} sont stimulées de façon spécifique par les ions sulfate ; le seul anion capable de les remplacer est le séléniate. Ils indiquent aussi que l'espèce réactive du Fe^{2+} en présence des protéines de la chaîne d'oxydation du fer est un complexe de sulfate ferreux, qui présente un potentiel redox égal à 650 mV, alors que celui du couple $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ est de 770 mV (Figure I.3). Ce résultat se traduit donc par un avantage énergétique pour les réactions d'oxydation du Fe^{2+} ,
- une concentration importante des constituants cellulaires de la chaîne d'oxydation du fer chez *T. ferrooxidans*, mais aussi l'ensemble des bactéries oxydatrices du fer ferreux.

5.- Transport des électrons du fer ferreux vers l'oxygène

Blake II *et al.* (1992), Blake II et McGinness (1993), et Nunzi (1993) l'on étudié en détail. Il apparaît maintenant évident que des bactéries oxydantes du Fe^{2+} , phylogénétiquement distinctes, expriment des protéines redox et des stratégies de transport des électrons du Fe^{2+} vers l'oxygène biochimiquement différentes (Blake II *et al.*, 1992 ; Blake II et McGinness, 1993). Chez *T. ferrooxidans*, ce mécanisme met probablement en jeu un système cytochrome c/rusticyanine. Trois modèles ont été proposés, respectivement par Ingledew (Ingledew *et al.*, 1977 ; Ehrlich *et al.*, 1991 ; Yamanaka *et al.*, 1991 et 1993 ; Blake II *et al.*, 1992). Ces modèles diffèrent par la nature des constituants impliqués dans le transfert d'électrons du Fe^{2+} vers l'oxygène et par l'ordre d'intervention de ces derniers. Les études de cinétique rapide réalisées par Blake II *et al.* (1992) indiquent que leur modèle est physiologiquement significatif.

Il implique la rusticyanine, un cytochrome c très agrégé et une oxydase terminale contenant un cytochrome a, selon l'ordre d'intervention présenté figure I.4.

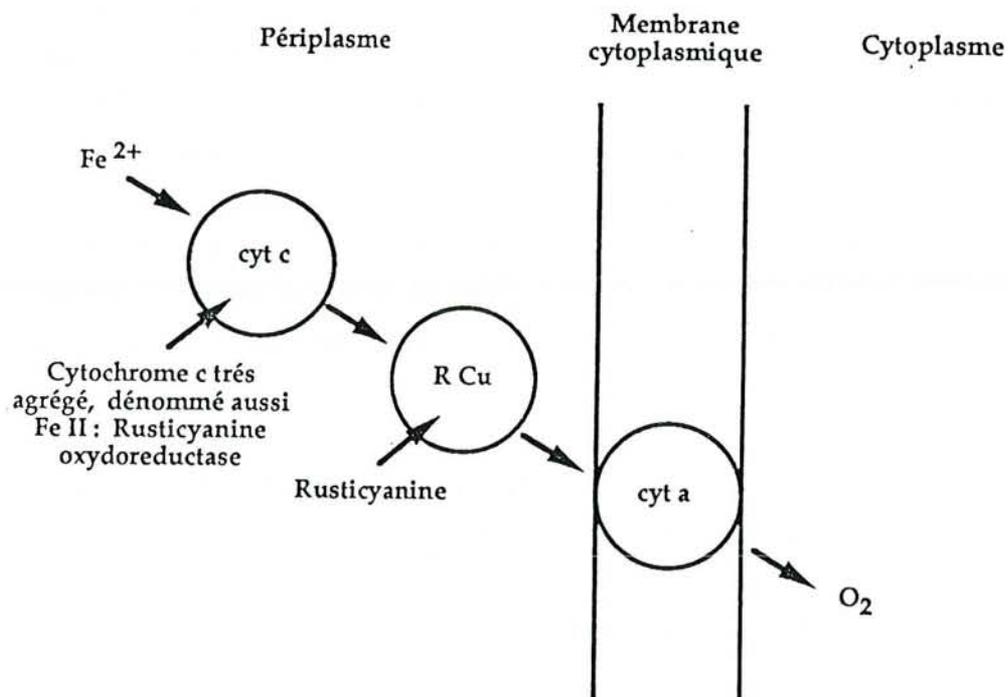


Figure I.4.- Chaîne de transfert d'électrons du Fe^{2+} à l'oxygène. Modèle présenté par Blake II *et al.*, (1992).

La rusticyanine

Elle représente le constituant le plus étudié de la chaîne de transfert d'électrons du Fe^{2+} vers l'oxygène et a été étudiée en détail par Nunzi (1993). Cette protéine à Cu de type I représente 5 à 10% des protéines solubles totales. Cette présence en grande quantité confère une couleur bleue

caractéristique de l'ion Cu^{2+} , aux extraits cellulaires bactériens (absorption à 600 nm). C'est également une protéine périplasmique, remarquablement stable à pH acide, qui demeure active pour des pH inférieurs à 1. Le potentiel redox standard de la protéine purifiée est de 680 mV et son poids moléculaire est d'environ 16,5 kDa.

Sa synthèse subit une régulation : elle est réprimée pour des bactéries de l'espèce *T. ferrooxidans* cultivées sur des composés réduits du soufre, et induite lorsque ces cellules sont mises en présence du Fe^{2+} .

Le cytochrome c fortement agrégé

Blake II *et al.* (1992) ont isolé ce cytochrome c agrégé non purifié, capable de catalyser la réduction Fe^{2+} dépendante de la rusticyanine purifiée. La préparation se montre très stable à pH 2,0 mais son exposition à pH > 3,5 l'inactive de façon irréversible. Cet agrégat présente une forte interaction des protéines qui le constituent, si bien que leur purification par les méthodes usuelles (à pH > 3,5) est impossible. Bien que cet extrait protéique ne soit pas purifié, il présente des caractéristiques cinétiques qui suggèrent son rôle de premier accepteur d'électrons et son rôle de catalyseur de la réduction Fe^{2+} -dépendante de la rusticyanine. Ces caractéristiques sont :

- la spécificité de la réaction vis à vis des ions sulfates, que seul le séléniate peut remplacer,
- l'observation d'une cinétique de saturation en relation avec la concentration de Fe^{2+} . Cette cinétique montre la formation d'un complexe $\text{Fe}^{2+}\text{-SO}_4^{2-}\text{-cyt c-rusticyanine}$, et indique que l'espèce physiologiquement réactive du Fe^{2+} est un complexe de sulfate ferreux, dont on peut estimer le potentiel redox à 650 mV. Ce complexe permet également de mieux comprendre comment un transfert d'électrons peut se réaliser entre le Fe^{2+} (potentiel redox : 770 mV) et la rusticyanine (potentiel redox : 680 mV).
- l'existence d'une vitesse de réaction physiologiquement significative. Les expériences de cinétique rapide montrent un k_{obs} (constante cinétique) compris entre 2 et 10 s^{-1} , qui correspond au nombre de transferts d'électrons du Fe^{2+} vers l'oxygène.

L'oxydase terminale contenant un cytochrome a

Une oxydase de ce type aurait un rôle dans les réactions finales de transfert d'électrons.

6.- Réactions d'oxydation du soufre élémentaire

L'oxydation du soufre élémentaire et des composés soufrés a été moins étudiée chez *T. ferrooxidans* que celle du Fe^{2+} , peut-être du fait de la réactivité importante de certains composés. Parmi les composés du soufre, le soufre élémentaire (S^0) représente certainement l'élément le plus étudié pour son mécanisme d'oxydation. Plusieurs voies enzymatiques sont probablement utilisées.

a.- Bioénergétique de l'oxydation du soufre élémentaire

L'oxydation du soufre peut avoir lieu en aérobiose et en anaérobiose. Dans ce dernier cas, l'accepteur final d'électrons est le Fe^{3+} . Actuellement, deux grandes voies bioénergétiques sont proposées pour l'ensemble de ces réactions:

- le modèle Fe^{3+} dépendant proposé par Sugio *et al.* (1989 et 1991),
- le modèle Fe^{3+} indépendant proposé par Corbett et Ingledew (1987) et Kuenen *et al.* (1993).

Ces auteurs, tout en reconnaissant la réduction du Fe^{3+} en anaérobiose sont en désaccord sur la génération d'énergie en anaérobiose et la dépendance de l'oxydation du S^0 en aérobiose vis à vis de la réduction du Fe^{3+} .

*Dans le modèle proposé par Sugio *et al.*, 1989 et 1991, mis en évidence pour la souche *Thiobacillus ferrooxidans* AP 19-3, l'oxydation du S^0 en aérobiose dépend de la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . L'énergie est produite par l'oxydation du Fe^{2+} par l'oxygène moléculaire. En anaérobiose, aucune multiplication cellulaire n'a pu être mise en évidence, suggérant que le transfert d'électrons du S^0 au Fe^{3+} n'est pas producteur d'énergie (Sugio *et al.*, 1988 a).

Le modèle peut se résumer à deux étapes :

- la première, catalysée par la SFOR_{ase} (Hydrogen Sulfide : Ferric Ion oxidoreductase), une enzyme périplasmique, qui conduit à la production d'ions sulfite (SO_3^{2-}), toxiques pour la cellule,
- la seconde, catalysée par la sulfite: Fe^{3+} oxydoréductase, une enzyme de la membrane plasmique, qui entraîne l'oxydation des ions bisulfite en sulfate et évite la toxicité des ions bisulfite (Sugio *et al.*, 1988 b).

Dans chacune des étapes, l'oxydation des composés soufrés est dépendante de la réduction du Fe^{3+} . Le Fe^{2+} produit est alors réoxydé par la cytochrome oxydase et l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire. Le schéma détaillé des réactions proposées est présenté figure I.5.

La réaction d'oxydation du S^0 par le Fe^{3+} catalysée par la SFOR_{ase} a été mise en évidence par Sugio *et al.* (1985), par l'accumulation de Fe^{2+} en anaérobiose. En aérobiose, une accumulation comparable de Fe^{2+} se produit à pH 3,0 en présence d'ions cyanure, inhibiteurs de la cytochrome oxydase. La présence d'une activité SFOR_{ase} chez 16 souches bactériennes oxydantes du fer, mésophiles et modérément thermophiles (en particulier chez toutes les souches de *T. ferrooxidans* ATCC) montre une grande répartition de cette activité parmi ce type de bactéries, et suggère que le mécanisme d'oxydation du S^0 , proposé pour *T. ferrooxidans* AP 19-3, fonctionne également chez ces autres bactéries (Sugio *et al.*, 1992).

L'importance de la réaction d'oxydation du S^0 par le Fe^{3+} dans le processus global d'oxydation du S^0 en aérobiose est encore discutée. Pour la connaître, il faudrait parvenir à inhiber

spécifiquement la réaction de la SFOR_{ase} sans bloquer la cytochrome oxydase et mesurer les conséquences de cette inhibition sur l'oxydation globale du S⁰.

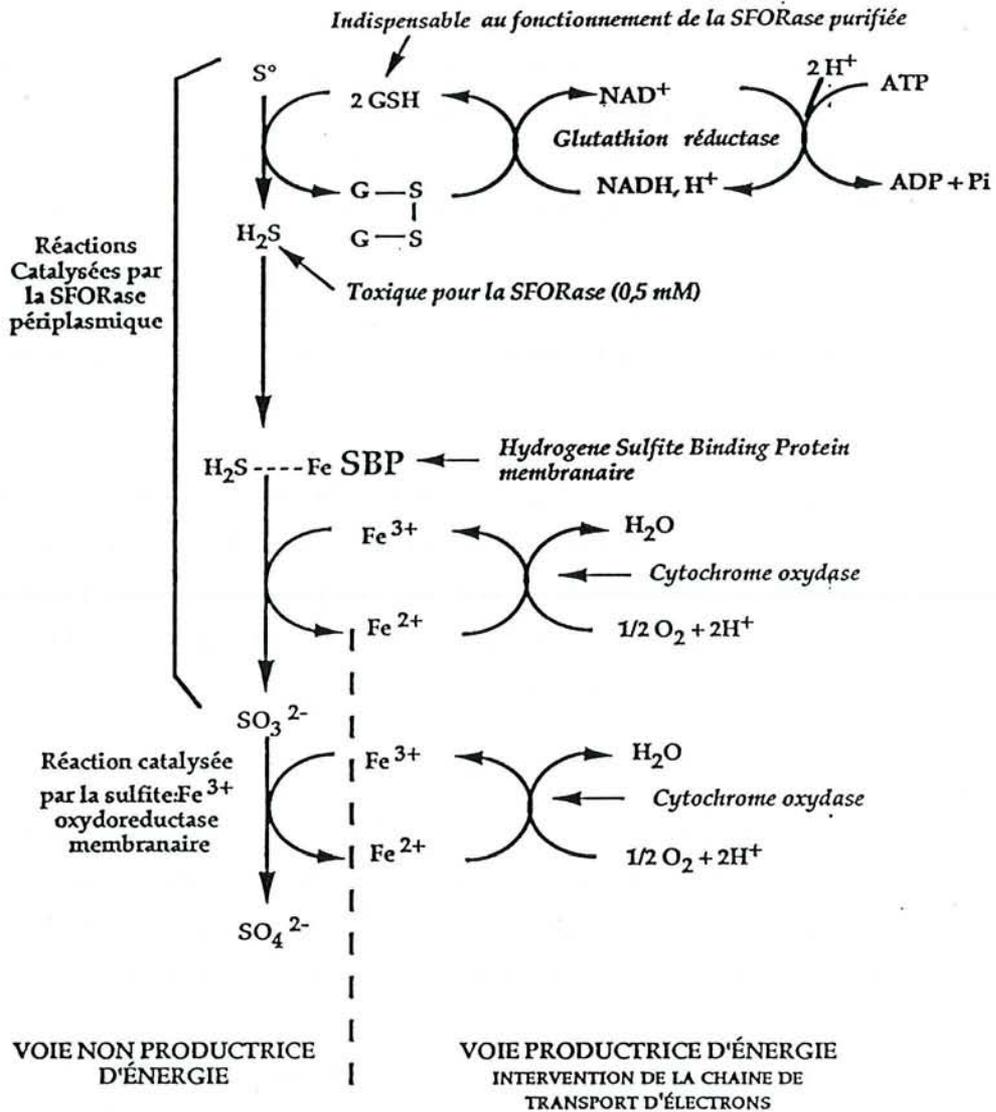


Figure I.5.- Modèle d'oxydation du soufre élémentaire proposé par Sugio *et al.* (1989 et 1991).

*Pour Kuenen *et al.* (1993), Das *et al.* (1992) et Corbett et Ingledew (1987), l'activité SFOR_{ase} ne représenterait que 1 % de la capacité de production de Fe³⁺ nécessaire à expliquer la vitesse de consommation totale d'oxygène par la bactérie cultivée sur S⁰ (44 nmol O₂/min/mg prot.), ce qui suggère une place mineure du mécanisme proposé par Sugio *et al.* (1989 et 1991) dans l'oxydation du S⁰ en aérobiose. Ces auteurs considèrent la réaction d'oxydation du S⁰ en aérobiose indépendante du Fe³⁺ et son oxydation en anaérobiose génératrice d'énergie. Leur modèle pourrait correspondre au schéma proposé par Corbett et Ingledew (1987) (Figure I. 6).

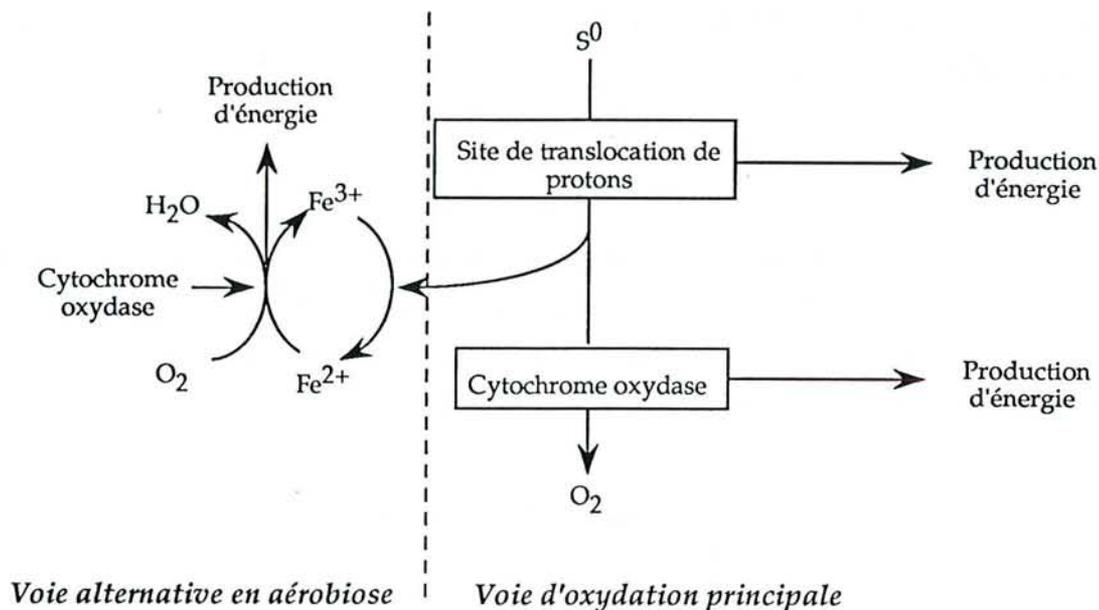


Figure I.6.- Modèle proposé par Corbett et Ingledew (1987) pour le transport des électrons au cours de l'oxydation du soufre élémentaire.

L'obtention de rendements cellulaires/mole d'électrons, plus importants au cours de l'oxydation du S^0 que du Fe^{2+} en aérobiose (Hazeu *et al.*, 1987), implique une génération d'énergie plus importante et l'existence d'au moins un site de translocation de protons supplémentaire dans l'oxydation du S^0 par rapport à celle du Fe^{2+} (Kuenen *et al.*, 1993). Certains résultats de Das *et al.* (1992) et Corbett et Ingledew (1987) suggèrent que l'oxydation du S^0 en aérobiose est indépendante de l'oxydation et de la réduction du fer.

Das *et al.* (1992) et Pronk *et al.* (1992) ont montré que l'oxydation du S^0 en anaérobiose est génératrice d'énergie et permet la croissance bactérienne, ce qui s'oppose aux résultats de Sugio *et al.* (1988 a). Le résultat négatif obtenu par ces auteurs pour la culture de *T. ferrooxidans* en anaérobiose pourrait être dû à l'utilisation de concentrations en CO_2 trop faibles. Cependant, Das *et al.* (1992) suggèrent également l'existence d'une voie de transfert d'électrons entre le S^0 et le Fe^{3+} , non productrice d'énergie et qui pourrait représenter 75 % du processus de réduction du Fe^{3+} en anaérobiose. Cette voie nous semble pouvoir coïncider avec celle proposée par Sugio *et al.* (1989 et 1991).

L'emploi d'inhibiteurs de la respiration bactérienne a également permis de montrer (Das *et al.*, 1992) l'utilisation par une même souche, de voies de transport d'électrons différentes, pour des conditions de culture différentes (cellules cultivées en aérobiose et en anaérobiose). Bien que les mécanismes de transport d'électrons entre le S^0 et Fe^{3+} ou O_2 ne soient pas encore élucidés, ces résultats suggèrent l'existence de plusieurs voies.

b.- Enzymologie de l'oxydation du soufre

Différents systèmes de transports d'électrons sont proposés pour l'oxydation du S^0 , mais un schéma général des réactions enzymatiques peut être résumé par la figure I.7. Comme pour l'oxydation du Fe^{2+} , le sulfate stimule de façon spécifique l'oxydation du soufre et seul le séléniate peut le remplacer (Pronk *et al.*, 1990).

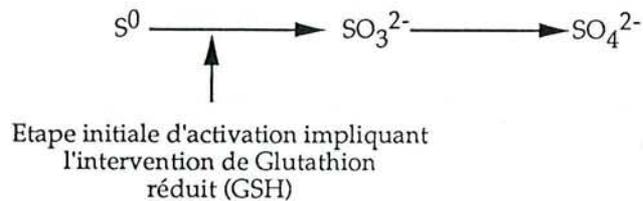


Figure I.7.- Etapes générales de l'oxydation du soufre élémentaire.

Etape d'activation

Sugio *et al.* (1989) ont observé que l'oxydation du S^0 par un extrait cellulaire de *T. ferrooxidans* nécessite le GSH. Au cours des réactions d'oxydation du soufre, *T. ferrooxidans* libère aussi de faibles quantités d' H_2S (Pronk *et al.*, 1990). Ces réactions d'oxydation peuvent être inhibées par le NEM (N éthyl maléimide), réactif spécifique des groupements - SH (Pronk *et al.*, 1990 ; Lorbach *et al.*, 1993). L'ensemble de ces résultats suggère une étape initiale d'activation correspondant à une réduction du soufre élémentaire par des groupements - SH.

Les ions sulfite et leur oxydation

Sugio *et al.* (1985) et Kuenen *et al.* (1993) ont observé une oxydation complète du S^0 en ion bisulfite, accompagnée d'une libération de cet ion dans le milieu, à des pH supérieurs à 5. Si cet ion est un intermédiaire essentiel de l'oxydation du soufre, (Kuenen *et al.*, 1993 ; Lorbach *et al.*, 1993 ; Sugio *et al.*, 1985), son mécanisme d'oxydation fait l'objet de désaccords. Hooper and Dispirito (1985) ont suggéré l'existence de deux voies d'oxydation des ions bisulfite. Ils ont décrit d'une part une oxydation dépendante de l'AMP, mettant en jeu une phosphorylation de substrat s'accompagnant

de la synthèse d'ATP (Figure I.8), et d'autre part, une sulfite oxydase périplasmique dépendante du cytochrome c. Cependant, aucun de ces systèmes n'a pu être mis en évidence récemment chez *T. ferrooxidans* (Kuenen *et al.*, 1993).

Lorbach *et al.* (1993) ont observé une inhibition totale de l'oxydation du soufre (S^0) et des ions sulfite en aérobiose par les ions cyanure, mettant en évidence l'intervention d'une oxydase terminale dans le transport des électrons à l'oxygène.

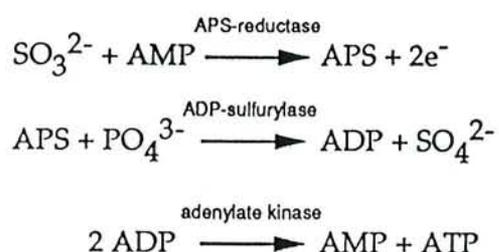


Figure I.8.- Voie d'oxydation des ions sulfite, AMP dépendante.

AMP : Adénosine monophosphate

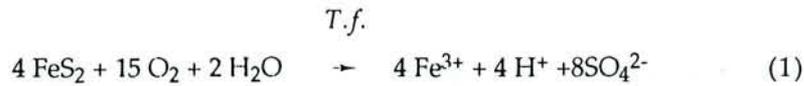
APS : Adénosine phosphosulfate

III.- OXYDATION DE LA PYRITE PAR *Thiobacillus ferrooxidans*

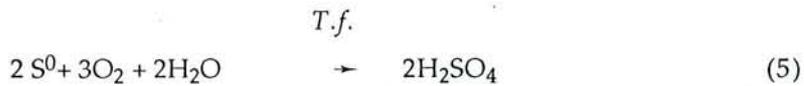
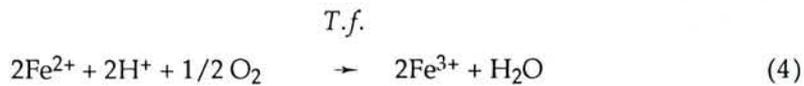
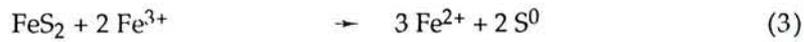
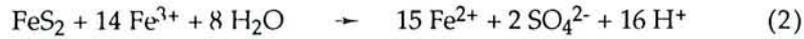
Les processus d'oxydation de pyrite par *T. ferrooxidans* semblent plus complexes que ceux des substrats plus simples dont nous venons de parler. La présence de phases oxydées à la surface du minéral (oxydes et hydroxydes de fer, sulfates ferreux et ferriques, S^0) complique le système (Mustin *et al.*, 1993 a et b ; de Donato *et al.*, 1991 et 1993). Ces processus d'oxydation de la pyrite au cours d'une biolixiviation mettent en jeu deux types de réactions : les réactions d'oxydation directe des éléments minéraux et du minéral par les bactéries, les réactions d'oxydation indirectes du minéral par l'oxydant chimique, le fer ferrique. Ce dernier est issu des réactions d'oxydation bactérienne directes, de l'oxydation bactérienne de fer ferreux provenant d'apports exogènes et/ou des réactions d'oxydation indirectes du minéral, ou encore d'apports exogènes (Konishi *et al.*, 1992 ; Larsson *et al.*, 1993 ; Pistaccio *et al.*, 1994).

On pourrait ainsi distinguer une réaction d'oxydation bactérienne qui aurait lieu directement à partir de la pyrite (réaction 1) de réactions chimiques *sensu stricto* faisant intervenir le fer ferrique (réactions 2 et 3). Le fer ferreux et le soufre produits sont alors oxydés par les bactéries adhérentes et non-adhérentes qui produisent à nouveau du fer ferrique et de l'acide sulfurique (réactions 4 et 5) :

Mécanisme direct :



Mécanisme indirect :



De nombreuses études montrent que les bactéries accélèrent le processus d'oxydation. Cependant, la contribution des réactions d'oxydation directes (1) à l'ensemble du processus d'oxydation et l'importance du rôle des bactéries adhérentes sont très mal ou pas définies. Le substrat bactérien est solide, ce qui permet de penser que le rôle de l'adhésion ou du contact bactérien est fondamental. Il est donc nécessaire d'étudier l'adhésion bactérienne (estimation et mécanisme) et de déterminer l'effet du contact direct pour répondre à ces questions.

Première Partie

**Adhésion de *Thiobacillus*
ferrooxidans sur les pyrites :
Mesure directe et indirecte et
approche des mécanismes**

Chapitre II

**Adhésion bactérienne :
connaissances actuelles des mécanismes
et des méthodes de mesure.
Objectifs et démarche de l'étude**

Adhésion bactérienne :
connaissances actuelles des mécanismes et des méthodes de mesure.
Objectifs et démarche de l'étude

Mustin (1992) a amplement étudié l'oxydation de pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* et les réactions à l'interface Bactérie-Minéral, en s'intéressant particulièrement aux caractéristiques physico-chimiques de la phase minérale. Du point de vue microbiologique, seule la croissance des bactéries non-adhérentes a été mesurée. Elle a montré souvent une diminution du nombre de bactéries, au cours du premier jour de culture. Il était logique de penser que ces bactéries étaient fixées à la surface de la pyrite. La décroissance de la concentration bactérienne peut être faible (0,5 log) si bien que la méthode usuelle de dénombrement des bactéries non-adhérentes par comptage au microscope ne met pas toujours en évidence l'adhésion bactérienne. Pour l'estimer, il est donc nécessaire de rechercher une méthode sensible et précise de dénombrement des bactéries fixées. Cette méthode doit également permettre de mesurer l'adhésion à différents sulfures (chalcopyrite, sphalérite, blende...) et autres minéraux (jarosite, goethite,...), pour élucider les mécanismes de ce phénomène.

Dans ce chapitre, nous présenterons d'abord une synthèse bibliographique où seront détaillés et discutés :

- la définition de l'adhésion bactérienne,
- les connaissances actuelles des mécanismes d'adhésion. Nous nous intéresserons à l'adhésion bactérienne en général et à l'interaction de *T. ferrooxidans* avec les sulfures.
- les différentes méthodes permettant d'estimer l'adhésion bactérienne.

Ensuite, nous présenterons les objectifs et la démarche expérimentale utilisée pour cette partie de l'étude.

I.- DÉFINITION DE L'ADHÉSION BACTÉRIENNE ET CONNAISSANCES ACTUELLES DES MÉCANISMES D'ADHÉSION

A.- DÉFINITION DE L'ADHÉSION

L'interaction d'une bactérie avec un support peut conduire à la colonisation du support ou formation d'un biofilm. Celle-ci met en jeu 4 étapes :

- le transport de la bactérie vers le support,
- l'adhésion au support, par l'établissement d'interactions physico-chimiques entre les deux surfaces,
- l'attachement, au cours duquel l'adhésion est consolidée par la production d'exopolymères,
- la colonisation, étape au cours de laquelle les bactéries se multiplient à la surface minérale.

L'adhésion bactérienne considérée ici est donc l'interaction initiale entre la surface d'une bactérie et celle du support. La nature et l'énergie des interactions physico-chimiques mises en jeu évolue en fonction de la distance d'interaction entre les deux surfaces. Le but de l'étude de l'adhésion est de comprendre son mécanisme, c'est à dire de déterminer la nature des interactions mises en jeu entre les deux surfaces et leur évolution. Etant donné que ces interactions sont *à priori* de nature physico-chimique et non biologique, on peut, dans un premier temps, utiliser une approche physico-chimique.

B.- CONNAISSANCES ACTUELLES DES MÉCANISMES D'ADHÉSION

1.- Approche physico-chimique d'étude du mécanisme d'adhésion

Deux théories différentes et complémentaires peuvent contribuer à la description des mécanismes mis en jeu (Thomas, 1988 et van Loosdrecht *et al.*, 1990) :

- la théorie de la chimie colloïdale ou théorie DLVO,
- la théorie des tensions interfaciales, qui correspond à une approche thermodynamique.

a.- Théorie DLVO

La bactérie est considérée comme une particule colloïdale dont la surface est lisse. En général dans les conditions naturelles, elle est chargée négativement comme les surfaces qu'elle rencontre. Cette charge est due aux groupements carboxyl et phosphate de la membrane bactérienne. En suspension dans un solvant hydrophile, une telle surface est entourée d'une double couche électrochimique (Figure II.1).

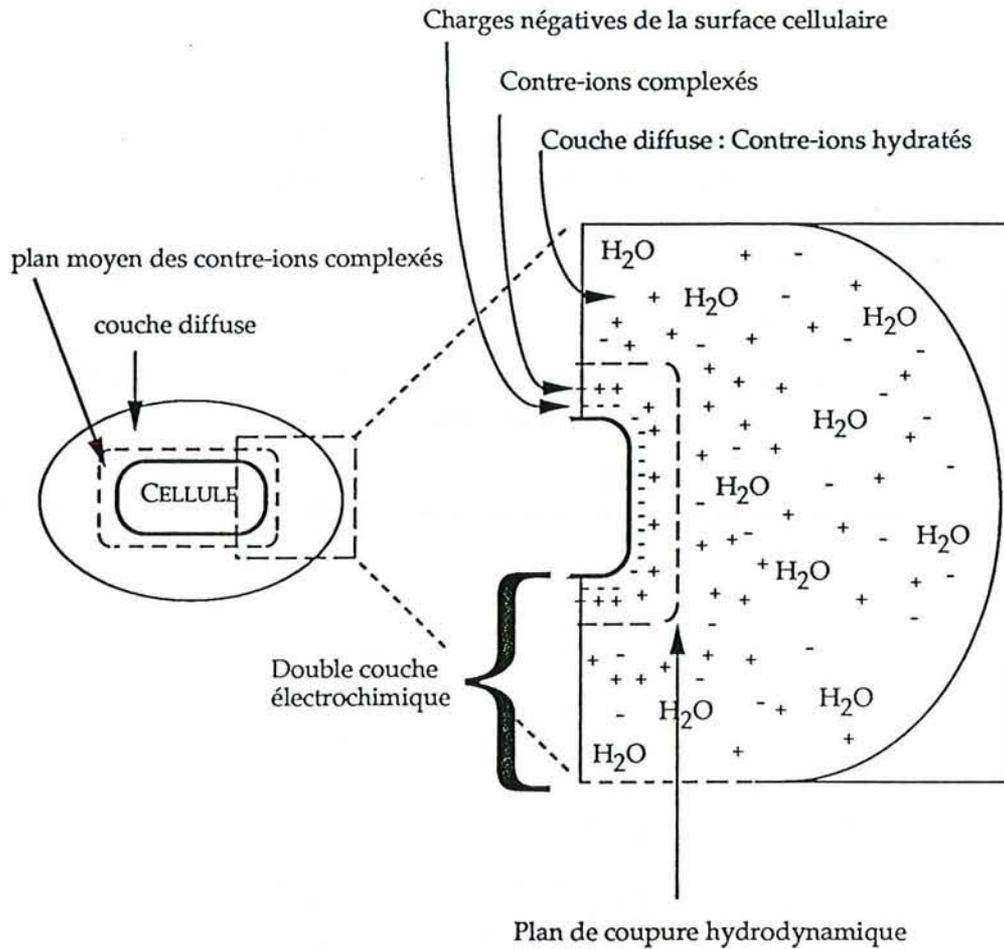


Figure II.1.- Représentation schématique de la double couche électrochimique.

Le même effet se produit pour la surface du support. Lorsque les deux surfaces se rapprochent progressivement, des interactions à longue distance vont s'établir et déterminer l'énergie d'interaction des deux surfaces ou Energie libre de Gibbs. Ces interactions sont :

- les interactions de van der Waals. Elles se réalisent entre groupements apolaires et sont de nature attractive. Elles s'établissent à partir d'une distance d (séparation des 2 surfaces) égale à 50 nm.
- les interactions électrostatiques, qui ont lieu entre groupements chargés et entre groupements polaires. Les cellules et le support étant chargés négativement, elles sont de nature répulsive. Elles s'établissent lorsque les couches diffuses des deux surfaces se chevauchent ($d = 10$ à 20 nm).

L'énergie totale d'interaction entre les deux surfaces (G_{tot}) est égale à la somme des énergies des interactions précédentes :

$$G_{tot} = G_a + G_e$$

où G_a = énergie des interactions de nature attractive (van der Waals)

et G_e = énergie des interactions de nature répulsive (électrostatiques).

L'énergie totale d'interaction varie en fonction de :

- la distance de séparation des deux surfaces,
- la force ionique du milieu, qui affecte les interactions électrostatiques : son augmentation écrante les charges nettes des surfaces, si bien que la répulsion électrostatique diminue.

Les figures II.2. représentent ces évolutions :

- ♦ à faible force ionique (10^{-2} M), la charge nette des deux surfaces est fortement négative et les interactions électrostatiques répulsives empêchent l'adhésion.

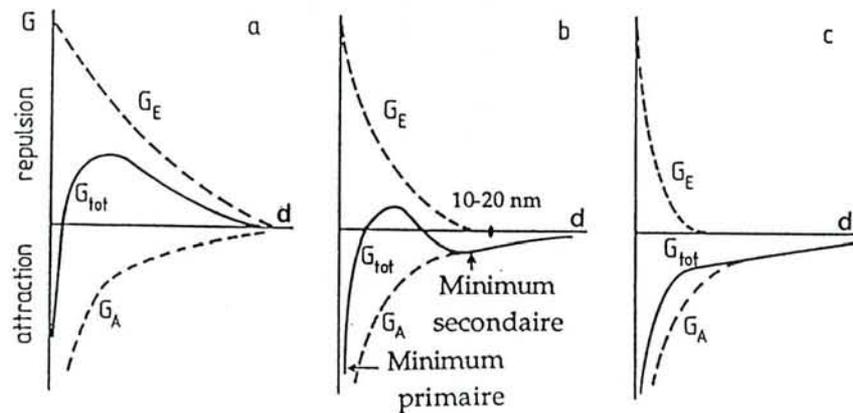


Figure II.2.- Evolution selon la théorie DLVO de l'énergie de Gibbs d'interaction entre une sphère et une surface plane dont les charges de surface sont de même signe. Représentation schématique pour une force ionique faible (10^{-2} M) (a), intermédiaire (10^{-1} M) (b) et importante 1M (c) (force ionique d'un électrolyte 1-1).
d = distance d'interaction ; G_e = Energie des interactions électrostatiques ; G_a = Energie des interactions de van der Waals.

- ♦ à force ionique intermédiaire (10^{-1} M), l'interaction ou l'adhésion est stabilisée à une distance moyenne de séparation des deux surfaces de 5 à 7 nm lorsque G_{tot} atteint le minimum secondaire. A ce stade l'adhésion est réversible. Une barrière énergétique s'oppose au rapprochement des deux surfaces pour former des interactions à courte distance. Cependant, à certaines forces ioniques cette barrière est faible, si bien qu'une partie des cellules développe suffisamment d'énergie thermique pour la franchir et évoluer vers une adhésion irréversible, au minimum primaire ($d < 1$ nm).

♦ à forte force ionique (1M), l'interaction est d'autant plus stable que les deux surfaces se rapprochent. Ce phénomène est dû à la mise en place d'interaction à courte distance entre les deux surfaces, au minimum primaire ($d < 1 \text{ nm}$) ; ces interactions sont de type liaisons hydrogène, liaisons ioniques, liaisons covalentes et liaisons entre groupements apolaires. Elles permettent d'obtenir une adhésion irréversible.

Mesure de la charge des particules

Elle peut se faire par chromatographie d'interactions électrostatiques (chromatographie ionique) ou par mesure du potentiel électrocinétique (ζ). Le potentiel ζ de particules (bactéries ou particules minérales de granulométrie $\leq 5 \mu\text{m}$) caractérise la charge nette des particules ; c'est le potentiel développé au plan de coupure hydrodynamique ou encore au commencement de la couche diffuse (Figure II.1). Il est déduit de la mesure de la mobilité électrophorétique des particules.

b- Approche thermodynamique de l'énergie interfaciale

Elle décrit l'aspect "hydrophobe" du système, et ne prend pas en compte les interactions électrostatiques. On considère qu'une particule est hydrophobe lorsqu'elle fuit l'eau, n'est pas chargée, apolaire, ne forme pas de liaisons hydrogène ou possède une faible énergie de surface. La bactérie est alors considérée comme une phase organique ayant une interface commune avec une ou plusieurs autres phases (le liquide et le solide) avec lesquelles elle a plus ou moins d'affinité. L'énergie libre de Gibbs ou énergie d'adhésion (qui permet de dire si l'adhésion est stable) de la cellule C sur un support S en présence d'un liquide L est donnée en relation avec les tensions interfaciales mises en jeu :

$$\Delta G_{\text{adh}} = \gamma_{\text{CS}} - \gamma_{\text{CL}} - \gamma_{\text{SL}}$$

γ = tension interfaciale

ou encore

$$\Delta G_{\text{adh}} = 2(\sqrt{\gamma_{\text{C}}} - \sqrt{\gamma_{\text{L}}})(\sqrt{\gamma_{\text{L}}} - \sqrt{\gamma_{\text{S}}})$$

γ_{L} , γ_{S} et γ_{C} sont respectivement les tensions à l'interface vapeur (v): γ_{LV} , γ_{SV} , γ_{CV} .

Les conséquences de cette équation sont les suivantes :

- ΔG_{adh} est nulle lorsque γ_{C} ou γ_{S} est égale à γ_{L} : il n'y a pas d'adhésion lorsque les énergies de surface de la cellule ou de la surface sont de même ordre que celles du liquide,
- ΔG_{adh} prend une valeur négative importante lorsque γ_{C} et γ_{S} sont toutes les deux, soit très petites, soit très grandes : une cellule de faible énergie de surface adhère sur un support de faible énergie ; une cellule de forte énergie de surface adhère sur un support de forte énergie,

- ΔG_{adh} est positive lorsque γ_L est comprise entre γ_C et γ_S : il n'y a pas d'adhésion lorsque l'énergie de surface du support est élevée et celle de la cellule basse par rapport à celle du liquide et inversement.

Estimation de l'hydrophobie des cellules

Elle peut être évaluée par :

- mesure de leur taux de répartition entre l'eau et une phase organique,
- mesure de l'angle de contact, qui correspond à l'angle formé entre une goutte d'un liquide de tension γ_{LV} (LV = liquide-vapeur) connue et un film de cellules réalisé sur un support standard (Figure II.3)
- par chromatographie d'interaction hydrophobe
- par test d'adhésion au polystyrène (surface hydrophobe, de faible tension de surface et légèrement négative),
- par agrégation par un sel : ce test consiste à provoquer la floculation des cellules par des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium. Les cellules les plus hydrophobes sont précipitées aux concentrations les plus faibles.

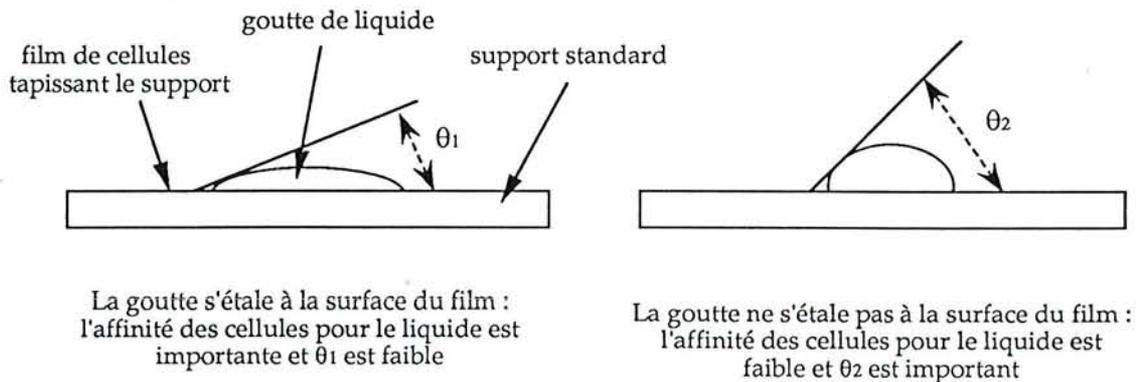


Figure II.3.- Représentation schématique de l'angle de contact θ .

c.- Limites des théories physico-chimiques

D'après ces théories, une adhésion se produit si $\Delta G_{adh} < 0$. Cependant, on remarque qu'une adhésion est possible lorsque $\Delta G_{adh} > 0$ et lorsque les 2 surfaces sont chargées négativement. Les théories physico-chimiques ne suffisent alors plus à expliquer le mécanisme d'adhésion. En réalité la surface bactérienne n'est pas lisse ; elle est constituée d'une multitude de macromolécules, en interaction entre elles et avec le milieu environnant. Il faut donc considérer la surface réelle de la bactérie comme un ensemble de macromolécules biologiques (Busscher and Weerkamp, 1987).

2.- Etude du mécanisme d'adhésion : complémentarité de l'approche physico-chimique et des caractéristiques biologiques des microorganismes

a- Composition de la membrane bactérienne et caractéristiques de la surface cellulaire (charges, hydrophobie)

Chez les bactéries Gram négatif, la membrane cellulaire externe est une double couche phospholipidique asymétrique :

- la couche interne est constituée de phospholipides et de protéines,
- la couche externe, en contact direct avec le milieu environnant, est constituée de LPS (lipopolysaccharides) et de protéines.

Les groupements phosphate des LPS, et carboxyl des LPS et des protéines confèrent aux cellules des charges négatives, et les groupements amine des protéines, des charges positives. Les chaînes aliphatiques, les molécules apolaires vont contribuer à l'aspect hydrophobe des cellules.

Chez les bactéries Gram positif, l'essentiel des charges négatives est attribuable à la muréine et aux acides téchoïques (Achouak *et al.*, 1994).

Domaines hydrophobes et hydrophiles à la surface cellulaire :

En plus des groupements précédents, l'interaction des macromolécules entre elles va également conférer à certains domaines de la surface cellulaire des propriétés hydrophiles ou hydrophobes. La formation de ces domaines est également favorisée par la mobilité des LPS et une mobilité plus faible des protéines au niveau de la membrane externe. On peut imaginer la surface bactérienne comme une mosaïque où alternent des domaines hydrophiles et hydrophobes. Si on estime d'après la mesure du potentiel ζ la densité relative des groupements chargés et polaires, on se rend compte qu'elle représente au maximum 10 % (van Loosdrecht *et al.*, 1987 ; Achouak *et al.*, 1994); le reste est formé par les groupements apolaires. Ces derniers sont donc majoritaires en extension, à la surface cellulaire, et vont conférer un caractère hydrophobe majoritaire aux bactéries.

Des structures supplémentaires peuvent participer aux caractéristiques de surface des cellules : les fimbriae et les flagelles. Ils sont de nature protéique et ont un rôle dans l'adhésion bactérienne. Les fimbriae pourraient participer au caractère hydrophobe des bactéries (Stenström, 1989). L'ensemble de ces protéines participe aussi au pontage des cellules et peut ainsi s'opposer aux répulsions électrostatiques. Des mécanismes d'adhésion spécifiques ont également été mis en évidence, qui mettent en jeu des sites ou protéines appelées adhésines, présents au niveau de ces structures. On parle d'adhésion spécifique lorsque le constituant impliqué dans l'adhésion a été identifié au niveau moléculaire (Busscher et Weerkamp, 1987 ; Rosenberg et Doyle, 1990).

Les bactéries ont en général un caractère hydrophobe prédominant. Cependant, elles forment des suspensions dispersées dans l'eau et sont donc globalement amphiphiles, du fait des interactions complexes existant entre groupements polaires, apolaires et le milieu environnant. Le comportement général d'une bactérie (charge, hydrophobie) est déterminé par la proportion relative des groupements polaires, apolaires, de leur interaction (entre eux et avec le milieu) et de leurs modifications conformationnelles (Rosenberg et Doyle, 1990).

Variabilité des caractéristiques de surface

La charge, l'hydrophobie de surface varient d'une bactérie à l'autre, et également chez une bactérie donnée, en fonction des conditions de culture, de l'état physiologique (phase exponentielle, phase stationnaire). Cette variabilité est due à l'expression des LPS et des constituants membranaires, en quantités différentes d'un état à l'autre (Stenström, 1989).

Le comportement d'une bactérie (charge, hydrophobie) dépend également de la nature du milieu et des caractéristiques de la surface face à laquelle elle se trouve :

- à faible force ionique, une bactérie peut exprimer une charge négative importante ; si la force ionique augmente, la charge sera plus faible et l'hydrophobie de la cellule plus importante, conduisant les bactéries à s'agréger.
- dans un milieu polaire, le caractère acide des groupements négatifs sera moins important que dans un milieu apolaire. Dans ce dernier, l'énergie des interactions électrostatiques sera plus importante.

En somme, plus la charge des bactéries sera faible, plus le caractère hydrophobe va s'exprimer et inversement. Plusieurs mécanismes différents d'adhésion seront donc mis en jeu, en fonction des conditions environnantes.

b.- Vers la compréhension du mécanisme d'adhésion

Busscher et Weerkamp (1987), van Loosdrecht *et al.* (1987), Stenström (1989), et Achouak *et al.* (1994) ont estimé les contributions de la charge et de l'aspect hydrophobe des bactéries, au mécanisme d'adhésion bactérienne. Ces études ont conduit à des résultats identiques.

Achouak *et al.* (1994) ont étudié l'adhésion au polystyrène et aux racines de riz, de 10 souches isolées de la rhizosphère. Ils ont observé qu'une bactérie relativement hydrophobe et fortement chargée (négativement) adhérait peu au polystyrène, tandis que d'autres cellules présentant également une hydrophobie élevée, mais une charge plus faible, y adhéraient d'avantage. A charge identique, l'adhésion était d'autant plus importante que l'était l'hydrophobie. Autrement dit, pour des bactéries Gram négatif, l'adhésion au polystyrène tend à être d'autant plus importante que leur charge négative est faible. La surface du polystyrène est légèrement négative. Par conséquent, si la bactérie est fortement chargée, à grande distance d'interaction entre les deux surfaces, les répulsions électrostatiques entre ces deux surfaces semblent être énergétiquement défavorables à la mise en place de l'adhésion et à la formation d'interactions à courte distance où intervient alors l'hydrophobie. Van Loosdrecht *et al.* (1987) ont observé également que des bactéries ayant une hydrophobie relativement faible ou moyenne adhéraient d'autant plus que leur charge était faible. Bien que Stenström (1989) accorde un rôle majoritaire à l'hydrophobie, pour l'adhésion des microorganismes à des particules minérales, certains de ses résultats sont analogues aux précédents. L'ensemble de ces résultats suggère que dans un premier temps, à longue distance d'interaction entre les deux surfaces (au minimum secondaire 10-20 nm), les interactions électrostatiques contrôlent l'adhésion. Si elles sont énergétiquement favorables (surface du support rendue positive par adsorption de Fe^{3+} ou Al^{3+}), les deux surfaces vont pouvoir se rapprocher. C'est alors seulement dans une seconde étape, à plus courte distance, que les interactions hydrophobes deviendraient effectives. Ce mécanisme en deux temps a également été proposé par Busscher et Weerkamp (1987). Les interactions hydrophobes contribueraient à déstabiliser et à expulser les molécules d'eau présentes entre les 2 surfaces. Ce processus favoriserait la formation d'interactions à courte distance entre groupements apolaires et entre groupements polaires et augmenterait l'étendue des surfaces en contact direct, pour stabiliser l'adhésion. Une fois ce stade atteint, l'ensemble des interactions mises en jeu est constitué d'interactions à courte distance mais aussi d'interactions électrostatiques réalisées entre les groupements les plus éloignés des deux surfaces (épaisseur de la paroi : 20 à 100 nm).

Il faut donc considérer l'adhésion comme le processus au cours duquel deux surfaces se rapprochent et où les interactions physico-chimiques mises en jeu sont en évolution permanente, tendant à stabiliser le système. On peut donc comparer l'adhésion bactérienne à l'interaction qui se produit entre le site actif d'un enzyme et son substrat.

C.- INTERACTIONS MISES EN JEU AU COURS DE L'ADHÉSION DE *T. ferrooxidans* AUX SULFURES

Le mécanisme d'adhésion de *T. ferrooxidans* aux sulfures a été surtout étudié par Blake II *et al.* (1994), Devasia *et al.* (1993) et Ohmura *et al.* (1993 a). Les études de Blake II *et al.* (1994) permettent d'établir un mécanisme d'adhésion probable de *T. ferrooxidans* à la pyrite.

Ces auteurs ont étudié essentiellement la charge :

- des bactéries,
- de la pyrite et du soufre,
- des particules obtenues après la mise en contact des deux.

Les résultats qu'ils ont obtenu sont les suivants :

Charges des bactéries

En milieu acide (à pH 2,0 = pH initial de biolixiviation) et en présence de Fe^{2+} , les cellules ont un potentiel ζ de -7 à -8 mV, montrant que leur surface est légèrement négative. En présence de concentrations croissantes en Fe^{3+} , le potentiel tend vers 0, montrant que les cellules se chargent positivement, en fixant du Fe^{3+} .

Charges de la pyrite

Dans l'eau, son potentiel est voisin de 0. Dans H_2SO_4 0,01N, elle se charge négativement, ce qui montre qu'elle fixe à sa surface des ions sulfate. A ce stade, en présence de concentrations croissantes de Fe^{3+} , elle se charge positivement, indiquant la liaison du Fe^{3+} aux ions sulfate présents à la surface du minéral.

Charge obtenue après mise en contact des bactéries avec la pyrite ou le S^0

Ces expériences ont été réalisées dans H_2SO_4 0,01N à partir de cellules non lavées, pour se placer dans des conditions d'interaction voisines de celles de la biooxydation. Dans ce cas, les charges initiales sont négatives pour la pyrite ou le soufre, et positives pour les bactéries. En mettant en contact les deux, les auteurs ont observé la formation de particules de la taille des bactéries (les particules de pyrite étaient plus petites) dont le potentiel est compris entre celui des bactéries et du minéral pris séparément. Ce résultat met en évidence l'adhésion et montre que celle-ci augmente la charge de la pyrite et lui confère une charge voisine des bactéries seules. L'ensemble des résultats montre aussi qu'en milieu sulfurique à pH 2,0, les bactéries (récupérées en présence de Fe^{2+}) et le minéral ont des charges négatives voisines. En l'absence de Fe^{3+} , les interactions initiales à longue

distance entre les cellules et le minéral seraient donc de nature répulsive. Le Fe^{3+} neutralise les charges négatives de la bactérie et abolit les répulsions électrostatiques : il réalise un pontage entre les deux partenaires, pour permettre l'adhésion bactérienne. En conditions de biooxydation, le Fe^{3+} est toujours présent et l'adhésion met probablement en jeu ce mécanisme.

Application de l'adhésion bactérienne à la suppression de la flottabilité de la pyrite et de sulfures dans les traitements de désulfuration de charbon

Blake II *et al.* (1994) et Devasia *et al.* (1993) ont observé, par mesures de potentiel ζ que l'adhésion augmente la charge des particules de pyrite, de S^0 et de chalcopryrite. Par ailleurs, Ohmura *et al.* (1993 b) constatent que l'adhésion bactérienne provoque la sédimentation préférentielle de la pyrite par rapport au charbon. Ces résultats suggèrent que l'adhésion bactérienne modifie les propriétés de surface des sulfures et les rend plus hydrophiles. Cette propriété des bactéries est mise à profit dans les procédés physico-chimiques de désulfuration de charbon par flottation.

II.- MÉTHODES D'ESTIMATION DE L'ADHÉSION

Avant d'étudier le mécanisme d'adhésion et pour pouvoir l'étudier, il est nécessaire de pouvoir dénombrer les bactéries adhérentes. Elles peuvent être estimées de 2 façons :

- indirectement par différence des concentrations de bactéries non-adhérentes avant et après contact Bactérie-Minéral,
- directement, en "marquant" les cellules fixées afin de les dénombrer.

A.- MÉTHODES INDIRECTES

Ce sont les méthodes permettant de dénombrer les bactéries non-adhérentes pour en déduire le nombre de bactéries adhérentes. Du point de vue microbiologique, la technique la plus sensible et la plus précise de dénombrement bactérien est la technique de dilution sur milieu gélosé. La culture des bactéries de l'espèce *T. ferrooxidans* sur milieux solides est cependant inhibée par les composés organiques (probablement des monosaccharides) résultant de l'hydrolyse de l'agar en milieu acide (Tuovinen and Kelly, 1973 ; Harrisson, 1984 ; Johnson et McGinness, 1991). L'utilisation d'agarose pour solidifier le milieu, et d'une concentration faible de K_2HPO_4 (0,002%) pour obtenir une croissance bactérienne optimale, ont permis l'isolement et le dénombrement de *T. ferrooxidans* (Johnson *et al.*, 1987). L'adaptation de la méthode du NPP au dénombrement de *T. ferrooxidans* en plaques de microtitration a également permis d'obtenir une précision comparable à celle du dénombrement sur milieu solide ($< 0,5 \log$) (Rouas, 1988) .

Dans la majorité des cas, l'adhésion de cette bactérie aux minéraux a été étudiée de cette manière indirecte. La méthode la plus utilisée est le comptage au microscope des cellules non

adhérentes (Solari *et al.*, 1992 ; Yelloji Rao *et al.*, 1992 ; Ohmura *et al.*, 1993), sans doute parce qu'elle est plus rapide que les précédentes. Pour obtenir une bonne précision, ce protocole nécessite toutefois un nombre important d'essais (au minimum 6 dénombrements pour 1 mesure d'adhésion) ; cette technique est également peu sensible.

Les méthodes indirectes sont longues et ne pourraient pas permettre d'estimer les bactéries fixées au cours d'une biolixiviation. Le développement d'une méthode directe est donc nécessaire.

B.- MÉTHODES DIRECTES

Yelloji Rao *et al.* (1992) ont dosé les protéines bactériennes sur les particules minérales mises en contact avec les bactéries. Yeh *et al.* (1987) ont également dénombré au microscope les bactéries fixées aux surfaces par épifluorescence (coloration des cellules par une molécule fluorescente qui s'intercale aux niveau des acides nucléiques). L'obtention d'une précision convenable par ces méthodes nécessite la réalisation de plusieurs essais et dans le cas du dosage de protéines, la mise en jeu d'une quantité de minéral non négligeable. Monroy *et al.* (1994) ont dénombré au microscope en cellule de Thoma, les bactéries de l'espèce *T. ferrooxidans* désorbées de la surface minérale à la suite d'un traitement physico-chimique par un tensio-actif, le Tween 80. Cette méthode a permis de mettre en évidence des bactéries faiblement fixées et des bactéries fortement fixées. La méthode du NPP a également été utilisée pour dénombrer les bactéries désorbées de particules minérales (Southam and Beveridge, 1992). Elle permet d'estimer les cellules viables et elle est également spécifique des bactéries capables d'oxyder le fer. Ces méthodes sont intéressantes pour suivre l'évolution des bactéries fixées au cours du processus de lixiviation, même si elles ne permettent probablement pas d'estimer la totalité des bactéries adhérentes, l'interaction bactérie-minéral de certaines cellules étant trop forte pour qu'elles soient détachées de la surface.

L'ensemble de ces méthodes ne permet cependant pas de distinguer spécifiquement les bactéries de l'espèce *T.ferrooxidans*, des autres, alors que dans les procédés industriels de biolixiviation plusieurs espèces coexistent. Dans ce cas, il est intéressant de pouvoir quantifier directement et spécifiquement les bactéries adhérentes.

Les méthodes immunologiques sont spécifiques et permettent de reconnaître une espèce au sein d'une culture mixte. Jerez and Arredondo (1990) ont développé une méthode immunoenzymatique spécifique et sensible de type DIMA (Dot Immuno-Assay) (Dénombrement à partir d'une goutte calibrée déposée sur filtre de nitrocellulose), pour dénombrer les bactéries non adhérentes de l'espèce *T.ferrooxidans*. Muyzer *et al.* (1987) ont combiné l'immunofluorescence à la fluorescence à ADN (coloration de l'ensemble des bactéries par une molécule qui s'intercale au niveau de l'ADN (Acide DéoxyriboNucléique) pour évaluer l'abondance des cellules de *T.ferrooxidans* adhérent à des particules de charbon. Ces résultats suggèrent qu'une méthode immunoenzymatique pourrait permettre d'estimer l'adhésion bactérienne et l'évolution des bactéries fixées au cours de processus de biooxydation.

III.- OBJECTIFS ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

Cette partie de l'étude comporte quatre objectifs.

A.- RECHERCHE D'UNE MÉTHODE PRÉCISE ET SENSIBLE DE MESURE DE L'ADHÉSION

Pour cela, nous avons testé des techniques d'estimation indirecte et directe de l'adhésion.

1.- Estimation indirecte de l'adhésion

Elle a été réalisée par différence des concentrations de bactéries libres en suspension au moment de l'inoculation et 24 heures après contact des bactéries avec le minéral.

Ces dernières ont été dénombrées avec une cellule de Thoma, et/ou par la méthode du NPP adaptée au plaques de microtitration (Rouas, 1988) et/ou par la technique de dilution sur milieu gélosé. Des milieux solides ont été mis au point à partir des études réalisées par Johnson *et al.* (1987). L'inoculum bactérien est pris en phase exponentielle, pour obtenir une viabilité de 100% des bactéries. Le temps de contact maximal est de 24 h, pour éviter toute multiplication bactérienne (temps de génération de la bactérie sur pyrite : 40 à 48 h).

2.- Estimation directe de l'adhésion

L'objectif est de déterminer si une réaction immuno-enzymatique de type ELISA, appliquée à des bactéries de l'espèce *T.ferrooxidans* fixées sur des particules de pyrite, permet d'estimer les bactéries adhérant au minéral. Pour cela, l'intensité de la réaction doit être proportionnelle à la quantité de pyrite mise en jeu, en considérant que les bactéries sont réparties indifféremment sur les particules de ce minéral.

La réaction immuno-enzymatique a été testée sur une pyrite mise préalablement en contact 24h, avec des bactéries de l'espèce *T.ferrooxidans*. Pour valider les résultats obtenus, l'adhésion bactérienne a été estimée indirectement par différence des concentrations de bactéries libres en suspension au moment de l'inoculation et 24 h après contact des bactéries avec le minéral.

La réaction immuno-enzymatique est réalisée sur membrane filtrante, selon le même principe que la technique ELISA. De ce fait, la technique porte le nom de "Technique ELIFA" ou Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay. En outre, elle est plus rapide que la technique ELISA.

B.- ETUDE DE L'ADHÉSION AU COURS DE LIXIVIATIONS

Les bactéries fixées à la surface du minéral ont été estimées , après désorption, au moyen d'un traitement physico-chimique mis au point par Monroy *et al.* (1994) et Dziurla *et al.* (1992). A ce niveau, on distingue deux classes de bactéries, en fonction de leur force d'adhésion au minéral:

- les bactéries faiblement fixées, désorbées à l'aide d'un simple lavage du minéral par le milieu minéral utilisé pour les cultures bactériennes,
- les bactéries fixées plus fortement à la pyrite, récupérées à l'aide d'un tensio-actif, le Tween 80. Les molécules composant le Tween 80 sont d'une part, un ester polyoxyéthylénique (Tensio-actif non ionique) et d'autre part, un tensio-actif anionique, l'acide oléique partiellement estérifié par le sorbitol.

Les cellules désorbées sont ensuite dénombrées par comptage au microscope par la cellule de Thoma.

Pour étudier l'évolution de la population bactérienne entière, la croissance des bactéries non-adhérentes a également été suivie. Simultanément, la mesure de paramètres chimiques de la biolixiviation a été réalisée :

- des dosages de fer et soufre solubilisés ont permis de suivre la dissolution de la pyrite;
- des mesures du pH du milieu nous ont informé sur la production d'acide sulfurique, en relation avec l'oxydation du soufre;
- des mesures du potentiel redox du milieu (Eh), ont permis de suivre l'oxydation du fer ferreux, en fer ferrique.

C.- OBSERVATIONS EN MEB DES PYRITES BIOOXYDÉES

Ces observations ont été réalisées pour examiner la surface minérale et les bactéries adhérentes, et observer leur évolution au cours de la biooxydation. Pour cela, les échantillons ont été prélevés aux différentes étapes de biolixiviation : au cours de la phase d'amorce, de la phase optimale, du ralentissement et de la phase stationnaire de l'oxydation.

D.-CARACTÉRISATION DE LA SURFACE DU MINÉRAL ET DES BACTÉRIES

Les objectifs ont été d'étudier la charge nette des bactéries et du minéral dans le but d'expliquer le mécanisme d'adhésion. Une étude des espèces chimiques présentes à la surface du minéral a été réalisée en parallèle, de façon à fournir des informations complémentaires.

La charge nette de surface des particules a été mesurée par électrophorèse, par mesure du potentiel ζ (Zeta) ou potentiel du plan de coupure hydrodynamique:

- sur *T.ferrooxidans* en phase exponentielle et stationnaire;

- sur le minéral: cette mesure a été réalisée sur deux pyrites, pour lesquelles des études préalables avaient montré des états de surface différents. Les espèces chimiques présentes à la surface du minéral ont aussi été déterminées par spectrométrie infrarouge en réflexion diffuse, pour compléter les mesures de charges de surface. Comme l'électrophorèse nécessite l'utilisation de particules ne sédimentant pas, la granulométrie de la pyrite utilisée pour les mesures de charges (5-20 μm) est plus fine que celle de la pyrite utilisée pour les cultures bactériennes (32-53 μm). La spectrométrie infrarouge a également servi à comparer les états de surface de ces fractions granulométriques différentes et de vérifier la qualité, et la stabilité du minéral utilisé pour les mesures de potentiel ζ , par une estimation de l'oxydation superficielle de la pyrite.

- sur une association bactérie-minéral dans les conditions de culture, de manière à vérifier si une relation existe entre cette mesure et l'adhésion des bactéries.

Chapitre III

**Matériel et Méthodes mis en oeuvre
pour étudier l'adhésion bactérienne**

Matériel et Méthodes mis en oeuvre pour étudier l'adhésion bactérienne

I.- LES ACTEURS : BACTÉRIES, MILIEU NUTRITIF ET PYRITE

A.- BACTERIES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les expériences ont été réalisées avec des bactéries de l'espèce *T. ferrooxidans* provenant de la souche de collection DSM 583 (Deutsche Sammlung Mikroorganismen). Selon les expériences, les cellules ont subi des cultures préliminaires sur différents substrats : le Fe^{2+} , le S^0 ou la pyrite (ES ou K2 ou K4). Les cultures cellulaires ont été incubées à 28-30°C, sous agitation à 130 rpm.

Le milieu de culture de base est le milieu minéral M2 (milieu DSM 70 modifié selon Monroy, 1993), constitué (par litre d'eau osmosée) de 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,4 g $\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g KH_2PO_4 et H_2SO_4 1N (environ 25 ml) pour ajuster le pH à 1,80. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C, pendant 20 min.

Le Fe^{2+} est stérilisé par filtration 0,2 μm et ajouté au milieu minéral M2 de façon à obtenir une concentration finale de 20 g/l de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$. Le S^0 est stérilisé à sec par autoclavage à 110 °C (deux autoclavages successifs séparés de 24 h), puis introduit dans le milieu de base à la concentration finale de 10 g/l. La pyrite est autoclavée sous forme de pulpe minérale à 2 % (w/v) dans le milieu M2, à 110°C (deux autoclavages successifs séparés de 24 h).

Les caractéristiques des cultures obtenues sur ces différents substrats minéraux sont rassemblées dans le tableau III.1.

Les expériences de biolixiviation, d'adhésion bactérienne sont réalisées à partir de suspensions bactériennes concentrées, obtenues après filtration et lavage des cultures cellulaires. La filtration (filtre de porosité 1 μm en fibres de verre) est destinée à éliminer les précipités (jarosite formée par oxydation du Fe^{2+}) ou les substrats minéraux (S^0 ou sulfures). Elle est suivie de trois lavages dans le milieu M2.

Tableau III.1.- Caractéristiques des cultures cellulaires de *T. ferrooxidans* sur Fe^{2+} , S^0 et pyrite.

Substrat	Temps de Génération (h)	Temps de culture nécessaires à l'obtention de cellules en phase exponentielle
Fe^{2+}	8	40-60 h
S^0	20 à 30	72 h
Pyrite K2 ou K4	45 à 60	13-15 jours

B.- LES SULFURES

Trois pyrites particulièrement pures, regroupées en deux classes minéralogiques différentes ont été utilisées pour l'ensemble des expériences.

- la pyrite ES, provenant d'un gisement d'origine sédimentaire en Espagne (Logroño). Elle contient de l'arsenic (0,3 %) en tant qu'impureté majeure, répartie de façon homogène dans la matrice cristalline.

- les pyrites K2 et K4, issues du même gisement d'origine hydrothermale au Pérou. Leur composition chimique et leur état de surface voisins, ainsi que des comportements semblables au cours de la biooxydation permet de considérer que ces deux pyrites sont identiques. Contrairement à la pyrite ES, ces pyrites présentent un faible pourcentage d'arsenic.

Les caractéristiques chimiques de ces sulfures sont rassemblées dans le tableau III.2.

Tableau III.2.- Caractéristiques chimiques des pyrites utilisées.

Pyrite	Origine	Analyse chimique (%)	Pureté minéralogique (%)
ES	sédimentaire	Fe : 45,36 S : 52,97 As : 0,34	98,33
K2	hydrothermale	Fe : 46,56 S : 53,38 As : 0,018	99,94
K4	hydrothermale	Fe : 45,88 S : 53,65 As : 0,0089	99,53

Les pyrites sont utilisées après lavage acide (HCl 3N) pour éliminer des impuretés superficielles, broyage à sec dans un broyeur en carbure de tungstène et tamisage par voie humide. Les fractions 32-53 μm et $\approx 10\text{-}32 \mu\text{m}$ ont été retenues pour la plupart des expériences. La fraction 10-32 μm a été obtenue par sédimentation 15 min en allonge, de la fraction $< 32 \mu\text{m}$.

II.- DISPOSITIF EXPERIMENTAL D'ÉTUDE DES BIOLIXIVIATIONS ET DE L'ADHÉSION BACTÉRIENNE

Les expériences de biolixiviation et d'estimation de l'adhésion bactérienne ont été réalisées en réacteurs constitués par un flacon sérum de 500 ou 250 ml, contenant respectivement 400 ou 200 ml de pulpe minérale de densité 2 %. La pulpe a été homogénéisée et oxygénée de façon optimale au moyen d'une turbine en téflon à double flux tournant à 750 tr/min (Figure III.1). Un ensemble de 7 réacteurs était disposé à l'abri de la lumière, dans un bain thermostaté à 30°C.

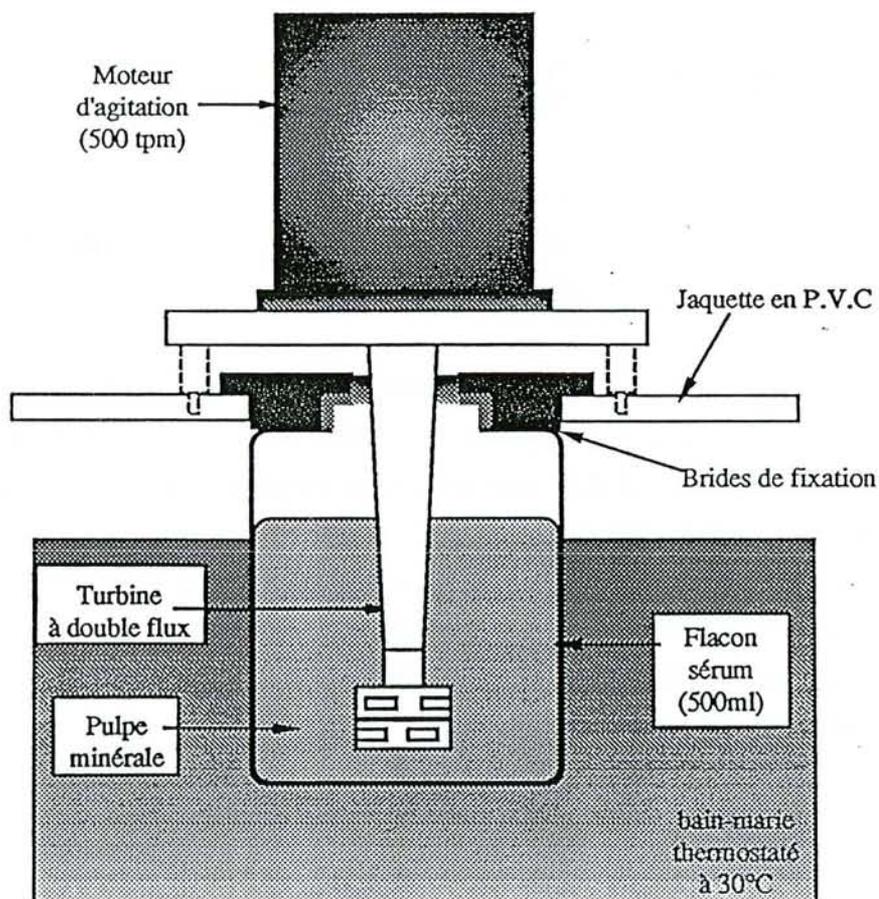


Figure III.1.- Représentation schématique du réacteur à turbine utilisé au cours des expériences de biolixiviation et d'adhésion bactériennes.

Les expériences entreprises au moyen de ces réacteurs n'ont pas été réalisées dans des conditions strictes de stérilité, les dispositifs ne le permettant pas (Figure III.1). Ce système a été choisi pour réaliser des biolixiviations, pouvoir réaliser des répétitions et obtenir une aération optimale des cultures bactériennes. Les microorganismes autres que *T. ferrooxidans* ne représentaient que 2% du nombre total de bactéries en suspension en fin de biolixiviation, le milieu de culture minéral, son pH acide et son inoculation par *T. ferrooxidans* limitant les risques de contamination.

III.- MÉTHODES

A.- MÉTHODES DE DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES NON ADHÉRENTES

1.- Comptage direct au microscope optique, en cellule de Thoma

Cette technique est utilisée pour estimer la concentration des bactéries non-adhérentes, au cours de processus de biolixiviation et indirectement l'adhésion bactérienne.

2.- Technique du NPP (Nombre le plus probable) ou MPN (Most Probable Number) en plaques de microtitration

Elle a été utilisée pour estimer indirectement l'adhésion bactérienne. Elle permet de dénombrer les cellules viables ; par conséquent, l'inoculum bactérien doit être pris en phase exponentielle, pour obtenir une viabilité de 100% des bactéries.

Des microplaques stériles de 96 cupules à fond plat et d'une capacité de 0,3 ml sont utilisées. Chaque dilution de la suspension bactérienne sert à ensemercer 40 cupules contenant chacune 0,2 ml de milieu M2 : 25 µl de suspension cellulaire diluée sont dispensés dans chaque cupule, à l'aide d'une pipette automatique.

Les microplaques sont ensuite incubées 15 jours (au minimum) à 1 mois, à 30°C, en atmosphère humide, puis un comptage des cupules positives et négatives est effectué pour chaque dilution. Le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon est déduit à l'aide d'un programme informatique de calcul de probabilités (Hughes et Plantat, 1982).

3. Milieux solides pour le dénombrement et l'isolement de *Thiobacillus ferrooxidans*

Ils ont été utilisés pour estimer indirectement l'adhésion bactérienne.

a.- Principe de préparation et détermination de la composition des milieux

Ils sont préparés par mélange d'un milieu minéral 10X concentré, d'agarose (agent gélifiant), et d'une solution de FeSO_4 (source d'énergie). L'autoclavage séparé d'agarose dans l'eau osmosée, et du milieu minéral acide, évite l'hydrolyse de l'agarose en milieu acide et à chaud.

Trois milieux solides ont été employés. Le milieu utilisé comme référence a été établi à partir du milieu "FeTSB" développé par Johnson *et al.* (1987). Il est noté "Milieu de Johnson". Les modifications apportées sont les suivantes :

- le TSB (Tryptone Soja Broth) a été remplacé par K_2HPO_4 , Johnson *et al.* (1987) ayant indiqué que ce dernier est le facteur, qui, présent dans le TSB, stimule la croissance de *T. ferrooxidans*. Il a également établi que seule une concentration faible de cet élément (0,02 g/l) permet d'obtenir une croissance optimale de *T. ferrooxidans*.

- le pH a été ajusté à 2,3-2,35 au lieu de 2,7, étant donné que la précipitation du Fe^{3+} est réduite à ce pH plus faible.

- la concentration en agarose a été ajustée . Des expériences réalisées dans le cadre de ce travail ont permis de constater un meilleur développement bactérien sur gélose, pour une concentration en agarose à 5 g/l qu'à 7 g/l. Johnson et McGinness (1991) ont également ajusté cette concentration à 5 g/l. Elle a été retenue pour le milieu de référence et les deux autres milieux testés.

Ces deux autres milieux, notés N2K et N3K présentent une concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et MgSO_4 différentes de celles du milieu de référence. Comme Monroy (1993) a obtenu de meilleures biooxydations en augmentant la concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dans le milieu liquide de 0,4 g/l à 1 g/l, nous avons également augmenté la concentration de cet élément de 1,25 g/l (dans le milieu de Johnson), à 2 g/l et 3 g/l (dans les milieux N2K et N3K). Le MgSO_4 a été utilisé à la même concentration que celle du milieu liquide M2 de biooxydation (0,4g/l).

b.- Composition des milieux solides

Les milieux solides sont notés milieux de Johnson, N2K et N3K.

Tableau III.3.- Composition des milieux solides.

Constituants	Milieu de Johnson (g/l)	Milieu N2K (g/l)	Milieu N3K (g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,25	2	3
K ₂ HPO ₄	0,02	0,02	0,02
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5	0,4	0,4
FeSO ₄ , 7H ₂ O	20	20	20
Agarose	5	5	5

L'agarose (Type I : Low EEO ; Sigma) est préparé à raison de 0,5 g pour 80 ml d'eau osmosée, puis autoclavé 15 min à 121°C. Le milieu final est obtenu par ajout, à l'agarose à 45°C, de :

- 10 ml de milieu minéral dix fois concentré, préalablement autoclavé 15 min à 121 °C.
- 8 ml de solution de FeSO₄, 7H₂O à 25 % dans H₂SO₄, 0,01M (pH 1,8), stérilisée par filtration à 0,2 µm.

Pour tous les milieux, le pH final est compris entre 2,3 et 2,35.

c.- Protocole du dénombrement sur milieu solide

Il est résumé par le schéma suivant:

Suspension bactérienne pure
de *Thiobacillus ferrooxidans* dans le milieu M2.
(Numération en cellule de THOMA)



Etalement sur boîtes des dilutions
(dans le milieu M2) suspectées former
entre 0 et 300 colonies/boîte.



3 boîtes par dilution
100µl de dilution / boîte
Incubation à 30°C.

En général, des dénombrements ont été réalisés à partir de 14 jours d'incubation lorsque toutes les colonies étaient bien développées. Un dénombrement a également été réalisé plus tard, pour s'assurer que la totalité des bactéries s'était développée.

La numération de 150 colonies/boîte est à la limite d'une bonne culture, pour obtenir des colonies individualisées, et la qualité de l'étalement conditionne le résultat final.

d.- Traitement statistique des résultats

La transformation logarithmique des numérations suit une loi normale. De plus, seuls les résultats vérifiant $30 \leq N \leq 300$ colonies/boîte (N = nombre de colonies/boîte) ont une signification statistique.

L'intervalle de confiance de la moyenne, au seuil $\alpha = 5\%$, est donné par la formule:

$$IC = 2 (S \times t)/a$$

où S = écart type

t = valeur donnée par la table de Student-Fisher
pour le nombre de degrés de liberté ($n-1$)

a = Racine ($n-1$) si $n < 30$ avec n = nombre de répétitions

a = Racine (n) si $n \geq 30$

B.- LA MÉTHODE ELIFA (ENZYME LINKED IMMUNOFILTRATION ASSAY)

1.- Principe

Son principe est le même que celui de la méthode ELISA (Enzyme-Linked-Immuno Sorbent-Assay). Ces méthodes mettent en jeu un ensemble de réactions dans lesquelles un complexe Antigène-Anticorps (Antigène = Ag ; Anticorps = Ac) est révélé par une réaction enzymatique (Figure III.2). L'intensité de la réaction enzymatique est proportionnelle au nombre d'épitopes bactériens ayant réagi. La spécificité de cette réaction dépend de celle de l'antisérum dirigé contre la bactérie à dénombrer.

L'antisérum a été préparé spécifiquement contre des bactéries de l'espèce *T.ferrooxidans*, issues de biolixivations de la pyrite K2, par immunisation d'un lapin (A. Dorier -IUT de Biologie Appliquée, F 69622 Villeurbanne, France). Les propriétés antigéniques des bactéries varient en fonction de leur état physiologique (Phase de croissance...), un mélange de bactéries en phase exponentielle et en fin de phase exponentielle de croissance a été utilisé pour préparer l'antisérum.

La réaction ELIFA est réalisée directement sur les particules minérales. Pour faciliter les lavages, éviter les pertes de matériel (pyrite, bactéries), l'ensemble des réactions se fait sur

membrane filtrante, selon le même principe que la technique ELISA. D'autre part, elle est plus rapide que la technique ELISA.

La réaction ELIFA a également été réalisée sur les bactéries libres en suspension; cette réaction, exprimée par rapport à la numération par la méthode du NPP, permet d'étalonner la réaction ELIFA.

Un essai témoin est réalisé avec de la pyrite autoclavée, pour éliminer les réactions non spécifiques dues au minéral.

La quantité de pyrite mise en jeu est déterminée par dosage du fer résultant de la solubilisation complète du sulfure, par l'acide nitrique concentré.

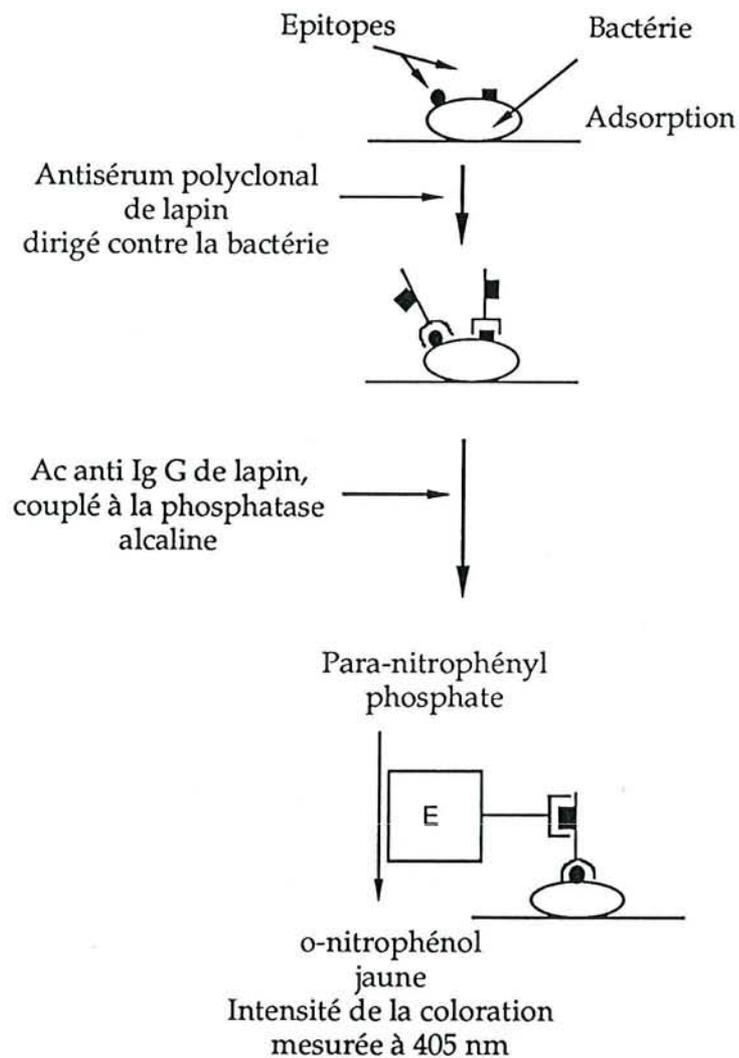


Figure III.2.- Méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay).
E = phosphatase alcaline

2.- Matériel et produits utilisés pour la réaction ELIFA

a.- Matériel

Les réactions sont réalisées sur plaques de filtration MultiScreen-GV Millipore (ref. MAGV N22 10). Chaque plaque est constituée de 96 puits.

Les tampons et réactifs mis en jeu dans la réaction sont :

- Tampon Tris, pH 7,6 (= TBS) ;
- Tween 20 (Prolabo 28 829.296) ;
- Sérum-Albumine-Bovine (= BSA)(Sigma A-7030) ;
- Conjugué constitué d'Ig G de chèvre anti-Ig G (H+L) de lapin, couplées à la phosphatase alcaline (= G.A.R.) (Biosys-BI 2507) ;
- p-nitro-phényl phosphate (= PNPP) (Boehringer Mannheim, 107 905) ;
- diéthanolamine (Prolabo 23 374.291).

L'agitation des plaques est effectuée avec des agitateurs de microplaques (Bioblock, 86247), les lectures d'absorbance avec un lecteur de microplaques (Dynatech MR 5000) équipé de filtres interférentiels de 405 nm et 630 nm.

b.- Protocole de préparation des tampons de la réaction ELIFA

- **Tampon Tris Saline Buffer ou "TBS", pour 1 l**

NaCl	8,0 g
Tris base	0,604 g (Trizina Base Sigma)
HCl 1M	3,8 ml
pH	7,6 ajusté avec HCl

Préparé 5x concentré, il est autoclavé à 121°C pendant 15 min. Son pH est vérifié lors de la dilution au 1/5^{ème}.

- **Tampon de la Réaction Enzymatique : Tampon diéthanolamine 1M à pH 9,8, pour 1 l**

diéthanolamine	97 ml
NaN ₃	0,2 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
pH	9,8 ajusté avec 10ml d'HCl≈10N

il se conserve à + 4°C et est remis à température ambiante 1 heure avant utilisation.

3.- Protocole de la réaction ELIFA

Ce protocole a été adapté d'après le protocole de réactions ELISA appliqué par Gouzou (1992), pour la reconnaissance et le dénombrement de *Bacillus polymyxa*. La réaction est réalisée en 1 jour. Ses étapes successives sont résumées figure III.3.

a.- Dépôt de l'antigène

100 µl de suspension bactérienne ou la pyrite mise en contact avec les bactéries sont déposés dans un puits de la microplaque. Les puits sont alors lavés par filtration, par 200 µl de milieu TBS - Tween 0,05 % (trois lavages au total).

b.- La saturation des sites non spécifiques par la BSA

La saturation des sites non spécifiques se réalise par 100 µl d'une solution à 1 % (p/v) de BSA dans le tampon TBS. Cette réaction se déroule pendant 1 heure à 37°C et sous agitation.

c.- La réaction Ag-Ac

Après une étape de lavage (trois lavages dans 200 µl de tampon TBS-Tween 0,05 %) 100 µl d'antisérum dilué au 1/10000 dans le tampon TBS-Tween 0,05%-BSA 1 %, sont introduits dans chaque puit. La microplaque est incubée 1h à 37°C, sous agitation.

d.- Révélation de la réaction Ag-Ac

Après une étape de lavage, pour éliminer les Ac non fixés, 100 µl de GAR dilué au 1/2000 dans le tampon TBS-Tween-BSA sont ajoutés dans chaque puit. Les plaques sont incubées 1 h à 37°C sous agitation. Après deux lavages par le tampon TBS-Tween, suivi d'un lavage par le tampon diéthanolamine, les complexes Ag-Ac sont révélés par la réaction enzymatique de la phosphatase alcaline avec le PNPP : cette réaction est déclenchée par l'addition de 100 µl de PNPP en solution à 1 mg/ml dans le tampon diéthanolamine. Les plaques sont incubées à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation. La formation du produit de réaction est quantifiée au moyen d'un lecteur à double longueur d'onde qui mesure la DO à 405 nm, dont on retranche la DO à 630 nm. Une mesure cinétique de la réaction est réalisée.

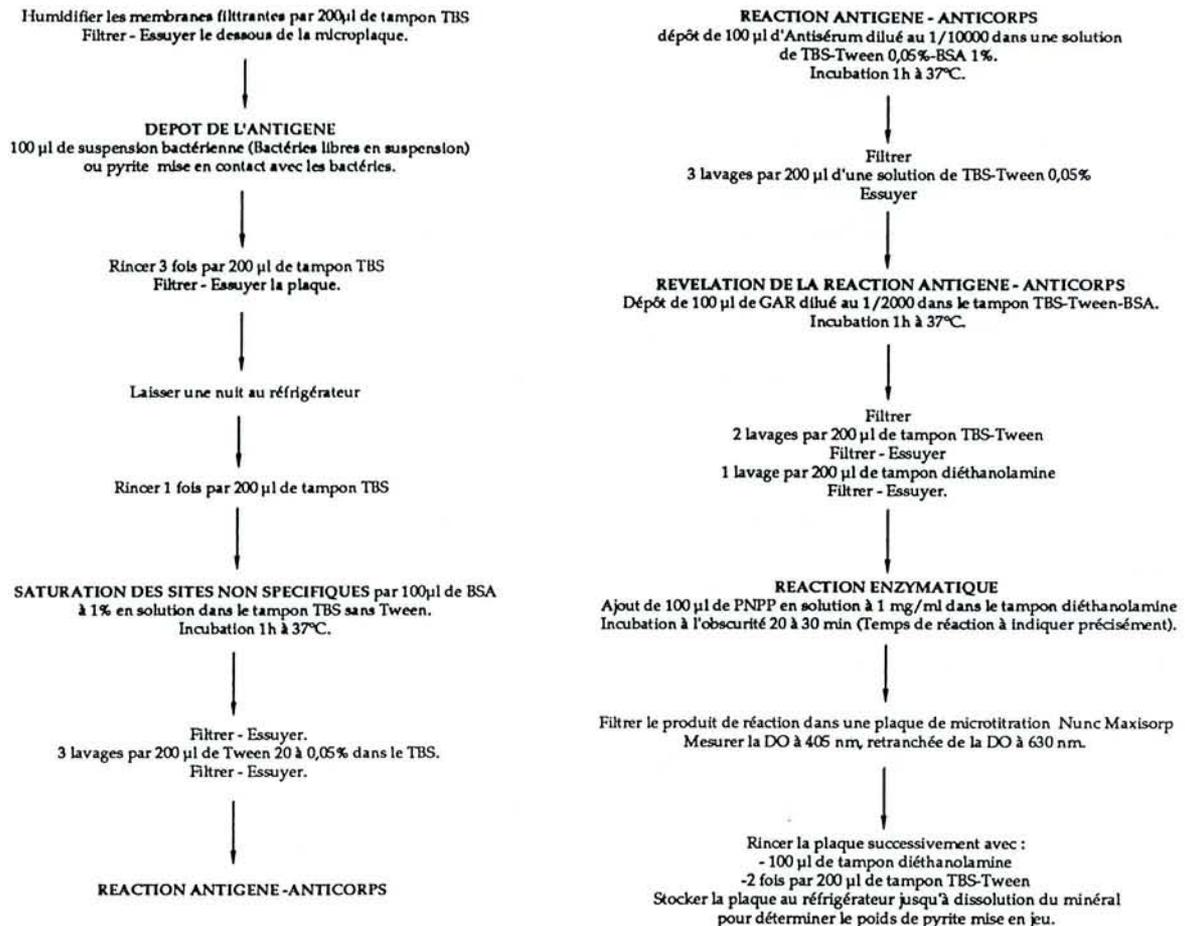


Figure III.3.- Protocole de la réaction ELIFA.

e.- Détermination du poids de pyrite mis en jeu au cours des réactions ELIFA

La pyrite contenue dans chacun des puits est dissoute par l'acide nitrique concentré 66 % et le dosage du fer libéré permet de calculer le poids de pyrite solubilisée. Le fer est dosé en ICPAS (Induced Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry), dans la matrice HNO_3 . L'erreur relative commise sur le résultat est de 1 %. Le poids de pyrite est déduit du dosage de fer, connaissant la composition chimique des pyrites.

4.- Lavage des particules minérales avant dépôt

La méthode ELIFA, réalisée sur des particules lavées et non lavées, a permis d'observer une réaction plus importante pour les particules non lavées, qui pourrait être due à la présence de bactéries dans le liquide interstitiel. Ce résultat nous a conduit à laver la pyrite deux fois par dilution au 1/10 dans H_2SO_4 pH 1,8, avant dépôt.

C.- ESTIMATION DES BACTÉRIES FIXÉES SUR LE MINÉRAL PAR DÉSorption PHYSICO-CHIMIQUE

Cette méthode développée par Monroy *et al.* (1994) permet de distinguer deux classes de bactéries fixées, en fonction de leur force de liaison au minéral :

- les bactéries faiblement fixées et récupérées à l'aide d'un simple lavage du minéral. De façon pratique, ces bactéries ou "bactéries de lavage" sont récoltées de la façon suivante: une pointe de spatule (300 mg environ) de pyrite est introduite dans un tube eppendorf (taré). Le minéral est lavé par des fractions de 1 ml de milieu M2. Ce lavage est poursuivi de façon à avoir dans la dernière fraction de lavage une concentration bactérienne $\leq 10^6$ bactéries/ml (4 bactéries au maximum/16 carrés unitaires en cellule de Thoma).

- les bactéries adhérant plus fortement à la pyrite, et désorbées à l'aide d'un tensio-actif: le Tween 80. Le minéral lavé au milieu M2, subit deux traitements successifs de 10 min par 1 ml de Tween 80 à 0,1 % ou 10 %. Deux mélanges au vortex sont réalisés: l'un après ajout du Tween, l'autre au cours du contact du minéral avec le tensio-actif. La pyrite ainsi traitée est finalement lavée par 1 ml de milieu M2.

Pour vérifier l'efficacité de ces traitements, la pyrite a été soumise à un traitement supplémentaire par 1 ml de Tween à 10 %. Les bactéries désorbées au cours du lavage et par le tween 80 sont dénombrées en cellule de Thoma.

Trois essais sont ainsi réalisés. La figure III.4 résume ce protocole.

D.- OBSERVATIONS EN MEB DES GRAINS DE PYRITE APRÈS BIOLIXIVIATION

Les échantillons ont été prélevés à différentes étapes de biolixiviation pour différentes conditions d'agitation des cultures.

Deux modes de fixation ont été mis en œuvre pour observer les bactéries présentes à la surface du minéral :

- ♦ la fixation par vapeurs osmiques utilisée par Monroy (1993) et Monroy *et al.* (1994) : pour conserver les structures organiques, les particules sont fixées lentement sous osmium pendant 3 jours, puis déshydratées dans un dessiccateur.

- ♦ la fixation, en milieu liquide, dans une solution de glutaraldéhyde, suivie d'une déshydratation à l'éthanol et au HMDM (1, 1, 1, 3, 3, 3-hexa-methyldisilazane).

Ses étapes successives sont :

- * une fixation pendant 10 min par une solution de glutaraldéhyde à 0,1 % (v/v) dans le tampon TBS, suivie d'un rinçage par le TBS,

SYSTEME DE BIOLIXIVIATION

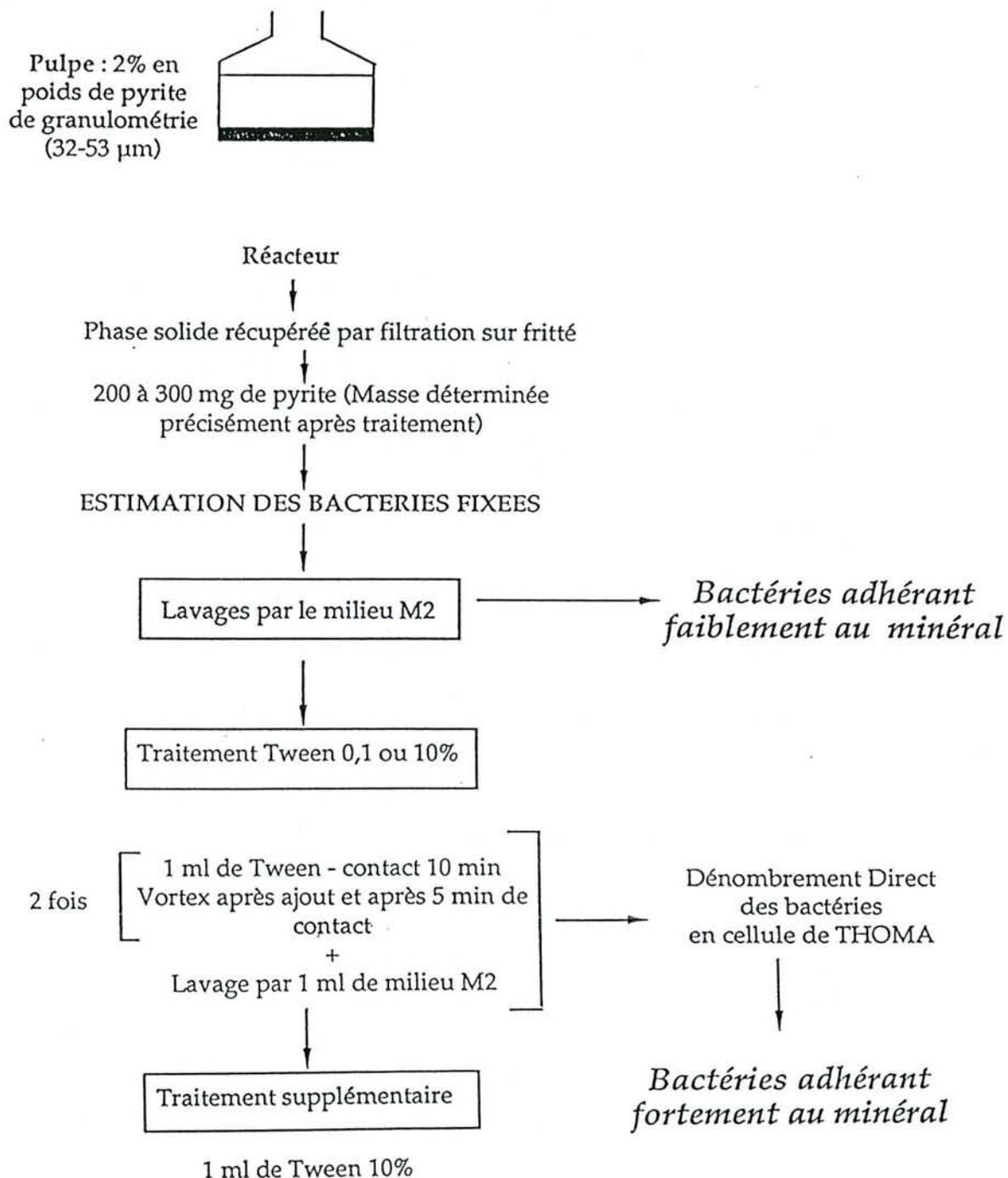


Figure III.4.-Technique de désorption des bactéries fixées à la pyrite par le Tween 80.

* Plusieurs étapes successives de déshydratation par l'éthanol utilisé en concentrations croissantes :

- d'abord 4 étapes de 5 min chacune, par des concentrations en éthanol successives de 10 %, 20 %, 40 %, 60 % (v/v),
- une étape de 15 min par l'éthanol à 80 %,
- deux étapes de 15 min par l'éthanol à 95 %,
- trois étapes de 20 min par l'éthanol à 100 %,
- une déshydratation de 5 min par une solution de HMDM.

Pour éviter la réhydratation de l'échantillon, ce dernier est placé au dessiccateur jusqu'au moment de l'observation.

Pour éliminer les bactéries présentes dans le liquide interstitiel, la pyrite a été lavée par une solution d' H_2SO_4 0,01 M, avant fixation-déshydratation. Pour ces observations, nous avons également choisi la fraction granulométrique 10-32 μm , plutôt que la fraction 32-53 μm , pour augmenter la probabilité de mettre en évidence les bactéries fixées, la surface spécifique et l'adhésion bactérienne étant plus importantes (Chapitre VIII) sur la fraction plus fine.

Les préparations ont été observées après métallisation au carbone, au moyen d'un microscope électronique à balayage Hitachi S 2500 (*Faculté de Sciences, Nancy I*).

E.- MESURE DU POTENTIEL ζ DES BACTÉRIES ET DU MINÉRAL

1.-Principe de la mesure du potentiel ζ par électrophorèse (d'après Thomas, 1987)

La distribution spatiale des charges électriques au voisinage de la surface d'une particule est structurée en **double-couche électrochimique** comportant (Chapitre II, § I.B.) :

- **les charges de la surface**, localisées ;
- **les charges de signe opposé**, qui se répartissent en deux catégories de contre-ions : les contre-ions complexés et les contre-ions hydratés de la couche diffuse.

Lors de la migration de l'ensemble, sous l'effet d'un champ électrique, seule une partie de la double-couche, les ions complexés et l'eau structurée par la surface est solidaire des particules, l'autre partie, le nuage ionique restant solidaire de la solution. Les deux couches sont séparées par le plan de coupure hydrodynamique, où se développe le potentiel ζ , qui fait l'objet de la mesure.

L'appareillage

Les mesures ont été réalisées au *Laboratoire "Environnement et Minéralurgie"* (CNRS-ENSG Nancy) à l'aide d'un appareil LASER-ZEE METER PENKEM 501. Un champ électrique est appliqué à une suspension colloïdale (les particules ne doivent pas sédimenter dans le milieu), et le

sens et la vitesse de migration des particules sont mesurés au moyen d'un microscope. Les particules se dirigent vers l'électrode de signe opposé à celui de leur charge, et à une vitesse proportionnelle à leur charge et au potentiel appliqué.

2.- Mode opératoire

Les mesures donnent directement la valeur du potentiel ζ , avec une précision de ± 3 mV.

Elles ont été effectuées dans l'eau déminéralisée, dans NaCl 10^{-2} M et 10^{-3} M, et dans le milieu de biooxydation M1 (1 g.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ ; 0,4 g.l⁻¹ MgSO₄ ; 0,4 g.l⁻¹ KH₂PO₄ ; pH 1,8). Des ajouts d'HCl ou de NaOH ont servi à ajuster le pH des suspensions.

L'évolution du potentiel ζ a été mesurée sur des suspensions bactériennes de densité supérieure ou égale à 10^7 bactéries/ml.

Pour la pyrite, de telles mesures ont nécessité un broyage du minéral à une granulométrie très fine: 5-20 μm : 0,1275 g de pyrite sont conditionnés 1 heure dans 500 ml de milieu (sous agitation magnétique). Un volume de 40 ml de cette suspension est mis sous agitation 15 min au pH désiré. Après un repos de 10 secondes, la cellule du Zeta Mètre est remplie, et le potentiel mesuré.

Des mesures ont également été réalisées sur un mélange bactérie-pyrite; les valeurs mesurées correspondent dans ce cas à la charge de surface des particules de pyrite, avec ou sans bactéries adsorbées. La taille des particules de pyrite (5-20 μm) était supérieure à celle des bactéries (0,5 μm sur 1 μm), ce qui permettait un repérage facile au microscope lors de la mesure du potentiel ζ . De plus, pour vérifier la présence de bactéries libres en suspension, des observations du surnageant ont été effectuées en cellule de Thoma. Ces mesures ont été effectuées à partir de 400 ml d'une pulpe à 2 % en poids de pyrite K2 (5-10 μm) et inoculée à 10^7 bactéries/ml par *Thiobacillus ferrooxidans* adapté au sulfure et récupéré en phase stationnaire.

Correction des valeurs lues, en fonction de la température:

La température intervient sur la mobilité des particules. Comme la valeur de potentiel affichée par l'appareil est calculée pour une température standard de 20°C, il y a lieu de tenir compte des écarts. Un capteur permet de mesurer la température de l'échantillon : l'appareil affiche 20°C \pm T. La correction à appliquer est:

$$\zeta_{\text{corr}} = \zeta_{\text{mes}} \cdot (1 - 0,02 \cdot T)$$

F.- CARACTÉRISATION DES PHASES SUPERFICIELLES DU MINÉRAL

Dans le cadre de ce travail comme dans celui de Mustin (1992) et Monroy (1993), la spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (SIRTF) couplée à la réflexion diffuse a permis de caractériser la nature des phases superficielles. Les spectres ont été obtenus au moyen d'un spectromètre infrarouge Bruker IFS88 avec un accessoire de réflexion diffuse Harrick (*Laboratoire "Environnement et Minéralurgie"*, CNRS-ENSG Nancy) équipé d'un détecteur MCT (Mercury-Cadmium-Telluride). Les analyses ont été effectuées sur 70 mg de minéral (séché sous azote) dilué dans 370 mg de KBr finement broyé.

G.- ANALYSES CHIMIQUES DE LA SOLUTION DE BIOLIXIVIATION

Les concentrations du fer et des sulfates solubilisés au cours du processus d'oxydation ont été déterminées par analyse par spectrométrie d'émission ICP (Inductively Coupled Plasma, Jobin Yvon JY 38S, au *Centre de Pédologie Biologique* - CNRS, Nancy), en présence d'un standard interne au strontium. Les précisions des dosages sont environ 0,5 % pour le fer et 1 % pour les sulfates.

Pour réaliser ces dosages, le milieu de biooxydation a été dilué au 1/20^{ème} ou au 1/200^{ème} (en fonction de l'importance de la solubilisation minérale) et filtré à 0,22 µm sur filtre de nitrocellulose, pour éliminer les microorganismes présents.

Chapitre IV

**Résultats : Mesure de l'Adhésion et
Approche des Mécanismes**

Résultats : Mesure de l'adhésion et approche des mécanismes

L'adhésion bactérienne a été étudiée pour les concentrations bactériennes initiales ($1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml) permettant d'obtenir une lixiviation optimale de la fraction granulométrique 32-53 μm des particules de pyrite.

I.- MÉTHODES INDIRECTES

A.- DENOMBREMENT DES BACTERIES NON ADHERENTES

1.- Précision

Trois méthodes ont été utilisées : la numération au microscope par la cellule de Thoma, la numération des bactéries viables par la technique du NPP et par la technique de dilution sur milieu solide. Leur précision a été déterminée en dénombrant une suspension bactérienne en phase exponentielle (Figure IV.1). Les résultats obtenus sont homogènes. Les intervalles de confiance de la moyenne se recouvrent et sont inférieurs à 0,5 log, montrant que ces méthodes sont précises. Le dénombrement de *T. ferrooxidans* sur les milieux solides N_{2K} et N_{3K}, mis au point pour l'isolement et la numération de *T. ferrooxidans*, est aussi précis que celui obtenu pour le milieu de Johnson (milieu de référence) et par la technique du NPP.

Pour la numération par cellule de Thoma, l'obtention d'une telle précision est longue : elle nécessite la réalisation de trois essais. Par ailleurs, le seuil de cette méthode est de $5 \cdot 10^5$ à 10^6 bactéries/ml, alors que celui des techniques de numération des bactéries viables (technique du NPP et dilution sur milieu gélosé) est de 100 bactéries/ml. La sensibilité de ces deux dernières méthodes est donc meilleure que celle de la numération par cellule de Thoma.

La technique du NPP est également moins lourde et statistiquement meilleure que la technique de dilution sur milieu gélosé (40 répétitions pour la première et trois pour la seconde). Elle est relativement facile à mettre en œuvre, sensible et précise et sera utilisée préférentiellement pour le dénombrement des bactéries non adhérentes avant et après contact bactérie-minéral au cours des expériences de détermination indirecte de l'adhésion.

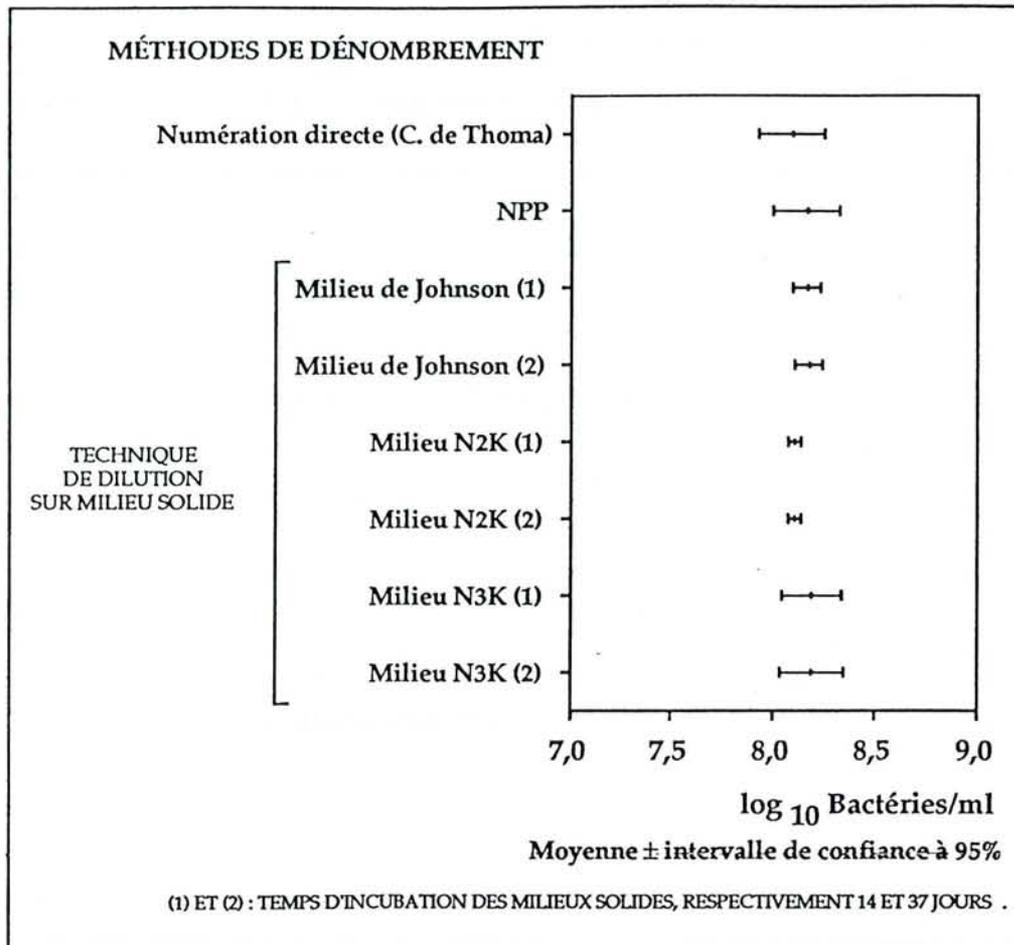


Figure IV.1.- Dénombrements d'une suspension de *Thiobacillus ferrooxidans* récoltée en phase exponentielle par numération au microscope par la cellule de Thoma, par la méthode du NPP et par dilution sur milieux gélosés.

2.- Dénombrement des bactéries non adhérentes par cellule de Thoma, par la technique du NPP et par dilution sur milieu gélosé

a.- Première expérience

Une première expérience a été réalisée pour estimer l'adhésion à la pyrite K2 après 4 heures et 24 heures de contact des bactéries adaptées au minéral et récupérées en phase exponentielle.

Les dénombrements des bactéries non adhérentes (Figure IV.2) permettent d'observer des concentrations voisines de $5 \cdot 10^6$ à $2,5 \cdot 10^7$ b/ml à T_0 (en l'absence de contact), 4 heures et 24 heures de contact. Les résultats obtenus par les différentes méthodes sont homogènes et les intervalles de confiance de la moyenne, obtenus aux différents temps de mesure se recouvrent, montrant qu'il n'y a pas de différence significative de la concentration des bactéries non adhérentes avant et après

contact bactérie-minéral. Ils sont également faibles (inférieurs à 0,5 log) et montrent que les déterminations sont précises.

L'absence de différence entre les concentrations bactériennes avant et après contact suggère l'absence d'adhésion bactérienne. La concentration des bactéries non adhérentes tend, cependant, à décroître après 4 heures de contact. Pour vérifier si l'adhésion bactérienne se produit, d'autres expériences similaires ont été réalisées.

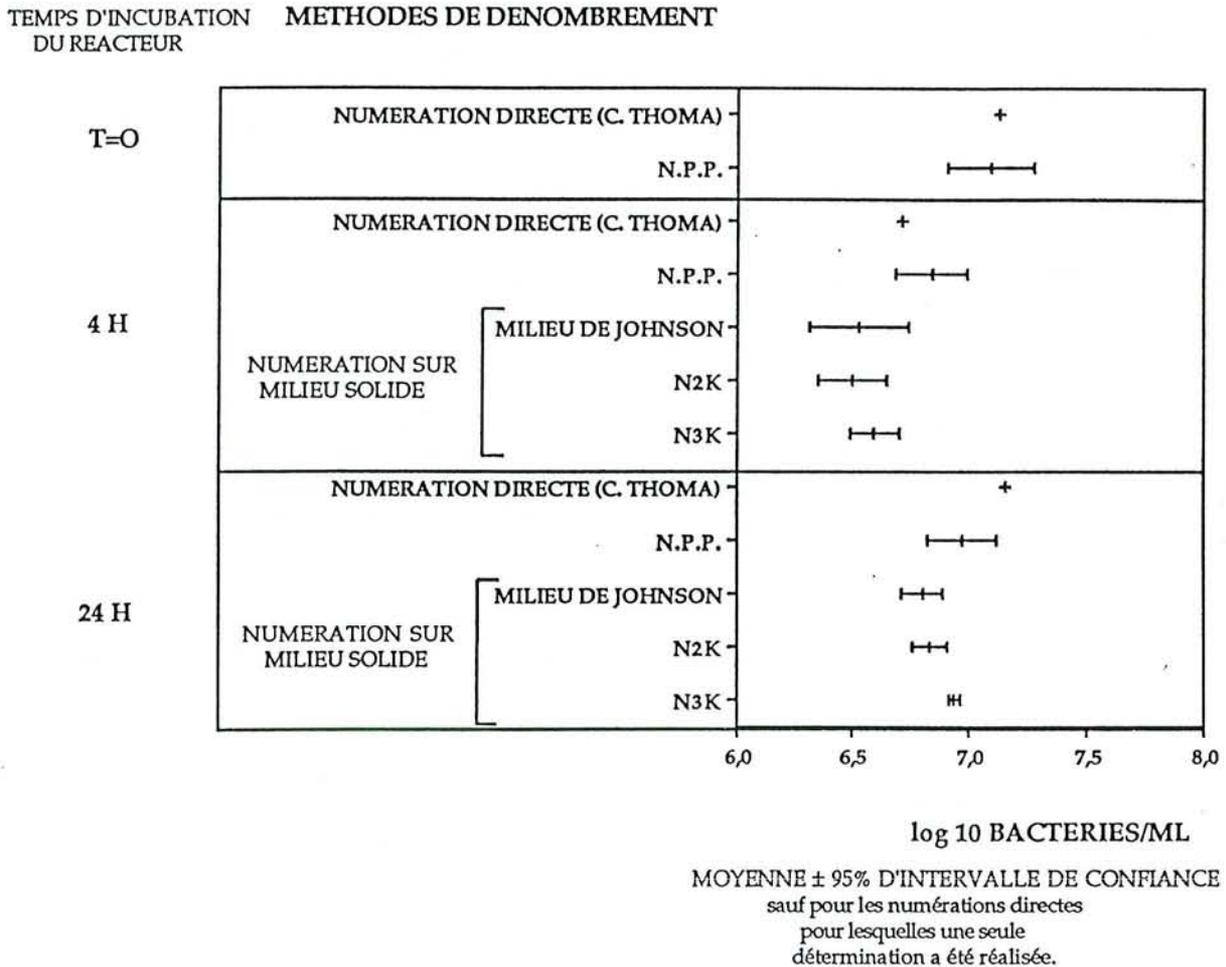


Figure IV.2.- Dénombrements des bactéries non adhérentes au cours d'études de l'adhésion des bactéries de l'espèce *Thiobacillus ferrooxidans*, à la pyrite K2. les bactéries sont dénombrées avant et après contact avec le minéral. L'inoculum bactérien est une préculture en phase exponentielle sur la pyrite K2.

b.- Seconde expérience

Elle a été réalisée pour estimer l'adhésion bactérienne à 1 heure, 4 heures, 6 heures et 24 heures de contact. Des bactéries adaptées à la pyrite ont été mises en contact avec la pyrite K4. Deux concentrations bactériennes ont été testées : une concentration permettant d'obtenir une lixiviation optimale ($1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml) et une concentration plus importante ($5 \cdot 10^7$ bactéries/ml).

L'estimation des concentrations de bactéries non adhérentes dans l'inoculum à T_0 (avant contact) et après contact, par numération par la cellule de Thoma et par la technique du NPP (Figure IV.3.), permet d'observer que :

- les résultats des deux méthodes à T_0 sont identiques, montrant que la totalité des bactéries est viable,
- les résultats obtenus par la technique du NPP à T_0 et à 24 heures de contact sont significativement différents lorsque l'inoculum correspond à $1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml, mettant en évidence l'adhésion bactérienne,
- les résultats obtenus par numération par cellule de Thoma à 1 heure, 4 heures, 6 heures et 24 heures sont différents. Connaissant la précision de cette méthode (0,4 log) ils ne sont pas significativement différents, suggérant l'absence d'adhésion. On peut cependant noter une légère chute de la concentration des bactéries non adhérentes jusqu'à 4 heures de contact. C'est aussi à ce moment que cette concentration semble être la plus faible.

La chute de la concentration bactérienne entre T_0 et 4 heures (mise en évidence par numération par cellule de Thoma) et entre T_0 et 24 heures (mise en évidence par la technique du NPP) met en évidence l'adhésion bactérienne. Les concentrations avant et après contact sont cependant peu différentes, indiquant que la procédure indirecte convient peu à l'estimation de l'adhésion et qu'il est nécessaire de mettre au point une méthode directe. Ces résultats suggèrent aussi que la concentration des bactéries non adhérentes atteint la valeur minimale à 4 heures et que c'est donc à ce moment que l'adhésion est la plus importante. L'ensemble des résultats de cette expérience a été considéré pour estimer l'adhésion de façon indirecte par différence des concentrations de bactéries non adhérentes dans l'inoculum (T_0) et après contact.

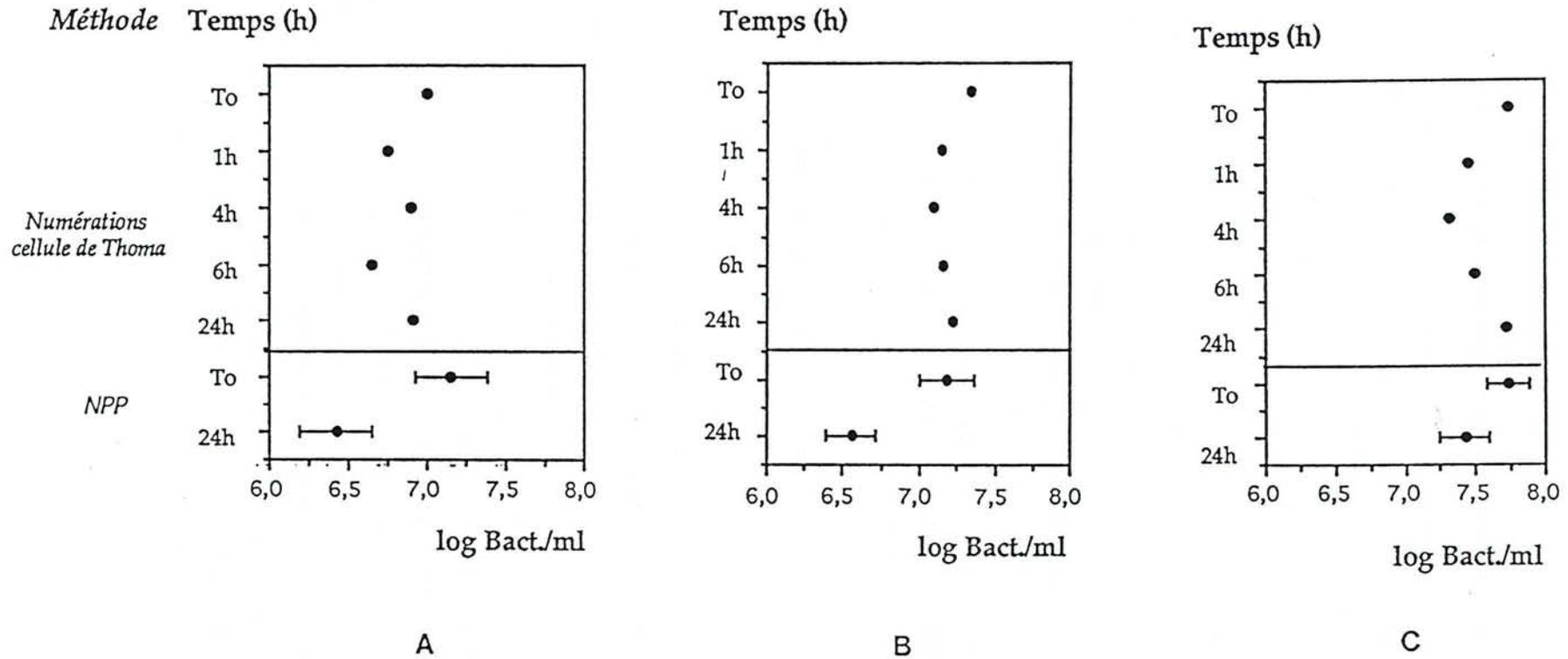


Figure IV.3.- Dénombrements des bactéries non adhérentes au cours d'études de l'adhésion à la pyrite K4 (fraction granulométrique 32-53 μm). Les concentrations initiales des inoculum bactériens sont de $1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml (A et B) et $5 \cdot 10^7$ bactéries/ml (C).

B.- ÉVOLUTION DE L'ADHÉSION BACTÉRIENNE AU COURS DES PREMIÈRES 24 HEURES DE CONTACT

1.- Résultats

Les estimations réalisées à partir des numérations par la cellule de Thoma (Figure IV.4.) montrent qu'entre 1 heure et 24 heures de contact, l'adhésion varie entre 10^5 et 10^6 bactéries/mg pour un inoculum de $1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml, et entre 10^6 et $5 \cdot 10^6$ bactéries/mg pour un inoculum de $5 \cdot 10^7$ bactéries/ml. Ces valeurs sont déterminées par différence de deux mesures réalisées par numération par la cellule de Thoma. Leur précision peut être considérée comme au moins égale ou inférieure à celle d'une numération par cellule de Thoma, de sorte que les valeurs d'adhésion obtenues pour les différents temps de contact ne sont pas significativement différentes.

Les mesures réalisées par la technique du NPP (Figure IV.4.) indiquent qu'à 24 heures de contact, l'adhésion est comprise entre $5 \cdot 10^5$ et 10^6 bactéries/mg pour un inoculum de $1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml, et égale à 10^6 bactéries/mg pour l'inoculum plus important. L'intervalle de confiance de la moyenne est inférieur à 0,5 log, montrant que l'estimation est précise.

Les valeurs obtenues à partir des deux méthodes sont semblables et indiquent que l'adhésion est constante entre 1 heure et 24 heures de contact. Elle est immédiate et met donc en jeu des interactions physico-chimiques.

2.- Détermination du taux de recouvrement

L'adhésion à la pyrite K4 peut être estimée en moyenne à $5 \cdot 10^5$ bactéries/mg pour une inoculation de $1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml et 10^6 bactéries/mg pour une inoculation de $5 \cdot 10^7$ bactéries/ml. La connaissance de la surface d'une bactérie ($1 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m} = 0,5 \mu\text{m}^2$) et de la surface spécifique de la pyrite K4 ($0,019 \text{ m}^2/\text{g}$) déterminée par granulométrie laser (chapitre VIII), permet d'évaluer le taux de recouvrement à 1,3 et 2,6 % respectivement, ce qui représente 350 à 700 bactéries par grain, sachant que le diamètre moyen d'une particule de pyrite est de $65 \mu\text{m}$ et que sa surface est donnée par la formule $4\pi R^2$ avec R = rayon de la particule.

Ce taux de recouvrement élevé devrait permettre une observation facile des bactéries fixées en microscopie électronique à balayage. Les tentatives de mise en évidence des bactéries faites par Mustin (1992) se sont cependant révélées infructueuses. En modifiant la préparation de l'échantillon de pyrite pour l'observation en microscopie électronique, Monroy (1992) et Monroy *et al.* (1994) ont pu mettre en évidence les bactéries fixées. Dans ce cas, plutôt que de sécher la pyrite sous flux d'azote, ces auteurs l'ont fixée lentement sous osmium, puis déshydratée dans un dessiccateur pour conserver les structures organiques. Il est donc probable que dans le travail de Mustin, les bactéries aient été désorbées sous la pression du flux d'azote utilisé pour sécher le minéral.

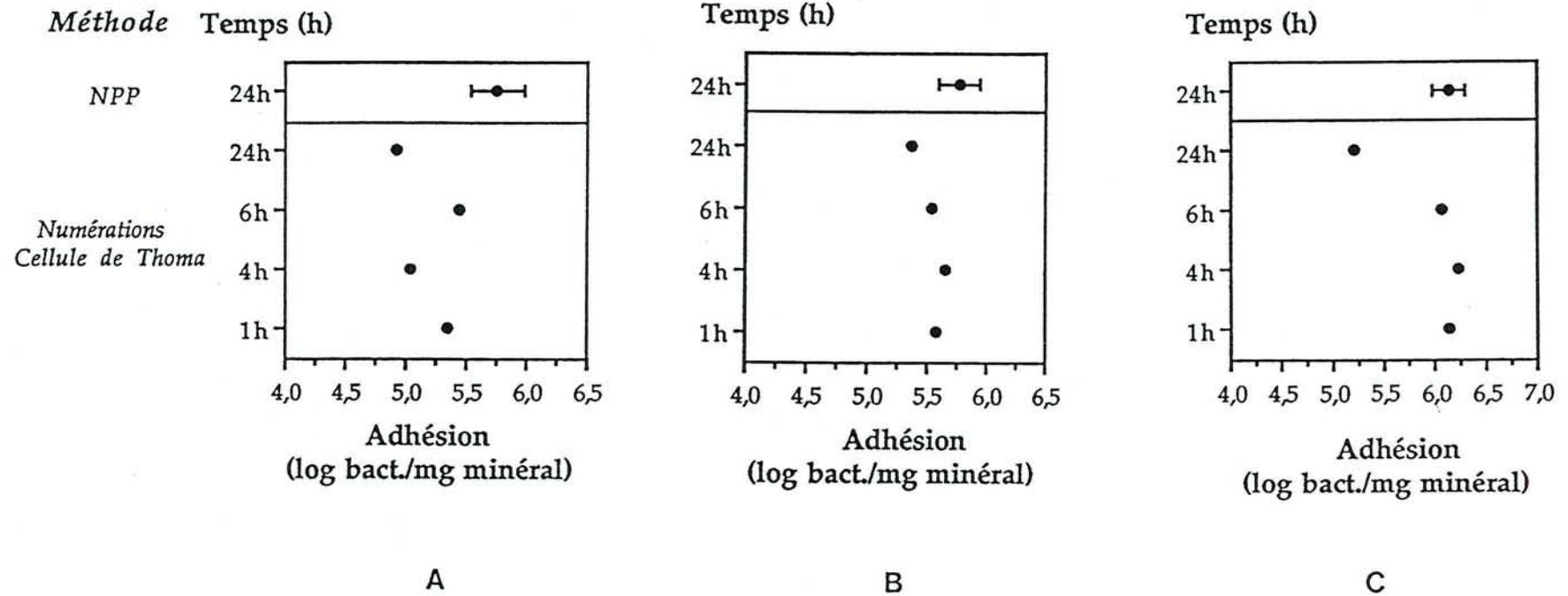


Figure IV.4.- Evolution de l'adhésion bactérienne de la pyrite K4 (fraction 32-53 μm) au cours des premières 24 heures de contact. L'adhésion a été estimée de façon indirecte par différence des concentrations de bactéries non adhérentes dans l'inoculum (T_0) et après contact. L'inoculum bactérien a été adapté à la pyrite. La concentration de l'inoculum est de $1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml (A et B) et $5 \cdot 10^7$ bactéries/ml (C).

Le taux de recouvrement réel est probablement inférieur à 350-700 bactéries par grain de minéral, parce qu'en choisissant la granulométrie laser pour estimer la surface spécifique, nous avons sous-estimé cette dernière. Nous avons fait l'hypothèse que les particules de pyrite étaient sphériques ; en réalité, elles n'ont pas de forme définie et ne sont pas poreuses. Leur surface spécifique est donc plus élevée que le résultat donné par la granulométrie laser. Son estimation par la méthode BET en utilisant le Krypton (Mustin 1992) a conduit à $1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Cependant, dans ce cas, l'estimation est réalisée à l'échelle moléculaire et les massifs formés à la surface minérale par certaines espèces chimiques telles que les sulfates, le S^0 , vont participer à cette estimation et provoquer une surestimation de la surface spécifique. Cette valeur doit être considérée lorsqu'on fait réagir un réactif chimique avec la surface minérale. Mais dans le cas de l'interaction bactérie-minéral, c'est l'estimation par granulométrie laser qui convient le mieux, les bactéries étant des particules, et cette méthode réalise une estimation des particules. En considérant que la surface spécifique est comprise entre $0,019 \text{ m}^2/\text{g}$ et $1 \text{ m}^2/\text{g}$, le taux de recouvrement peut lui, être estimé entre 350 à 700 bactéries par grain ou encore 7 à 13 bactéries par grain, respectivement. Les cellules doivent donc être théoriquement visibles au MEB. Il est toutefois également possible qu'une partie des bactéries se détache de la surface minérale sous l'effet du vide nécessité par l'observation en microscopie électronique et rende la mise en évidence des bactéries plus difficile.

Des taux de recouvrement de l'ordre de 1 à 2 % sont faibles par rapport aux valeurs de 20 à 45 % déterminées par Ohmura *et al.* (1993) pour des particules de pyrite de taille moyenne similaire aux nôtres ($63 \mu\text{m}$). Dans leurs expériences, un inoculum bactérien important a été utilisé (10^9 bactéries/ml) pour obtenir une saturation du minéral en bactéries. Dans notre expérience, l'inoculum est environ 100 fois plus faible ($1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml) et correspond à la concentration bactérienne initiale permettant d'obtenir une lixiviation optimale. Des expériences dans le cadre de ce travail ont également montré que l'utilisation d'un inoculum plus important ($5 \cdot 10^7$ bactéries/ml) n'améliore pas la solubilisation minérale (résultats non présentés). Le faible taux de recouvrement estimé dans nos conditions expérimentales suggère que pour ces conditions de lixiviation optimale, la pyrite n'est pas saturée en bactéries.

L'ensemble de ces taux de recouvrement indique que la répartition bactérienne à la surface minérale ne se réalise pas sous forme de couches multiples et permet de supposer qu'une méthode immunoenzymatique de type ELISA pourrait permettre une estimation directe de l'adhésion.

II.- ESTIMATION DIRECTE DES BACTÉRIES FIXÉES A LA PYRITE, PAR LA MÉTHODE IMMUNOENZYMATIQUE ELIFA

Des cellules récupérées en phase exponentielle, cultivées préalablement sur Fe^{2+} (notées Tf/ Fe^{2+}) et des cellules adaptées à la pyrite K4 (notées Tf/K4) ont été étudiées pour leur adhésion aux pyrites ES et K4 (fraction 32-53 μm). Celle-ci a été estimée après 23 heures de contact bactérie-minéral.

A.- DILUTION OPTIMALE DU SÉRUM

L'objectif est de rechercher la dilution en sérum pour laquelle les anticorps sont en excès par rapport aux antigènes, pour la concentration bactérienne moyenne à détecter (10^7 bactéries/ml). La courbe réactionnelle pour laquelle le point d'inflexion correspond à cette concentration bactérienne, définit la dilution optimale de l'antisérum. Celle-ci a été déterminée par réaction ELISA classique.

Les réactions ELISA obtenues pour différentes dilutions de l'antisérum sont représentées sur la figure IV.5. Les réactions aux dilutions 10^{-2} et 10^{-3} atteignent un plateau pour des concentrations bactériennes de 10^6 bactéries/ml, ce qui témoigne d'une saturation de la réaction, en anticorps. A la dilution 10^{-4} du sérum, pour une concentration bactérienne de 10^7 bactéries/ml (concentration moyenne que l'on souhaite encadrer par le test) la courbe atteint son point d'inflexion.

La dilution 10^{-4} de l'antisérum présente donc le type de réaction recherchée : pour des concentrations bactériennes supérieures à 10^7 bactéries/ml, une réaction importante et l'absence de plateau de réaction montrent que les anticorps sont encore en excès à cette dilution, pour réagir à des concentrations bactériennes élevées.

La comparaison des réactions pour les dilutions en antisérum 10^{-4} et 10^{-5} a également montré une réaction plus intense pour la dilution 10^{-4} que pour la dilution 10^{-5} (résultats non présentés).

Pour la dilution 10^{-5} , les anticorps ne sont plus en excès par rapport aux antigènes.

La dilution 10^{-4} de l'antisérum a été choisie pour les prochaines réactions .

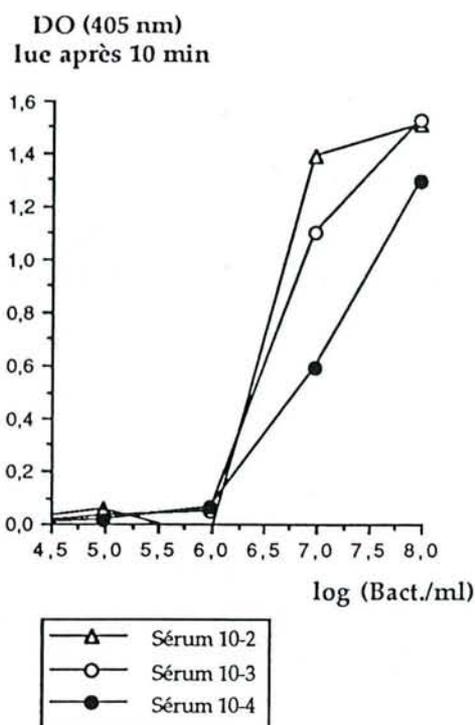


Figure IV.5. Effet de la dilution de l'antisérum sur la réaction ELISA.

B.- SENSIBILITÉ DE LA RÉACTION ELIFA POUR LA DÉTECTION DE *T. ferrooxidans* : RÉACTION DES BACTÉRIES NON ADHÉRENTES - COURBE ÉTALON

La DO obtenue pour la réaction ELIFA des bactéries non-adhérentes à 23 heures de contact a été rapportée au nombre de bactéries estimé par le dénombrement par la technique du NPP (Figure IV.6.). Le seuil de détection de la réaction ELIFA est de $0,7 \text{ à } 1.10^5$ bactéries/ml. Cette méthode est donc plus sensible que la technique de numération par cellule de Thoma. La réaction est significativement différente pour des concentrations bactériennes différant de $0,5 \text{ log}$, ce qui montre sa précision. Une meilleure sensibilité est obtenue pour les cellules adaptées à la pyrite K4 que pour les cellules ayant subi une préculture sur sulfate ferreux. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les anticorps ont été préparés à l'aide de bactéries cultivées sur la pyrite K2. La présence d'épitopes spécifiques chez les bactéries cultivées sur pyrite est à démontrer. Les cellules non adhérentes récupérées après un jour de contact, d'une part avec la pyrite ES et d'autre part avec la pyrite K4, donnent la même réaction, ce qui suggère qu'aucune modification de la constitution antigénique n'a eu lieu au cours du premier jour de contact.

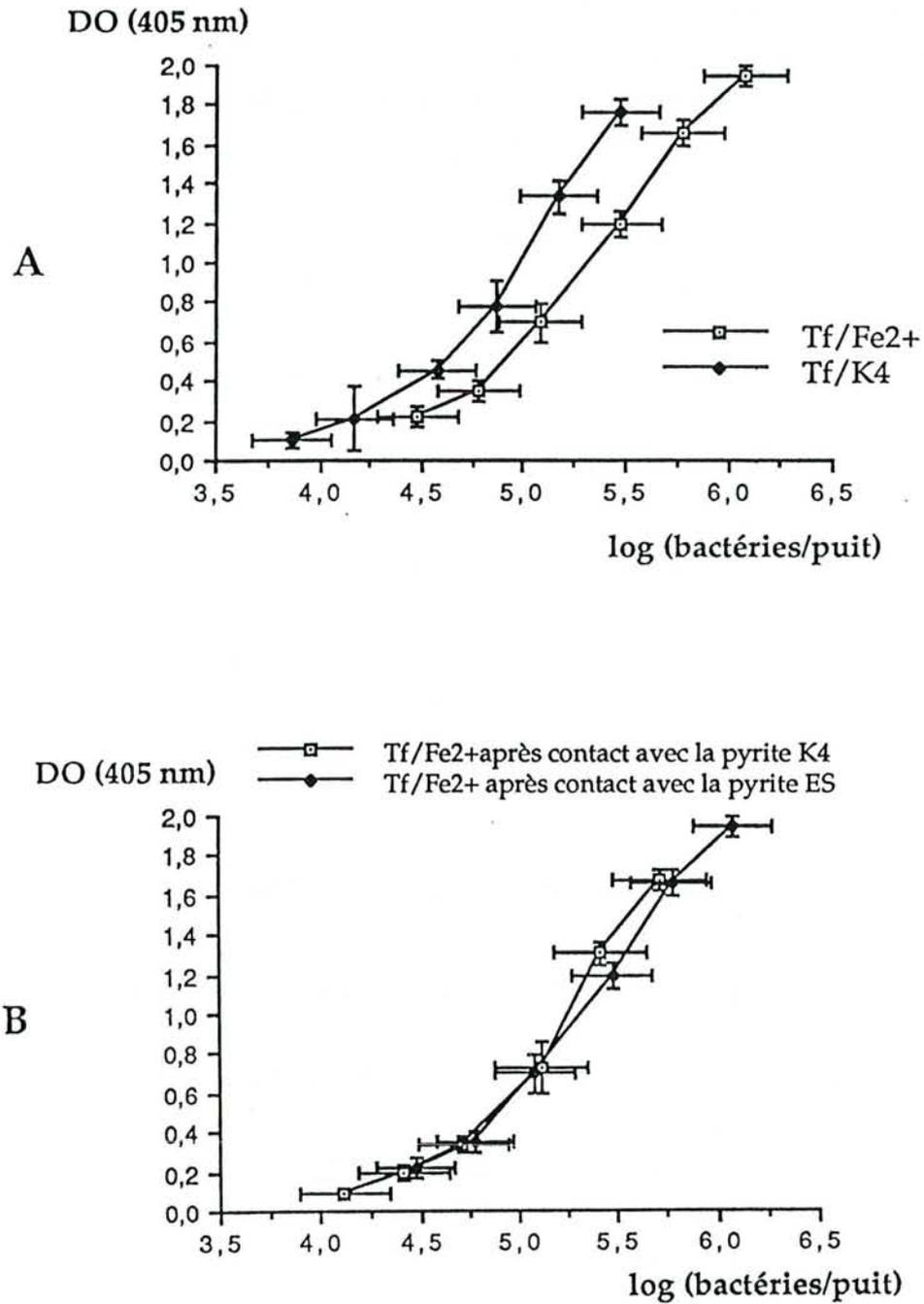


Figure IV.6.- Intensité de la réaction ELIFA des bactéries non adhérentes après 23 h de contact avec le minéral.

(A) Réaction des cellules Tf/Fe²⁺ et Tf/K₄ après contact avec la pyrite ES.

(B) Réaction des cellules Tf/Fe²⁺ après contact avec les pyrites ES et K₄.

Les cellules Tf/Fe²⁺ et Tf/K₄ correspondent respectivement à des bactéries cultivées préalablement sur Fe²⁺ et sur pyrite K₄.

La réaction étant plus sensible que la numération par cellule de Thoma, on pourrait envisager de l'utiliser pour dénombrer les bactéries non adhérentes au cours d'une biooxydation. Dans une étude mettant en jeu des répétitions, la numération par cette méthode serait plus rapide, puisqu'il est possible de réaliser 60 dépôts par microplaque. Les résultats de la figure IV.6. suggèrent une variation de la réaction en fonction des propriétés antigéniques des bactéries. Celles-ci varient probablement en fonction de leur état physiologique (phase de croissance, nature du substrat). Il est important de vérifier l'influence de l'état physiologique sur la réaction. Une variation de cette réaction en fonction de la croissance bactérienne indiquerait que le dénombrement, par cette méthode, des bactéries non adhérentes au cours d'une biooxydation serait sans intérêt.

C.- RÉACTION ELIFA DES BACTÉRIES FIXÉES SUR LES PARTICULES DE PYRITES

1.- Expériences préliminaires

a.- Réaction des particules minérales stériles et inoculées

La DO obtenue pour un témoin minéral constitué par de la pyrite autoclavée est inférieure à 0,2 unités après 30 minutes de réaction. Au contraire, la pyrite mise en contact 23 heures avec les bactéries donne une réaction rapide et positive. Cette réaction positive montre que les bactéries sont fixées.

b.- Proportionnalité de la réaction en relation avec le poids de pyrite

Une expérience préliminaire, où la réaction a été étudiée en fonction de la quantité du minéral, a permis d'observer une corrélation linéaire pour des poids de pyrite inférieurs à environ 1,5 à 2 mg (Figure IV.7.). Pour des quantités plus importantes de minéral, les résultats montrent une variabilité importante. De plus, au lieu d'obtenir une réaction hors du domaine de lecture de l'appareil ("OVER"), un phénomène de saturation apparaît, comme si la réaction n'était pas totale. Ces observations suggèrent qu'une quantité importante de pyrite est limitante ; par encombrement stérique, le minéral pourrait empêcher l'accès des anticorps à une partie des microorganismes adhérents.

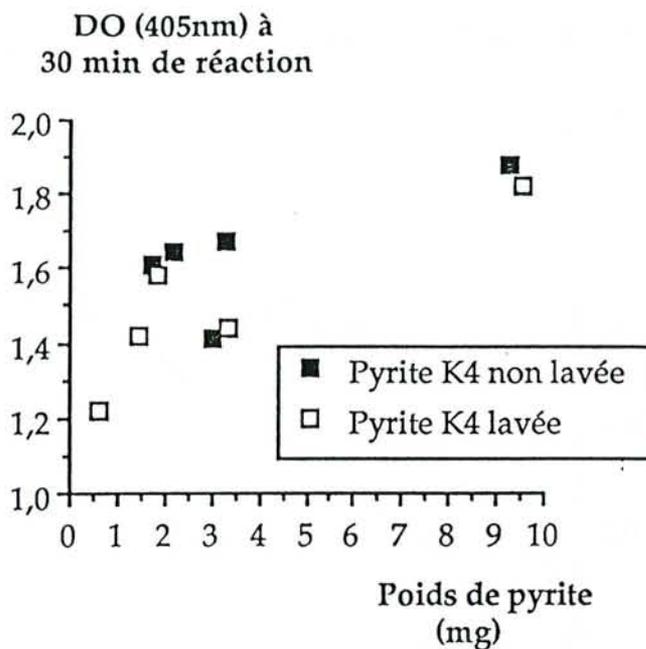


Figure IV.7.- Réaction ELIFA obtenue sur le minéral en contact pendant un jour avec les bactéries de l'espèce *Thiobacillus ferrooxidans*.

2.- Réaction ELIFA sur les particules de pyrite ES et K4 après 23 heures de contact avec les suspensions bactériennes Tf/Fe²⁺ et Tf/K4

a.- Relation DO-quantité de minéral

Dans tous les cas, une corrélation linéaire est observée entre l'intensité de la réaction et le poids de pyrite mis en jeu (Figure IV.8.). Elle suggère une répartition uniforme des bactéries adhérentes sur la surface minérale.

Dans le cas de la pyrite ES (Figure IV.8.A), une meilleure sensibilité a été obtenue avec les particules mises en contact avec les bactéries adaptées à la pyrite. Un phénomène identique a déjà été observé pour la réaction de bactéries non adhérentes. Ces résultats suggèrent une spécificité de la réaction vis-à-vis de l'antigénicité de la membrane cellulaire.

Dans le cas de la pyrite K4 (Figure IV.8.B), les particules minérales mises en contact avec les deux types de bactéries réagissent de la même façon. La présence d'épitopes spécifiques chez les bactéries adaptées à la pyrite doit être vérifiée.

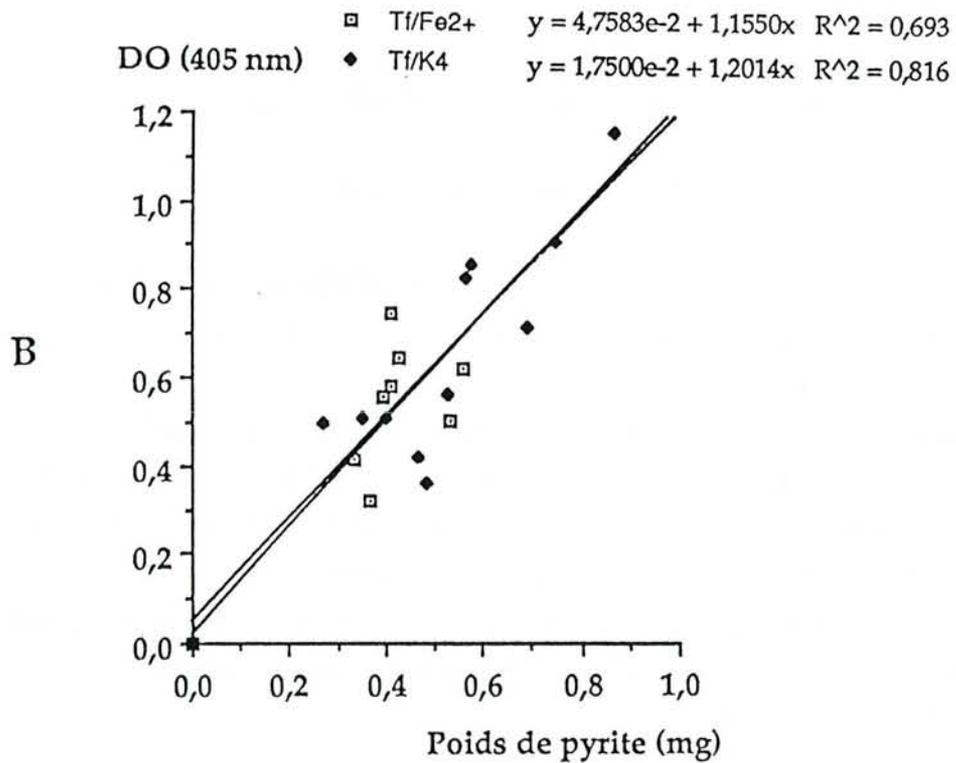
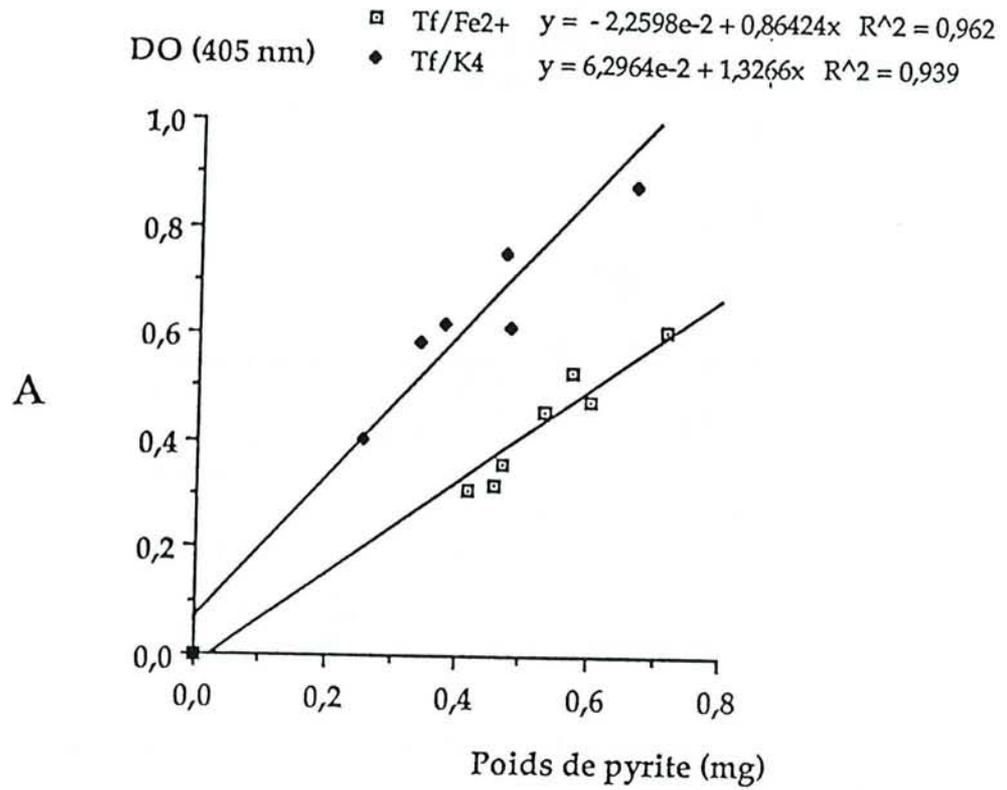


Figure IV.8.- Réaction ELIFA de cellules de *Thiobacillus ferrooxidans* fixées sur la pyrite ES (A) et sur la pyrite K4 (B) après 23 heures de contact.

b.- Détermination de la quantité de bactéries fixées

Pour cela, les DO obtenues pour la réaction des particules de pyrite ont été reportées sur les courbes étalons obtenus pour les bactéries non adhérentes (Figure IV.6.). les résultats sont présentés en même temps que ceux obtenus pour les mesures indirectes (Figure IV.9.).

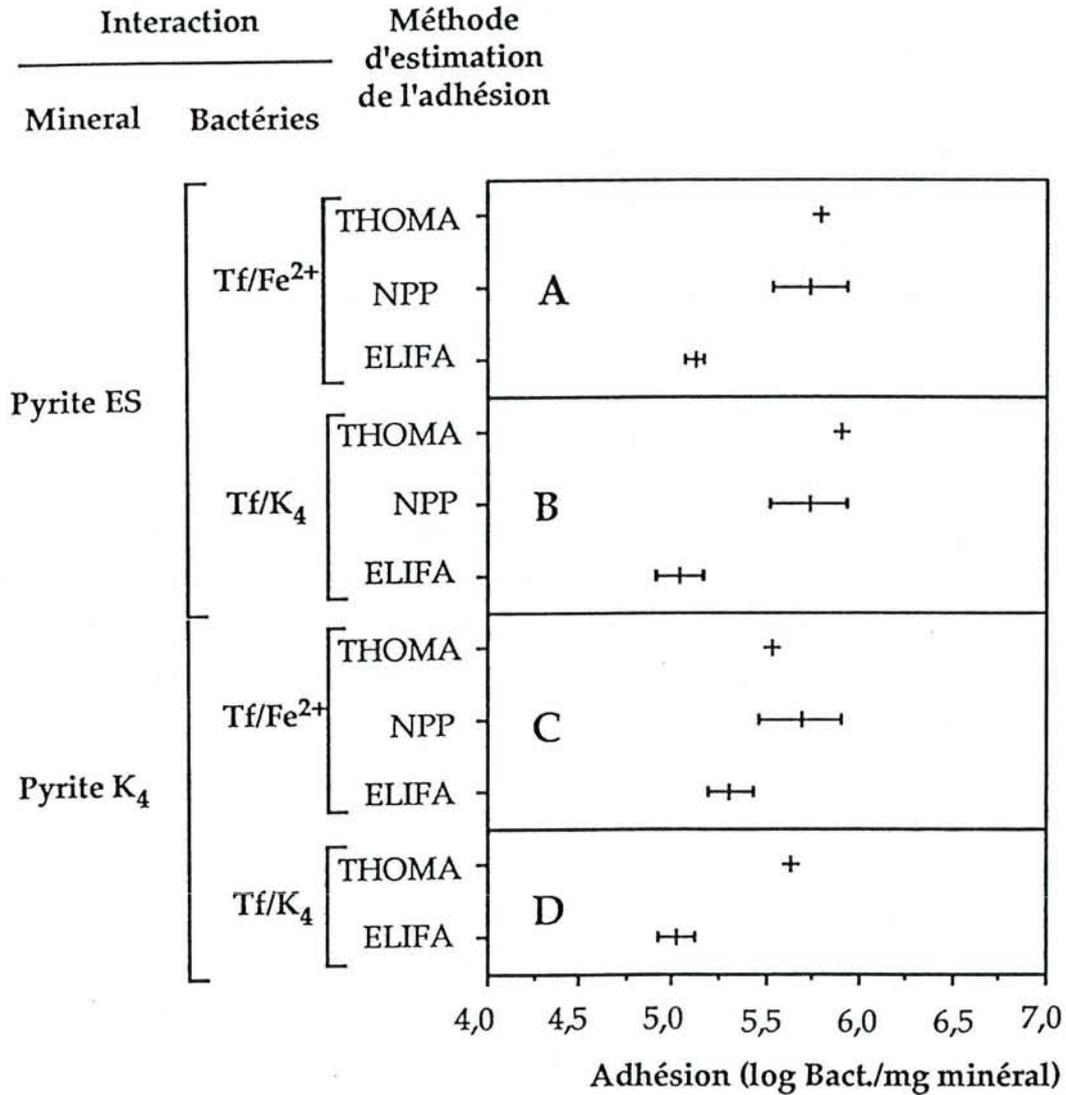


Figure IV.9.- Estimation de l'adhésion bactérienne de *T. ferrooxidans* aux pyrites ES et K4. A et B représentent respectivement les études d'adhésion des cellules Tf/Fe²⁺ et Tf/K₄ à la pyrite ES, C et D les études d'adhésion de ces bactéries à la pyrite K₄.

Les résultats montrent que l'adhésion est identique pour tous les traitements (A, B, C, D), montrant que, dans nos conditions expérimentales (biooxydations optimales), les deux types de cellules adhèrent de la même façon aux deux pyrites. Les mesures indirectes indiquent une adhésion de $3 \text{ à } 9.10^5$ bactéries/mg. Ce résultat est en accord avec celui obtenu dans le paragraphe précédent, et permet d'estimer le taux de recouvrement des bactéries de 0,75 % à 2,25 %, ce qui représente 170 à 500 bactéries par grain.

La réaction ELIFA montre que l'adhésion est identique dans tous les cas (A, B, C, D). Elle est estimée à 10^5 bactéries/mg, avec un intervalle de confiance à la moyenne inférieur à 0,3 log, qui montre que l'estimation est précise. Les résultats obtenus pour la réaction ELIFA sont légèrement inférieurs à ceux de l'estimation indirecte par cellule de Thoma ou par la technique du NPP.

L'ensemble de ces résultats montre que la réaction ELIFA met en évidence l'adhésion bactérienne et permet d'estimer directement la quantité de bactéries fixées au minéral. Elle permet aussi d'obtenir des résultats homogènes, puisqu'elle montre, comme l'estimation indirecte, que l'adhésion est identique dans tous les cas. Elle est aussi précise et sensible car elle permet de détecter 10^4 bactéries par puits.

Par cette méthode, l'adhésion est estimée à 10^5 bactéries/mg, soit un taux de recouvrement égal à 0,25 % ou encore 57 bactéries/grain de minéral, sachant que la surface moyenne d'une bactérie est de $0,5 \mu\text{m}^2$ ($1 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$), la surface spécifique moyenne du minéral est de $20.10^6 \mu\text{m}^2/\text{mg}$, la surface d'un grain de pyrite est donnée par la formule $4\pi R^2$ et la taille d'une particule de pyrite est en moyenne de $60 \mu\text{m}$. Ces résultats sont légèrement inférieurs à ceux obtenus par l'estimation indirecte. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les anticorps ne réagissent pas avec la face bactérienne en contact avec les particules de pyrite. En conséquence, l'adhésion est sous-estimée. On peut également penser que l'élimination des bactéries du liquide interstitiel par lavage peut expliquer cette différence ; dans l'estimation indirecte, ces bactéries sont comptabilisées comme des bactéries adhérentes.

Dans une autre expérience, l'adhésion a également été estimée par les méthodes précédentes (Tableau IV.1). L'un des essais, réalisé dans les mêmes conditions que les précédentes (préculture cellulaire sur Fe^{2+} , mise en contact avec la pyrite K4) a permis d'obtenir des valeurs d'adhésion voisines des précédentes. L'autre essai a été réalisé avec un inoculum bactérien plus important (7.10^7 bactéries/ml). Comme les autres méthodes, la réaction ELIFA a permis de mettre en évidence une adhésion bactérienne importante (de l'ordre de 10^6 bactéries/mg). Elle devrait donc permettre de réaliser une estimation directe de l'adhésion bactérienne à la pyrite en présence d'inoculum importants, dans des conditions pour lesquelles l'estimation indirecte n'est plus significative, et d'étudier les isothermes d'adsorption des bactéries à la pyrite. Il faut pour cela vérifier qu'une adhésion importante ne sature pas la réaction immunoenzymatique, du fait de la proximité des cellules à la surface minérale. D'autre part, pour des pyrites inoculées et lavées, issues du 5ème jour de biooxydation, cette réaction s'est révélée positive, montrant la présence et la persistance de

bactéries fixées en cours de biooxydation. Cette méthode, contrairement aux méthodes indirectes d'estimation de l'adhésion, pourrait permettre de suivre l'évolution des bactéries fixées au cours du processus d'oxydation minérale.

Tableau IV.1.- Expériences d'adhésion de *T. ferrooxidans* à la pyrite : comparaison des résultats obtenus pour les estimations indirectes (Thoma et NPP) et pour l'estimation directe (ELIFA).

Conditions expérimentales	Concentration moyenne de l'inoculum déterminées par le NPP (Bact./ml ⁻¹)	Estimation de l'adhésion (Bact./mg ⁻¹)		
		Numérations cellule de Thoma	NPP	ELIFA
Adhésion de <i>T. ferrooxidans</i> adaptées à la pyrite avec la pyrite K2	6.9.10 ⁷	1.6.10 ⁶	1.7 à 3.6.10 ⁶	9.10 ⁵ à 1.10 ⁶
Adhésion d'une préculture sur sulfate ferreux avec la pyrite K4	1.2.10 ⁷	5.8.10 ⁵	2.9 à 6.0.10 ⁵	2 à 4.10 ⁵

III.- ADHÉSION DANS DES CONDITIONS OPTIMALES DE BIOOXYDATION

L'ensemble des mesures d'adhésion à la pyrite K4 (fraction 32-53 µm) réalisées par les méthodes indirectes a été reporté sur la figure IV.10. Cette représentation permet d'observer une corrélation linéaire entre le log de la quantité de cellules adhérentes et celui de la concentration de l'inoculum bactérien. Elle montre que la pyrite n'est pas saturée aux concentrations bactériennes voisines de 2.10⁷ bactéries/ml, qui permettent d'obtenir une biooxydation optimale. Nous discuterons cette observation en détail après avoir présenté les résultats obtenus pour la solubilisation minérale (Chapitre V).

Dans les conditions choisies, les cellules cultivées initialement sur Fe²⁺ (Tf/Fe²⁺) et pyrite (Tf/K4) adhèrent de la même façon sur la surface du minéral. Cependant, pour déterminer, l'affinité de ces bactéries pour cette surface et la quantité maximale de cellules que l'on pourrait y adsorber, il est nécessaire de réaliser des isothermes d'adsorption.

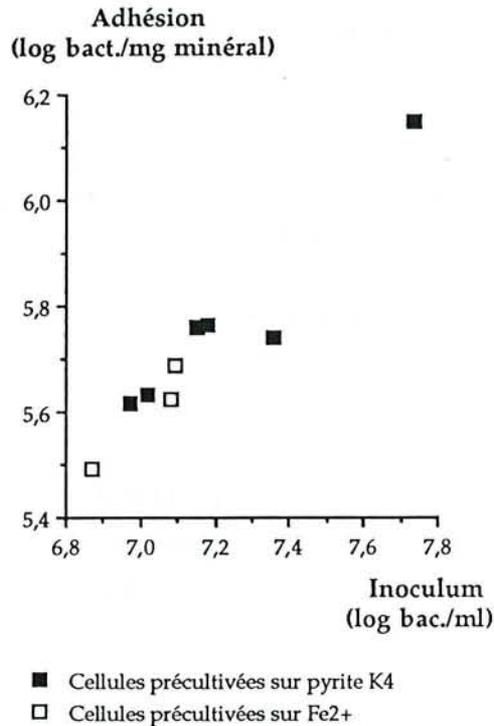


Figure IV.10.- Influence de la concentration de l'inoculum sur l'adhésion à la pyrite K4 (32-53 μm).

IV.- EVOLUTION DES BACTÉRIES FIXÉES AU COURS D'UNE BIOLIXIVIATION DE PYRITE : MESURE APRÈS DÉSORPTION

Avant la mise au point de la méthode ELIFA, des essais ont été réalisés dans le but d'estimer la quantité de bactéries fixées sur la pyrite après les avoir désorbées de la surface minérale. Différents traitements de désorption ont été testés : des traitements par l'urée 6M, par les ultrasons, par action d'un tensio-actif, le Tween 80 et par des combinaisons Tween-ultrasons. Un traitement physico-chimique des particules de pyrite, associant l'action du Tween 80 et l'action mécanique du vortex a fourni les meilleurs résultats (Monroy *et al.*, 1994). Son protocole est décrit au chapitre Matériel et Méthodes.

Cette technique a été testée sur différents échantillons de pyrite prélevés en cours de biooxydation. Nous analyserons d'abord le résultat de cette désorption sur un échantillon de pyrite prélevé à 50 jours de biooxydation, et nous comparerons les résultats obtenus pour deux concentrations de Tween (0,1 et 10 % (v/v)). Ensuite nous suivrons l'évolution des bactéries fixées à l'aide de cette technique au cours d'un cycle complet de biolixiviation.

A.- DESORPTION DES BACTERIES FIXEES À LA PYRITE K2 APRES 50 JOURS DE BIOLIXIVIATION EN REACTEUR

La numération des bactéries non-adhérentes associée à la désorption des bactéries fixées au minéral permettent de mettre en évidence 3 classes bactériennes, en fonction de leur adhésion au minéral (Figure IV.11.) :

- les bactéries non adhérentes ou bactéries libres en suspension, dénombrées par la cellule de Thoma,
- les bactéries adhérant faiblement au minéral et récupérées par lavage de la pyrite à l'aide du milieu minéral M2 utilisé pour les cultures bactériennes,
- les bactéries adhérant fortement au minéral et désorbées par le Tween 80 (0,1 ou 10 %).

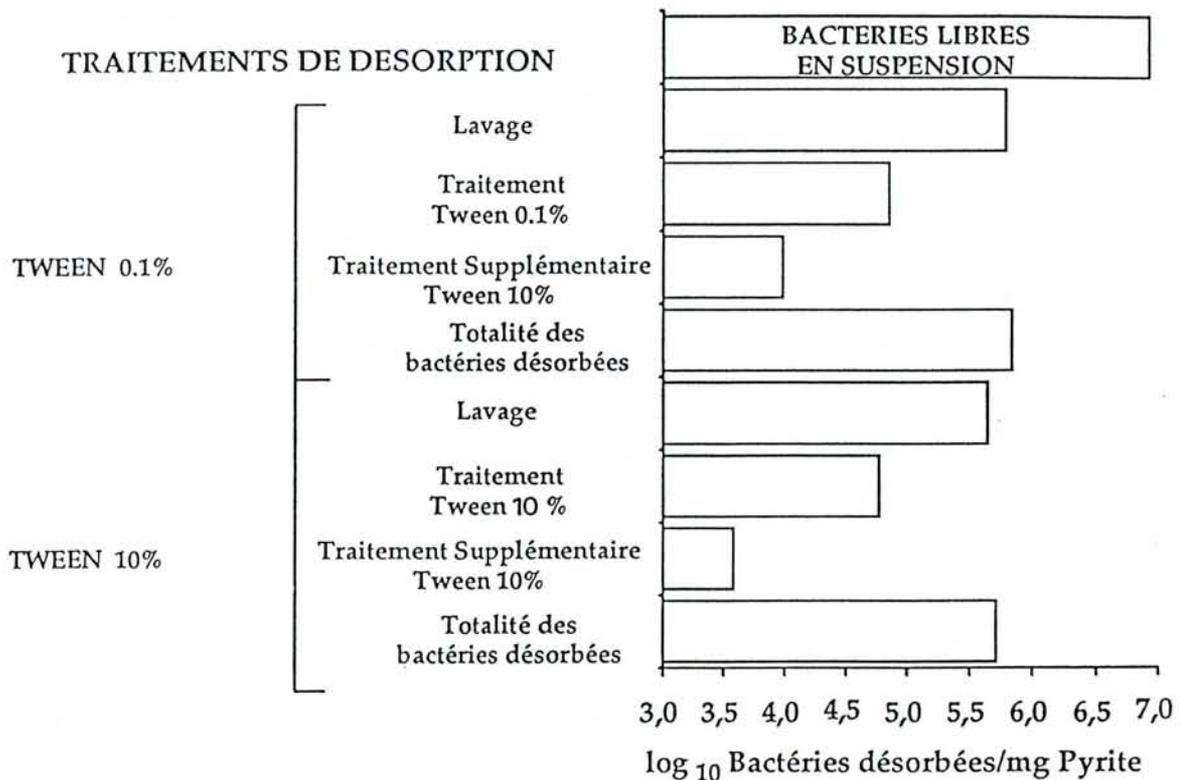


Figure IV.11.- Désorption bactérienne à partir de la pyrite K2 biolixiviée en réacteur. La pyrite K2 (fraction granulométrique 32-53 μm) a été biolixiviée pendant 50 jours par des bactéries de l'espèce *T. ferrooxidans* et adaptées au minéral. Les bactéries fixées sur la pyrite ont été désorbées par des solutions de Tween à 0,1 % et 10 % dans le milieu M2.

À 50 jours de biooxydation, les bactéries libres en suspension sont majoritaires ($1,8 \cdot 10^8$ bact./ml, correspondant à $9 \cdot 10^6$ bact./mg de pyrite) et représentent 93 à 98 % de la population bactérienne. Parmi les bactéries fixées, les bactéries adhérant faiblement au minéral (10^5 à 10^6 bact./mg) sont plus nombreuses que les cellules fixées fortement (10^4 à 10^5 bact./mg). Les bactéries adhérentes représentent seulement 2 à 7% de la totalité des cellules et la majorité d'entre elles est constituée de cellules faiblement fixées.

L'efficacité des deux concentrations en Tween 80 (0,1 et 10 %) pour la désorption des bactéries fortement fixées est équivalente. D'autres résultats ont permis d'observer que l'inoculation de pyrite stérile par les bactéries désorbées par des solutions de Tween à 1 et 10 %, n'a conduit à une solubilisation minérale que dans le premier cas. Les concentrations de 1 % et par conséquent 0,1 % permettent donc de maintenir une partie ou peut-être la totalité des cellules viables. Pour cette raison, la concentration de 0,1 % est retenue pour les désorptions ultérieures.

Un traitement supplémentaire par une solution de Tween 10% libre seulement 0,1 à 1 % de bactéries supplémentaires et permet de vérifier que la technique de désorption adoptée permet de récupérer la majorité des bactéries fixées mais probablement pas la totalité des bactéries fixées, l'interaction Bactérie-Minéral étant forte (Southam et Beveridge, 1992). Cependant, elle permet de classer les bactéries fixées en fonction de leur force de fixation au minéral.

B.- EVOLUTION DES BACTERIES FIXEES ET SOLUBILISATION MINERALE AU COURS D'UNE BIOOXYDATION DE PYRITE ES (FRACTION 32-53 μm).

1.- Suivi des bactéries au cours de la biooxydation

L'évolution des bactéries libres en suspension (Figure IV.12.A) montre une croissance en quatre phases :

- une phase de diminution du nombre de microorganismes au cours des premières 24 heures,
- une phase exponentielle entre 2 et 7 jours,
- une phase de diminution de la vitesse de croissance entre 7 et 14 jours,
- une phase stationnaire à partir de 14 jours de culture.

L'évolution des bactéries fixées sur la pyrite (Figure IV.13.A) permet de constater :

- qu'au premier jour de biolixiviation, le nombre de bactéries fortement fixées au minéral (désorption par le Tween 80) est élevé ($3,5 \cdot 10^5$ bact./mg). Par contre, celui des microorganismes faiblement fixés (désorbés par lavage au milieu minéral M1) est cent fois plus petit ($4,3 \cdot 10^3$ bact./mg).

- qu'ensuite les deux classes de bactéries sont présentes en quantité identique, à la surface de la pyrite (10^5 à 10^6 bact./mg). Ce nombre reste pratiquement constant jusqu'à la fin du processus de biooxydation.

La représentation des intervalles de confiance à la moyenne pour la détermination des bactéries fortement fixées (Figure IV.13.B) montre que ces intervalles varient de 0,7 à 2 log. La faible précision de la technique peut s'expliquer par le fait que c'est une méthode indirecte : l'incertitude des résultats obtenus résulte d'une combinaison de l'incertitude de la numération par la cellule de Thoma et de celle de la désorption.

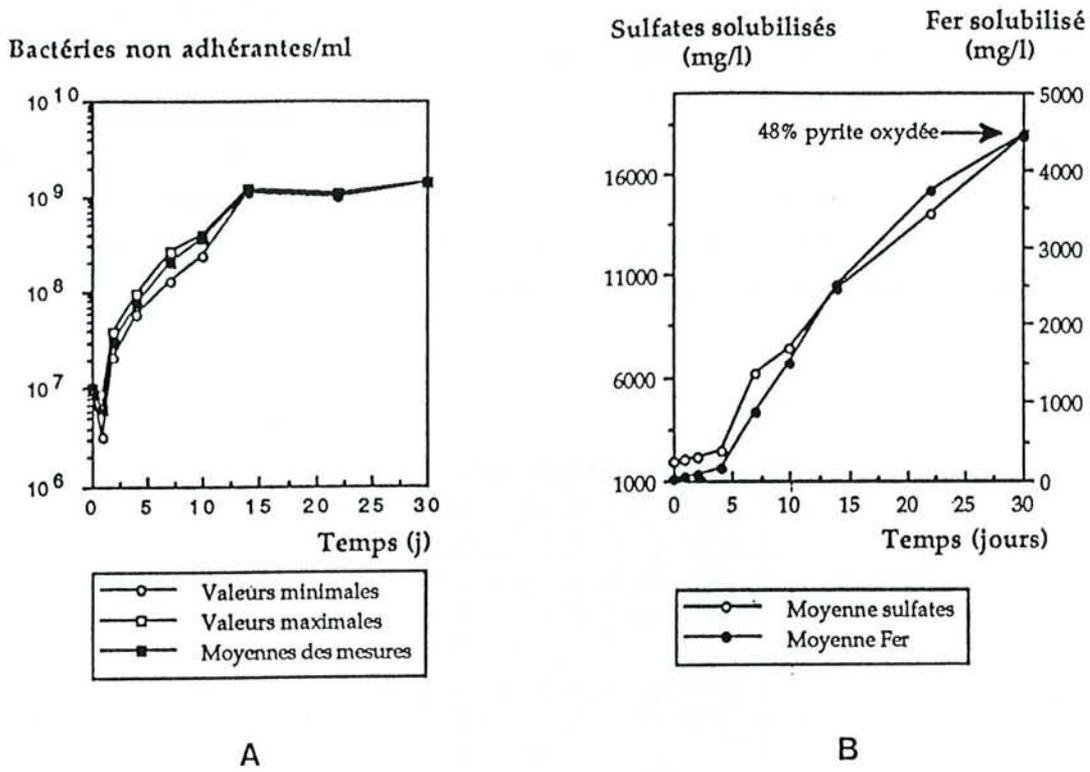


Figure IV.12.- Evolution des bactéries non adhérentes et solubilisation des sulfates et du fer au cours de la biooxydation de pyrite ES (32-53 µm).

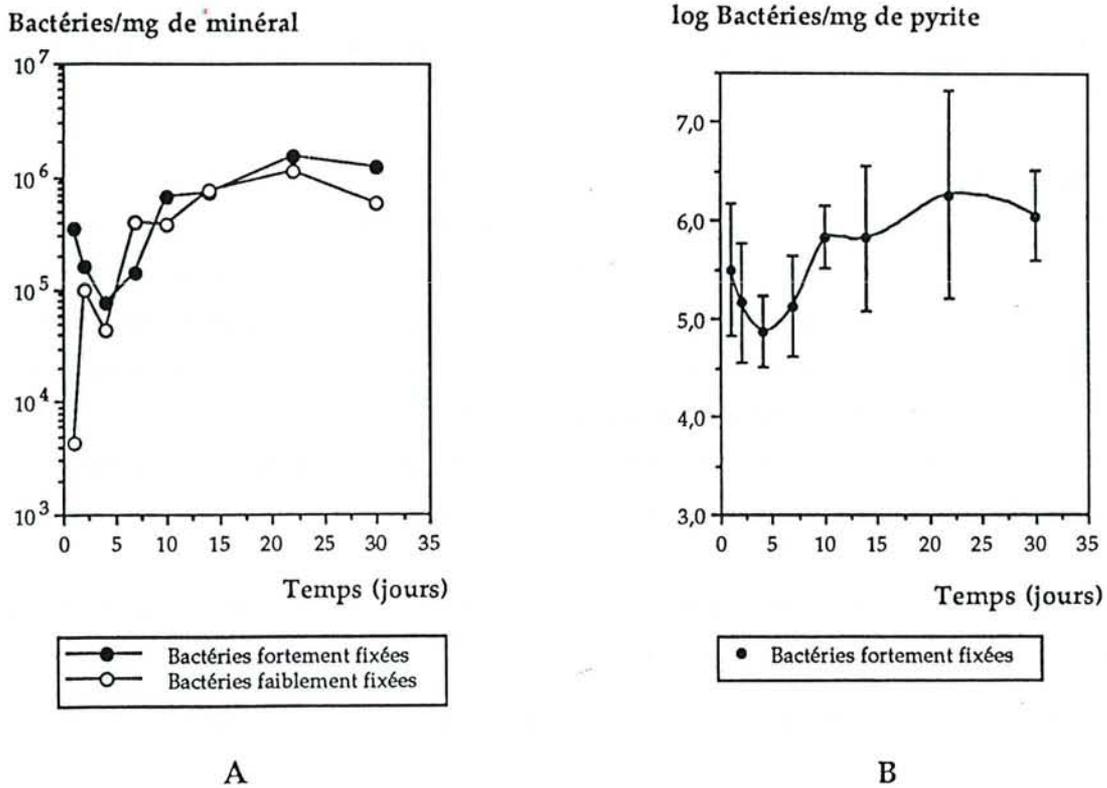


Figure IV.13.- Evolution des bactéries fixées au cours de la biooxydation de pyrite ES (32-53 µm).

L'histogramme de répartition des bactéries au cours de la biolixiviation met en évidence un point remarquable (Figure IV.14.) : au cours du premier jour de contact Bactérie-Minéral, 68 % des microorganismes sont fortement adsorbés à la surface minérale, ce qui représente $3,5 \cdot 10^5$ bact./mg de pyrite. La proportion des bactéries fixées baisse ensuite. L'ensemble des bactéries fixées représente encore 12 % des cellules au cours du deuxième jour de contact. Ensuite cette proportion est faible (5 % maximum), alors que la quantité de cellules fixées reste cependant constante (10^5 à 10^6 bact./mg de cellules fixées faiblement et autant de cellules fixées fortement).

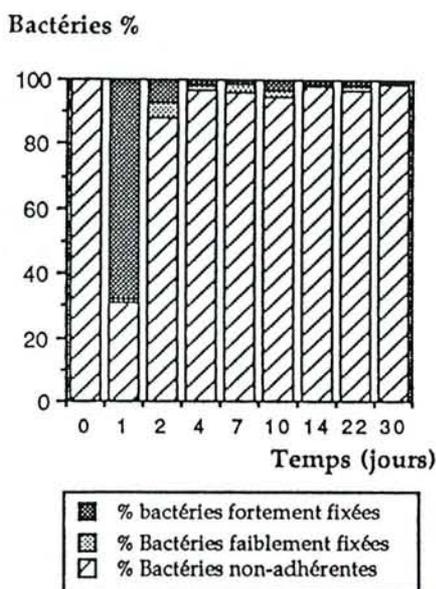


Figure IV.14.- Répartition des bactéries au cours de la biolixiviation en réaction de pyrite ES (32-53 μm).

Les estimations indirecte et directe de l'adhésion avaient mis en évidence 10^5 à 10^6 bactéries fixées/mg de pyrite au cours des premières 24 heures de contact. La coïncidence de ces résultats avec ceux obtenus pour le premier jour de contact, par désorption des bactéries fixées, montre qu'au cours du premier jour, l'adhésion bactérienne est forte et que le protocole de désorption permet de récupérer la majorité des bactéries fixées. Ces résultats montrent la complémentarité des méthodes employées et que la méthode de désorption, bien que peu précise, est très utile : les méthodes d'estimation de l'adhésion permettent de déterminer la quantité de cellules initialement fixées sur le minéral ; la méthode de désorption permet de préciser la force d'adsorption des bactéries.

Ainsi, la biolixiviation débute par une adhésion forte de *T. ferrooxidans* à la surface de son substrat énergétique : la pyrite. Cela nous permet de supposer que cette adhésion jouera un rôle capital dans le processus de dissolution.

2.- Suivi de la biooxydation de la pyrite, à l'aide des paramètres chimiques

Les courbes de solubilisation du fer et du soufre (Figure IV.12.B) présentent une évolution parallèle et traduisent:

- une dissolution lente de la pyrite durant les 4 premiers jours de biolixiviation;
- une dissolution rapide ensuite.

Le potentiel redox du milieu (Figure IV.15.A), augmente rapidement au cours des deux premiers jours de culture. Le passage du milieu d'un état réducteur à un état oxydant, s'explique par l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} . Une faible quantité de fer ferrique (fer solubilisé), suffit pour produire cette augmentation. Après 7 jours de biooxydation, le potentiel redox n'évolue pratiquement plus.

Le pH du milieu, quant à lui, (Figure IV.15.B.), diminue rapidement au cours des 7 premiers jours de biolixiviation, pour décroître plus lentement ensuite. Cette baisse de pH montre une production d'acide, due à l'oxydation des sulfures.

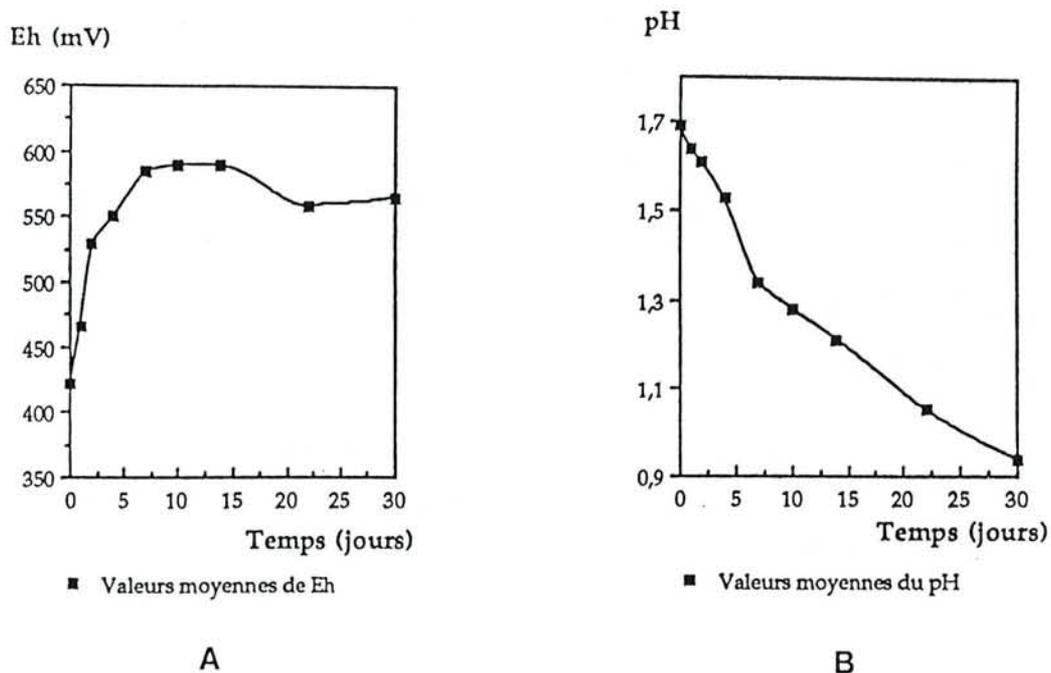


Figure IV.15.- Evolution du potentiel d'oxydoréduction (Eh) et du pH au cours de la biooxydation de la pyrite ES (32-53 μm).

La comparaison des figures IV.12.A. et IV.12.B. ne montre pas de parallélisme entre la croissance des bactéries libres en suspension et la biooxydation de la pyrite :

- une phase exponentielle de croissance débute à partir du 2^{ème} jour de biolixiviation, alors que la solubilisation de la pyrite est encore lente,
- durant la phase stationnaire de croissance bactérienne (à partir du 14^{ème} jour), l'oxydation de la pyrite est rapide.

Par contre, la solubilisation du fer et du soufre (Figure IV.12.B.), et la répartition des bactéries adhérentes (Figure IV.14.) au cours de la biolixiviation, semblent être liées : jusqu'à 4 jours de biolixiviation, alors que la proportion des bactéries fixées est maximale, la solubilisation de la pyrite est lente. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse d'un lien entre l'adhésion bactérienne au cours des premières étapes de biolixiviation, et la première phase de solubilisation lente de la pyrite.

Cette relation possible entre les bactéries adsorbées sur la pyrite, et la lenteur de la première phase de dissolution du sulfure, souligne l'importance et l'intérêt de l'étude des premières étapes d'évolution du système "*Thiobacillus ferrooxidans*-Solution-Pyrite".

V.- OBSERVATIONS EN MEB DES GRAINS DE PYRITE APRÈS BIOLIXIVIATION

Pour ces expériences, nous avons choisi la fraction granulométrique 10-32 μ m plutôt que la fraction 32-53 μ m, pour augmenter la probabilité de mettre en évidence les bactéries fixées, la surface spécifique et la quantité de cellules adhérentes étant plus élevées (Chapitre VIII) sur la fraction plus fine.

Quatre échantillons notés I, I_{opt}, I_{ral} et III ont été prélevés à différentes étapes de biolixiviation et pour différentes conditions d'agitation du réacteur. Ils sont respectivement :

Echantillon I : Il provient d'une culture de la souche *T. ferrooxidans* DSM583 sur pyrite, en réacteur non agité. Il a été prélevé au cours de la phase d'amorce de l'oxydation (Figure IV.16.).

Echantillons II : Ils proviennent d'une culture agitée à 130 tr/min. Un échantillon a été prélevé au cours de la phase optimale d'oxydation Il est noté II _{opt}. Un autre échantillon, noté II _{ral}, a été prélevé au début de la phase de ralentissement de l'oxydation (Figure IV.16.).

Echantillon III : Il provient d'une culture en réacteur classique à turbine, agitée à 750 tr/min. Il a été prélevé au cours de la phase stationnaire d'oxydation minérale (Figure IV.16.). Pour compléter cette dernière observation, nous avons réalisé une coloration des grains de pyrite au bleu de toluidine suivie d'une observation au microscope optique.

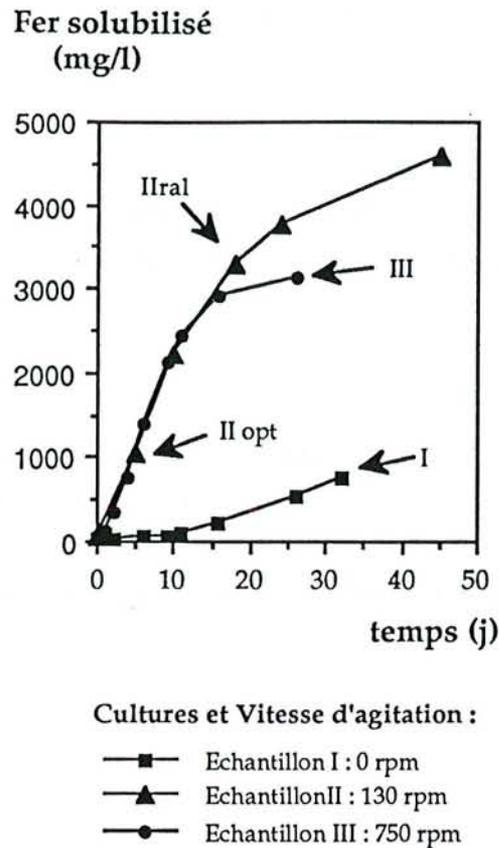


Figure IV.16.- Conditions et temps de culture des échantillons de pyrite observés en MEB.

A. - ECHANTILLON I PRELEVE AU COURS DE LA PHASE D'AMORCE D'OXYDATION

Deux modes de fixation ont été mis en œuvre pour observer les bactéries présentes à la surface minérale :

- la fixation par vapeurs osmiques,
- la fixation, en milieu liquide, dans une solution de glutaraldéhyde, suivi d'une déshydratation à l'éthanol et au HMDM (hexaméthyl disilazane).

Sur l'échantillon fixé à l'osmium, les observations en microscopie électronique à balayage ont permis de repérer facilement des bactéries à la surface du minéral (Figures 1, 2 planche I). Leur taille moyenne est de 1 à 2 μm x 0,5 à 0,7 μm . La majorité d'entre elles semblent vidées de leur contenu cytoplasmique et seraient mortes (bm) (Figure 1 planche I). Cette observation paraît normale, la culture étant âgée de 1 mois. Toutefois, on peut observer des bactéries sans doute viables (bv). La figure 1 montre aussi de nombreux précipités (p) à la surface minérale ; certains recouvrent les bactéries, et pourraient par conséquent empêcher ou freiner la réaction ELIFA en limitant l'accès des anticorps à ces bactéries.

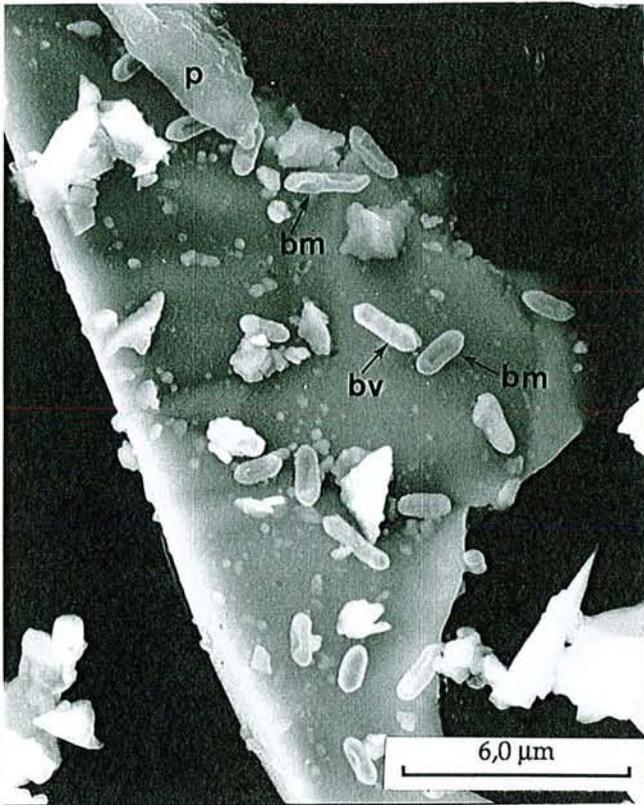
Planche I

Images par électrons secondaires au MEB, issues de l'observation de l'échantillon I, prélevé au cours de la phase d'amorce de l'oxydation de la pyrite K4 (fraction 10-32 μm), en réacteur non agité.

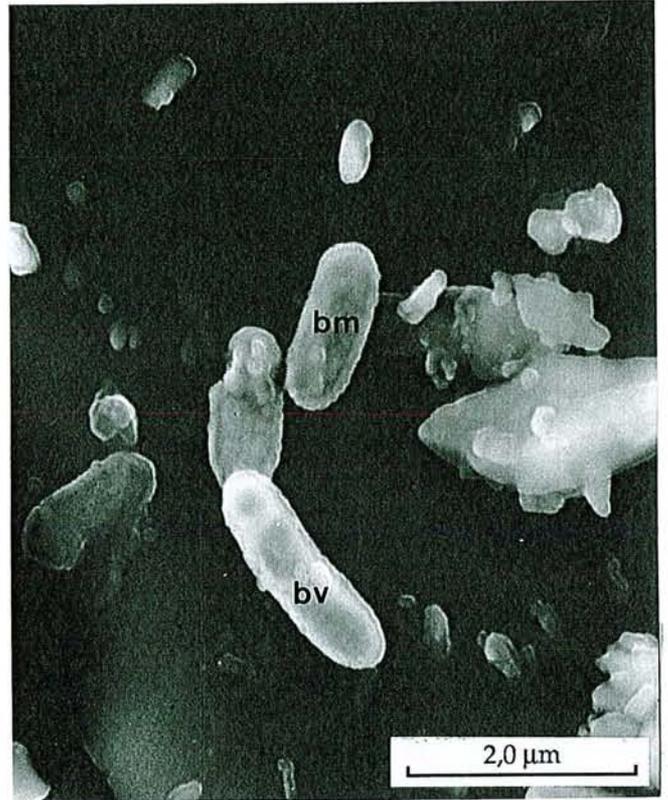
Figures 1 et 2 : Bactéries vivantes (bv), bactéries mortes (bm) et précipités (p) à la surface d'un grain de pyrite, observé après fixation de l'échantillon par vapeurs osmiques.

Figures 3 et 4 : Bactérie en division (bd) et fortement fixée, observée après fixation de l'échantillon en suspension en milieu liquide.

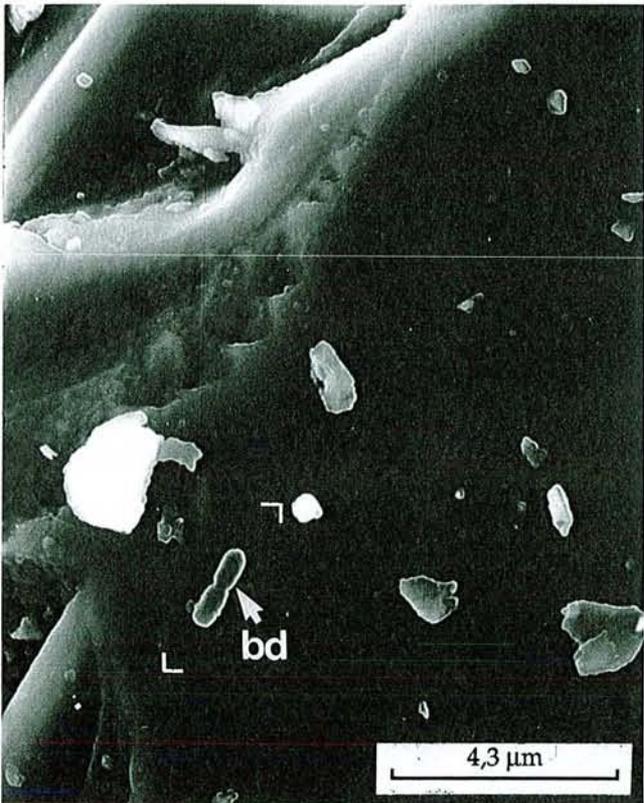
Planche I



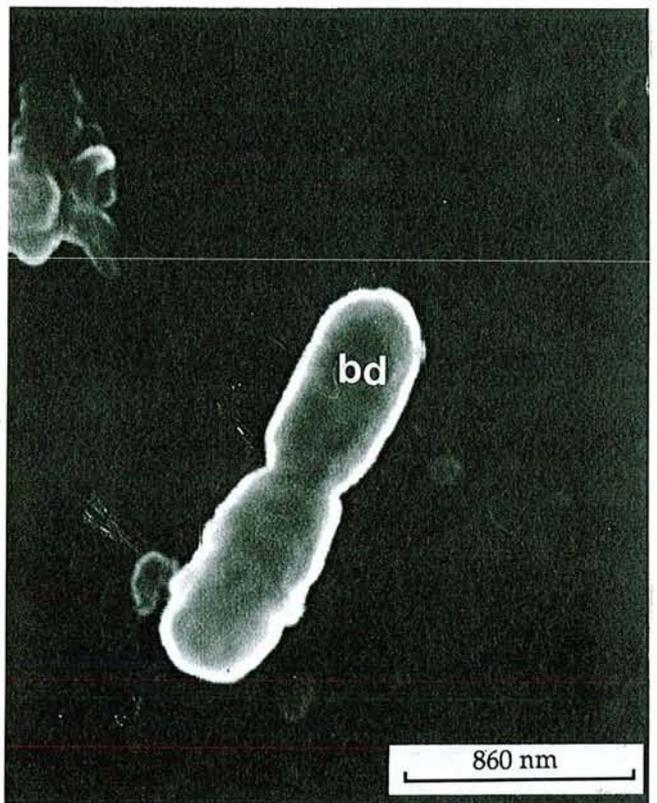
1



2



3



4

Sur l'échantillon fixé en milieu liquide (Figures 3 et 4-planche I), la densité bactérienne est plus faible que celle observée après fixation par vapeurs d'osmium, indiquant que les lavages successifs ont éliminé une grande partie des bactéries fixées. De rares bactéries ont toutefois pu être observées sur certains grains de pyrite, ce qui montre leur forte fixation. La cellule observée figures 3 et 4 est en division, ce qui montre son bon état physiologique et suggère qu'une multiplication bactérienne a probablement lieu sur la surface du minéral.

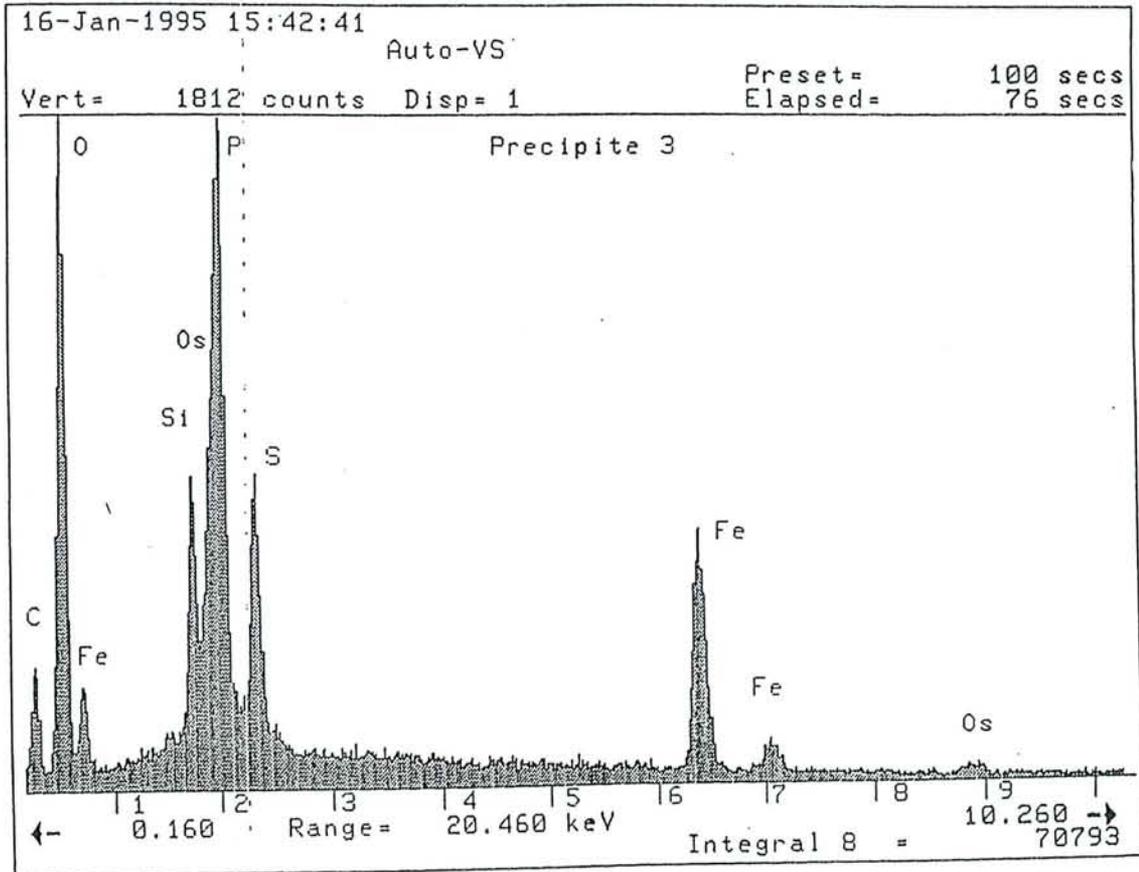


Figure IV.17.- Spectres obtenus en EDS à partir des précipités formés au cours de la lixiviation de pyrite K4 (10-32 μm).

Cette culture non agitée a produit des précipités blancs sur les parois en verre du réacteur. Leur observation en microscopie optique, à l'état frais, a révélé de nombreuses bactéries sur ces précipités. Cette observation s'est confirmée au MEB (Figures 1 et 2-planche II). Les spectres EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) réalisés sur ces précipités (Figure IV.17.) montrent qu'ils sont constitués de S, Fe, P, O ainsi que de Si et Os provenant de la fixation. La proportion des différents éléments dans les précipités est donnée tableau IV.2. Ces précipités peuvent être un amalgame d'oxydes de fer, de phosphates, de soufre élémentaire et/ou sulfates d'autant plus que le milieu est riche en sulfates et contient des phosphates. Le soufre peut aussi, comme le fer, provenir de la solubilisation du minéral. La présence d'Os, considérée comme marqueur de matière organique, est probablement due à sa fixation sur les bactéries. Ces observations montrent qu'une grande partie des

bactéries est emprisonnée par ces précipités, et qu'elles ont été adsorbées chimiquement par ces précipités. L'emprisonnement de bactéries à l'intérieur de précipités a déjà été mis en évidence à la surface minérale au cours de l'oxydation d'arsénopyrite par Monroy (1993). L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'au cours de la lixiviation, une proportion importante des bactéries peut aussi être fixée sur la surface du minéral, sous l'influence des précipités qui s'y développent. Ces bactéries seraient présentes sur la surface du minéral sans avoir forcément une activité oxydatrice .

Tableau IV.2.- Composition relative globale des précipités déterminée par analyse EDS.

Eléments	Poids (%)	Atomes (%)
O	44,77	72,37
Si	3,72	3,42
P	9,74	8,13
S	5,77	4,66
Fe	19,94	9,23
Os	16,06	2,18

B. -ECHANTILLON II

1.- Echantillon II opt prélevé au cours de la phase optimale d'oxydation

Les observations montrent (Figures 1, 2 et 3-planche III) des "phases pelliculaires grossières" (pp), semblables à celles observées figure 1-planche I. Ici elles sont plus importantes. Les études de de Donato *et al.* (1991) ont mis en évidence ces phases pelliculaires au cours de la phase initiale de l'oxydation de pyrite K₂ (fraction 32-53 μm). L'étude de l'état de surface du minéral par SIRTf (Spectroscopie Infrarouge par Transformée de Fourier) en réflexion diffuse a montré qu'à cette étape, le massif des bandes d'absorption des sulfates (ferreux et ferriques) présents à la surface, était important.

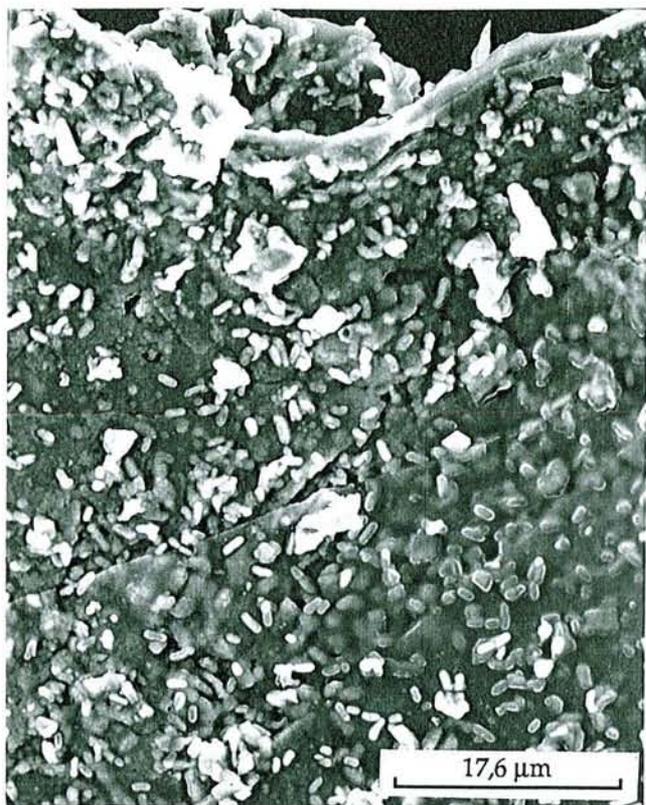
Nos observations, à la différence de celles de Mustin (1992), mettent en évidence de nombreuses particules (p), ce qui suggère que le mode de préparation de l'échantillon de pyrite (séchage sous flux d'azote) employé par Mustin, a provoqué leur élimination. La figure 2-planche III (fort grossissement) montre qu'elles ont la morphologie (taille, forme) des bactéries, qu'elles sont agrégées (pa) et également enrobées dans une "phase superficielle" (ps) qui semble recouvrir la totalité du grain minéral.

Planche II

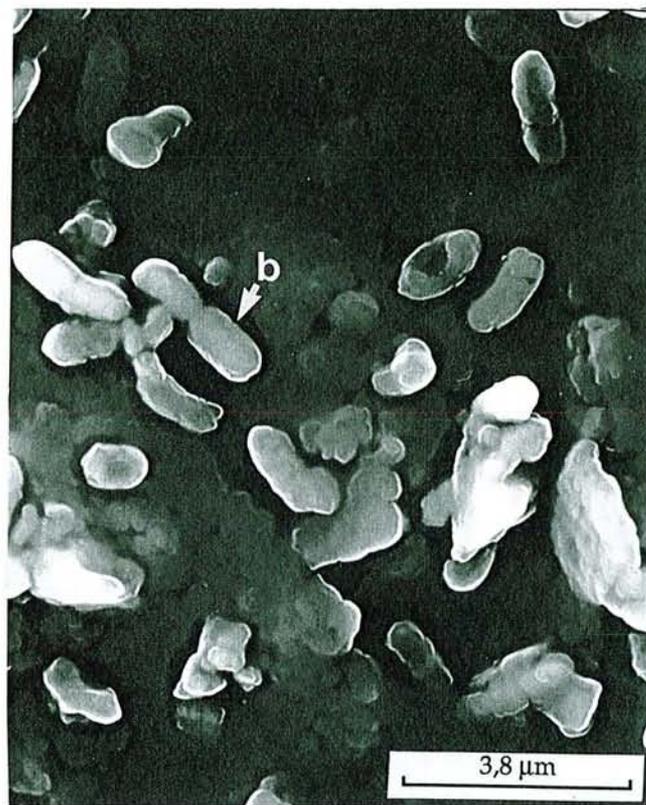
Images par électrons secondaires au MEB, issues de l'observation de précipités formés au cours de la lixiviation de la pyrite K4 (fraction 10-32 μm), en réacteur non agité (échantillon I).

Figures 1 et 2 : Bactéries (b) enrobées de précipités (amalgame de Fe, S, O, P, Si, et Os).

Planche II



1



2

La figure 3-planche III obtenue sur une autre face montre la présence d'un trou à l'extrémité de certaines particules, qui apparaissent comme des tubes (t). L'aspect grumeleux de leur paroi suggère qu'elles pourraient être de nature minérale. La présence du trou central et la morphologie proche de celle d'une bactérie suggèrent la formation d'une gaine minérale autour d'une cellule bactérienne. Au niveau des tubes, la gaine est bien délimitée et présente une épaisseur régulière (évaluée à $0,25 \mu\text{m}$). Sur l'ensemble des bactéries, elle suit la forme de la cellule et sa localisation se limite à la surface cellulaire. Une telle régularité serait difficilement observable dans le cas où elle se serait formée par dépôt purement chimique, d'éléments présents dans la solution. Elle suggère au contraire que la gaine est formée par les bactéries.

S'il en est ainsi, cette gaine doit probablement empêcher l'accès des nutriments aux bactéries. La taille de l'ensemble d'une particule est peu différente de celle des bactéries nues (figures 1, 2, 4-planche I) : on peut l'évaluer à $0,9 \mu\text{m} \times 1,7 \mu\text{m}$. Elle pourrait éventuellement être plus grande s'il s'agissait de cellules entourées d'une gaine. Cette taille peut indiquer des modifications morphologiques. Des observations de bactéries non-adhérentes au microscope optique, réalisées dans le cadre du présent travail, ont permis de constater une variation morphologique en fonction de l'état physiologique des cellules : les cellules en phase stationnaire apparaissent plus petites que les cellules en phase exponentielle de croissance. Pichuantes *et al.* (1986) ont aussi signalé, dans le cas de cellules âgées, des altérations de la surface cellulaire, des déformations des cellules et des lyses. Les bactéries observées ici pourraient correspondre à des cellules en mauvais état physiologique, partiellement vidées de leur contenu, ou mortes, et entourées d'une gaine, ou bien encore des fantômes de bactéries dont il ne resterait plus que la gaine minérale. Cela suggère qu'une partie de ces particules serait des fossiles bactériens. Ces structures pourraient être, au moins en partie, à l'origine des dépôts à la surface des particules de pyrite. Parallèlement à cela, le fait que l'oxydation soit optimale suggère la présence de bactéries actives en suspension ou à la surface du minéral.

Le nombre élevé des cellules à la surface du minéral a pu être atteint par :

- co-précipitation et éventuellement adsorption des cellules non-adhérentes au cours de la biooxydation,
- multiplication cellulaire sur la surface

La répartition cellulaire ne semble pas aléatoire : les cellules sont agrégées et forment des amas. L'enrobage, dans une phase superficielle, suggère la présence des bactéries avant la formation de cette phase. Ces observations sont aussi en faveur d'une multiplication cellulaire à la surface de la pyrite. Ces hypothèses pourront être vérifiées :

- en tentant de réaliser des coupes du minéral, afin d'observer en MET (Microscopie électronique à transmission), le contenu des particules, et de faire une analyse élémentaire des éléments légers (C, H, N, O, Fe, S) de la gaine et de la phase superficielle en EELS (Energy Electron Loss Spectroscopy). La résine utilisée (EPON 812) de dureté moyenne n'a pas permis la réalisation de telles coupes. Les particules minérales, plus dures que la résine, sont "délogées" au moment de la

coupe. L'utilisation d'une résine de dureté avoisinant celle de la pyrite (SPURR de dureté maximale) permettrait peut-être ces préparations.

- en détachant ces dépôts des particules du minéral, par un traitement neutre vis-à-vis des structures des particules. Les méthodes utilisées par Mustin (1992) pour préparer les échantillons de pyrite ou celles utilisées par Monroy (1994) pour désorber les bactéries fixées, pourraient être reprises et adaptées pour récolter les dépôts. Cette désorption réalisée, il serait plus facile de réaliser des observations au MET et des analyses de la surface des particules par EELS.

Ces figures montrent également une hétérogénéité des grains de pyrite, par l'aspect de leur surface : le grain central est recouvert de bactéries et de précipités, alors que les grains périphériques semblent être nus. Cette hétérogénéité suggère des propriétés physico-chimiques différentes provenant des résultats du broyage mais aussi une dispersion aléatoire des sites d'activité bactérienne sur certaines particules.

2. -Echantillon Ilral prélevé au cours de la phase de ralentissement de l'oxydation

Les figures obtenues (figures 1 et 2-planche IV) permettent d'observer :

- le début de la corrosion minérale. Elle apparaît sous forme de galeries (g) et se produit plus particulièrement au niveau des arêtes des grains, comme l'a également indiqué Mustin (1992).
- de rares bactéries isolées (b),
- des agrégats volumineux qui pourraient correspondre à des précipités (Aom).

Elles permettent aussi de constater que les phases pelliculaires grossières observées pour l'échantillon précédent, ont disparu à ce stade de biolixiviation (phase de ralentissement de l'oxydation). Cette observation a déjà été soulignée par de Donato *et al.* (1991). Sa corrélation à la diminution du massif IR correspondant aux bandes d'absorption des espèces de type sulfates suggère également que cette phase pelliculaire est de nature sulfatée.

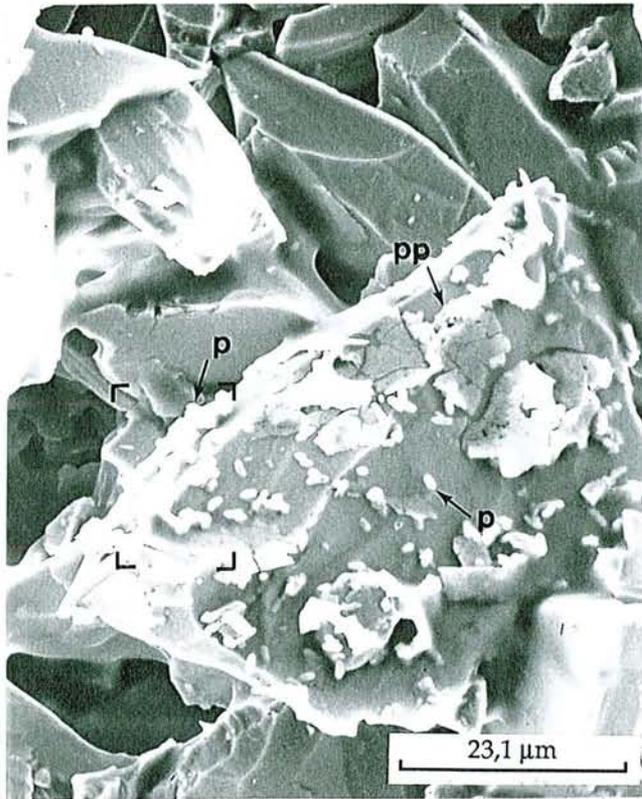
Les bactéries fixées paraissent moins nombreuses que pour l'échantillon précédent. Au cours du ralentissement de l'oxydation, la surface apparaît totalement différente de celle observée au début de la phase optimale d'oxydation, ce qui suggère une modification des propriétés de surface de la pyrite (charge de surface, propriétés électrochimiques). L'étude des courbes intensité-potentiel d'échantillons de pyrite prélevés aux différentes étapes de biooxydation pourrait nous renseigner sur les propriétés électrochimiques du minéral. Il serait également intéressant de déterminer la charge de surface des particules minérales au cours de la lixiviation, par l'étude du potentiel ζ . La présence d'agrégats, sans doute de nature minérale, est l'élément nouveau obtenu à ce stade.

Planche III

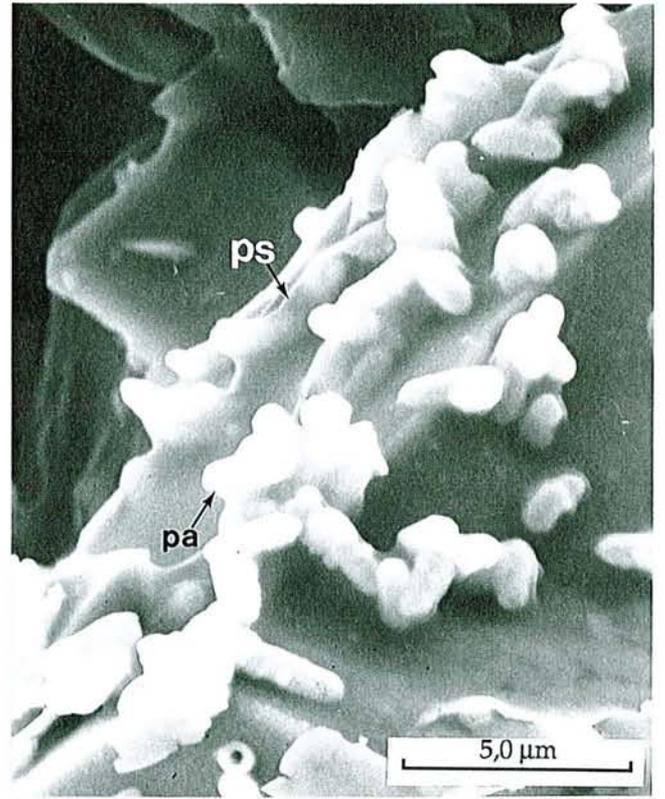
Images par électrons secondaires au MEB, issues de l'observation de l'échantillon Π_{opt} , prélevé au cours de la phase optimale d'oxydation de la pyrite K4 (fraction 10-32 μm), en réacteur agité à 130 rpm.

Figures 1, 2 et 3 : Phases pelliculaires grossières (pp), particules isolées (p), tubulaires (t) ou agrégées (pa) et enrobées dans une phase superficielle (ps) d'un grain de pyrite

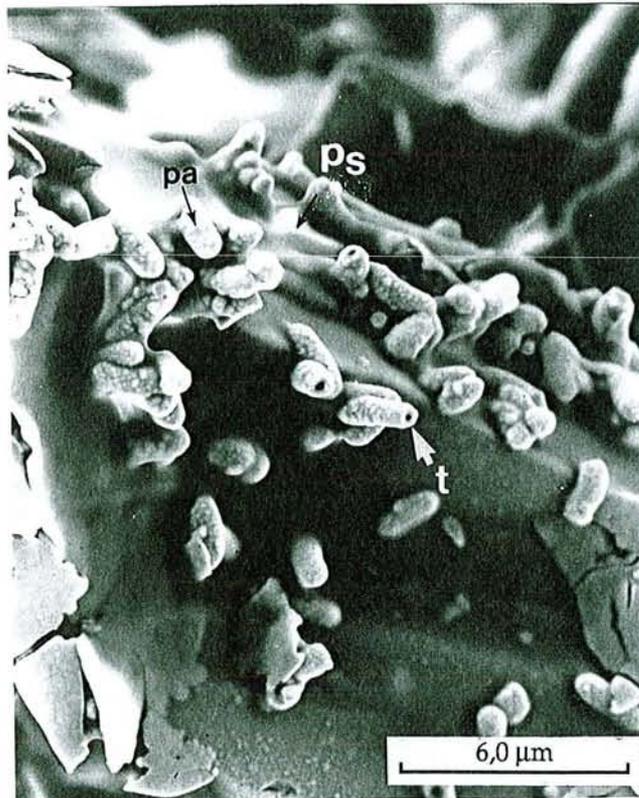
Planche III



1



2



3

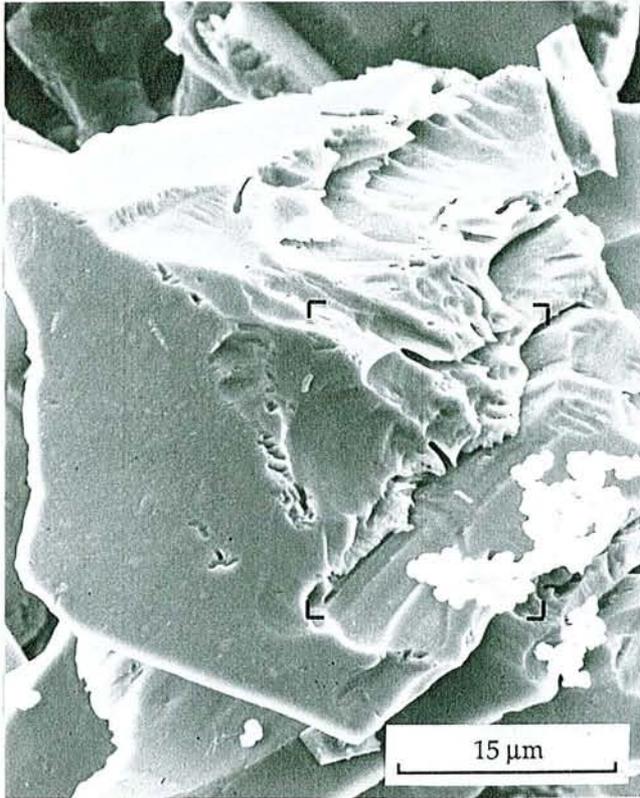
Planche IV

Images par électrons secondaires au MEB, issues de l'observation de l'échantillon Π_{ral} , prélevé au cours de la phase de ralentissement d'oxydation de la pyrite K4 (fraction 10-32 μm), en réacteur agité à 130 rpm.

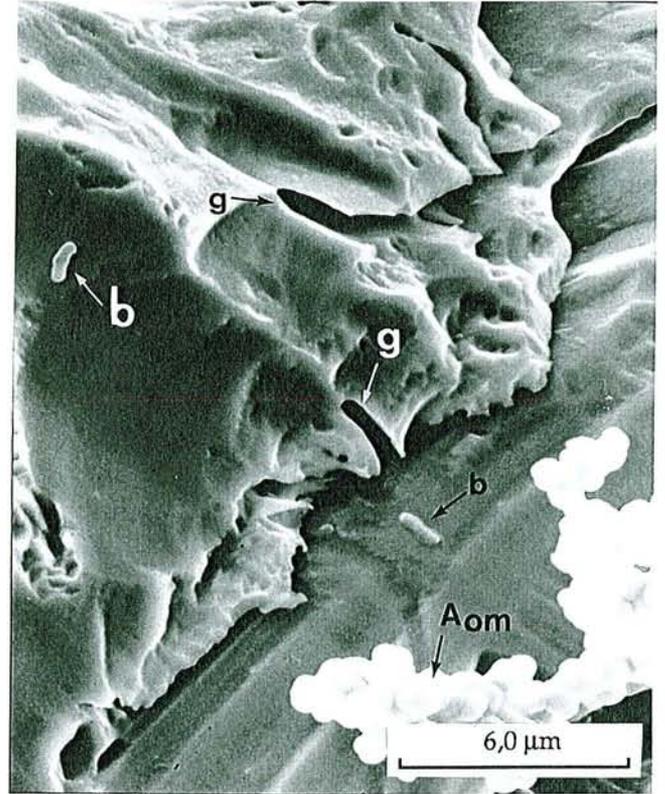
Figure 1 : Figures de corrosion développées particulièrement sur les arêtes du grain minéral.

Figure 2 : Bactéries (b), agrégats (Aom) et galeries de corrosion (g) sur le grain.

Planche IV



1



2

**C.- ECHANTILLON III PRÉLEVÉ AU COURS DE LA PHASE STATIONNAIRE D'OXYDATION
(Planches V et VI)**

1. -Images au MEB

L'observation au MEB d'échantillons prélevés au cours de la phase stationnaire d'oxydation a permis de mettre en évidence certains grains recouverts d'importants agrégats (Aom) (Figure 1-planche V), qui semblent agglomérer et cimenter plusieurs grains de pyrite. Leur observation à un grossissement plus important (Figures 1, 2-planche VI) montre des structures analogues aux agrégats observés à la figure 2-planche IV. Ici, ils recouvrent la presque totalité des grains de pyrite. Cette observation, et le fait que l'oxydation soit plus avancée que celle de l'échantillon précédent (IIra1), suggèrent que ces agrégats se développent progressivement au cours de l'oxydation et qu'ils correspondent à des précipités minéraux. Ils n'ont été observés qu'au niveau de certains grains de pyrite, montrant là encore, l'hétérogénéité des grains minéraux.

2. -Images EDS

Afin de savoir si ces agrégats sont constitués de matière organique, la répartition de l'osmium, qui peut être considéré comme un "témoin" de matière organique, a été déterminée par image EDS. En parallèle, nous avons également visualisé le Fe et le S (Figures 2, 3, 4-planche V). Ces figures montrent une concentration importante et préférentielle de l'osmium au sein des agrégats, ce qui permet de supposer qu'ils sont de nature organo-minérale.

La concentration de S la plus importante est obtenue pour les zones de pyrite non recouvertes d'agrégats (nues), à l'exception de celles situées à l'extrémité droite du bas de la figure 1-planche V. Cette zone n'est pas non plus recouverte d'osmium. Pour le Fe, les différences de densité de cet élément à la surface des grains sont moins évidentes que pour le S. Il apparaît plus dense sur les grains nus et également sur la zone en bas à droite (Figure 1-planche V) non marquée par l'osmium et le soufre.

Ces observations montrent, comme les précédentes (Figure 1-planche III), que la surface des grains n'est pas homogène, certains grains présentant une densité de S plus importante que d'autres. Les travaux de Mustin (1992) ont mis en évidence la production de soufre élémentaire à la surface minérale au cours de l'oxydation. Les figures 1, 2, 3 et 4-planche V, suggèrent une hétérogénéité des grains de pyrite et permettent de penser que les réactions (oxydation chimique, adhésion, oxydation bactérienne) qui se produisent à la surface minérale, sont elles aussi hétérogènes et vont dépendre de l'état de surface et des caractéristiques minéralogiques de chacun des grains. Mustin (1992) a même signalé une hétérogénéité de l'attaque en fonction de la face cristalline d'un grain: ses observations

ont effectivement montré que certains grains monocristallins présentent à la fois des faces fortement corrodées et d'autres peu ou pas attaquées, alors qu'à priori ces faces sont chimiquement comparables.

3. Observations au microscope optique, après coloration au bleu de Toluidine

Pour savoir si les agrégats observés sont constitués de cellules bactériennes, nous avons réalisé une coloration au bleu de toluidine. Ce colorant est spécifique de la matière organique, qu'il colore du bleu au violet. Cette observation a été réalisée sur des particules de pyrite provenant d'une culture bactérienne pure récupérée en phase stationnaire d'oxydation (figures 3 et 4-planche VI).

La figure 3-planche VI montre :

- les bactéries libres en suspension colorées en bleu (b),
- des particules minérales qui apparaissent grises ; elles ne sont pas colorées. Certaines d'entre elles sont entourées de particules bleues de la taille des bactéries qui sont probablement des bactéries fixées.

- des particules minérales corrodées (Pc) qui semblent également recouvertes d'une matrice violette (Mv). Cette coloration suggère que cette matrice est constituée de matière organique.

- une particule minérale colorée en rose pâle, avec à sa surface des bactéries. Elle apparaît plus fine que les autres particules de pyrite.

La figure 4-planche VI montre un agrégat renfermant des grains de pyrite corrodés et probablement des débris minéraux (Dm) qui semblent être associés entre eux par une matrice (Mv). En certains endroits, elle est fortement colorée en violet, ailleurs en rose pâle. On distingue également des points bleus autour et à l'intérieur de l'agrégat et on peut penser que ce sont des bactéries (b).

Ces observations montrent que les agrégats apparaissent apparemment à partir de la phase de ralentissement de l'oxydation minérale et semblent se développer progressivement au cours de la phase stationnaire. L'observation au microscope optique (figure 4-planche VI) suggère qu'ils se sont formés par agrégation de bactéries et de précipités minéraux, autour de particules minérales corrodées, et qu'ils "séquestrent" des bactéries, en les empêchant d'être actives à la surface de la pyrite ou en solution. Le ralentissement de l'oxydation est peut-être lié à la formation de ces agrégats. Au cours de ses études concernant l'oxydation de l'arsénopyrite, Monroy (1993) a mis en évidence au MEB, la formation de phases superficielles au cours de la phase optimale d'oxydation, et le développement de phases précipitées sur la surface du minéral au cours de la phase de déclin et de la phase stationnaire d'oxydation. Ces observations ont aussi montré qu'une grande partie des bactéries était enrobée par ces précipités sur la surface du minéral. Des expériences complémentaires en SIRTf en réflexion diffuse et en transmission ont permis d'identifier ces phases, comme des

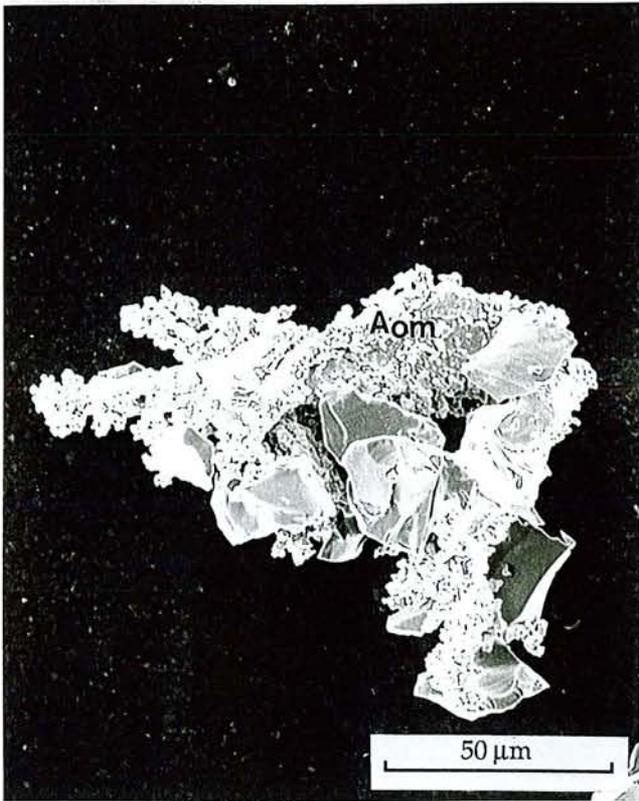
Planche V

Echantillon III prélevé au cours de la phase stationnaire d'oxydation de la pyrite K4 (fraction 10-32 μm) en réacteur agité à 750 rpm.

Figure 1 : Agglomérat de grains minéraux recouverts et cimentés par d'importants agrégats (Aom).
Image par électrons secondaires au MEB.

Figures 2, 3 et 4 : Images EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) montrant respectivement la répartition du fer, de l'osmium et du soufre à la surface de l'agglomérat de la figure 1-planche V.

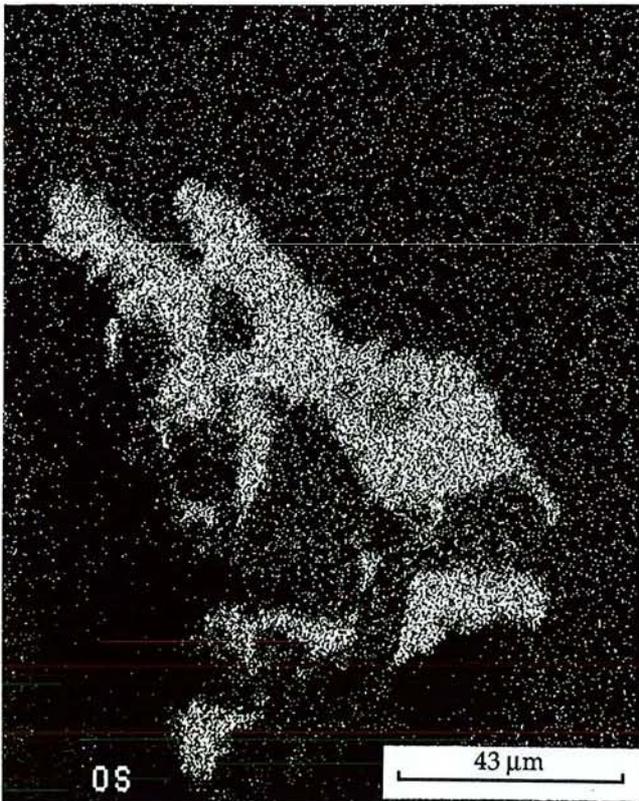
Planche V



1



2



3



4

Planche VI

Figures 1 et 2 : Images à un grossissement important de l'agrégat présenté figure 1-planche V, qui cimente les grains minéraux. Images par électrons secondaires.

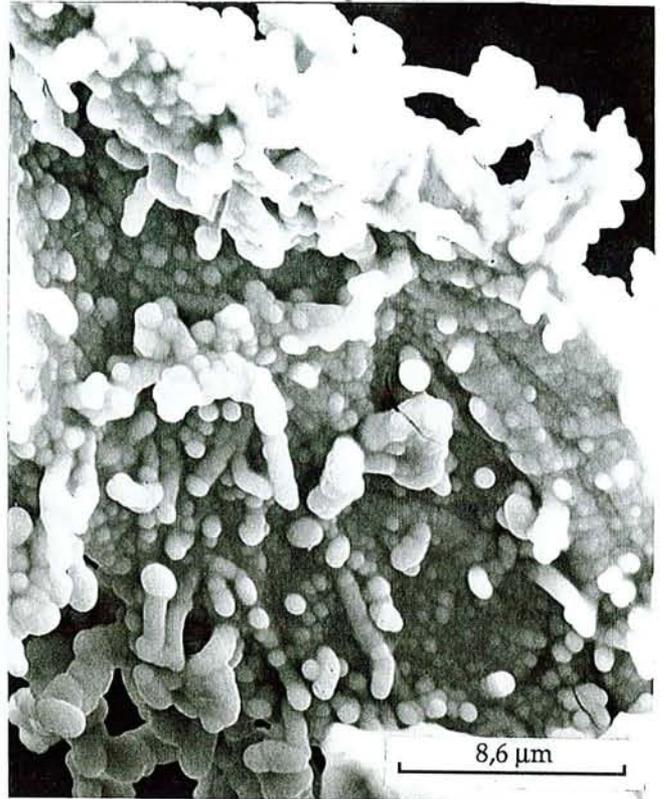
Figure 3 : Particules minérales corrodées (Pc), recouvertes d'une matrice violette (Mv), bactéries (b) libres en suspension ou fixées observées sur un échantillon de biooxydation de pyrite K4 (fraction 10-32 μm), prélevé au cours de la phase stationnaire de l'oxydation minérale. Images au microscope optique après coloration au bleu de toluidine.

Figure 4 : Agrégat renfermant des grains de pyrite corrodés, des débris minéraux (Dm) et des bactéries (b), associés entre eux par une matrice violette (Mv), observés à partir du même échantillon que celui de la figure 3. Images au microscope optique après coloration au bleu de toluidine.

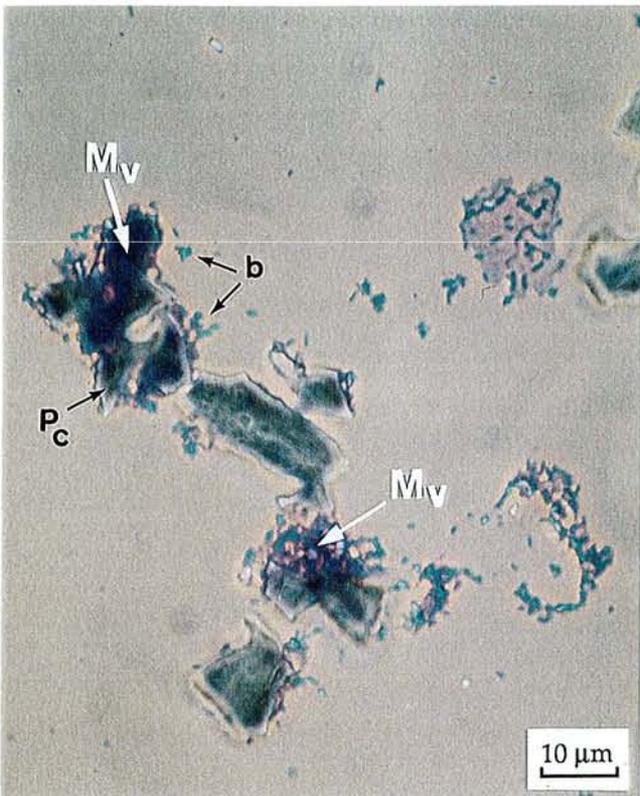
Planche VI



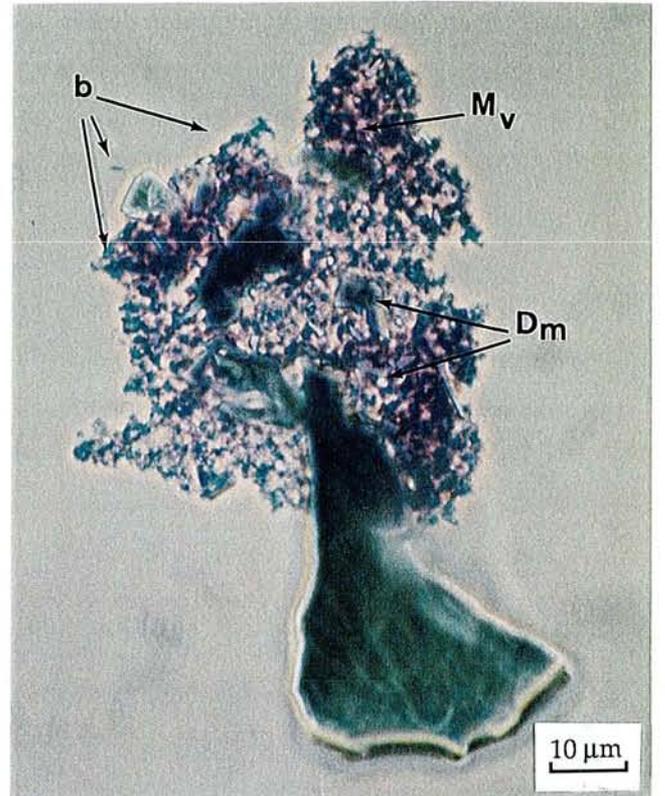
1



2



3



4

arséniates ferriques. L'ensemble de cette étude a permis de suggérer que la formation de ces précipités était à l'origine du ralentissement de l'oxydation minérale.

La formation de précipités de jarosite sur la surface du minéral bloque également l'oxydation minérale. Les expériences de Pronk et Johnson (1992) ont démontré que certaines bactéries hétérotrophes sont capables de solubiliser *in vitro*, la jarosite et des oxydes de fer hydratés. Johnson *et al.* (1993) ont également montré que certaines bactéries acidophiles (incluant des hétérotrophes mésophiles et des hétérotrophes modérément thermophiles) utilisées en cultures pures et en conditions contrôlées (pO_2), étaient capables de catalyser, soit l'oxydation, soit la réduction du fer. Ces expériences suggèrent que la formation des précipités à la surface minérale pourrait être contrôlée en utilisant des associations de microorganismes acidophiles oxydant et réduisant le fer, en travaillant en conditions contrôlées. En limitant la formation de ces précipités, on pourrait alors augmenter le rendement d'oxydation. Il est important de déterminer leur nature de manière à essayer d'éviter leur formation. Cette détermination peut se faire :

- en MET, en réalisant des coupes : des colorations spécifiques des polysaccharides et des protéines peuvent permettre de déterminer s'ils sont constitués de matière organique.
- par analyse élémentaire sur ces particules en EDAX (Energy Dispersive X Ray Spectroscopy) et en EELS,
- par SIRTf en combinant réflexion diffuse et transmission : ce sont apparemment des phases précipitées : elles devraient donc être mises en évidence et identifiées en transmission .

Présents au sein de déchets miniers, ces agrégats doivent probablement protéger les bactéries de la déshydratation et assurer leur survie. Il est possible qu'une acidification se produise dans des microenvironnements à l'intérieur de ces déchets et favorise leur dissolution et la libération des bactéries présentes qui pourraient alors reprendre leur activité oxydante en générant de l'acide et du Fe^{3+} qui contribueraient à l'amplification de la lixiviation des déchets. Ces agrégats peuvent alors contribuer aux phénomènes de pollution dus à l'acidité de l'eau de ruissellement des déchets miniers (pollution de cours d'eau).

Ces agrégats vont également fausser les estimations des bactéries fixées par adsorption par le Tween 80 ou par réaction ELIFA. Ces déterminations sont donc sans intérêt au cours de la phase de ralentissement et de la phase stationnaire d'oxydation minérale.

VI- PROPRIÉTÉS DE SURFACE DES BACTÉRIES ET DU MINÉRAL

A.-LE POTENTIEL ζ SUR *Thiobacillus ferrooxidans* ADAPTE A LA PYRITE K2.

L'évolution du potentiel ζ , en NaCl $10^{-3}M$ et $10^{-2}M$ est représentée pour *T.ferrooxidans* en phase exponentielle et stationnaire par les figures IV.18. et IV.19.

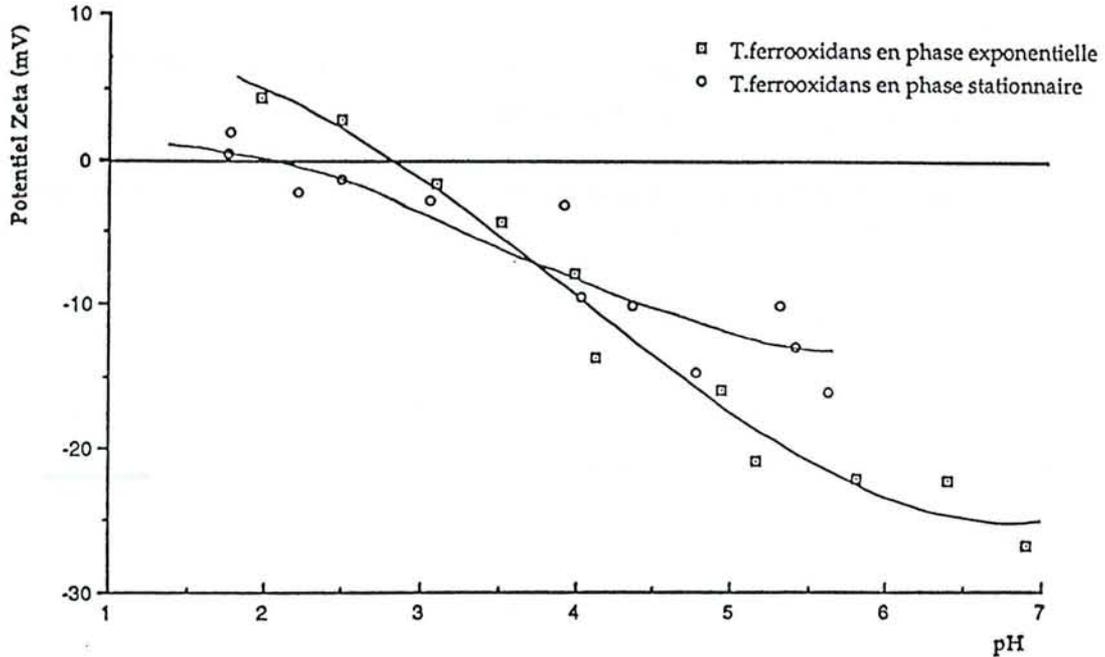


Figure IV.18.- Evolution du potentiel ζ de *T. ferrooxidans* en fonction du pH, dans NaCl $10^{-3}M$.

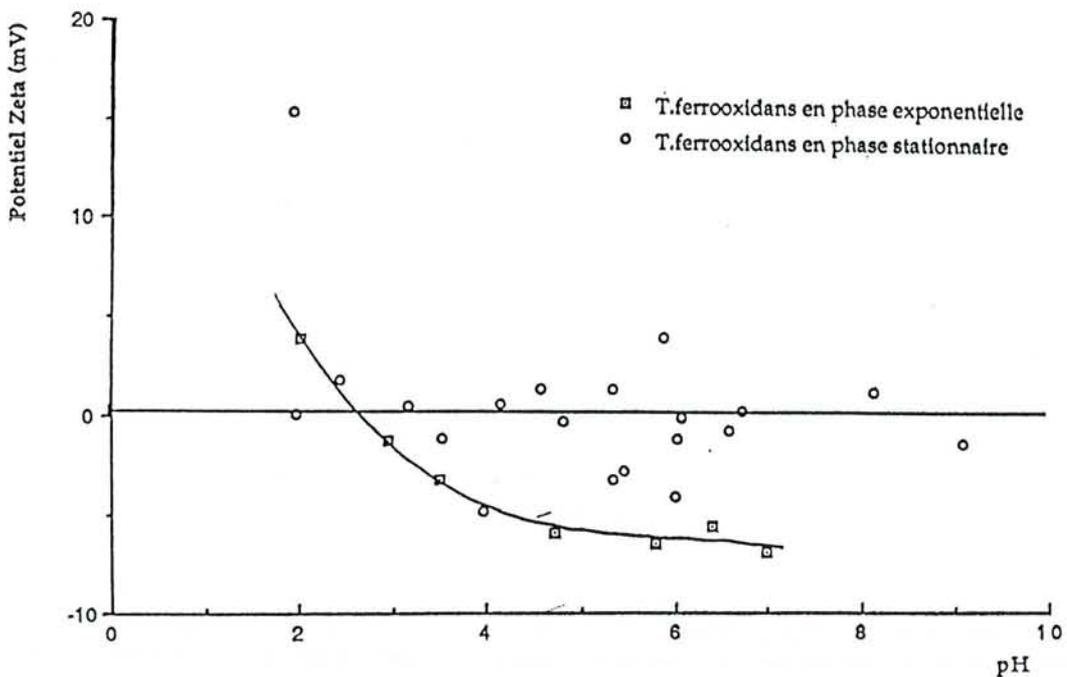


Figure IV.19.- Evolution du potentiel ζ de *T. ferrooxidans* en fonction du pH dans NaCl $10^{-2}M$.

Les bactéries en phase exponentielle présentent un P.I.E. (point isoélectrique) voisin de 2,5. A des pH > P.I.E., leur charge nette de surface est négative. Par contre, dans le domaine de culture de *T.ferrooxidans* (pH < 2,5), la charge globale des bactéries est positive et faible (+ 5 à + 10 mV).

Les bactéries en phase stationnaire sont moins chargées que les bactéries en phase exponentielle, et leur charge globale apparaît pratiquement nulle à une force ionique $10^{-2}M$ en NaCl.

B.-ETUDES DE LA SURFACE DE LA PYRITE

La mesure des charges de surface des pyrites K2 et ES par cette méthode a nécessité un broyage des sulfures à une granulométrie très fine : 5-20 μm .

1.-Mise en évidence des espèces présentes sur la surface des pyrites, par spectrométrie infrarouge en réflexion diffuse.

a.- Spectres des deux pyrites de granulométrie 32-53 μm

Cette granulométrie a été utilisée pour les expériences d'adhésion et de biolixiviation. Les spectres des deux pyrites sont différents (Figure IV.20.).

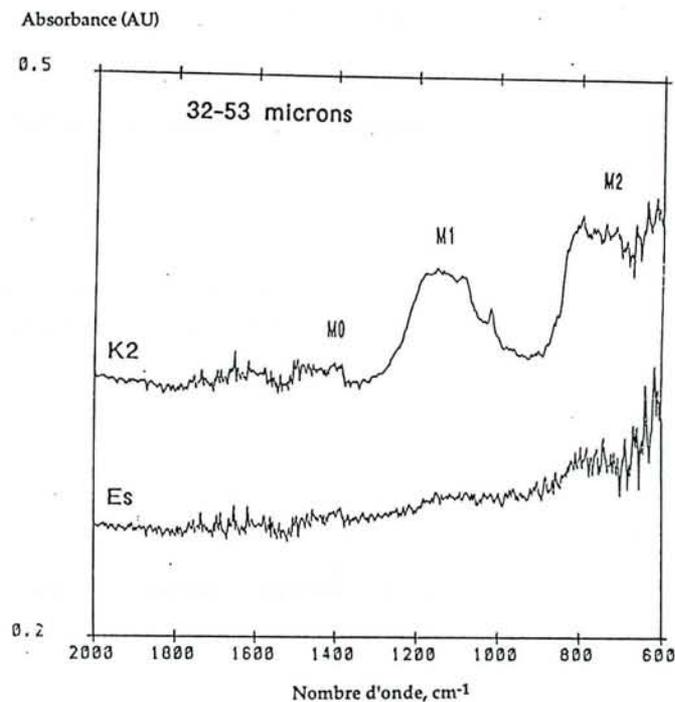


Figure IV.20.- Spectres I.R.T.F. de réflexion diffuse des pyrites ES et K2 (32-53 μm).

Tel que de Donato *et al.* (1991) l'ont décrit, le spectre de la pyrite K₂ montre l'existence de trois massifs:

- M0 (1420-1380 cm⁻¹) correspondant à des carbonates;
- M1 (environ de 1300 à 980 cm⁻¹) : vibrations correspondant essentiellement à des sulfates ferreux et ferriques;
- M2 (environ de 800 à 600 cm⁻¹) : massif qui peut être attribué à un amalgame complexe d'espèces oxydées ou hydroxylées (FeS, Fe₂O₃, FeOOH majoritaire).

Par contre, le spectre de pyrite ES montre la présence en surface, d'une faible quantité de carbonates (massif M0) et d'oxyhydroxydes de fer (massif M2). Les espèces du type sulfate ferreux et ferrique sont pratiquement inexistantes (quantité inférieure à la limite de détection de l'appareil). Le profil infrarouge de la pyrite ES est caractéristique d'une surface peu ou pas oxydée.

b.- Spectres des pyrites de granulométrie 5-20 μm

Les spectres présentés figure IV.21. montrent un état de surface semblable pour les deux pyrite, caractérisé par :

- un massif situé aux alentours de 1640 cm⁻¹, qui correspond à de l'eau structurellement liée aux sulfates de fer (FeSO₄ + 7 H₂O et Fe₂(SO₄)₃ + 2H₂O),
- un massif M₁ très important (et différent pour les deux pyrites),
- et un massif M₂ ;

De plus, on constate, pour la pyrite ES, la présence d'une quantité non négligeable de carbonates (massif M0).

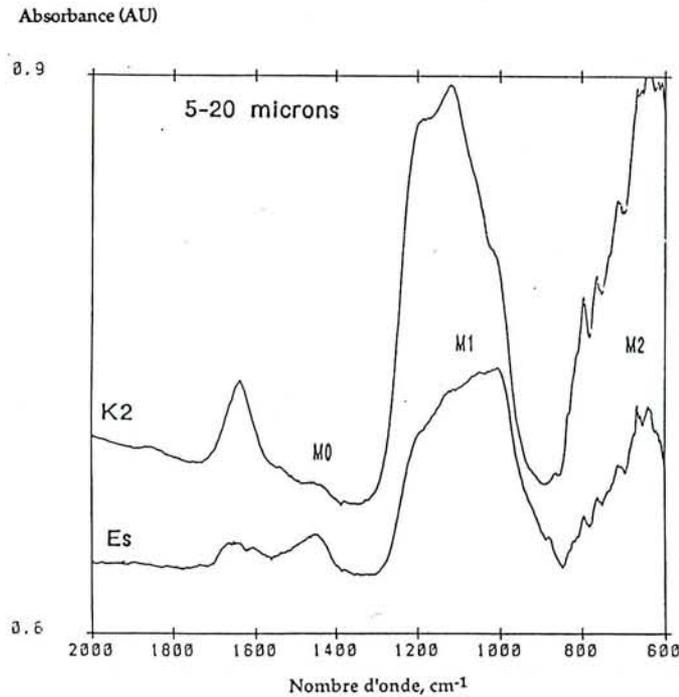


Figure IV.21.- Spectres I.R.T.F. de réflexion diffuse des pyrites ES et K₂ (5-20 μm).

Les fractions étudiées en potentiel ζ (5-20 μm) présentent des états de surface différents de celle utilisée lors des études d'adhésion et de biolixiviations (32-53 μm). Les deux pyrites sont plus oxydées à la granulométrie 5-20 μm , qu'à la granulométrie 32-53 μm . C'est vraisemblablement la conséquence d'un broyage poussé, dans le but d'obtenir des particules fines pour la mesure du potentiel ζ . Tout broyage conduisant à une granulométrie inférieure à 30 μm produit des phases superficielles, dont la composition, la structure et la solubilité sont fortement modifiées par rapport au minéral de départ. La diminution de la granulométrie du minéral s'accompagne d'une augmentation de la densité de tous les sites réactifs sur la surface du minéral, y compris ceux impliqués dans l'adhésion (Brierley, 1978). Cela suggère que dans ces conditions, le phénomène d'adhésion pourrait être amplifié.

2.-Le potentiel ζ de la pyrite

Les évolutions du potentiel ζ des pyrites sont représentées figures IV.22. et IV.23. L'allure des courbes obtenues pour les deux sulfures est globalement semblable. Le P.I.E. apparaît entre pH 6 et pH 8.

Ces résultats sont différents de ceux obtenus au cours d'études antérieures. Des mesures du potentiel d'écoulement sur des fractions granulométriques $> 100 \mu\text{m}$ ont conduit à un P.I.E. situé entre pH 3 et pH 5. Or, dans notre cas, le P.I.E. est plus élevé.

En comparant ces courbes à celles de solides connus, nous pouvons remarquer que leur évolution, et le P.I.E. sont analogues à ceux d'un oxyhydroxyde métallique, en l'occurrence, un oxyhydroxyde de fer. Ainsi, nous pouvons présumer l'existence de telles espèces à la surface des pyrites étudiées.

Dans NaCl, le P.I.E. des pyrites varie avec la force ionique du milieu (Figures IV.22. et IV.23.) : il augmente lorsque la force ionique du milieu augmente. Un mécanisme probable pourrait être l'échange des sulfates présents à la surface de la pyrite, par les ions Cl^- du milieu: à chaque échange, la surface perdrait ainsi une charge négative.

Les mesures du potentiel ζ nous permettent de supposer l'existence d'oxyhydroxydes de fer, à la surface des deux pyrites, à la granulométrie 5-20 μm , qui témoignerait donc d'une oxydation superficielle des deux pyrites, pendant ou après le broyage fin. Ces résultats sont en accord avec ceux des études spectrométriques.

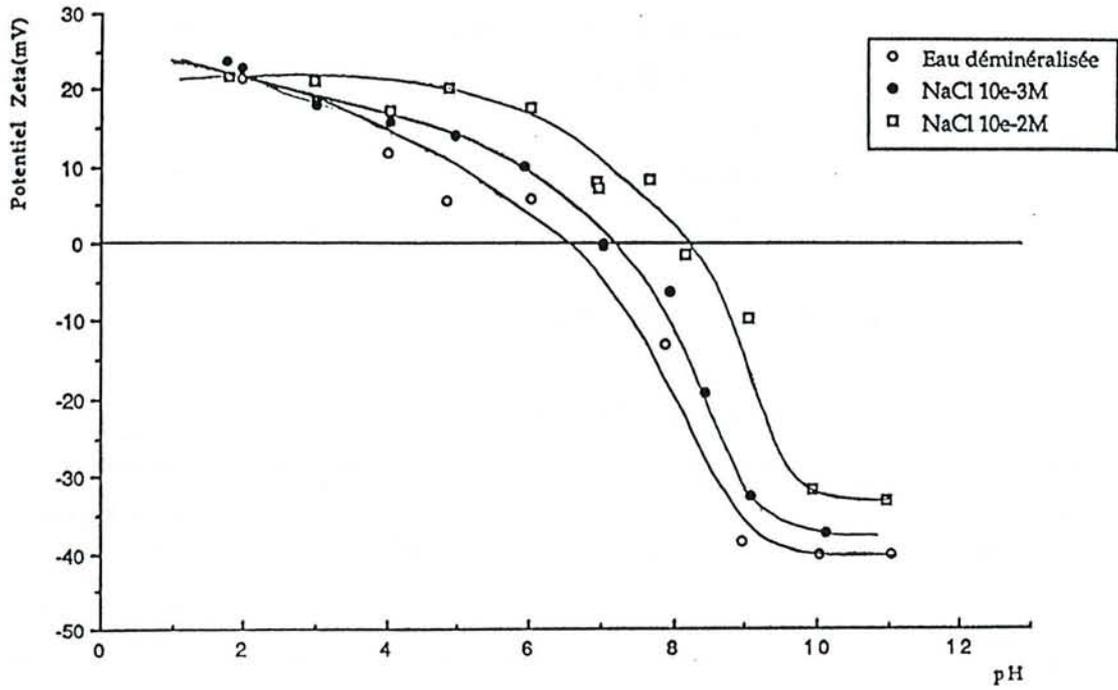


Figure IV.22.- Evolution du potentiel Zeta de la pyrite ES en fonction du pH et du milieu.

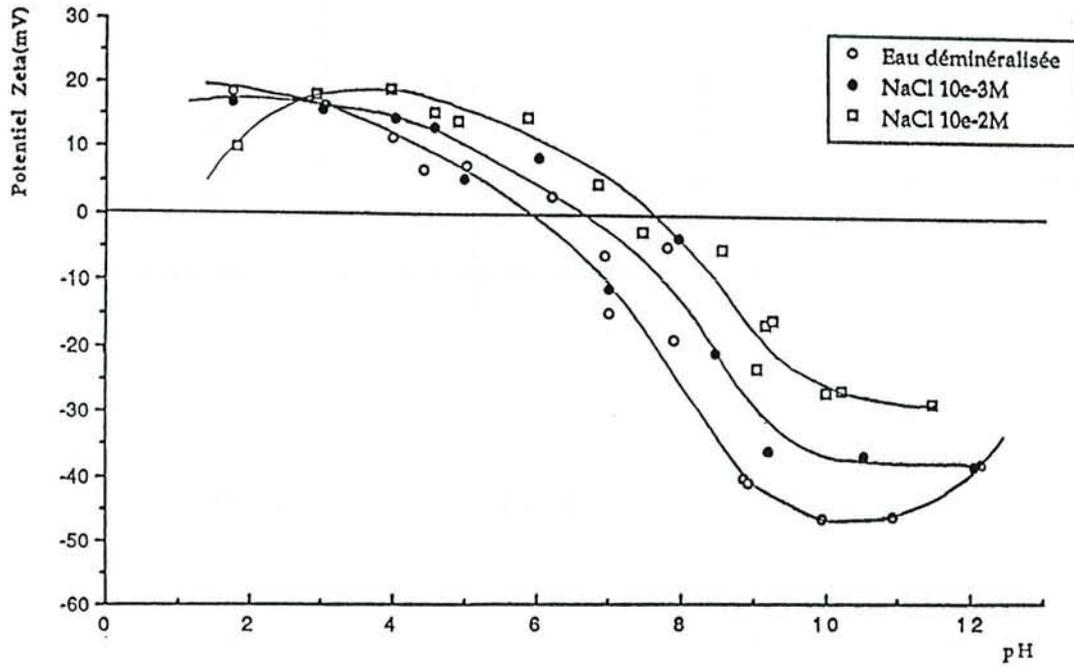


Figure IV.23.- Evolution du potentiel Zeta de la pyrite K2 en fonction du pH et du milieu.

La comparaison des études de charge des bactéries et du minéral montre une charge nette positive pour les deux types de particules, en milieu NaCl, à des pH < 2. Dans ces conditions, une interaction électrostatique bactérie-minéral est difficilement envisageable. Or, le milieu NaCl est loin d'être le milieu de culture de *Thiobacillus ferrooxidans*. Par conséquent, nous avons réalisé des mesures de potentiel ζ en milieu M1 :

- sur les bactéries et la pyrite pris séparément;
- sur un mélange bactéries-pyrite.

3.-Le potentiel ζ dans le milieu M1

Les résultats sont regroupés dans le tableau IV.3.

Conditions	Potentiel ζ (mV)	pH	Présence de bactéries libres en suspension (observation en cellule de Thoma)
Témoin pyrite (K2 conditionnée 1 h dans M1)	- 5,5 - 10,4	1,82 1,80	-
Témoin <i>T. ferrooxidans</i> ($5 \cdot 10^7$ bact./ml dans M1)	- 7,4 - 6,4	1,78 1,78	- -
Réacteur : Mélange <i>T.f.*</i> -Pyrite K2 • 3 heures après T_0	0 à - 2,4	1,80	< seuil de détection ($5 \cdot 10^5$ à 10^6 bact./ml)
• 3 jours	+ 4,6	1,57	"
• 19 jours	0 à - 8,8	1,39	"

**T.f.* = *Thiobacillus ferrooxidans*

Ces résultats indiquent que dans le milieu de biolixiviation M1, la charge nette des bactéries et du minéral est négative.

Dans le mélange bactérie-minéral, la concentration des bactéries non-adhérentes est trop faible pour pouvoir être estimée par numération au microscope par la cellule de Thoma, ce qui montre que l'adhésion bactérienne a eu lieu (la concentration bactérienne dans l'inoculum était 10^7 bactéries/ml). Les particules obtenues à la suite de cette adhésion, et observées au microscope lors de la mesure du potentiel ζ ont une charge nette négative.

Dans le cas des expériences d'adhésion à la fraction 32-53 μm , la différence des concentrations de bactéries non-adhérentes avant et après contact était faible et parfois non significative. Pour la fraction 5-20 μm , la chute de la concentration des bactéries non-adhérentes paraît élevée, ce qui suggère que l'utilisation d'une granulométrie fine permet d'amplifier le phénomène d'adhésion. L'adhésion et la biooxydation obtenues pour ces fractions seront comparées en détail au chapitre VIII.

C.- DISCUSSION

Thiobacillus ferrooxidans et le minéral, ont des charges nettes de surface:

- positives dans le milieu NaCl et à $\text{pH} < 2$,
- négatives dans le milieu de lixiviation M1.

L'acquisition d'une charge négative dans le milieu M1, indique que les deux surfaces ont fixé en excès des anions, qui peuvent être les sulfates et/ou phosphates du milieu. Blake II et *al.* (1994) montrent, en réalisant les mesures dans H_2SO_4 0,01N, que le minéral et les cellules fixent des ions sulfate. La charge négative des deux particules indique également que dans des conditions de biolixiviation, les interactions électrostatiques entre ces particules sont de nature répulsives.

Dans le milieu NaCl, lorsque la concentration en électrolyte est augmentée, le point isoélectrique de la pyrite augmente, ce qui pourrait être dû à un échange des ions sulfates présents à la surface minérale (mis en évidence par SIRTf en réflexion diffuse) par les ions Cl^- du milieu : à chaque échange, la surface perdrait ainsi une charge négative.

Les interactions mises en jeu dans le mécanisme d'adhésion sont :

- les interactions à courte distance de type liaisons hydrogène, ioniques, covalentes, interactions entre groupements polaires, apolaires. Elles n'ont pas été étudiées au cours de ce travail.
- les interactions à longue distance ou interactions électrostatiques. Elles sont de nature répulsives.

Pour que l'adhésion et les interactions à courte distance puisse s'établir, cette répulsion électrostatique doit être supprimée ou franchie. On pourrait imaginer que ce phénomène a eu lieu :

- par l'intervention d'un liant multivalent qui réalise un pontage entre les cellules et la surface minérale et qui supprime les répulsions. Selon Blake II et *al.* (1994), celui-ci pourrait être le Fe^{3+} présent dans le milieu de biooxydation.

- par un mécanisme dans lequel les ions sulfate de la surface du minéral s'échangeraient par la surface négative des bactéries, du fait d'une affinité importante de la bactérie pour la surface du minéral, comme si la surface du minéral jouait un rôle d'échangeur d'anions. Les groupements avec lesquels la bactérie pourrait interagir sur la surface du minéral seraient le Fe^{2+} ou le Fe^{3+} associés aux sulfates, ou encore le Fe^{3+} présent dans les oxyhydroxydes, mis en évidence par SIRTf en réflexion diffuse. Ohmura *et al.* (1993) ont mis en évidence une inhibition compétitive de l'adhésion

aux sulfures de fer par le Fe^{2+} . Ce résultat serait en faveur d'une interaction faisant intervenir les sulfates ferreux.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction bactérie-minéral serait contrôlée par l'**Affinité** des cellules pour le Fe^{3+} ou le Fe^{2+} présents sur la surface du minéral. Cette affinité pourrait être due à une ou plusieurs protéines ou macromolécules de la membrane bactérienne acteurs du mécanisme d'adhésion.

CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

Les résultats de cette partie de l'étude précisent divers aspects qualitatifs et quantitatifs de l'adhésion de *T. ferrooxidans* aux pyrites et de l'évolution des bactéries fixées et de la surface du minéral au cours des processus de biooxydation.

ADHÉSION BACTÉRIENNE

Méthodes d'estimation

L'adhésion bactérienne a été étudiée pour les concentrations bactériennes initiales ($1,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml) permettant d'obtenir une lixiviation optimale de la fraction granulométrique 32-53 μm des particules de pyrite. Elle a d'abord été mesurée par les méthodes indirectes (numération au microscope par cellule de Thoma, dénombrement des bactéries viables par la technique du NPP), par différence des concentrations des bactéries non-adhérentes avant et après contact. Ces concentrations ne sont pas toujours significativement différentes. Par conséquent, les méthodes indirectes conviennent peu à l'estimation précise de l'adhésion de *T. ferrooxidans* à la pyrite et à l'observation des bactéries réellement fixées. Pour suivre spécifiquement l'adhésion et l'évolution des bactéries fixées de l'espèce *Thiobacillus ferrooxidans* au cours de processus de biolixiviation, nous avons développé une méthode immunoenzymatique de type ELISA dans laquelle la réaction est réalisée sur une membrane filtrante. De ce fait, elle porte le nom de "Réaction ELIFA" ou Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay.

La réaction ELIFA met en évidence l'adhésion bactérienne et permet d'estimer directement la quantité de bactéries fixées au minéral. Elle a permis d'obtenir des résultats homogènes, voisins de ceux obtenus par les méthodes indirectes (différence de 0,5 log entre les deux types de méthodes). Elle est également précise (Intervalle de confiance inférieur à 0,3 log) et sensible (elle permet de détecter 10^4 bactéries/puits). Les dénombrements obtenus étaient cependant légèrement plus faibles que ceux de l'estimation indirecte. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les anticorps ne réagissent pas avec la face bactérienne en contact avec les particules de pyrite. En conséquence, l'adhésion est sous-estimée. On peut également penser que l'élimination des bactéries du liquide interstitiel par lavage peut expliquer cette différence, car dans l'estimation indirecte, ces bactéries sont comptabilisées comme des bactéries adhérentes.

Les applications possibles de cette méthode sont :

- la détermination d'isothermes d'adsorption des bactéries à la pyrite et d'autres sulfures, pour estimer l'affinité des cellules et la quantité maximale de bactéries capable d'être adsorbée sur les sulfures. Il faut pour cela vérifier qu'une adhésion importante ne sature pas la réaction immunoenzymatique par encombrement stérique, du fait de la proximité des cellules sur la surface du minéral.
- le suivi de l'évolution des bactéries fixées, spécifiquement de l'espèce *Thiobacillus ferrooxidans*, au cours du processus d'oxydation minérale. Pour cela, il reste à déterminer la spécificité de l'antisérum vis à vis de la bactérie.

Taux de recouvrement des pyrites en bactéries

Les mesures directes et indirectes réalisées ont permis d'estimer l'adhésion en moyenne à 5.10^5 bactéries/mg et d'évaluer le taux de recouvrement à 1,3 %, ce qui représente 350 bactéries par grain. Ce taux de recouvrement devrait permettre une observation des bactéries en microscopie électronique à balayage.

Ces taux de recouvrement (1 à 2 %) sont faibles par rapport aux valeurs de 20 à 45 % déterminées par Ohmura *et al.* (1993) pour des particules de granulométrie voisine aux nôtres. Ce résultat est dû à l'absence de saturation du minéral par les bactéries dans les conditions optimales de biolixiviation correspondant à nos expériences. Ohmura *et al.* (1993) au contraire, se sont placés en conditions de saturation, en utilisant des inoculum importants (10^9 bactéries/ml).

Force d'adhésion des bactéries au minéral :

Les bactéries fixées ont également été estimées après désorption par un traitement physico-chimique développé par Monroy *et al.* (1994) qui combine l'action mécanique du vortex et physico-chimique du Tween 80. Cette méthode permet d'étudier l'évolution des bactéries fixées au cours de la biooxydation et de distinguer deux classes de bactéries en fonction de leur force d'adhésion au minéral :

- les bactéries adhérant faiblement au minéral et récupérées par lavage de la pyrite à l'aide du milieu minéral M2 utilisé pour les cultures bactériennes,
- les bactéries adhérant fortement au minéral et désorbées par le Tween 80.

Les mesures réalisées par cette méthode ont permis de constater qu'à 1 jour de contact, 68 % des cellules étaient fortement fixées et que cette classe de bactéries représente $3,5.10^5$ bactéries/mg. Les estimations directe et indirecte de l'adhésion avaient mis en évidence 10^5 à 10^6 bactéries fixées/mg de pyrite au cours des premières 24 h de contact. La coïncidence de ces résultats avec ceux obtenus pour le premier jour de contact, par désorption des bactéries fixées, montre que pendant le premier jour, l'adhésion bactérienne est forte et que le protocole de désorption permet de récupérer la majorité des bactéries fixées.

Ces résultats montrent la complémentarité des méthodes employées et l'utilité de la méthode de désorption : les méthodes d'estimation de l'adhésion permettent de déterminer la quantité de cellules initialement fixées au minéral ; la méthode de désorption permet de préciser la force d'adsorption des bactéries.

Approche du mécanisme d'adhésion

La spectrométrie infrarouge en réflexion diffuse a mis en évidence des massifs importants de sulfates (ferreux et ferriques) et d'oxyhydroxydes de fer à la surface des pyrites ES et K2.

L'étude des propriétés électrochimiques de la pyrite et des bactéries a été abordée par la mesure du potentiel ζ . Ces mesures ont indiqué que *Thiobacillus ferrooxidans* et le minéral, ont des charges nettes de surface, positives dans le milieu NaCl et à pH < 2, et négatives dans le milieu de lixiviation M1. L'acquisition d'une charge négative dans le milieu M1, indique que les deux surfaces ont fixé en excès des anions, qui peuvent être les sulfates et/ou phosphates du milieu et que dans ce milieu de biolixiviation, les interactions électrostatiques entre les deux particules sont de nature répulsive.

Pour que l'adhésion et les interactions à courte distance (liaisons hydrogène, ioniques, covalentes) puissent s'établir, cette répulsion électrostatique doit être supprimée ou franchie. Ce phénomène pourrait avoir lieu :

- par l'intervention d'un liant multivalent qui réalise un pontage entre les cellules et la surface minérale et qui supprime les répulsions. Selon Blake *et al.* (1994), celui-ci pourrait être le Fe^{3+} présent dans le milieu de biooxydation.

- on pourrait également proposer un mécanisme dans lequel les bactéries interagiraient directement avec le fer (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) présent à la surface du minéral sous forme de sulfates ou d'oxyhydroxydes mis en évidence par SIRTf. Ces interactions d'adhésion peuvent faire intervenir des récepteurs spécifiques du fer.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction bactérie-minéral serait contrôlée par l'**Affinité** des cellules pour le Fe^{3+} ou le Fe^{2+} présents sur la surface du minéral. Cette affinité pourrait être due à une ou plusieurs protéines ou macromolécules de la membrane bactérienne acteurs du mécanisme d'adhésion.

EVOLUTION DES BACTÉRIES ET DE LA SURFACE DU MINÉRAL AU COURS DE LA BIOOXYDATION

La mesure de la quantité de bactéries fixées, par la méthode de désorption (Monroy *et al.*, 1994) a permis de constater que pendant la biooxydation, la proportion des bactéries fixées est faible (5 à 10 %), mais la quantité de cellules fixées reste cependant constante (10^5 à 10^6 cellules faiblement fixées et autant de cellules fortement fixées/mg).

Les observations au MEB de pyrites biolixiviées ont permis de constater que l'état des bactéries et l'état de surface du minéral évoluent au cours de la biooxydation.

L'observation d'un échantillon de pyrite prélevé au cours de la phase d'amorce d'oxydation a permis de repérer des bactéries à la surface du minéral. La fixation de l'échantillon en milieu liquide a montré qu'une grande partie des cellules a été détachée par ce traitement, mais que certaines cellules étaient fixées fortement et présentaient même des figures de division, indiquant qu'une multiplication bactérienne se produit à la surface du minéral.

L'observation d'un échantillon prélevé au cours de la phase optimale d'oxydation a permis d'observer de nombreuses particules ayant la morphologie des bactéries, agrégées en formant des amas, présentant une surface grumeleuse, et également enrobées dans une phase superficielle. Certaines d'entre elles apparaissent sous forme de tubes, avec un orifice à leur extrémité. Elles pourraient correspondre à des cellules entourées d'une gaine dure de précipités, formée par les cellules elles-mêmes. Cette gaine doit probablement empêcher l'accès des nutriments aux bactéries et bloquer l'activité bactérienne, ce qui suggère que les cellules pourraient être en mauvais état physiologique ou mortes et qu'une partie des particules pourrait constituer des "fossiles" bactériens. Les tubes pourraient correspondre à des cellules lysées. Le nombre important des particules pourrait être dû à la persistance de la gaine sur la surface du minéral après la mort des cellules. Leur répartition en amas, et le fait qu'elles soient recouvertes d'une phase superficielle suggèrent également que pour atteindre ce nombre important, les cellules se sont multipliées sur la surface du minéral ou ont coprecipité avec les dépôts minéraux. Parallèlement à ces observations, le fait que l'oxydation soit optimale suggère la présence de bactéries actives, avec une gaine moins épaisse ou absente, en suspension ou à la surface du minéral. Une partie de ces hypothèses pourrait être vérifiée en désorbant les particules par le traitement physico-chimique au Tween 80 (Monroy *et al.*, 1994). Des observations MET permettraient d'observer la structure et le contenu de ces particules. Des analyses par EELS pourraient permettre de préciser la composition de la gaine.

En ce qui concerne l'estimation des bactéries fixées en cours de biooxydation, la présence d'une gaine autour des cellules au cours de la phase optimale permet de suggérer que la réaction ELIFA sera négative avec ces cellules. Pour cela, il est préférable d'utiliser des méthodes moins spécifiques telles que le traitement physico-chimique cité précédemment, pour être sûr de détacher la majorité

des cellules. L'incubation des cellules désorbées, en présence de pyrite ou de Fe^{2+} , permettrait de déterminer si les cellules sont encore viables.

L'observation du minéral a permis de constater que certains grains étaient recouverts d'une phase pelliculaire grossière et de bactéries au cours de la phase optimale, alors que d'autres apparaissaient nus. Ces observations ont donc montré une hétérogénéité des grains qui pourrait être liée à des propriétés différentes dues entre autres, au broyage. Ces résultats suggèrent que les réactions qui se produisent à la surface des grains dépendent de ces propriétés, et montrent que les réactions d'oxydation sont réparties de façon hétérogène pour l'ensemble des particules. Les observations en MEB réalisées par de Donato *et al.* (1991), couplées à l'étude de l'état de surface du minéral par SIRTf en réflexion diffuse, ont suggéré que les phases pelliculaires grossières seraient des espèces de type sulfate.

Au cours du ralentissement de l'oxydation, la surface apparaît totalement différente de celle observée au cours de la phase optimale d'oxydation. Les phases pelliculaires grossières observées au cours de la phase optimale, ont disparu à ce stade de biolixiviation. Les bactéries fixées apparaissent également moins nombreuses. Ces observations suggèrent une modification des propriétés de surface de la pyrite (charge de surface, propriétés électrochimiques). L'étude des courbes intensité -potentiel d'échantillons de pyrite prélevés pendant les différentes étapes de biooxydation peut nous renseigner sur les propriétés électrochimiques du minéral. Il serait également intéressant de déterminer la charge de surface des particules minérales aux différentes étapes de l'oxydation, par l'étude du potentiel ζ .

L'observation en MEB de la surface du minéral au cours des différentes étapes de biooxydation est donc importante. Elle apporte des renseignements complémentaires aux mesures d'adhésion et de solubilisation minérale et montre que pour comprendre les réactions à l'interface Bactérie-Minéral, il est nécessaire de préciser la nature des espèces chimiques présentes sur la surface du minéral (par SIRRd, ESCA), de les quantifier et d'étudier leur localisation. Elle suggère aussi des modifications de la charge de surface minérale et peut être du comportement électrochimique du minéral, au cours de l'oxydation bactérienne (Mustin, 1992).

L'adhésion bactérienne initiale a été mise en évidence par la réaction ELIFA. Les résultats correspondants ont suggéré une répartition bactérienne homogène sur la surface du minéral que ne confirme pas l'observation au MEB (densité bactérienne et répartition).

Deuxième Partie

Chapitre V

**Contribution du contact direct bactérie-minéral
au processus d'oxydation de la pyrite
par *Thiobacillus ferrooxidans***

Contribution du contact direct bactérie-minéral au processus d'oxydation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans*

I.- INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Au cours des processus de biooxydation de la pyrite, la population bactérienne de *T. ferrooxidans* est constituée de cellules adhérant au minéral et de bactéries en suspension dans la solution de lixiviation. Les rôles respectifs de ces deux types de cellules sont mal définis (Mustin, 1992 ; Konishi *et al.*, 1992 ; Bailey et Hansford, 1993 ; Monroy *et al.*, 1994). Les résultats précédents suggèrent un rôle important des bactéries fixées au cours de la phase initiale de l'oxydation. Le but de cette partie de l'étude est de déterminer l'influence de l'adhésion et de définir ou au moins de préciser les réactions provoquées par les bactéries fixées à la surface du minéral.

Cette 2^{ème} partie comprend un seul chapitre regroupant une étude bibliographique complémentaire concernant l'adhésion, la description du matériel et des méthodes spécifiques à cette partie de l'étude et enfin, les résultats obtenus.

II. - CONNAISSANCES ACTUELLES, DES CONSÉQUENCES DE L'ADHÉSION SUR L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE, ET DU RÔLE DU CONTACT BACTÉRIE-MINÉRAL DANS LE PROCESSUS D'OXYDATION DES SULFURES

L'adhésion bactérienne sur une surface solide peut correspondre à deux principaux types de situations. Dans la première, qui correspond au cas général, le support ne constitue pas directement un substrat pour les microorganismes. La question de nécessité de l'adhésion ne se pose pas en terme de besoins énergétiques. Il peut toutefois s'agir d'un phénomène trophique comme dans le cas d'adhésion de bactéries aux racines, mais il s'agit aussi et surtout, dans ce cas, de considérer les conséquences de l'adhésion sur l'activité, la survie et la viabilité des bactéries. Ainsi, en industrie alimentaire, le développement de biofilms sur les surfaces internes d'installations de stockage (par exemple du lait) ou d'installations de traitements de matières premières, peut provoquer non seulement d'importants problèmes d'hygiène, mais aussi modifier l'activité des organismes et, par exemple, la qualité organoleptique des produits (Criado *et al.*, 1994). Dans un autre domaine, comme la sulfato-

réduction, le développement de biofilms sur des supports en acier (l'acier n'est pas un substrat bactérien), amplifie indirectement la corrosion chimique du métal (Somlev et Tishkov, 1994).

Dans la seconde situation, le support de l'adhésion est aussi le substrat énergétique et nutritionnel. Il s'agit alors de préciser si cette adhésion est nécessaire à l'utilisation et à la dégradation du substrat, avant de déterminer les mécanismes d'action des bactéries fixées et l'influence de l'adhésion sur l'activité bactérienne. Ces situations correspondent à celles rencontrées dans la dégradation de constituants végétaux ligno-cellulosiques insolubles, mais aussi à celles des phénomènes d'altération et dissolution par oxydation ou réduction de minéraux sulfurés (pyrite, chalcoppyrite, arsénopyrite, ...) ou d'oxyhydroxydes (gœthite, hématite, ...).

Avant d'aborder le rôle du contact direct entre *Thiobacillus ferrooxidans* et la pyrite, il apparaît nécessaire de présenter les principaux types d'incidence de l'adhésion des bactéries sur une surface solide et, en particulier, d'envisager le cas des interactions minéral-microorganismes.

A.- CONSÉQUENCES DE L'ADHÉSION SUR L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE

De nombreuses études ont montré que les effets de l'adhésion sur l'activité bactérienne ne peuvent pas être généralisés. Elles ont cependant abouti à une meilleure connaissance de l'interface bactérie-solide, favorisant la compréhension de chaque système particulier. Une bonne synthèse de ces études est réalisée par Fletcher (1991) et van Loosdrecht *et al.* (1990).

1.- Accumulation de molécules à l'interface solide-liquide et conséquences

Les propriétés physico-chimiques à la surface d'un solide sont souvent différentes de celles de la solution environnante. En conséquence, certaines molécules ou certains substrats peuvent se concentrer à l'interface solide-liquide. Ces conditions physico-chimiques particulières vont contrôler l'activité des bactéries fixées.

a.- Conséquences de la concentration de molécules de faible masse moléculaire sur la surface d'un support

La concentration de molécules ou de substrats de faible masse moléculaire à la surface d'un support entraîne un gradient de concentration de substrat plus important entre la surface et une cellule fixée, qu'entre la surface et une cellule en suspension. Le transfert du substrat vers une cellule fixée sera donc plus rapide, la distance étant plus petite. En conséquence, les bactéries fixées seront plus actives que les bactéries en suspension. Cet effet est cependant indirect, car il ne provoque pas de modification de la physiologie bactérienne.

b.- Conséquences de l'interaction de macromolécules avec une surface solide

Les macromolécules peuvent subir des modifications conformationnelles, et être ainsi plus disponibles en tant que substrats d'exo-enzymes bactériens. Par contre, la modification conformationnelle d'exo-enzymes sur des surfaces peut altérer leur activité et avoir un effet négatif pour les bactéries fixées. La présence de surfaces impose donc des conditions physico-chimiques particulières, qui conditionnent l'activité des bactéries fixées (Fletcher, 1991).

2.- Influence des propriétés physico-chimiques de l'interface sur l'adhésion des bactéries et leur activité

L'influence des propriétés des surfaces et de l'interface sur l'adhésion des bactéries et leur activité peut se manifester de trois grandes façons :

a.- Contrôle de la répartition cellulaire à la surface d'un support

Les propriétés de surface du support et des cellules contrôlent la nature des microorganismes qui s'adsorbent, leur nombre et leur distribution. Un exemple d'interaction ordonnée entre cellules immobilisées est fourni par la croissance sur milieux solides (Fletcher, 1991).

b.- Modifications indirectes de l'activité bactérienne

Les conditions physico-chimiques particulières du microenvironnement Bactérie-Minéral influencent indirectement la physiologie bactérienne (Fletcher, 1991, ; van Loosdrecht *et al.*, 1990).

Le fait que la vitesse de transfert de substrats vers les bactéries fixées soit favorisée et que les macromolécules subissent des modifications conformationnelles influence l'activité des cellules immobilisées. Ainsi, l'adhésion bactérienne dans les milieux oligotrophes (pauvres en nutriments) correspond à une réponse physiologique de résistance et d'adaptation bactérienne aux conditions nutritionnelles défavorables du milieu (Fletcher, 1991).

La réalisation de réacteurs en continu à cellules immobilisées sur verre fritté a permis à Halfmeier *et al.* (1993a et b) d'améliorer la productivité relative à l'oxydation du Fe^{2+} par *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 583. La vitesse d'oxydation a ainsi pu être augmentée de 0,77 g/l.h dans le cas d'un réacteur classique (sans cellules immobilisées), à 3,6 g/l.h pour un réacteur à cellules immobilisées. Des résultats comparables ont été cités pour une autre souche de *T. ferrooxidans* par Jensen et Webb (1994)

Dans les réacteurs en continu, la croissance des cellules immobilisées est indépendante de la vitesse de dilution (rapport du débit au volume du réacteur). Ce phénomène permet ainsi d'accroître

la biomasse totale par rapport à un réacteur classique et se manifeste par une augmentation apparente de la productivité bactérienne (van Loosdrecht *et al.*, 1990).

La formation de biofilms permet aux bactéries de se protéger face aux agressions. Elle a pour conséquences d'augmenter leur résistance aux agents antimicrobiens (tensio-actifs, antibiotiques, température) et de favoriser les transferts génétiques et les interactions (synergie ou compétition) entre ces microorganismes. Les raisons de cette résistance accrue aux antibiotiques et tensio-actifs ne sont pas connues précisément. La présence du biofilm pourrait constituer une résistance au transfert de molécules (Fletcher, 1991). Par exemple, en industrie alimentaire, lors du nettoyage et de la désinfection d'installations de stockage et de traitement de matières premières, la réaction du biofilm avec une partie des détergents diminue l'efficacité de ces agents vis-à-vis des bactéries du biofilm. En conséquence, la présence de biofilms nécessite une amélioration des procédés de nettoyage (Zottola, 1994).

Par ailleurs, la rétention d'eau par des surfaces très hydratées, comme dans le cas des argiles, peut protéger les bactéries de la dessiccation (Dommergues et Mangenot, 1970).

Cependant, ces hypothèses ne peuvent pas expliquer totalement cette résistance accrue des bactéries du biofilm. Il est probable que ces dernières soient phénotypiquement différentes des bactéries en suspension, puisqu'elles sont soumises à des conditions physico-chimiques différentes : les microorganismes d'un biofilm sont essentiellement en phase stationnaire de croissance et sont relativement inactifs (Fletcher, 1991).

c.- Modifications directes de l'activité bactérienne

Les conditions physico-chimiques de l'interface Bactérie-Minéral pourraient provoquer des modifications directes de la physiologie bactérienne (Fletcher, 1991). Dans les réacteurs classiques en continu, la vitesse spécifique de croissance μ des microorganismes est égale à la vitesse de dilution. Par conséquent, une vitesse de dilution supérieure au μ_{\max} (vitesse de croissance maximale) provoque la perte de l'ensemble des cellules. Dans le cas d'un réacteur à cellules immobilisées, la vitesse de croissance des cellules fixées est indépendante de la vitesse de dilution. Dans ce cas, il est possible de récupérer les cellules produites par multiplication bactérienne au sein du biofilm, en appliquant une vitesse de dilution supérieure au μ_{\max} . Une telle expérience a été réalisée avec *T. ferrooxidans*. Elle a permis de montrer que les cellules immobilisées sont physiologiquement différentes des bactéries originales. Elles expriment une vitesse d'oxydation du Fe^{2+} plus importante, une tolérance à un domaine de températures plus large, que les bactéries originales, et une résistance accrue à des concentrations élevées de substrat et de produit. Ces altérations physiologiques sont interprétées comme le résultat direct de l'immobilisation des bactéries (Karamanev et Nikolov, 1988 ; Nikolov et Karamanev, 1992). La concentration des électrolytes sur les surfaces pourrait d'une part modifier la densité de charges de l'enveloppe bactérienne, et les mêmes, ou d'autres facteurs physiques pourraient entraîner des déformations de l'enveloppe bactérienne. En conséquence, tous ces

phénomènes pourraient modifier les processus membranaires tels que le transport de substrats et la production d'énergie (Fletcher, 1991), et nous pouvons même avancer qu'ils pourraient avoir des conséquences sur les mécanismes moléculaires de régulation bactérienne

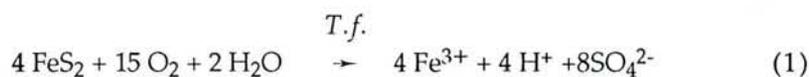
B.- ROLE DU CONTACT BACTÉRIE-MINÉRAL DANS LE PROCESSUS D'OXYDATION DE SULFURES

Les dernières remarques ci-dessus s'appliquent sans doute lorsque le support d'adhésion est source d'énergie, comme dans le cas de l'interaction de *T. ferrooxidans* avec la pyrite. Il y a alors lieu d'étudier la signification de l'adhésion et de déterminer sa nécessité et ses contributions au processus d'oxydation du minéral avant de déterminer l'activité des bactéries fixées. C'est l'objectif de notre étude.

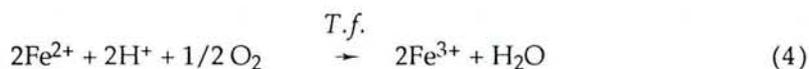
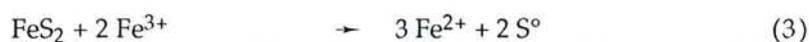
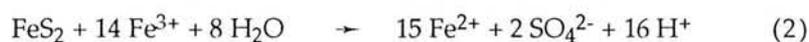
Les processus d'oxydation de pyrite par *T. ferrooxidans* mettent en jeu deux types de réactions : les réactions d'oxydation directe des éléments minéraux et du minéral par les bactéries, les réactions d'oxydation indirectes du minéral par l'oxydant chimique, le fer ferrique. Ce dernier peut être issu des réactions d'oxydation bactérienne directes, de l'oxydation bactérienne de fer ferreux provenant d'apports exogènes et/ou des réactions d'oxydation indirectes du minéral, d'apports exogènes (Konishi *et al.*, 1992 ; Larsson *et al.*, 1993 ; Pistaccio *et al.*, 1994).

On pourrait ainsi distinguer une réaction d'oxydation bactérienne qui s'effectuerait directement à partir de la pyrite (réaction 1) d'une réaction chimique *sensu stricto* faisant intervenir le fer ferrique (réactions 2 et 3). Le fer ferreux et le soufre produits sont alors oxydés par les bactéries en régénérant le fer ferrique et l'acide sulfurique (réactions 4 et 5) :

Mécanisme direct :



Mécanisme indirect :



La contribution des réactions d'oxydation directes (1) à l'ensemble du processus d'oxydation et l'importance du rôle des bactéries fixées sont très mal ou pas définies. Elles semblent dépendre de la nature du sulfure. En effet, des contributions équivalentes des mécanismes direct et indirect ont été mises en évidence dans l'oxydation d'un concentré peu soluble de ZnS (Konishi *et al.*, 1992). Dans le cas de la molybdénite, un sulfure peu soluble, Pistaccio *et al.* (1994) ont montré qu'une oxydation importante n'est obtenue qu'en augmentant l'adhésion de *T. ferrooxidans* au minéral, en rendant la surface hydrophile par l'addition de Tween 80. Dans le cas de la pyrite, les réactions d'oxydation chimique par FeCl_3 sont négligeables à 30°C, mais la participation au processus d'oxydation chimique augmente avec la température, si bien qu'elles représentent 43 % du processus à 70°C (Boogerd *et al.*, 1991).

En général, un rôle majeur est attribué à l'interaction directe Bactérie-Minéral dans les processus de biooxydation (Natarajan, 1990 ; Bailey et Hansford, 1993). Cependant, dans la plupart des études, les particules minérales ne sont pas séparées des bactéries (Asai *et al.*, 1992 ; Konishi *et al.*, 1992 ; Monroy *et al.*, 1994), si bien que les réactions d'oxydation directe et indirecte se produisent simultanément. Il est alors difficile d'évaluer la contribution de chacun de ces mécanismes au processus global d'oxydation et de déterminer le rôle des bactéries fixées.

Récemment, le rôle du contact a été étudié directement en séparant les bactéries du minéral. Par utilisation de sacs à dialyse, Pogliani *et al.* (1990) ont ainsi montré la nécessité du contact Bactérie-Minéral au cours des réactions d'oxydation directe de CuS par *T. ferrooxidans*, mais aussi la prépondérance des réactions d'oxydation indirecte dans le cas où un apport de Fe^{2+} était réalisé. En utilisant un réacteur à compartiments séparés, dans le cas de l'oxydation de pyrite par les archaebactéries thermophiles de l'espèce *Acidianus brierleyi*, une oxydation efficace n'a été obtenue que lors du contact physique Bactérie-Minéral (Larsson *et al.*, 1993).

III.- DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

Le but de cette partie de notre travail a été de déterminer la contribution du contact Bactérie-Minéral au processus d'oxydation de la pyrite par *T. ferrooxidans*. Pour cela, un réacteur original à deux compartiments séparés par une membrane microporeuse a été utilisé : la membrane permet de séparer physiquement les bactéries du minéral, sans empêcher les échanges ioniques et l'action des produits solubles. Ainsi, l'action directe des bactéries fixées peut être déterminée dans une expérience de contact total entre les cellules et le minéral. Les réactions d'oxydation indirectes par le fer ferrique peuvent être étudiées en empêchant le contact.

Deux expériences ont été réalisées :

- la première, pour distinguer l'influence du contact total bactérie-minéral pour une densité de pulpe de 1 et 2 %, de celle de l'absence de contact avec une densité de pulpe de 2 %,

- la seconde pour distinguer l'effet du semi-contact, désignant des conditions où la moitié du minéral est en contact avec les microorganismes, de l'effet du contact total et de l'absence de contact pour une densité de pulpe de 2 %.

L'activité des bactéries a été suivie par leur croissance, l'oxydation du fer et les modifications de l'état de surface du minéral.

La première partie des résultats concernera l'incidence du contact Bactérie-Minéral sur la cinétique d'oxydation de la pyrite. La seconde partie traitera de l'évolution des phases superficielles de la pyrite sous l'effet de l'oxydation chimique et des bactéries fixées.

IV.- MATÉRIEL ET MÉTHODES

A.- RÉACTEUR À DEUX COMPARTIMENTS

Ce réacteur dérivé des dispositifs de culture en dialyse (Berthelin, 1976) est constitué de deux compartiments (d'un volume de 500 ml chacun), séparés par une membrane semi-perméable en Durapore ou difluorure de polyvinylidène (Millipore) de porosité $0.22 \mu\text{m}$ (Figure V.1.). Cette membrane permet d'éviter le contact entre les microorganismes et les particules minérales, sans empêcher la diffusion des composés chimiques entre les deux compartiments. Ce type de membrane a été choisi pour sa résistance aux conditions de biolixiviation et à l'autoclavage à 110°C . Le réacteur est agité à 100 tr/min sur un plateau. La nécessité de maintenir des conditions de culture stériles explique l'utilisation de ce système d'agitation. La vitesse est plus faible que celle obtenue au moyen de la turbine à double flux des réacteurs classiques (750 tr/min). Les parois du réacteur étant rondes, ce système d'agitation permet cependant d'obtenir un bon équilibre chimique entre les deux compartiments ainsi qu'une bonne aération de la culture bactérienne. Ce réacteur a été construit par la société Verrex S.A./Marseille d'après un schéma proposé par Spor (1994).

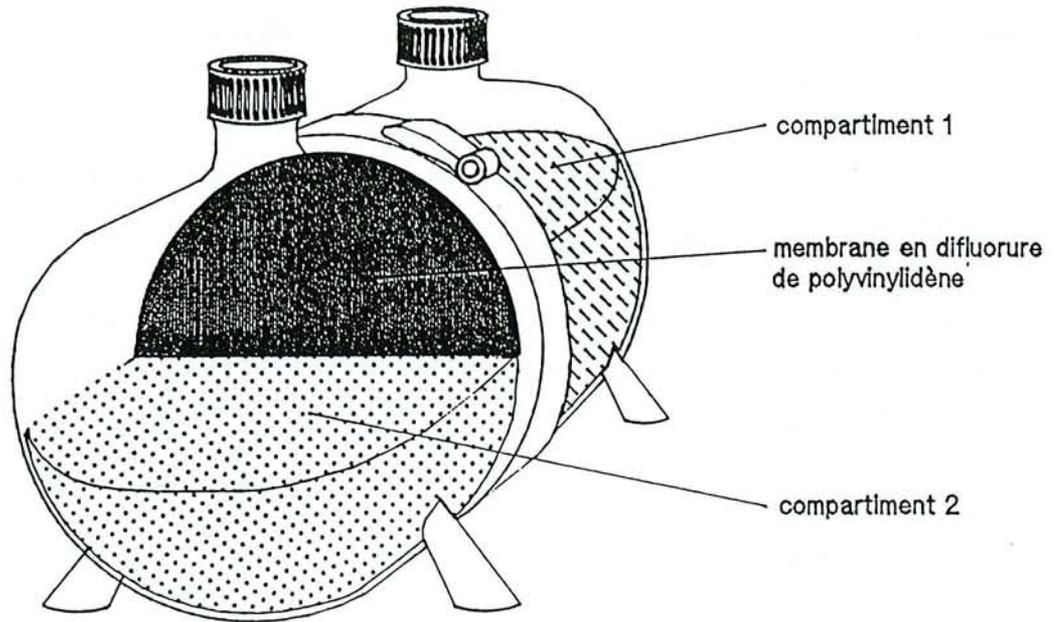
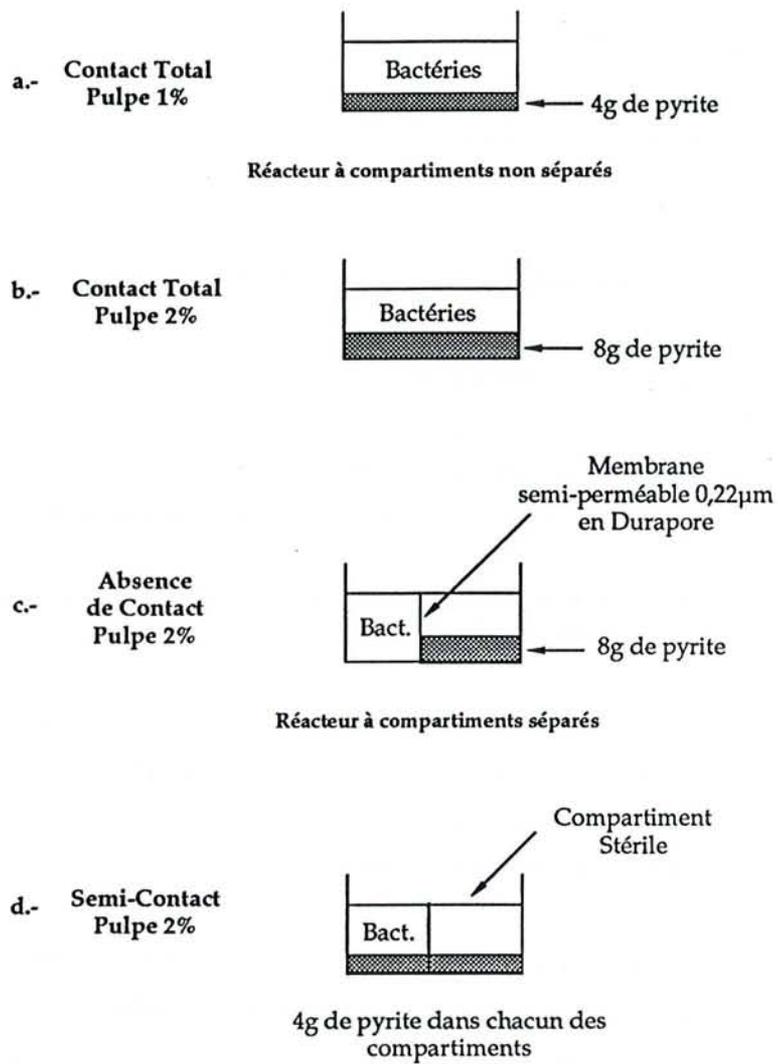


Figure V.1.- Réacteur à deux compartiments (d'après Spor, 1994).

B.- CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les expériences de biooxydation ont été effectuées dans les conditions de contact bactérie-minéral suivantes, présentées par la figure V.2 en assurant un contact total pour des densités de pulpe de 1 et 2 % et l'absence de contact ou semi-contact, pour une densité de pulpe de 2%. Les expériences ont été réalisées sur des particules de pyrite K4 (fraction 10-32 μm) autoclavées, en plaçant 400 ml de milieu M2 dans le réacteur, et en apportant un inoculum de façon à obtenir une concentration bactérienne initiale de $5 \cdot 10^7$ bactéries/ml, avant contact. Les bactéries de l'inoculum proviennent de cultures sur sulfate ferreux, lavées après leur récolte en phase exponentielle de croissance. Les températures d'incubation étaient de 30°C. L'aération du milieu était assurée par l'agitation à 100 tr/min du plateau supportant ce réacteur.



Volume total de pulpe = 400 ml dans l'ensemble du réacteur

Figure V.2.- Conditions expérimentales mises en œuvre pour l'étude des contributions du contact Bactérie-Minéral, au processus de biooxydation.

C.- MÉTHODES D'ANALYSES

1.- Suivi des populations bactériennes

La concentration des bactéries en suspension a été estimée par comptage direct au microscope optique, en cellule de Thoma.

2.- Analyses chimiques de la solution de biolixiviation

a.- Dosage du fer solubilisé

Les concentrations de fer solubilisé au cours du processus d'oxydation ont été déterminées par analyse en spectrométrie d'émission ICP. La précision du dosage est de 0,5 %.

b.- Estimation du Fe^{2+} par la méthode colorimétrique à l'orthophénanthroline

Le Fe^{2+} donne, avec la phénanthroline-1,10 un ion complexe $Fe(o-phen)_3^{2+}$ qui absorbe entre 380 et 580 nm, et dont la coloration rouge-orange est stable plus de 6 mois et indépendante du pH entre les valeurs 2 et 9. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de Fe^{2+} jusqu'à 100 μg de Fe^{2+} dans l'échantillon. Le seuil de détection du dosage est de 10 μg de Fe^{2+} .

Dans le milieu de biooxydation, du Fe^{3+} peut être présent en même temps que le Fe^{2+} . Dans ce cas, le Fe^{3+} atténue légèrement l'intensité de la coloration et induit une sous-estimation de la concentration en Fe^{2+} . Nos mesures ont été réalisées sans tenir compte de la présence du Fe^{3+} : la concentration en Fe^{2+} a été calculée à partir d'une courbe étalon établie sans Fe^{3+} . De ce fait, chacune des valeurs ne représente qu'une estimation de la concentration en Fe^{2+} présente dans l'échantillon.

Protocole :

Le Fe^{2+} est dosé dans les solutions de lixiviation en mélangeant dans une fiole de 25 ml :

- 100 μl à 1 ml de solution de lixiviation filtrée à 0,2 μm (10 à 100 μg de Fe^{2+}),
- 1 ml de solution de chlorhydrate de phénanthroline-1,10 à 0,5 % dans l'eau osmosée.

Le volume est complété à 25 ml par l'eau osmosée.

La solution de lixiviation est filtrée pour éliminer les bactéries qui pourraient fausser la densité optique du milieu. L'intensité de la coloration est mesurée après 10 minutes à 490 nm. La quantité de Fe^{2+} présente dans l'échantillon est déterminée à partir d'une courbe étalon (Figure V.3.)

établie au moyen d'une solution étalon à 100 mg/l de Fe^{2+} , préparée au moyen de sel de Mohr ($\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, 6 \text{H}_2\text{O}$).

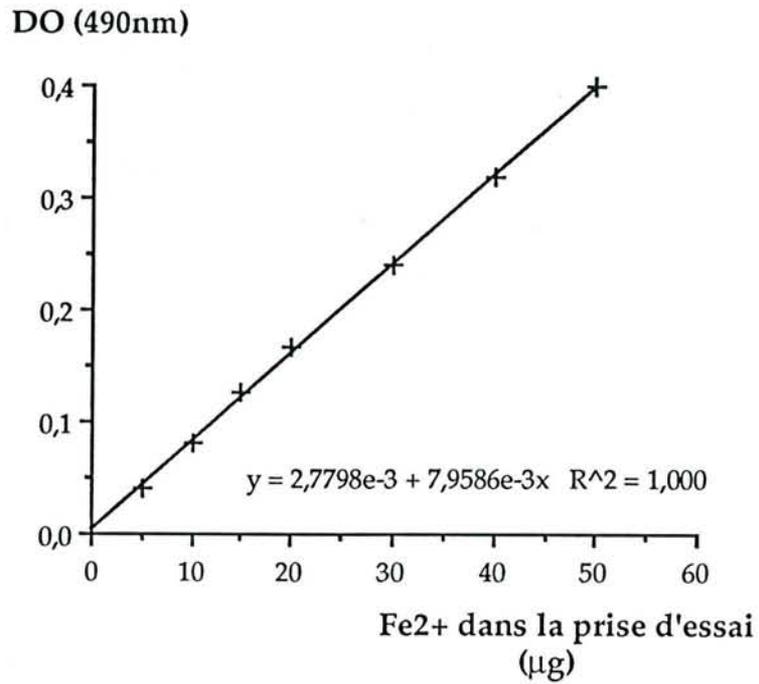


Figure V.3.- Courbe étalon pour le dosage du Fe^{2+} par la méthode à l'orthophénanthroline dans les liqueurs de biooxydation.

3.- Analyses des constituants minéraux présents sur la surface des pyrites

Elles sont effectuées par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (SIRTF) couplée à la réflexion diffuse décrite précédemment.

V.-RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

A.- INCIDENCE DU CONTACT BACTÉRIE-MINÉRAL SUR LA CINÉTIQUE D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR THIOBACILLUS FERROOXIDANS

1.- Comparaison de l'oxydation de la pyrite avec ou sans contact entre la bactérie et le minéral

La figure V.4. présente les teneurs du fer en solution résultant de l'oxydation du minéral en l'absence de contact pour une densité de pulpe de 2 %, et dans des conditions de contact total bactérie-minéral, pour les densités de pulpe égale à 1 et 2 %.

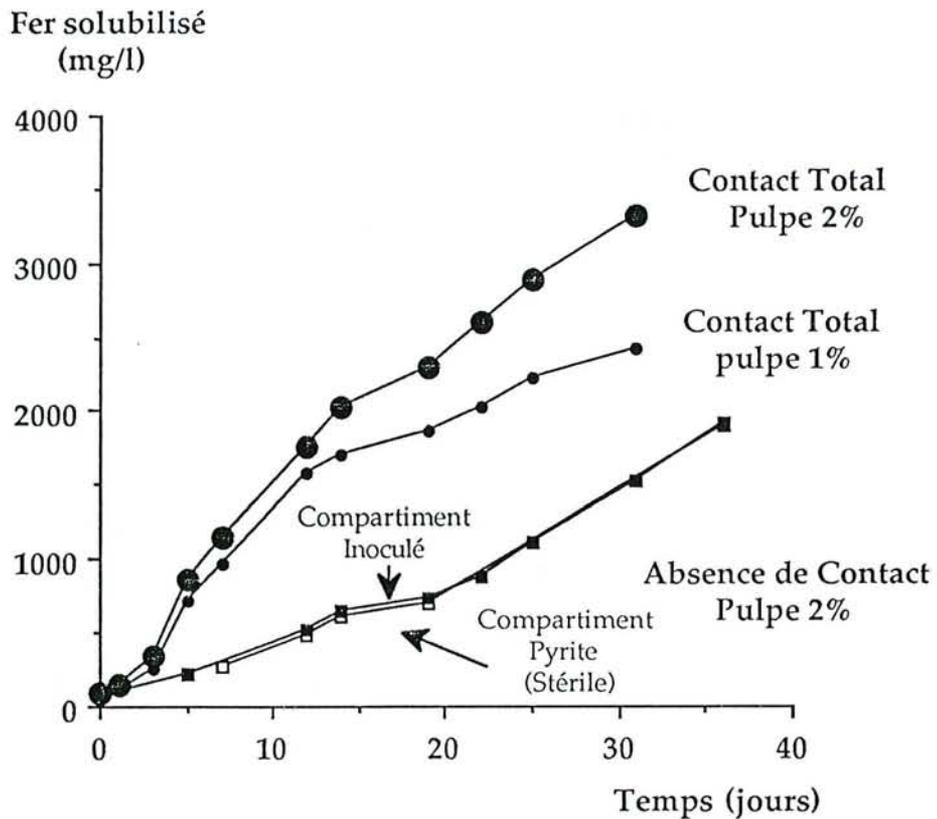


Figure V.4.- Solubilisation du fer au cours de l'oxydation de la pyrite par *T. ferrooxidans* avec ou sans contact entre la bactérie et le minéral.

a.- En l'absence de contact

◆ Cinétiques de solubilisation du fer dans le compartiment minéral stérile (sans bactérie) et le compartiment bactérien (bactérie seule)

Elles mettent en évidence une oxydation du minéral non négligeable, qui semble se dérouler en deux étapes (Figure V.4) :

- une première étape de solubilisation lente jusqu'à 19 jours, au cours de laquelle la vitesse de dissolution peut être estimée à 29 mg/l.j de fer solubilisé de T_0 à 5 jours et à 46 mg/l.j entre 5 et 14 jours

(Tableau V.1.). Une période de transition est observée entre 14 et 19 jours, au cours de laquelle la dissolution est très lente. Cette première étape peut être considérée comme la phase d'amorce de l'oxydation chimique de la pyrite.

- une seconde étape plus rapide, à partir de 19 jours, au cours de laquelle la vitesse d'oxydation est constante et maximale (73 mg/l/j de fer solubilisé), et qui est considérée comme la phase optimale d'oxydation chimique de la pyrite en l'absence de contact.

A chaque instant, les teneurs en fer total sont identiques dans les deux compartiments, montrant que l'agitation du réacteur est efficace et assure une bonne homogénéisation de la solution.

Tableau V.1.- Vitesse de solubilisation du fer au cours de l'oxydation de la pyrite dans les expériences des figures V.4. et V.5.

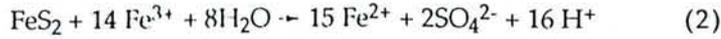
	Vitesse de solubilisation du fer (mg Fe/l.jour)		
	Contact total Bactérie-minéral (densité de pulpe 2 %)	Contact total Bactérie-Minéral (densité de pulpe 1 %)	Sans contact Bactérie-Minéral (densité de pulpe 2 %)
Phase de démarrage de l'oxydation	1er jour : 50 1-3 jours : 101	1er jour : 55 1-3 jours : 73	T ₀ -5 jours : 29 5-14 jours : 46
Phase d'oxydation optimale	3-5 jours : 262 5-14 jours : 128	3-5 jours : 231 5-12 jours : 123	à partir de 19 jours : 73
Phase de ralentis- sement de l'oxydation	14-31 jours : 78	14-31 jours : 44	/

◆ Evolution du Fe²⁺ et du fer total

Pour expliquer l'oxydation du minéral en l'absence de contact bactérie-minéral, la concentration du Fe²⁺ a été estimée dans les deux compartiments (Figure V.5.).

* *Mesure initiale* (à T₀) : Elle montre l'absence de Fe²⁺ dans les deux compartiments. Par contre, le dosage du fer total met en évidence, dans les deux compartiments, du fer à une concentration identique, qui indique la présence de Fe³⁺ et suggère la possibilité d'une oxydation chimique.

* *Evolution de T₀ à 1 jour* : Dans le compartiment "minéral", la concentration en Fe²⁺ augmente à 50 mg/l, alors que celle du fer total n'évolue pas (80 mg/l), montrant que le Fe²⁺ formé résulte de la réduction du Fe³⁺ au contact de la pyrite, ou encore que la pyrite est oxydée par le Fe³⁺ selon le mécanisme d'oxydation indirecte :



et/ou

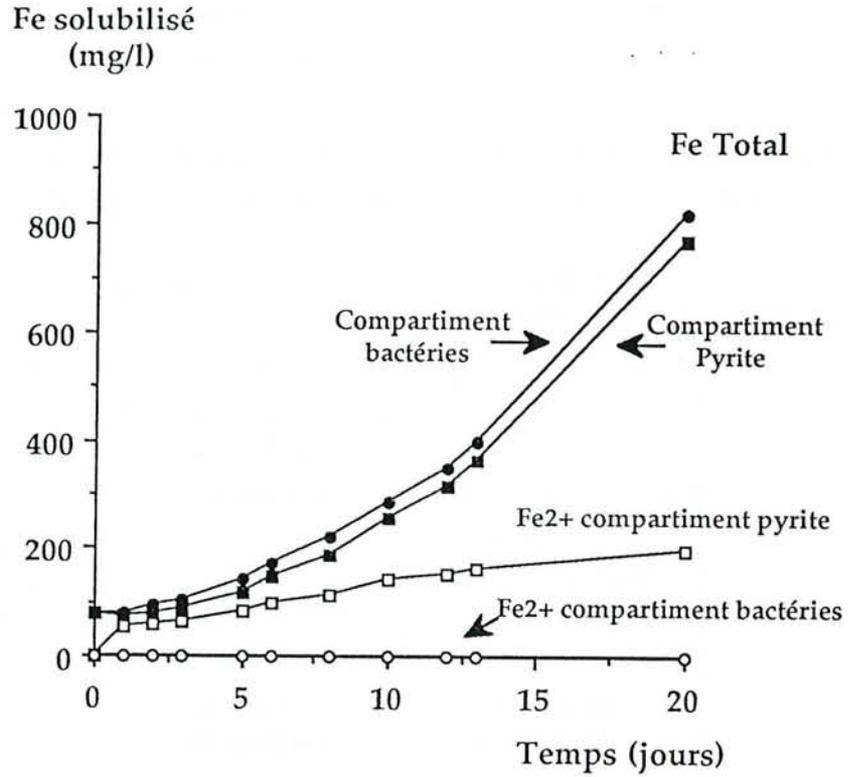
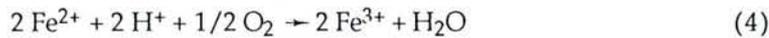


Figure V.5.- Solubilisation et différentes formes du fer au cours de l'oxydation de la pyrite par *T. ferrooxidans* sans contact entre la bactérie et le minéral.

Dans le compartiment bactérien, la concentration en Fe^{2+} devrait évoluer de la même façon que dans le compartiment minéral, les deux étant en équilibre. L'absence de Fe^{2+} et la présence exclusive de Fe^{3+} montrent que le Fe^{2+} est oxydé, selon l'équation (3), par les bactéries dès qu'il pénètre dans ce compartiment :



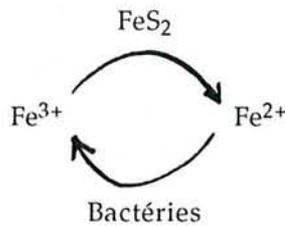
Le Fe^{3+} peut alors oxyder la pyrite dans le compartiment où le minéral est seul et libérer ainsi du fer Fe^{2+} qui sera oxydé par *T. ferrooxidans* dans le compartiment bactérien.

* Evolution après 1 jour : Dans le compartiment bactérien, la concentration en Fe^{2+} reste nulle tout au long de l'oxydation montrant que le Fe^{2+} est oxydé par les bactéries. La concentration en Fe total augmente, ce qui témoigne de l'oxydation de la pyrite.

Dans le compartiment minéral, la concentration en Fe^{2+} augmente légèrement et celle du Fe total (Fe^{3+}) plus rapidement jusqu'à 10 jours, mais le Fe^{2+} reste la forme majoritaire du fer en solution dans ce compartiment. Après 10 jours, sa concentration reste pratiquement stable, alors que celle du Fe^{3+} augmente. Le Fe^{3+} devient alors la forme majoritaire du fer dans ce compartiment. La concentration en Fe total augmente comme dans le compartiment bactérien permettant de vérifier la solubilisation du minéral et l'équilibre des solutions entre les deux compartiments.

La présence de Fe^{2+} dans le compartiment "minéral" et l'augmentation du Fe total au cours du temps montrent que la pyrite est oxydée. Les bactéries et le minéral étant séparés, le seul agent capable d'oxyder la pyrite est le Fe^{3+} produit par les bactéries. L'oxydation de la surface du minéral est donc chimique ou indirecte et les réactions mises en jeu sont les mêmes que précédemment (réactions 2, 3 et 4).

Le cycle d'oxydation peut donc être schématisé de la façon suivante :



où la vitesse d'oxydation de la pyrite par le Fe^{3+} s'écrit : $v = k[\text{Fe}^{3+}]^a[\text{FeS}_2]^b$

k étant la constante de vitesse, a l'ordre de la réaction par rapport au Fe^{3+} et b l'ordre de la réaction par rapport à FeS_2 .

La solubilisation du minéral dépend de la concentration en FeS_2 et de celle du Fe^{3+} . La concentration en pyrite est constante ; le seul facteur pouvant limiter l'oxydation est donc le Fe^{3+} . Au cours des 20 premiers jours (Figure V.4), l'oxydation est lente et donc probablement limitée par la concentration en Fe^{3+} ; elle augmente progressivement avec elle. Après 20 jours, la vitesse d'oxydation est constante et optimale, ce qui suggère que la concentration en Fe^{3+} est optimale ou saturante. Cette vitesse optimale est atteinte pour une concentration en fer total égale à 700 mg/l ; celle du Fe^{2+} est environ de 200 mg/l et celle du Fe^{3+} d'environ 500 mg/l.

b.- En cas de contact total bactérie-minéral

◆ Cinétique de solubilisation du fer pour les densités de pulpe égales à 1 et 2 %

Les courbes de solubilisation de la Figure V.4. mettent en évidence :

* une phase de démarrage, entre T_0 et 3 jours, au cours de laquelle la vitesse d'oxydation est estimée à 50 mg/l/j de fer solubilisé au cours des premières 24 heures, puis de 70 à 100 mg/l/j entre 1 et 3 jours (Tableau V.1.).

* une phase d'oxydation optimale de 3 à 12-14 jours, au cours de laquelle la vitesse de solubilisation est d'abord de l'ordre de 230 à 260 mg Fe/l.j entre 3 et 5 jours, puis chute à 120-130 mg Fe/l.j pour la période 5-14 jours

* une phase de ralentissement pour laquelle la vitesse d'oxydation est de 78 mg Fe/l.j pour la densité de pulpe de 2 % et de 44 mg Fe/l.j pour la densité de pulpe de 1 %.

Les vitesses de solubilisation du fer au cours de la phase de démarrage et de la phase optimale de l'oxydation sont pratiquement identiques pour les deux densités de pulpe. Par contre, pour la phase de ralentissement, la vitesse d'oxydation est pratiquement deux fois plus faible pour la densité de pulpe 1 % que celle observée avec la densité de pulpe 2 %. La vitesse d'oxydation semble donc être indépendante de la concentration de pulpe minérale au cours de la phase de démarrage et de la phase optimale d'oxydation, alors qu'ensuite, elle semble être proportionnelle à la concentration de pulpe minérale.

La comparaison, avec contact et sans contact, des solubilisations du fer et des vitesses d'oxydation permet de constater qu'avec le contact direct, la phase de démarrage est plus courte et la vitesse deux fois plus importante que sans contact (Figure V.4 et Tableau V.1). Au cours de la phase optimale d'oxydation, la vitesse est également deux à trois fois plus importante que sans contact. Le contact bactérie-minéral permet donc d'augmenter les vitesses d'oxydation au cours de l'initiation (phase de démarrage) et de la phase optimale de biolixiviation. Il permet aussi de raccourcir la phase de latence et la phase de démarrage. Les bactéries fixées semblent jouer un rôle fondamental au cours de ces phases, ce qui permet de les considérer comme des catalyseurs très efficaces de l'oxydation.

En ce qui concerne la phase de ralentissement, on peut constater, pour la densité de pulpe 2 %, que la vitesse, avec contact, est pratiquement identique à celle observée pour la phase optimale d'oxydation sans contact (Figure V.4 et Tableau V.1). Cette similarité suggère que pendant cette étape, l'oxydation avec contact, serait surtout de nature chimique et correspondrait à la réaction de la pyrite avec le Fe^{3+} . La vitesse d'oxydation est également proportionnelle à la densité de pulpe, ce qui suggère qu'elle est limitée par la concentration du minéral. L'oxydant, qui serait alors principalement le Fe^{3+} , est en concentration optimale ou saturante (> 500 mg/l) et ne peut donc pas limiter le processus. Ces hypothèses doivent être vérifiées en réalisant les mêmes expériences (contact bactérie-minéral et absence de contact) pour d'autres concentrations de pulpe, inférieures à 2 %.

♦ Evolution des bactéries libres en suspension avec contact et sans contact, en relation avec les espèces en solution

* En l'absence de contact, une augmentation faible de la concentration bactérienne se produit au cours de la phase d'amorce de l'oxydation, qui montre que la multiplication bactérienne est faible (Figure V.6). Puis la concentration bactérienne n'évolue plus, suggérant que les bactéries sont en phase stationnaire.

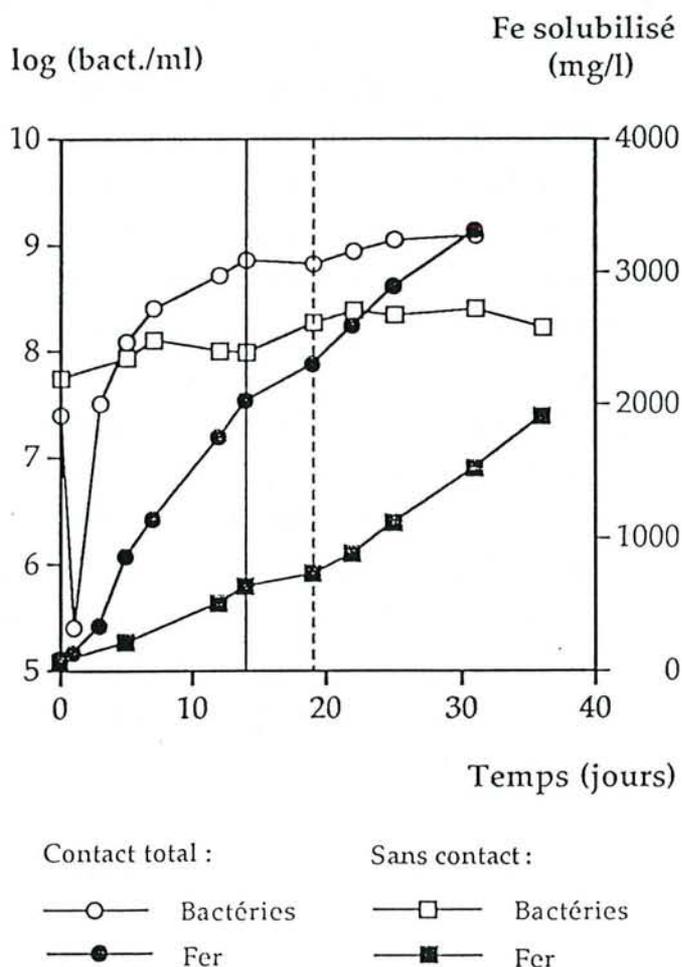


Figure V.6.- Evolution de la population bactérienne et du fer solubilisé au cours de l'oxydation de la pyrite par *T. ferrooxidans*, avec ou sans contact entre la bactérie et le minéral (densité de pulpe 2%).

* En cas de contact direct :

• Au cours de la phase de démarrage d'oxydation et dès l'inoculation, la concentration bactérienne diminue considérablement (de 2 log) le premier jour, indiquant une adhésion de 99 % des bactéries à la surface du minéral. Cette adhésion correspond à 10^6 bactéries/mg. Une partie de ces bactéries est sans doute fixée fortement au minéral, comme l'ont montré les résultats des études de désorption bactérienne par un traitement mécanique et chimique (action mécanique du vortex et chimique du Tween 80).

Ensuite entre 1 et 3 jours, la concentration bactérienne augmente et est multipliée par 100. Cette augmentation rapide des bactéries en suspension pourrait être due à la *désorption des bactéries fixées de la surface du minérale*. Mais, comme l'ont montré les résultats des études de désorption bactérienne par le Tween 80 (sur la fraction 32-53 μm), la quantité de bactéries fixées reste constante au cours du processus d'oxydation. Le seul détachement des bactéries ne peut expliquer cette augmentation. *La multiplication des bactéries en suspension* semble aussi limitée, comme le montre l'expérience réalisée sans contact (0,36 log pour 7 jours). On peut alors suspecter une *multiplication bactérienne sur la surface de minéral*. Halfmeier *et al.* (1993a et b) et Nikolov et Karamanev (1992) ont mis en évidence la multiplication de *T. ferrooxidans* à la surface de supports inertes (verre fritté). Yelloji Rao *et al.* (1992), en dosant les protéines bactériennes en solution et à la surface de galène inoculée par *T. ferrooxidans*, ont observé une adhésion suivie d'une multiplication bactérienne à la surface du minéral, sans multiplication en solution. La pyrite pourrait donc, comme la galène, être utilisée directement par *T. ferrooxidans* qui se multiplierait sur la surface du minéral, libérant des cellules filles ou des bactéries initialement fixées, en solution.

Au cours de cette phase (Figure V.7) on constate une augmentation de la concentration en Fe^{2+} entre T_0 et 1 jour, suivie d'une décroissance entre 1 et 3 jours. L'augmentation initiale de concentration en Fe^{2+} montre, comme en l'absence de contact, la réduction du Fe^{3+} par le minéral. La diminution entre 1 et 3 jours indique la réoxydation du Fe^{2+} par les bactéries et met donc en évidence leur activité oxydante. L'augmentation de la concentration des bactéries libres en suspension suggère que la consommation du Fe^{2+} est essentiellement réalisée, entre 1 et 3 jours, par les bactéries non adhérentes, comme l'a souligné Monroy (1993), permettant ainsi la production de Fe^{3+} de façon à accélérer indirectement le processus d'oxydation.

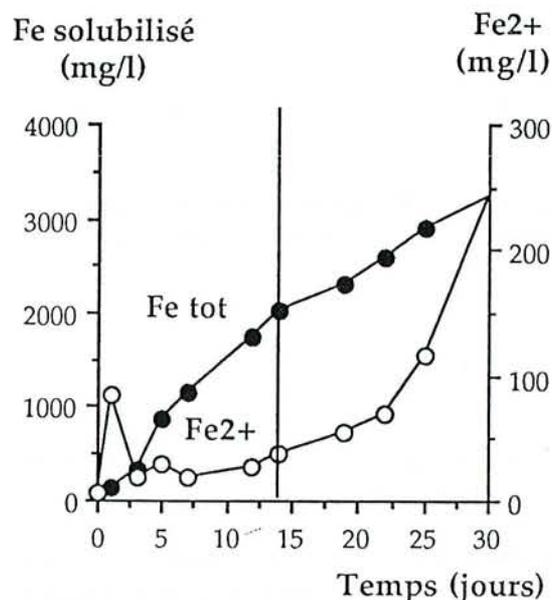


Figure V.7.- Solubilisation du fer total et du fer ferreux au cours de l'oxydation de la pyrite par *T. ferrooxidans* en avec contact entre la bactérie et le minéral.

- *Au cours de la phase optimale*, la concentration des bactéries libres en suspension augmente. Elle est plus importante que sans contact, ce qui souligne l'aspect bénéfique du contact direct du point de vue de la nutrition des bactéries.

Le suivi du Fe^{2+} montre que sa concentration reste constante pendant cette phase, aux environs de 25 mg/l. Sa vitesse de production chimique et bactérienne à la surface du minéral est égale à sa vitesse de consommation par les bactéries. L'activité bactérienne serait alors optimale.

- *Au cours de la phase de ralentissement*, la concentration des bactéries libres en suspension n'évolue plus. Les cellules sont donc en phase stationnaire. La concentration du Fe^{2+} augmente en solution, montrant soit que sa vitesse de solubilisation, par oxydation chimique et bactérienne augmente, soit que sa vitesse d'oxydation par les bactéries diminue, les deux phénomènes pouvant intervenir et suggérant aussi une diminution de la contribution des bactéries au processus d'oxydation. Le processus d'oxydation est alors essentiellement chimique.

2.- Comparaison de l'oxydation du minéral en cas de "semi-contact", de contact total et absence de contact

L'oxydation bactérienne de la pyrite présente des différences dans des conditions de contact total et de semi-contact. Dès le début des expériences (Figure V.8) et jusqu'à 10 jours, la vitesse de dissolution est deux fois plus importante avec contact total qu'en semi-contact. Entre T_0 et 1 jour, elle est de 50 mg/l.j de fer solubilisé dans le premier cas et de 26 mg/l.j dans le second. Ensuite, entre 1 et 10 jours, elle est de 212 mg/l.j et 102 mg/l.j respectivement (Tableau V.2). A 10 jours, la solubilisation du fer atteint 2 030 mg/l dans le premier cas et 1 066 mg/l dans le second. Ces résultats montrent qu'au cours de cette période (phase de démarrage et début de la phase optimale d'oxydation), la vitesse est proportionnelle à la quantité de pyrite en contact avec les bactéries. Ceci confirme donc le rôle catalytique des bactéries fixées.

Comme la concentration bactérienne initiale est la même dans les deux cas (5.10^7 bactéries/ml), la quantité de bactéries disponibles pour la totalité de la surface est deux fois plus importante dans des conditions de semi-contact qu'en condition de contact total. Mais comme la vitesse de solubilisation du minéral est deux fois plus faible dans des conditions de semi-contact et proportionnelle à la quantité de pyrite, on peut considérer que le nombre de "sites actifs" en contact avec les bactéries est aussi deux fois plus faible. Les "sites actifs" ou "sites biologiques" sont considérés comme les sites qui vont être engagés dans le processus d'oxydation à la suite du contact bactérie-minéral. Ces résultats suggèrent que dans ces deux traitements, la quantité de bactéries apportée serait suffisante pour saturer les sites actifs et que la vitesse maximale d'oxydation serait atteinte.

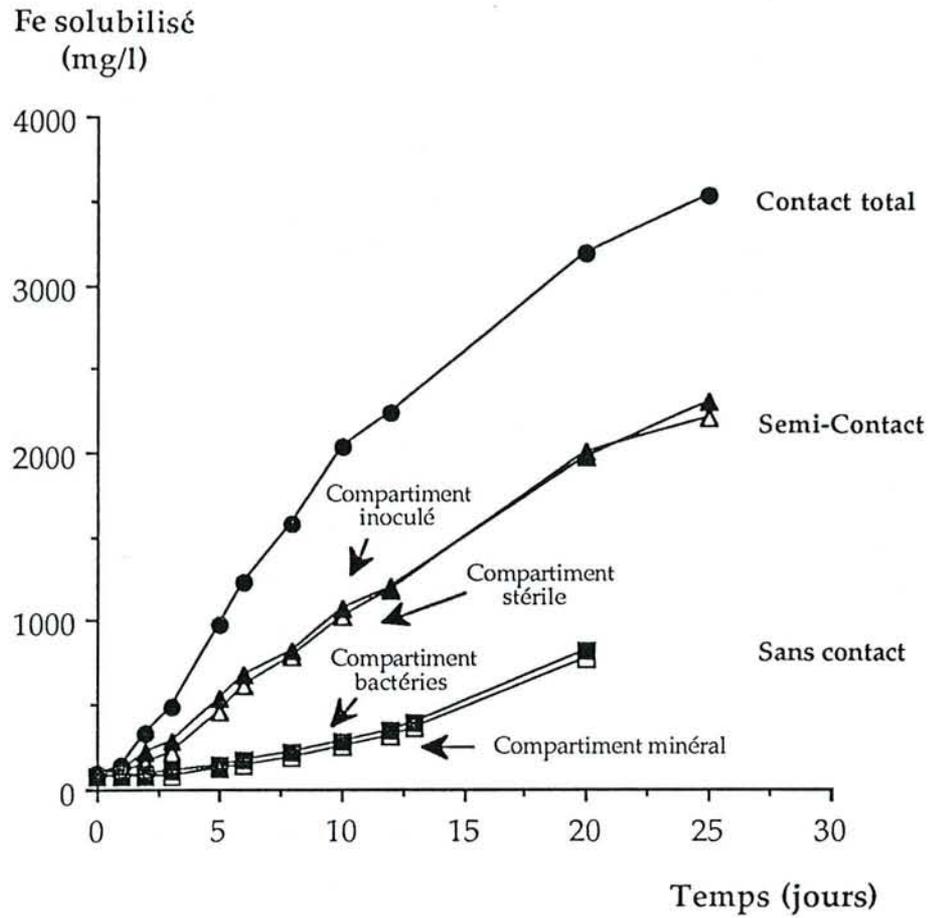


Figure V.8.- Solubilisation du fer au cours de l'oxydation de la pyrite K4 (10-32 μm) par *T. ferrooxidans* pour différentes conditions d'interaction bactérie-minéral. (Les expériences ont été réalisées pour une densité de pulpe de 2 %).

Tableau V.2.- Vitesse de solubilisation du fer au cours de l'oxydation de la pyrite dans les expériences de la figure V.8.

	Vitesse de solubilisation du fer (mg Fe.jour)		
	Contact total Bactérie-minéral	Semi-contact	Sans contact Bactérie-Minéral
Phase de démarrage de l'oxydation	1er jour : 51	1er jour : 26	T ₀ -3 jours : 11 3-12 jours : 28 12-20 jours : 59
Phase d'oxydation optimale	1-10 jours : 212 10-20 jours : 116	1-12 jours : 102 12-20 jours : 96	/

Dans d'autres expériences de biooxydation rapportées plus loin (Chapitre IX), la mesure de l'adhésion bactérienne a permis d'observer, pour des inoculums de 10^7 à 10^8 bactéries/ml, une corrélation linéaire entre le log de l'adhésion (log bactéries fixées/mg) et celui de la concentration initiale de l'inoculum (log bactéries/ml), ce qui montre qu'à ces concentrations, la pyrite n'est pas "physico-chimiquement" saturée en bactéries.

En d'autres termes, l'ensemble de ces résultats suggère que la vitesse maximale d'oxydation est atteinte, que la surface du minéral est "biologiquement" mais pas "physico-chimiquement" saturée. Konishi *et al* (1990) et Asai *et al.* (1992) ont également constaté qu'une oxydation optimale était atteinte pour une concentration bactérienne initiale non saturante pour la surface minérale. On peut donc penser que parmi l'ensemble des sites physico-chimiques impliqués dans l'adhésion bactérienne, on pourrait considérer des sites biologiques pour lesquels les bactéries auraient l'affinité la plus importante et qui seraient les premiers à être occupés. Ces sites pourraient correspondre à des sites chimiques particuliers, la surface de la pyrite présentant différentes espèces minérales (S^0 , oxydes de fer, sulfates...) (Mustin, 1992 ; Chapitre IV et Troisième partie de ce travail). Ils pourraient aussi correspondre à des sites minéralogiques particuliers provenant de l'hétérogénéité minéralogique des grains de pyrite, suggérée par les observations de la pyrite par MEB (Chapitre IV) et l'analyse des figures de corrosion minérale par Mustin (1992). On pourrait encore imaginer que lorsque l'oxydation commence en un site, la cellule délimite une zone d'exclusion en empêchant toute autre amorce d'oxydation à l'intérieur de cette zone, par nécessité d'un "espace d'action".

Les isothermes d'adsorption établies par Ohmura *et al.* (1993) suggèrent que l'affinité des cellules pour la pyrite est plus importante aux faibles concentrations d'inoculum. Ces résultats signifient peut-être également que différents sites sont impliqués dans l'adhésion, lorsque les concentrations d'inoculums sont faibles et importantes.

B.- EVOLUTION DIFFÉRENTIELLE DES PHASES SUPERFICIELLES DE LA PYRITE SOUS L'EFFET DE L'OXYDATION CHIMIQUE ET DES BACTÉRIES EN CONTACT

L'utilisation de la spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier (SIRTF) en réflexion diffuse a permis de suivre, au cours des lixiviations, l'évolution des constituants minéraux plus ou moins oxydés se trouvant en surface des pyrites.

Les échantillons de pyrite observés proviennent de l'expérience en l'absence de contact et de celle dite de semi-contact correspondant à la figure V.8, où la moitié de la pyrite placée dans le réacteur est en contact avec les bactéries dans l'un des compartiments et l'autre moitié est soumise exclusivement à des réactions d'oxydation chimique (Figure V.2.d), en fait aux réactions dites d'oxydation indirecte. Cette situation permet de suivre en parallèle l'évolution de l'état de surface de la pyrite présente dans chacun des compartiments, en distinguant un éventuel effet direct du contact avec les bactéries de celui d'un effet strictement chimique.

1.- Spectre de la pyrite initiale

Il montre l'existence de trois massifs, déjà caractérisés par de Donato *et al.*(1991) (Figure V.9. : temps T_0) :

- le massif H, centré sur $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$, attribuable à la vibration de déformation de l'eau structurale qui traduit l'état hydraté des sulfates ferreux-ferriques,
- le massif M1 ($1\ 300\text{-}950\ \text{cm}^{-1}$) correspondant aux vibrations d'élongation du groupement SO_4^{2-} engagé dans des structures de type sulfate ferreux (centrés sur $1\ 055\text{-}1\ 060\ \text{cm}^{-1}$) et de type sulfate ferrique (centrés sur $1\ 198\ \text{cm}^{-1}$). L'intensité de l'absorption est plus importante à $1\ 198\ \text{cm}^{-1}$ qu'à $1\ 060\ \text{cm}^{-1}$, ce qui montre qu'initialement le sulfate ferrique est majoritaire par rapport aux sulfates ferreux. Un épaulement supplémentaire ($1\ 120\ \text{cm}^{-1}$) absent pour la fraction granulométrique $32\text{-}53\ \mu\text{m}$, apparaît dans le cas présent pour la fraction $10\text{-}32\ \mu\text{m}$.
- le massif M2 ($850\text{-}600\ \text{cm}^{-1}$) correspondant à la combinaison complexe de vibrations d'espèces du type oxydes et oxyhydroxydes de fer et de l'espèce FeS_2 .

Ces massifs M1 et M2 témoignent de la présence d'espèces oxydées sur la surface du minéral.

Absorbance (AU)

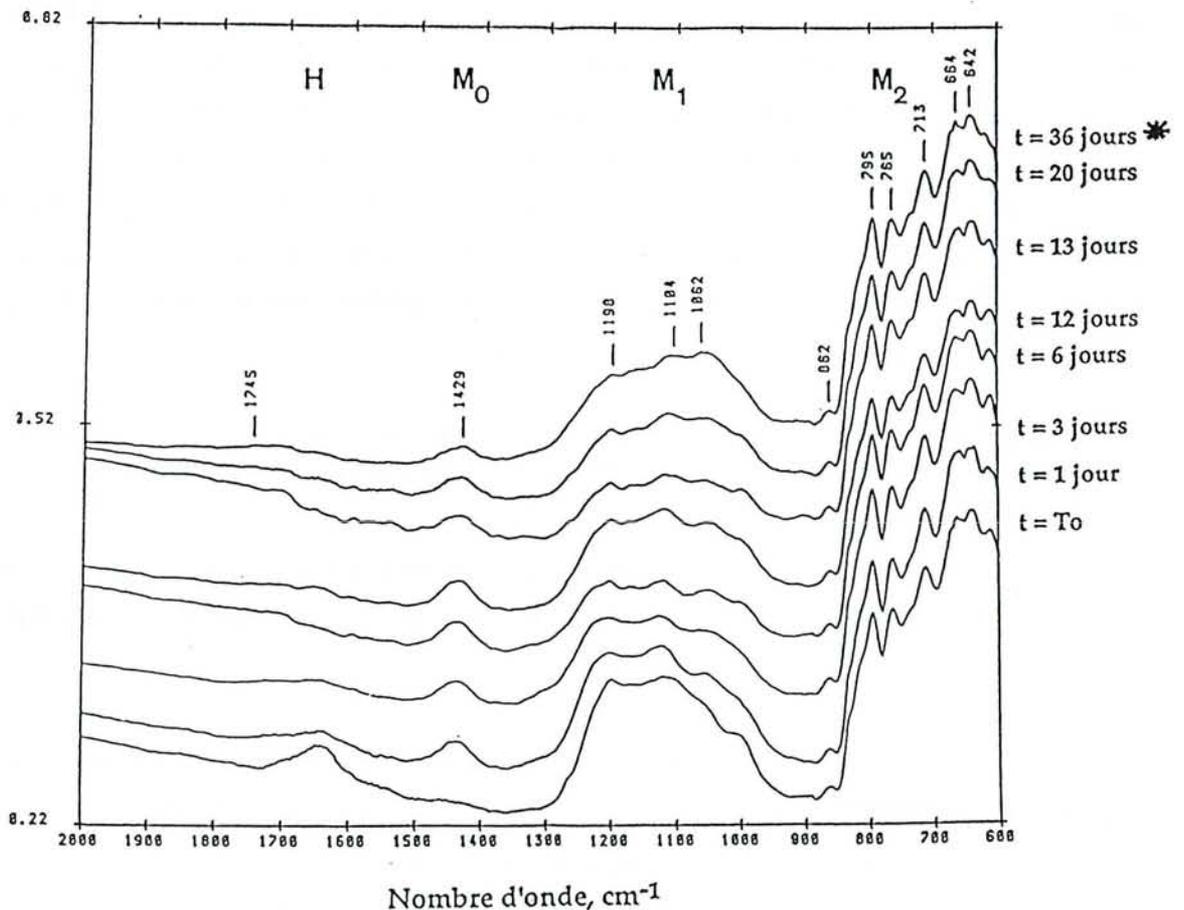


Figure V.9.- Evolution des spectres infra-rouges en réflexion diffuse au cours de l'oxydation indirecte (chimique) de la pyrite K4 (10-32 μm) sans contact avec les bactéries. (* spectres obtenus dans les conditions de la figure V.4.).

Un massif supplémentaire apparaît habituellement : le massif Mo centré sur $1\,435\text{ cm}^{-1}$, correspondant aux vibrations d'élongation du groupement CO_3^{2-} d'une phase carbonatée apparue au cours du séchage du minéral. Ici il est absent pour le spectre de la pyrite initiale, mais il apparaît sur les spectres de la pyrite en l'absence de contact avec les bactéries (Figure V.9).

2.- Spectres obtenus dans le cas d'une oxydation indirecte par action du seul sulfate ferrique

Dans ce cas des modifications se produisent essentiellement sur le massif M1 (Figure V.9) :

- au cours des 3 premiers jours, l'intensité des absorptions aux hautes fréquences (1198 cm^{-1} à 1104 cm^{-1}) et l'amplitude du massif diminuent. Ces phénomènes traduisent respectivement la réduction du sulfate ferrique (de Donato *et al.*, 1991) et la diminution de la quantité de sulfates sur la surface du minéral,

- entre 3 et 20 jours, le massif M1 est pratiquement plat, ce qui indique que la quantité de sulfates est faible.

- à 36 jours, lorsque la vitesse d'oxydation chimique est maximale, le sulfate ferreux est légèrement prédominant par rapport au sulfate ferrique.

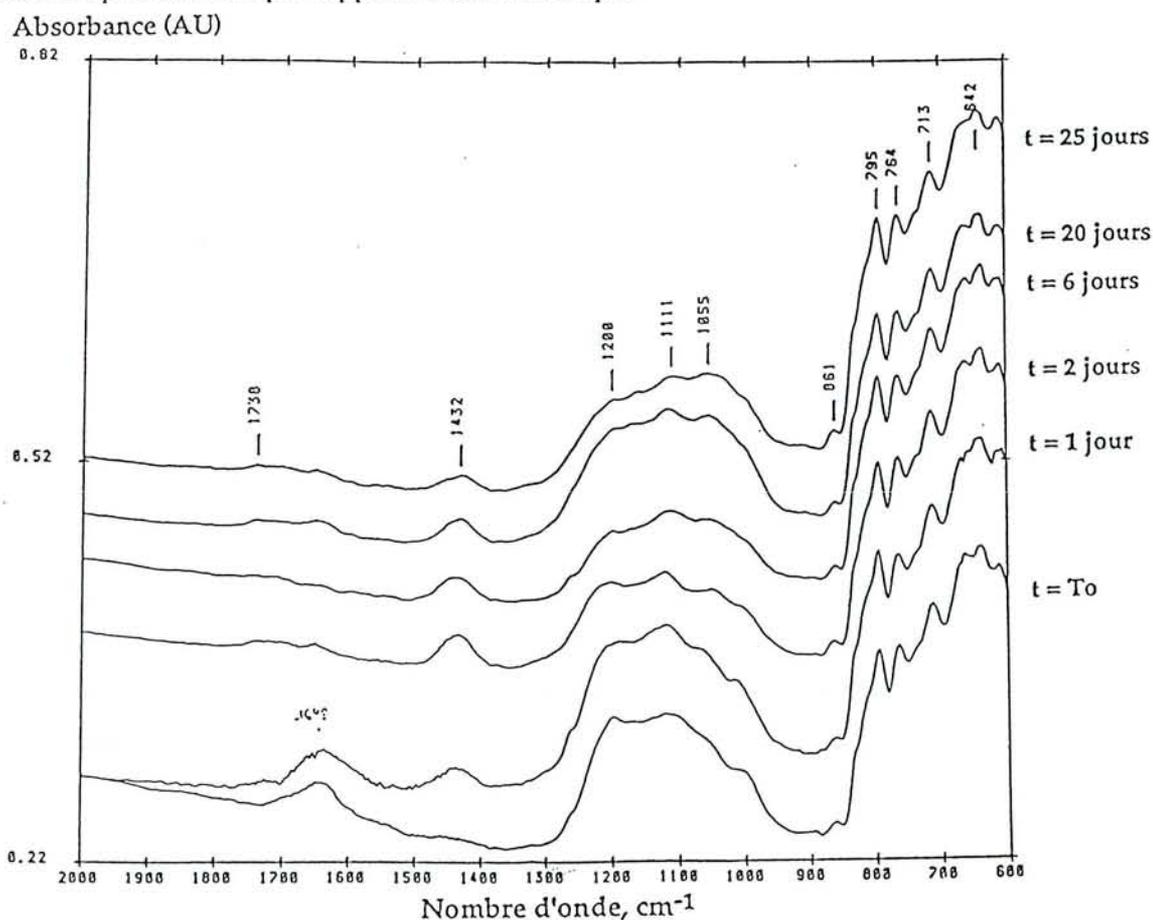


Figure V.10.- Evolution des spectres infra-rouges en réflexion diffuse, au cours de l'oxydation indirecte (chimique) de la pyrite K4 (10-32 μm) dans le cas du semi-contact (compartiment minéral seul).

3.- Spectres obtenus dans le cas du semi-contact

La pyrite oxydée indirectement (exclusivement chimiquement) montre une évolution analogue à celle observée précédemment sans contact (Figure V.10.). On constate en effet la diminution de l'intensité des absorptions aux hautes fréquences et de l'amplitude de l'ensemble du massif des sulfates et, en fin d'oxydation chimique, une présence plus importante de sulfates ferreux.

Par contre, la pyrite en contact avec les bactéries subit d'importantes modifications au cours des 6 premiers jours d'oxydation (Figures V.11 a et b). Les spectres montrent la formation de quantités relativement importantes de sulfate ferreux (vibrations d'élongation centrées sur $1\ 060\ \text{cm}^{-1}$) dès le premier jour du contact bactérie-pyrite. En parallèle, apparaît un pic correspondant aux vibrations de l'eau d'hydratation des sulfates (massif à $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$) et un massif supplémentaire à $1\ 544\ \text{cm}^{-1}$, correspondant sans doute à la combinaison des vibrations d'élongation des sulfates centrées sur $400\ \text{cm}^{-1}$ (non visibles ici) et $1\ 100\ \text{cm}^{-1}$.

Après 6 jours (Figure V.11.b), la quantité de sulfates diminue à la surface minérale, mais le sulfate ferreux reste prédominant par rapport au sulfate ferrique. Les spectres sont alors analogues à celui obtenu à 36 jours d'oxydation chimique (Figure V.9), lorsque la vitesse d'oxydation est optimale.

L'ensemble des spectres obtenus en condition de contact a montré l'absence d'absorption aux fréquences caractéristiques de la matière organique (liaisons C-H et N-H vers $3\ 000\ \text{cm}^{-1}$; liaisons C=O vers $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$). Cette dernière observation également faite par Mustin (1992) montre que la technique n'est pas assez sensible pour mettre en évidence les cellules à la surface minérale.

Ainsi, lorsque la pyrite est en contact avec *Thiobacillus ferrooxidans*, des espèces de type sulfate ferreux se développent sur la surface du minéral au cours des 6 premiers jours. Le fer en solution atteint pendant ce temps 500 à $700\ \text{mg/l}$ à partir du 6ème jour (Figure V.8 : semi-contact). En revanche, pour la pyrite oxydée par mécanisme indirect, on note des évolutions différentes de l'état de surface du sulfure. Dès les premiers jours, la quantité de sulfate diminue progressivement et le sulfate ferrique de la surface est réduit au contact de l'espèce FeS_2 . Le sulfate ferreux n'apparaît dominant qu'en fin de biolixiviation (36 jours). On distingue ainsi nettement deux types d'évolution des sulfates en présence ou en l'absence de bactéries pour une même amplitude de dissolution.

Le contact bactérien entraînerait la formation de quantités importantes de sulfate ferreux, qui constituerait un substrat plus facilement utilisable par la bactérie comme source d'énergie.

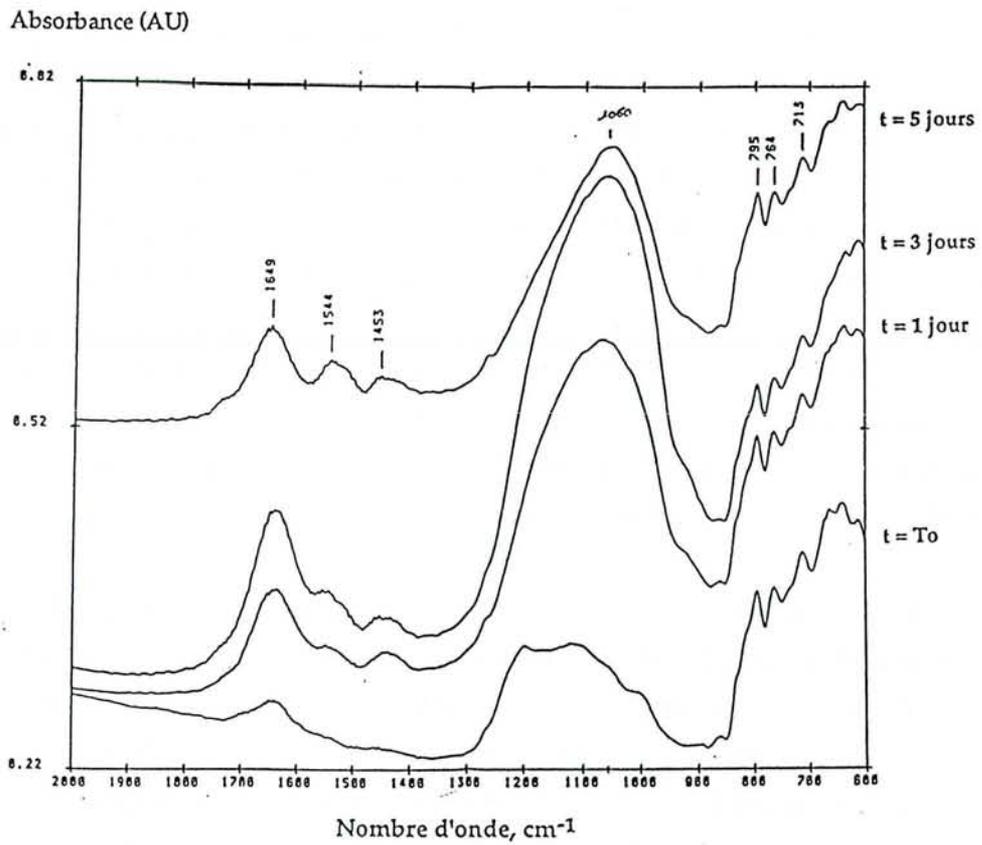
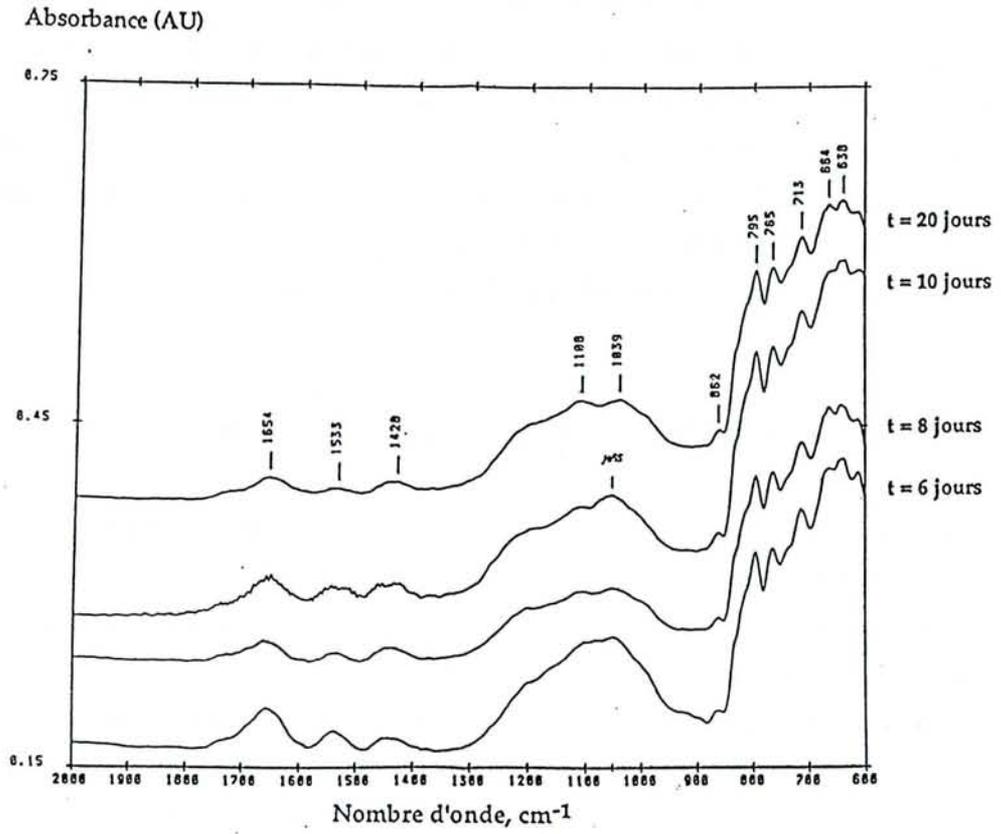


Figure V.11.- Evolution des spectres infra-rouges en réflexion diffuse, au cours de la biooxydation de la pyrite K4 (10-32 μm) dans le cas du semi-contact (compartiment bactérien).

Ce développement initial de sulfate ferreux à la surface minérale avait été préalablement observé par de Donato *et al.* (1991) au cours d'une lixiviation bactérienne en réacteur à turbine avec la pyrite K₂ (32-53 µm), et avait été attribué à l'initiation du processus d'oxydation du minéral. Les résultats obtenus ici montrent que cette production de sulfate ferreux résulte spécifiquement de l'interaction des bactéries fixées avec la surface du minéral et avec les espèces présentes sur la surface de la pyrite. Ce résultat confirme ainsi le rôle primordial des bactéries fixées ou au contact direct avec la pyrite dans l'initiation du processus d'oxydation.

VI.- CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE ET PERSPECTIVES

L'utilisation d'un réacteur à deux compartiments séparés par une membrane microporeuse a permis de montrer que le contact bactérie-minéral, sans être nécessaire à l'oxydation des pyrites, en accélère de façon très significative les processus (Tableau V.1. et V.2.). La phase de latence ou d'amorce est beaucoup plus courte (3 jours contre 19 jours en l'absence de contact). Les vitesses initiales d'oxydation et les vitesses obtenues en phase exponentielle sont deux à trois fois plus élevées. Ces phénomènes conduisent plus rapidement à une oxydation finale plus importante. Les vitesses initiales et optimales d'oxydation sont également, comme le montrent les résultats comparés des expériences en contact total et en semi-contact (Tableau V.2.), dépendantes de la quantité de pyrite en contact avec les cellules, et par là, du nombre de complexes Bactérie-Pyrite présents dans le réacteur. La connaissance du rapport optimal bactéries fixées/pyrite pour un type de pyrite donné présenterait un grand intérêt, pour déterminer la nature des espèces minérales impliquées à l'origine dans les réactions de biooxydation. Les bactéries fixées et au contact direct ont donc un rôle fondamental au cours de la phase de démarrage et au début de la phase optimale d'oxydation. Elles augmentent les vitesses d'oxydation et sont donc les catalyseurs efficaces de ces processus de lixiviation.

Par ailleurs, la vitesse finale d'oxydation en cas de contact bactérie-minéral (densité de pulpe 2 %), identique à la vitesse optimale d'oxydation chimique (sans contact) et deux fois plus importante que pour une densité de pulpe 1 %, suggère que la fin du processus de biooxydation (lors d'un contact) met en jeu principalement des réactions d'origine chimique.

Dans les expériences dites de semi-contact, le rapport (Bactéries)/(Quantité de minéral en contact direct) deux fois plus important que dans des conditions du contact total, et les vitesses d'oxydation initiale et optimale deux fois plus faibles suggèrent que les "sites actifs" du minéral sont saturés par les cellules et que la vitesse maximale d'oxydation est atteinte. Ces "sites actifs" ou "sites biologiques" pourraient être considérés comme les sites qui sont engagés dans le processus d'oxydation à la suite du contact bactérie-minéral.

Les résultats suggèrent aussi que la saturation des sites biologiques est atteinte pour des concentrations bactériennes plus faibles que celles nécessaires à la saturation de la totalité des sites

physico-chimiques, et donc que l'affinité des bactéries serait plus importante pour les sites biologiques que pour le reste des sites d'adhésion. On pourrait donc considérer les sites biologiques comme des sites physico-chimiques d'adhésion particuliers. Ils pourraient correspondre à des sites chimiques ou minéralogiques particuliers. Pour préciser ces hypothèses, il serait nécessaire d'étudier l'affinité des bactéries pour les différentes espèces minérales pouvant exister sur la surface de la pyrite, en travaillant sur des surfaces modifiées, avec des espèces minérales pures (S^0 , Fe_2O_3 , $Fe_2(SO_4)_3$, Fe^0 , pyrite synthétique) et avec d'autres sulfures (chalcopyrite $CuFeS_2$, galène PbS , covellite CuS , molybdénite MoS , sphalérite ZnS) et de délimiter les zones d'influence et d'adhésion des bactéries.

Cette adhésion et l'activité des bactéries de l'espèce *T. ferrooxidans* sur la surface minérale se traduit par le développement de composés minéraux, spécifiques du contact bactérie-minéral, qui, ici, serait le sulfate ferreux. Ces composés seraient à la fois un produit de l'oxydation bactérienne et un substrat pour celle-ci. Ils résulteraient de l'oxydation bactérienne des sulfures (S^{2-}) et polysulfures (S_5S^{2-}) ou encore du soufre élémentaire (S^0). Ceci signifierait que *T. ferrooxidans* oxyde préférentiellement les composés soufrés réduits par rapport au fer. Le sulfate ferreux représente également un substrat énergétique en complément de la production de composés soufrés. L'oxydation des composés réduits du soufre par les bactéries fixées pourrait constituer l'un des rôles catalytiques des cellules adhérentes.

L'observation de vitesses d'oxydation et d'évolutions différentes de l'état de surface pour l'oxydation bactérienne (mixte) et chimique *sensu stricto*, traduit l'existence de deux mécanismes d'oxydation. Le sulfate ferrique Fe^{3+} et les bactéries fixées ne réagiraient pas avec les mêmes espèces présentes à la surface du minéral. L'existence de figures de corrosion différentes en cas d'oxydation bactérienne et chimique (Keller et Murr, 1982) conduit également à envisager des processus différents.

La compréhension des réactions à l'interface *T. ferrooxidans*-pyrite nécessite l'utilisation de méthodes d'observation et de mesure des espèces minérales présentes à la surface de la pyrite, telles la SIRTIF couplée à la réflexion diffuse qui permet l'observation des sulfates et des oxydes (de Donato *et al.*, 1991), la méthode d'extraction et de chromatographie qui permet le dosage du soufre élémentaire (Mustin *et al.*, 1993 a). La mesure des polysulfures présenterait aussi un grand intérêt (Lizama et Suzuki, 1989 ; Mustin, 1992).

Le réacteur à deux compartiments se révèle également très utile pour distinguer et améliorer la compréhension des deux types de mécanismes d'oxydation, chimique et bactérienne, car il permet d'obtenir un cycle complet d'oxydation indirecte du minéral par le sulfate ferrique, en assurant l'oxydation minérale séparément de la régénération du fer ferrique, par oxydation bactérienne du fer ferreux.

Troisième Partie

Réactions à l'interface
Bactérie-Minéral :
rôle fondamental de quelques
propriétés des pyrites et de l'activité
oxydante de *Thiobacillus ferrooxidans*

Chapitre VI

**Connaissances orientant
cette partie de l'étude et objectifs des travaux**

**Connaissances orientant cette partie de l'étude
et objectifs des travaux**

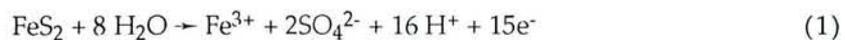
Les résultats précédents (cf. II^{ème} partie) montrent bien que les réactions déterminantes pour la cinétique de biooxydation des sulfures par *T. ferrooxidans* ont lieu à la surface du minéral, les acteurs principaux étant les bactéries au contact du minéral et les espèces minérales présentes sur cette surface. Ces réactions, qui se manifestent aux premiers jours des mises en présence de la bactérie et du minéral, sont complexes. Elles font intervenir à la fois des réactions d'oxydation chimique et bactérienne du fer ferreux et d'espèces réduites du soufre (sulfures, polysulfures, soufre élémentaire).

Dans un système "sulfures (pyrite)-solution-bactérie (*T. ferrooxidans*)", les réactions de biooxydation à l'interface dépendent étroitement des propriétés de la bactérie et du minéral, dont certaines ont déjà été étudiées et mises en évidence, mais dont beaucoup restent à être précisées. Leur connaissance est d'un grand intérêt, tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué. C'est pourquoi l'étude de l'incidence et du rôle de certains de ces paramètres concernant les propriétés du minéral, l'état physiologique et l'adaptation des bactéries, sera abordée dans la troisième partie de cette étude. Mais avant de présenter les travaux effectués, un rappel non exhaustif de l'état des connaissances dans ce domaine s'impose.

I.- LES RÉACTIONS DE BIOOXYDATION : RÉACTIONS ÉLECTROCHIMIQUES

Les pyrites sont de bons conducteurs et des travaux comme ceux de Mustin (1992) montrent que leur oxydation en présence de *T. ferrooxidans* correspond essentiellement à des réactions électrochimiques complexes, entre les zones cathodiques et anodiques de la surface minérale.

L'utilisation de radio-isotopes a permis de montrer qu'en l'absence de bactéries, l'oxydation chimique de la pyrite au site anodique, se résume par la compétition de deux demi-réactions (Bailey et Peters, 1976) (Figure VI.1):



Certains résultats récents (Mustin *et al.*, 1993 a et b) ont mis en évidence la présence de soufre élémentaire (S^0) sur la surface de pyrites et son effet promoteur sur l'oxydation électrochimique et bactérienne du minéral, en suggérant également qu'il pourrait représenter une source d'énergie facilement accessible à la bactérie. Il est communément admis que cet élément est exclusivement d'origine chimique et qu'il peut être ensuite oxydé par *T. ferrooxidans*.

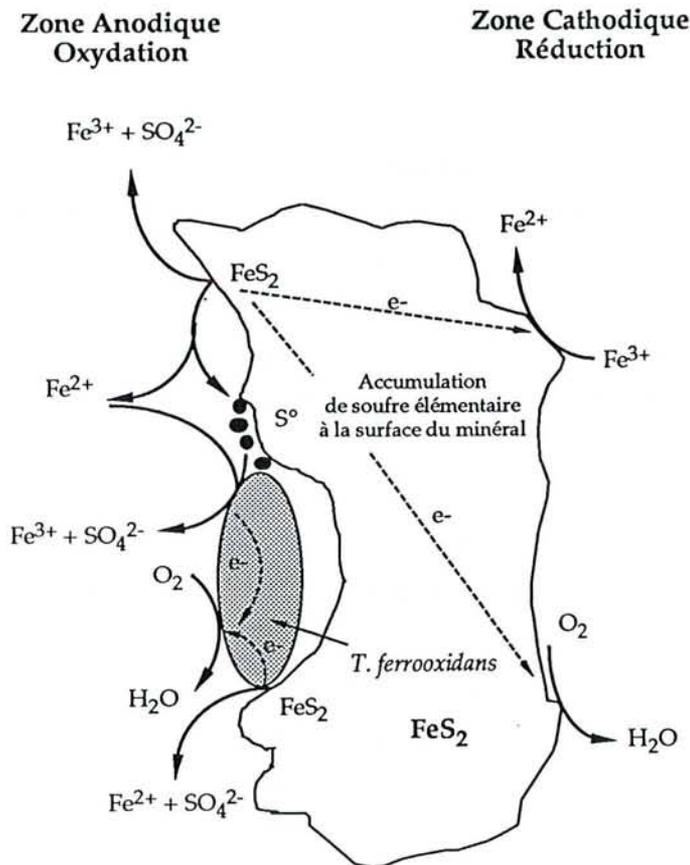
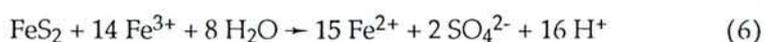


Figure VI.1.- Représentation schématique du processus d'oxydation bactérienne.

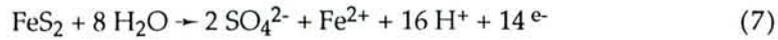
Les réactions cathodiques associées aux réactions précédentes correspondent à la réduction d' O_2 dissous ou de Fe^{3+} par les électrons libérés et conduits par le minéral selon les équations suivantes :



L'oxydation chimique de la pyrite par le fer ferrique peut se résumer selon les équations suivantes (Kawakami *et al.*, 1988) conduisant à la production de sulfates, de soufre élémentaire, de fer ferreux et de protons :



Les bactéries amplifient ces processus électrochimiques d'oxydation. Elles sont capables d'oxyder directement les sulfures, le soufre et le Fe^{2+} présents sur la surface minérale (Ehrlich, 1990 ; Ehrlich et Brierley, 1990) :



De plus, en favorisant la production de Fe^{3+} , elles amplifient le processus d'oxydation chimique de la pyrite. L'ensemble de ces réactions à l'interface bactérie-minéral dépend à la fois des propriétés du minéral et de celles des bactéries.

II.- INFLUENCE DES PROPRIÉTÉS MINÉRALOGIQUES, CRISTALLOCHIMIQUES ET ELECTROCHIMIQUES DES PYRITES SUR LE PROCESSUS DE BIOOXYDATION

Les travaux de Mustin (1992), Monroy (1993) et Mustin *et al.*, (1993b) ont permis de montrer l'importance des propriétés du minéral sur la biooxydation. Par l'utilisation de deux pyrites (ES et K2) minéralogiquement pures (99 %), mais présentant des propriétés cristallochimiques légèrement différentes, liées à la présence d'arsenic (impureté minéralogique) à des concentrations différentes, ces auteurs ont montré que la cristallochimie et l'électrochimie de la pyrite sont des paramètres intrinsèques essentiels qui contrôlent les réactions de biooxydation (Figure VI.2.).

Les figures de corrosion obtenues dans le cas de pyrites pures (K2 et ES) montrent que la corrosion est fortement orientée (anisotrope) et suit des axes cristallographiques perpendiculaires aux faces (111) ou (110) du cristal (Mustin, 1992). Elle est favorisée autour de microfissures induites par le broyage. C'est l'une des raisons pour laquelle l'utilisation de granulométries fines favorise l'oxydation du minéral. Une biooxydation plus rapide est également favorisée par la présence d'impuretés comme l'arsenic, même à très faible teneur (pyrite ES). A plus forte teneur, comme dans les arsénopyrites, la présence d'impuretés chimiques (l'arsenic, dans le cas présent) favorise une corrosion isotrope (non orientée), accompagnée du développement d'une porosité intense et d'une diminution importante de la taille des grains.

En plus de désordres cristallins, la présence d'As modifie les propriétés électrochimiques de la pyrite : elle confère à la zone enrichie en arsenic un potentiel red-ox inférieur à celui du reste du corps pyriteux et favorise alors la corrosion par des phénomènes de couplage galvanique. La zone riche en As joue le rôle d'anode (zone d'oxydation) et le corps pyriteux le rôle de cathode (zone de réduction), si bien que la première est oxydée préférentiellement par rapport à la seconde, protégée cathodiquement (Figure VI.3.).

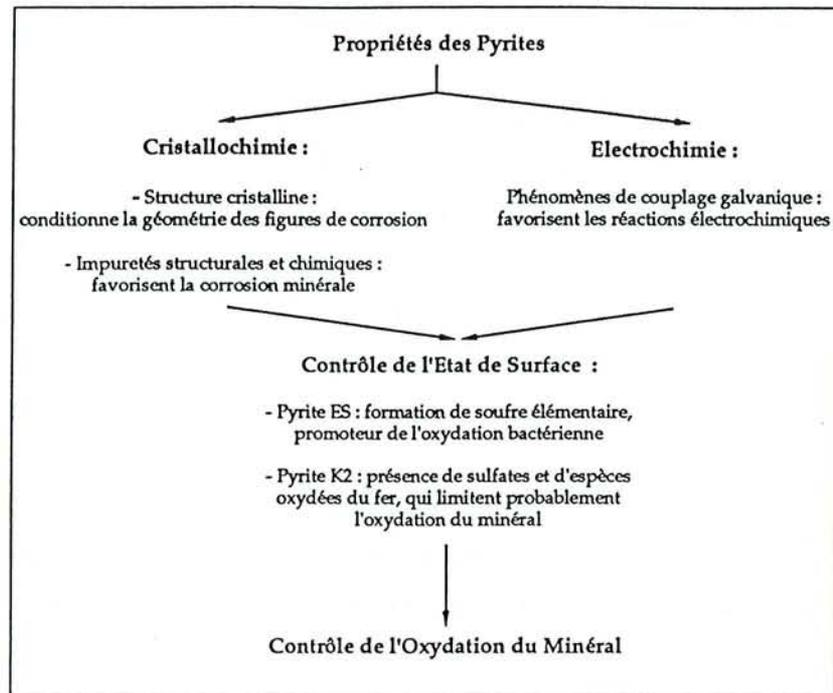


Figure VI.2.- Influence des propriétés cristallochimiques et électrochimiques sur le processus d'oxydation bactérienne.

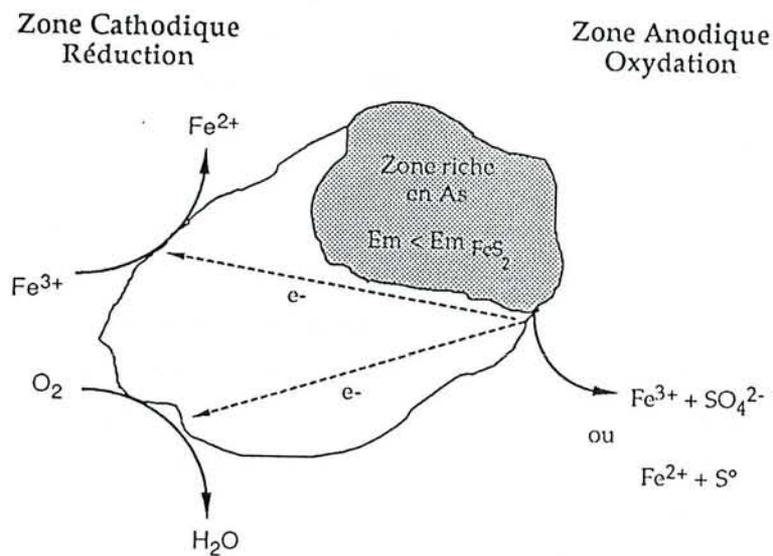


Figure VI.3.- Représentation schématique des phénomènes de couplage galvanique induits par la présence d'arsenic.

De telles propriétés cristalochimiques et électrochimiques conditionnent l'état de surface de la pyrite et, par conséquent, les réactions d'oxydation qui ont lieu précisément sur la surface du minéral, entre les bactéries fixées et les espèces chimiques. Les deux pyrites ES et K2 présentent initialement des phases superficielles oxydées, dont la composition (proportions relatives des différentes espèces) est identique ; cependant, la pyrite K2 est quantitativement plus oxydée que la pyrite ES (de Donato *et al.*, 1993). Certains résultats cités précédemment (cf. Chapitre V), suggèrent également que la formation de sulfate ferreux à la surface du minéral, au cours de son oxydation, pourrait favoriser l'activité bactérienne.

III.- INFLUENCE DES CARACTÉRISTIQUES DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE SUR LE PROCESSUS DE BIOOXYDATION

A.- VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE AVEC LA NATURE DU SUBSTRAT

Plusieurs études récentes montrent que les bactéries de l'espèce *T. ferrooxidans* présentent d'importantes capacités d'adaptation à des substrats variés (S^0 , thiosulfates, sulfures, Fe^{2+} ,...). Cette adaptation met en jeu des modifications physiologiques qui conduisent à une augmentation de l'activité métabolique des cellules et des vitesses d'oxydation des substrats bactériens (Cwalina et Dzierzewicz, 1991 ; Suzuki *et al.*, 1990 ; Attia et Elzeki, 1991). L'adaptation bactérienne concerne non seulement la résistance des souches vis-à-vis de métaux, mais également et avant tout les réactions conduisant à la production d'énergie, c'est à dire les activités d'oxydation du fer et du soufre.

L'étude réalisée par Suzuki *et al.* (1990) sur 8 souches différentes de *T. ferrooxidans* montre que les capacités des bactéries à oxyder le Fe^{2+} et le S^0 varient avec la nature de la souche et celle du substrat. En général, les cellules cultivées sur Fe^{2+} présentent l'activité oxydante du Fe^{2+} la plus importante. Selon les souches, le transfert des cellules sur S^0 s'accompagne du maintien de cette activité élevée, ou d'une baisse importante d'activité. Dans le cas d'un transfert sur minerai sulfuré, l'activité oxydante du Fe^{2+} décroît légèrement. D'autre part, Hallman *et al.* (1992) ont observé, pour des cellules récoltées en phase exponentielle et qui présentent donc une activité métabolique élevée, une activité oxydante du fer 5 à 8 fois plus importante sur Fe^{2+} que sur soufre.

En présence de soufre ou de sulfures, l'activité spécifique d'oxydation du soufre ou des enzymes impliquées dans le cycle du soufre (sulfite oxydase, thiosulfate oxydase, rhodanèse) augmente également, suggérant une induction de ces activités par le soufre (Oliver et Van Slyke, 1987 ; Suzuki *et al.*, 1990 ; Cwalina et Dzierzewicz, 1991).

L'étude des mécanismes de régulation des systèmes d'oxydation du S^0 et du Fe^{2+} (Kulpa *et al.*, 1986) a permis de montrer que l'activité oxydante du S^0 est constitutive, que la présence de soufre

induit le système d'oxydation du S^0 (Oliver et Van Slyke, 1987) et réprime le système d'oxydation du Fe^{2+} . L'addition de soufre à des cellules cultivées sur Fe^{2+} est suivie d'une chute immédiate (en 15 minutes) de la vitesse de synthèse protéique et de la croissance cellulaire. Les cellules obtenues après une phase de latence de 12 à 24 h présentent une activité oxydante du Fe^{2+} réduite de moitié et une activité oxydante du S^0 trois fois supérieure aux cellules originales, alors que les deux substrats sont encore présents et utilisables par les bactéries.

La comparaison, en électrophorèse 2D NEPHGE (Two Dimensional Non Equilibrium pH Polyacrylamide Gel Electrophoresis), des profils de protéines totales de cellules cultivées sur S^0 et Fe^{2+} met en évidence plusieurs différences concernant des protéines basiques, qui sont probablement acidophiles et pourraient être des protéines périplasmiques (Orosio *et al.*, 1993), la spécificité de certaines protéines, associée à une culture sur S^0 ou sur Fe^{2+} , et les variations quantitatives d'autres protéines en fonction de la nature du substrat (S^0 ou Fe^{2+}).

La comparaison des protéines totales, avec celles de la membrane externe et de la fraction soluble (comprenant les protéines de la membrane cytoplasmique et du périplasma) indique l'induction de protéines de la membrane externe, de PM de l'ordre de 45 à 55 kDa dans le cas des cellules cultivées sur S^0 (Orosio *et al.*, 1993). Cette induction par le S^0 suggère un rôle potentiel de ces protéines dans l'interaction de la surface cellulaire (membrane externe) avec le S^0 ou les sulfures, ou encore dans le métabolisme du soufre (Buonfiglio *et al.*, 1993a et b).

L'utilisation d'une procédure d'extraction, destinée à mettre en évidence les cytochromes stables en milieu acide, révèle la présence spécifique de deux protéines de PM 10 000 et 20 000 pour des cellules cultivées sur S^0 , qui pourraient intervenir dans les mécanismes de transport d'électrons impliqués dans les réactions d'oxydation du S^0 (Orosio *et al.*, 1993).

Pour les bactéries cultivées sur Fe^{2+} , les études réalisées par Orosio *et al.* (1993) mettent également en évidence l'existence d'au moins deux protéines spécifiques (de PM 19 et 26 kDa) présentes dans la membrane externe, ainsi que la synthèse accrue de protéines d'un PM de l'ordre de 90 kDa.

La différence la plus évidente observée à partir des profils de protéines totales pour les cellules cultivées sur Fe^{2+} , est l'expression accrue de la rusticyanine (Orosio *et al.*, 1993 ; Pulgar *et al.*, 1993 ; Blake II et McGinness, 1993), par rapport aux cellules cultivées en présence de S^0 ou de (S^0+Fe^{2+}). Le mécanisme de régulation de la synthèse de cette protéine est probablement d'origine génétique. L'hybridation de l'ADN bactérien total avec une sonde spécifique de la rusticyanine (Southern Blot), produite par amplification PCR, permet de montrer l'existence d'un gène unique de la rusticyanine dans le génome de *T. ferrooxidans*. De plus, l'hybridation de la sonde avec les produits de transcription (Northern Blot) révèle la synthèse de deux mRNA (RNA messagers) de poids moléculaires différents (0,6 et 0,8 kilobases) chez les cellules cultivées en présence de Fe^{2+} ou S^0 , suggérant l'existence d'une régulation transcriptionnelle (Pulgar *et al.*, 1993).

A ces variations de la capacité des bactéries à oxyder le Fe^{2+} et le S^0 peut s'ajouter une adaptation bactérienne à des concentrations élevées de métaux (Collinet-Latil, 1989 ; Battaglia, 1994). Cette adaptabilité importante de *T. ferrooxidans* serait liée à la présence de séquences répétées mobiles, activement transposées, à l'intérieur du génome bactérien. Bien que cette hypothèse n'ait pas été prouvée, l'instabilité génétique, associée à la présence d'éléments génétiques mobiles, constitue une flexibilité vis-à-vis de modifications des conditions environnementales. Celle-ci permet probablement d'expliquer la survie de certains individus de la population, dans des conditions hostiles à la croissance de la majorité des cellules (Holmes et Ul-Haq, 1989 ; Rawlings et Kusano, 1994).

B.- INTÉRÊT DE LA CAPACITÉ DE *T. ferrooxidans* À OXYDER LE SOUFRE ET SES COMPOSÉS RÉDUITS

L'intérêt porté à *T. ferrooxidans* dans les processus de biolixiviation a été longtemps associé à sa capacité d'oxydation du Fe^{2+} et à son rôle dans le processus d'oxydation indirecte, par le recyclage du Fe^{3+} . Cependant, plusieurs études récentes accordent un rôle fondamental à l'oxydation bactérienne du S^0 et des composés soufrés, dans le processus d'oxydation de la pyrite et de sulfures (Suzuki *et al.*, 1990 ; Cwalina *et al.*, 1988 ; Mustin *et al.*, 1993a et b), et particulièrement dans le mécanisme d'oxydation directe (Hazeu *et al.*, 1987 ; Kuenen *et al.*, 1993).

En effet, des vitesses spécifiques d'oxydation des composés soufrés plus grandes pour les cellules cultivées en présence de ces composés que pour les cellules cultivées sur Fe^{2+} , et l'affinité plus importante de *T. ferrooxidans* pour certains composés soufrés ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ et S^{2-}) que pour le Fe^{2+} suggèrent que les voies d'oxydation du soufre jouent un rôle primordial dans la dissolution des sulfures. Un autre résultat en faveur de cette hypothèse est l'obtention de rendements cellulaires (exprimés en g de biomasse/mol d'électrons échangés) sur pyrite intermédiaires à ceux observés sur soufre et sur Fe^{2+} (les rendements sur soufre étant supérieurs à ceux obtenus sur Fe^{2+}) (Hazeu *et al.*, 1987). D'autre part, l'arrêt de l'oxydation de la pyrite provoqué par l'inhibition de l'oxydation bactérienne du soufre par le NEM (N-éthyl maléimide) (inhibiteur des groupements thiol) montre également l'importance de l'oxydation bactérienne du soufre dans l'oxydation de pyrite (Kuenen *et al.*, 1993). Enfin, les études de Cwalina *et al.* (1988) montrent l'existence d'une relation directe entre l'efficacité de *T. ferrooxidans* dans l'oxydation de sulfures, et les activités spécifiques d'enzymes impliqués dans le cycle du soufre (sulfite oxydase, thiosulfate oxydase et rhodanèse) et celles de Suzuki *et al.* (1990) indiquent que l'adaptation bactérienne aux minéraux sulfurés permet d'améliorer les vitesses d'extraction de métaux.

IV.- OBJECTIFS DE CETTE PARTIE DE L'ÉTUDE

Les études réalisées dans cette troisième partie sont destinées à préciser la nature des réactions à l'interface bactérie-minéral et le rôle de l'activité oxydante des bactéries dans le processus d'oxydation de pyrite :

♦ d'une part, en cherchant à mettre en évidence l'importance des propriétés du minéral en veillant plus particulièrement à déterminer le rôle :

- de différences relativement importantes de propriétés de surfaces de deux pyrites, ES et K2 pures à 99%,

- de différences de taille des particules

♦ d'autre part, en définissant l'influence de l'adaptation bactérienne par l'utilisation, en tant qu'inoculum, de cellules précultivées sur différents substrats et présentant des activités différentes.

Les expériences ont été réalisées en réacteurs classiques à turbine décrits précédemment (cf. Chapitre III). Les résultats ont par la suite pu être complétés en utilisant un réacteur à deux compartiments (cf. Chapitre V).

Chapitre VII

**Matériel et Méthodes mis en œuvre pour étudier
les réactions à l'interface *T. ferrooxidans*/pyrites**

**Matériel et Méthodes mis en œuvre
pour étudier les réactions à l'interface *T. ferrooxidans*/pyrites**

Dans cette partie de notre étude, quelques méthodes, qui n'ont pas encore été décrites dans ce mémoire, sont présentées ci-dessous.

I.- SUIVI DES POPULATIONS BACTÉRIENNES

La concentration des bactéries en suspension a été estimée par comptage direct au microscope optique, en cellule de Thoma. L'adhésion bactérienne a été mesurée indirectement, par la méthode du MPN (cf. Chapitre II).

II.- MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE D'OXYDATION DU Fe^{2+} PAR LES BACTÉRIES

La vitesse spécifique d'oxydation du Fe^{2+} par les cellules de *T. ferrooxidans* a été déterminée en mesurant la disparition de Fe^{2+} résultant de son oxydation en Fe^{3+} , avec la méthode à l'orthophénanthroline.

A.- RÉACTION ENZYMATIQUE : OXYDATION DU Fe^{2+} PAR LES BACTÉRIES

Les cellules cultivées en présence de Fe^{2+} , S^0 ou pyrite K4 sont lavées 3 fois par une solution d' H_2SO_4 0,01 M (pH 1,8). La réaction enzymatique est réalisée selon la méthode décrite par Kulpa *et al.* (1986), en présence de 1 ml de β -alanine-sulfate 400 mM pH 3,0, 500 μ l ou 1 ml de solution de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ à 400 mM dans H_2SO_4 0,01M et $2 \cdot 10^9$ bactéries. Le volume est ajusté à 20 ml, par la solution de H_2SO_4 0,01M, de façon à obtenir les concentrations finales suivantes : 20 mM en β -alanine-sulfate, 10 ou 20 mM en $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et 10^8 bactéries/ml.

La réaction est effectuée à 28°C, sous agitation à 280 rpm. 1 ml de mélange réactionnel est prélevé toutes les 5 à 10 min. La réaction est bloquée par 200 μ l d'HCl 37 % pour analyses.

B.- DOSAGE DU Fe^{2+} PAR LA MÉTHODE À L'ORTHO-PHÉNANTHROLINE

Ce dosage est réalisé dans deux conditions différentes, en fonction de la concentration en Fe^{2+} du mélange réactionnel.

- Pour une concentration égale à 10 mM de Fe^{2+} , il met en jeu 200 μl d'échantillon, 200 μl d'acétate de sodium 2M, 1 ml d'une solution de chlorhydrate de phénanthroline-1,10 à 0,5% dans l'eau.

- Pour une concentration égale à 20 mM de Fe^{2+} , le dosage met en jeu 100 μl d'échantillon et 1 ml de solution de chlorhydrate de phénanthroline-1,10. L'ajout d'acétate de sodium n'est pas nécessaire dans ce cas, le pH étant supérieur à 2.

L'intensité de la coloration obtenue est mesurée à 490 nm et la concentration en Fe^{2+} est déterminée à partir d'une courbe étalon (Figure VII.1.).

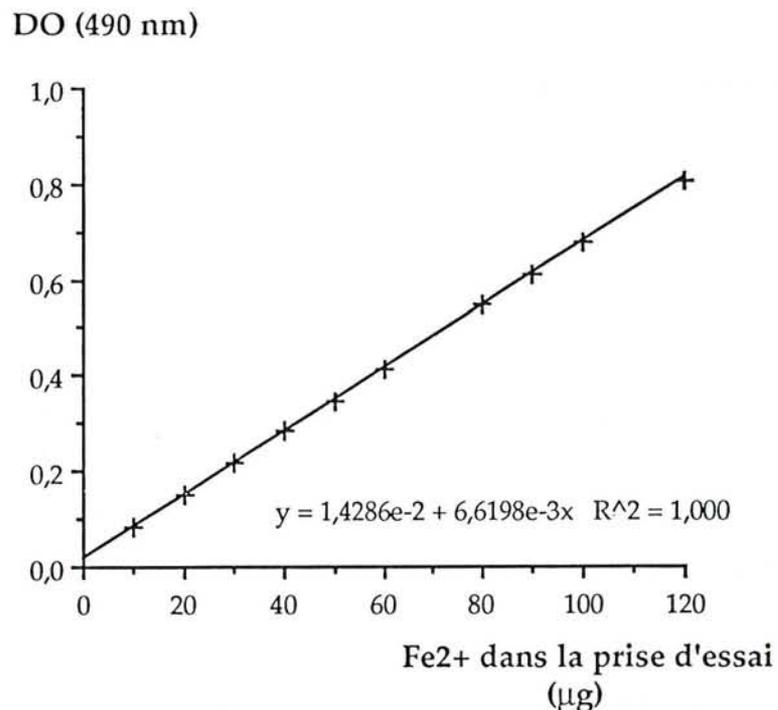


Figure VII.1.- Courbe étalon pour le dosage de Fe^{2+} par la méthode à l'ortho-phénanthroline, au cours de la mesure de l'activité spécifique d'oxydation du fer par les bactéries.

La vitesse spécifique d'oxydation du Fe^{2+} par les bactéries est exprimée en $\text{nmol Fe}^{2+} / \text{min.mg}$ protéines bactériennes, à partir du dosage des protéines de la suspension bactérienne par la méthode de Lowry modifiée.

C.- DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE Fe^{2+} PERMETTANT D'OBTENIR LA VITESSE MAXIMALE DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE

Pour cela, l'oxydation du Fe^{2+} a été étudiée pour différentes concentrations initiales de substrat (10, 20, 40 et 80 mM). Ces expériences ont permis d'obtenir une vitesse maximale pour les concentrations égales à 20 et 40 mM de Fe^{2+} . En présence de 10 mM, le substrat devient limitant et la vitesse est réduite de 20 %. Nos mesures ont cependant été réalisées en présence de 10 mM de Fe^{2+} , car la variation de densité optique est plus importante dans ce cas (Figure VII.2.). De plus, comme notre objectif était de comparer l'activité des cellules cultivées sur des substrats différents, il était plus important d'avoir réalisé l'ensemble des expériences dans des conditions identiques.

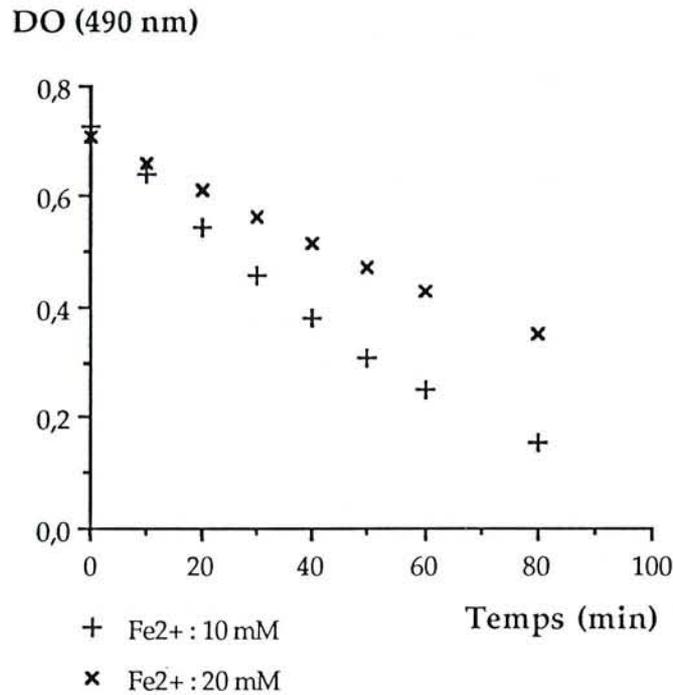


Figure VII.2.- Influence de la concentration en Fe^{2+} sur la mesure de l'activité spécifique d'oxydation du fer par *T. ferrooxidans*.

III.- DOSAGE DES PROTÉINES BACTÉRIENNES PAR LA MÉTHODE DE LOWRY MODIFIÉE, APRÈS LYSE ALCALINE DES BACTÉRIES

L'étude comparative de différentes techniques de lyse des bactéries (par sonication, par action de la soude...) et de différentes méthodes de dosage des protéines (méthodes de Bradford, méthode de Lowry) a conduit Monroy (1993) à adopter un protocole de lyse alcaline des cellules, suivie du dosage des protéines par la méthode de Lowry.

Le principe de la méthode de Lowry repose sur la formation d'une coloration bleue due à la réaction des protéines avec l'ion Cu^{2+} en solution alcaline (réaction du Biuret) et à la réduction de l'acide phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin, par les acides aminés aromatiques des protéines traitées. La méthode a été adaptée à la lyse alcaline : la présence de NaOH dans les solutions de lyse bactérienne réduit l'intensité de la coloration. Pour éviter ce phénomène, le réactif habituel de la méthode de Lowry, le Na_2CO_3 2% dans NaOH 0,1N est remplacé par une solution de Na_2CO_3 à 2% dans l'eau osmosée.

A.- LYSE ALCALINE DES BACTÉRIES

1 ml de suspension bactérienne est lysée par 1,5 ml de NaOH 4N pendant 15 minutes au bain-marie à 100°C (ébullition). Après un refroidissement dans la glace, la solution est neutralisée partiellement par 1 ml d'HCl 4N.

B.- DOSAGE DES PROTÉINES PAR LA MÉTHODE DE LOWRY MODIFIÉE

1 ml de lysat bactérien est mélangé avec 5 ml de solution (A+B)* (préparée extemporanément). Après 10 minutes de repos, 500 μl de réactif de Folin dilué au 1/2 est ajouté, et l'ensemble est placé 30 minutes à l'obscurité. L'intensité de la coloration obtenue, stable au moins 2 h, est lue à 750 nm.

Solution A + B = 25 ml de solution A + 0,5 ml de solution B (à préparer extemporanément)

A = Na_2CO_3 à 2% dans l'eau osmosée

B = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 % dans une solution de Tartrate de Na et K 1%

La concentration de protéines dans la suspension bactérienne est déduite d'une courbe étalon, obtenue à partir d'une solution standard de BSA (Protein Standard 2-BIORAD-Serum Albumine Bovine (SAB) Fraction 5 - ref. 5 000 007 Biorad S.A.) ayant subi le même traitement que la suspension bactérienne (Figure VII.3.).

La méthode permet de doser les protéines pour des suspensions bactériennes à partir de 2.10^8 bactéries/ml (Figure VII. 4.). Pour des concentrations bactériennes supérieures à 1.10^9 bact./ml, il est nécessaire de diluer la suspension, la lyse n'étant plus totale.

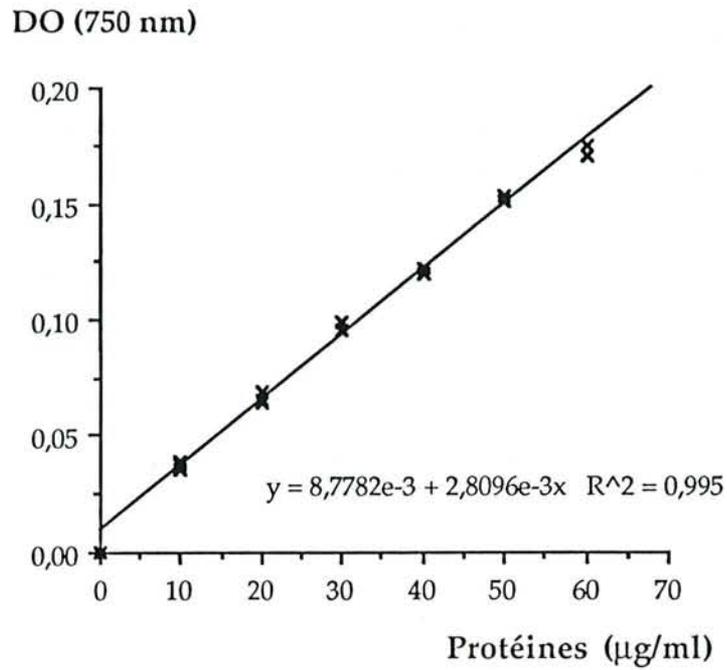


Figure VII.3.- Courbe étalon du dosage des protéines bactériennes par la méthode de Lowry modifiée.

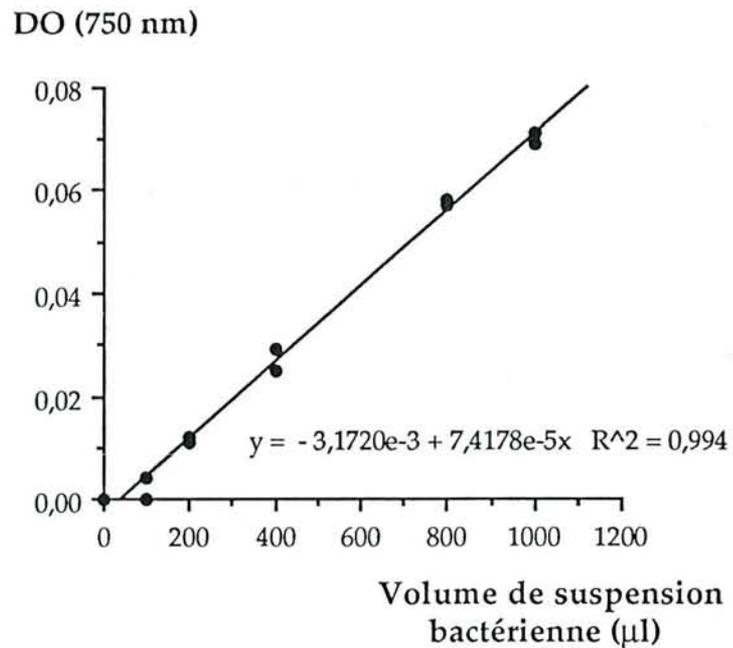


Figure VII.4.- Dosage des protéines bactériennes sur une suspension de *T. ferrooxidans* à $1,16 \cdot 10^9$ bactéries/ml.

IV.- ANALYSES CHIMIQUES DE LA SOLUTION DE BIOLIXIVIATION

Le dosage du fer total et des sulfates en solution est réalisé en spectrométrie d'émission ICP, en présence d'un standard interne au strontium.

Le dosage du Fe^{2+} est effectué par la méthode à l'ortho-phénanthroline décrite précédemment (Cf. Chapitre III).

V.- ÉTUDE DES PHASES SUPERFICIELLES DU MINÉRAL

La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (SIRTF) associée à la réflexion diffuse décrite au chapitre III est utilisée pour observer en particulier les phases oxydées, sulfates et oxydes de fer.

La chromatographie liquide haute pression couplée à une détection UV permet le suivi des phases soufrées présentes à la surface des sulfures (de Donato *et al.*, 1993 ; Mustin, 1992) et en particulier dans ces expériences, celui du soufre élémentaire.

L'extraction du S^0 est réalisée par Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC) (Hewlett Packard 1081 B) (Laboratoire "Environnement et Minéralurgie", ENSG Nancy). La phase stationnaire de la colonne est constituée par la pyrite étudiée. Un spectromètre UV couplé à la sortie de la colonne permet de mesurer (à 263 nm) la quantité de S^0 extrait au méthanol.

La colonne est conditionnée dans l'eau déminéralisée, afin d'éliminer toutes les espèces hydrosolubles. L'élimination du méthanol en fin d'extraction est vérifiée par spectrométrie infrarouge en réflexion diffuse (l'eau et le méthanol sont désoxygénés par bullage d'argon). La figure VII.5. décrit le dispositif expérimental.

VI.- ESTIMATION DE LA GRANULOMÉTRIE ET DE LA SURFACE SPÉCIFIQUE DES PARTICULES DE PYRITE

A.- ANALYSES GRANULOMÉTRIQUES

Le contrôle de la granulométrie a été effectué au moyen du granulomètre Malvern Mastersizer (Laboratoire "Environnement et Minéralurgie", ENSG, Nancy). Cet appareil opère par diffraction laser et permet d'obtenir la distribution granulométrique en volume des particules minérales. Le montage optique, comprenant une lentille de focale 300 nm, permet d'observer la distribution granulométrique des échantillons entre 2 et 600 μm .

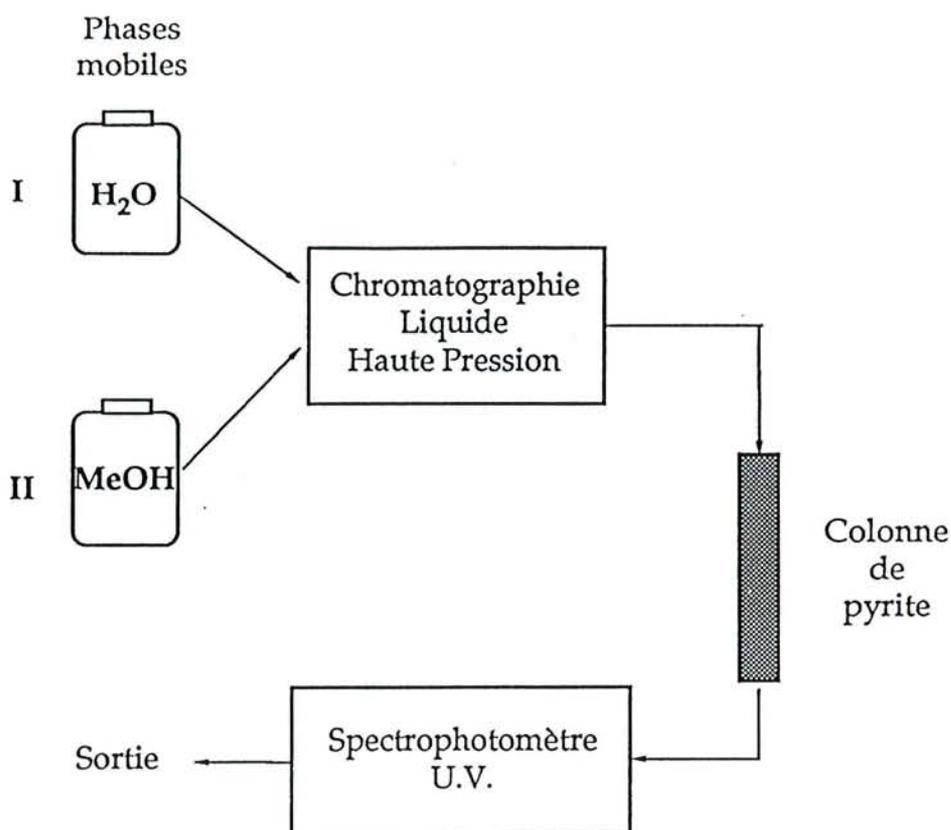


Figure VII.5.- Représentation schématique du dispositif de désorption et de dosage des polysulfures et du soufre élémentaire présents sur la surface du minéral (d'après Mustin, 1992).

B.- MESURE DE LA SURFACE SPÉCIFIQUE

Les surfaces spécifiques des échantillons ont été estimées en appliquant la méthode BET aux isothermes d'adsorption d'azote, effectués à 77 °K, par volumétrie point par point, avec un appareil équipé d'une jauge de pression Datametrics 0-1000 Tor. La précision de cet appareil est d'environ $1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, pour des surfaces de particules contenues dans l'ampoule comprises entre 15 et $25 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Le seuil de mesure correspond à une surface spécifique d'environ $1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

Chapitre VIII

**Influence et évolution
des phases superficielles des pyrites
Influence de la taille des particules**

Influence et évolution des phases superficielles des pyrites - Influence de la taille des particules

Les résultats obtenus par Mustin (1992) et Monroy (1993) ont bien souligné l'importance des constituants superficiels des pyrites et arsénopyrites et de la taille des particules qui conduisent, grâce à des différences, même peu prononcées, à des cinétiques et des figures de dissolution et de corrosion très différenciées. C'est pourquoi il a semblé particulièrement intéressant de comparer la biooxydation de deux pyrites (ES et K2 ou K4) différentes d'un point de vue cristallographique et présentant des espèces minérales superficielles différentes (Mustin, 1992). Ces expériences ont été suivies d'étude concernant l'influence de la taille des particules du minéral.

I.- PROPRIÉTÉS DES PYRITES

Les trois pyrites ES, K2, et K4 utilisées au cours des expériences de biooxydation sont minéralogiquement pures et présentent des propriétés cristallographiques légèrement différentes, liées à la présence d'arsenic (impureté minéralogique) à des concentrations différentes : la pyrite ES contient de l'arsenic (0,3 %) en tant qu'impureté majeure, répartie de façon homogène dans la matrice cristalline. Les pyrites K2 et K4 contiennent une faible proportion d'arsenic (0,02% pour K2 et 0,009% pour K4).

A.- ETAT DE SURFACE DES PYRITES À LA GRANULOMÉTRIE 32-53 μm

Les études par SIRTf en réflexion diffuse présentées au chapitre IV ont mis en évidence que la surface du minéral est :

- peu oxydée dans le cas de la pyrite ES,
- fortement oxydée dans le cas de la pyrite K2, caractérisée par la présence d'espèces de type sulfates (ferreux et ferrique) représentées par le massif M1, et d'espèces du type oxydes et oxyhydroxydes de fer, représentées par le massif M2.

Des spectres établis dans le cadre de ce travail sur la pyrite K4 (résultats non présentés) ont permis d'observer un état de surface semblable à celui de la pyrite K2. Les compositions chimiques de ces deux pyrites sont également voisines (cf. Chapitre III). Ces résultats permettent de considérer que les pyrites K2 et K4 sont identiques du point de vue cristallographique.

B.- GRANULOMETRIE

La taille des particules minérales a été vérifiée et leur surface spécifique estimée par granulométrie laser, pour les fractions 32-53 μm des pyrites ES et K4 et la fraction 10-32 μm de la pyrite K4 (Figure VIII.1. et Tableau VIII.1.).

Tableau VIII.1- Estimation de la taille des particules minérales et de leur surface spécifique par granulométrie laser.

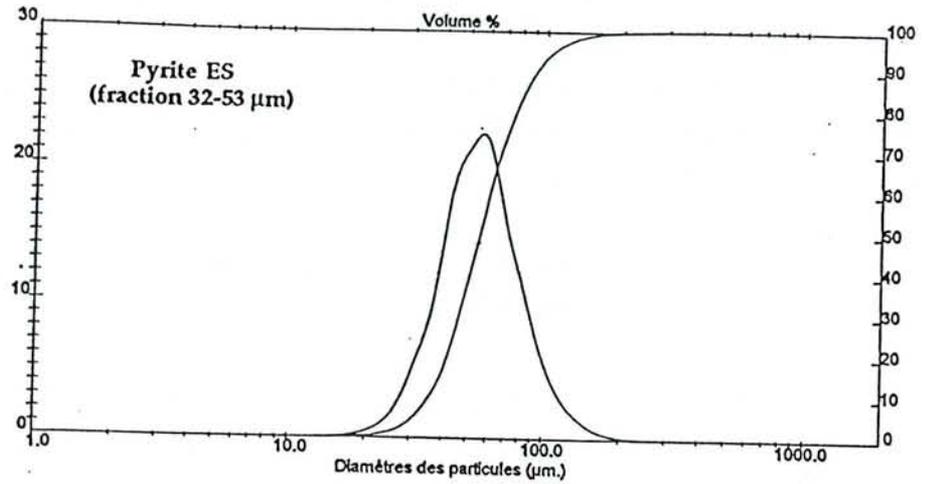
Particules minérales	Méthodes		Granulométrie laser
		Tamissage en voie humide	
ES (32-53 μm)	Estimation de la taille moyenne des particules (μm)	32-53	d (0,5) = 56 μm
	Estimation de la surface spécifique (m^2/g)	-	0,022
K4 (32-53 μm)	Estimation de la taille moyenne des particules (μm)	32-53	d (0,5) = 65 μm
	Estimation de la surface spécifique (m^2/g)	-	0,019
K4 (10-32 μm)	Estimation de la taille moyenne des particules (μm)	10-32	Distribution à deux modes centrés sur 5 et 30 μm
	Estimation de la surface spécifique (m^2/g)	-	0,103

Les pyrites ES et K4 (32-53 μm) présentent des profils granulométriques semblables. Les maxima de la distribution log normale, correspondant ici au d(0,5), sont respectivement 56 et 65 μm . La fraction 10-32 μm présente une distribution à 2 modes centrés sur 5 et 30 μm .

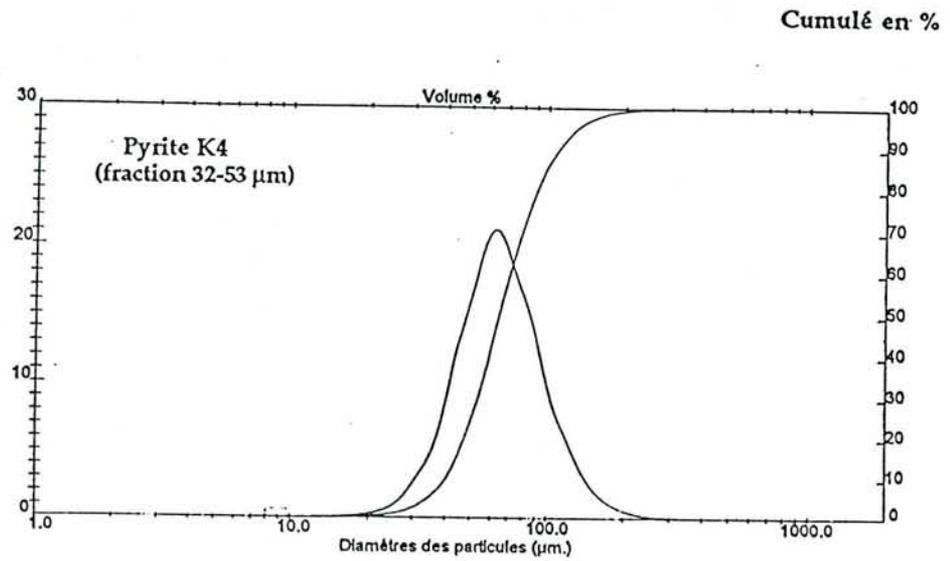
Les trois profils (Figure VIII.1.) présentent des proportions non négligeables de particules de taille mesurée supérieure à la maille des tamis utilisés. Cette différence est inhérente aux principes des deux méthodes. Le tamisage peut sous-estimer la taille des particules lorsqu'elles sont allongées ou s'agrègent après tamisage. La diffraction laser mesure le volume hydrodynamique total des particules, proche de leurs plus grandes dimensions.

Cumulé en %

a.-



b.-



c.-

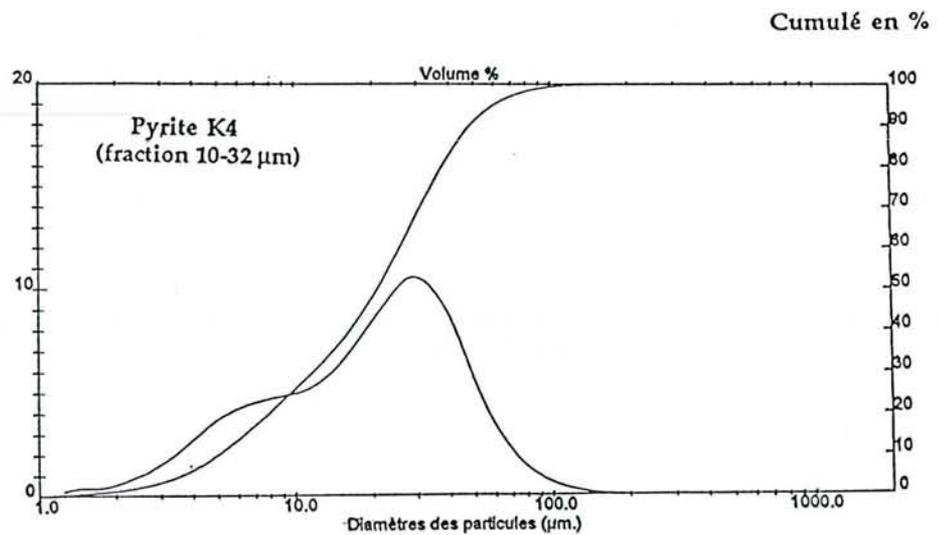


Figure VIII.1.- Distribution granulométrique des pyrites utilisées au cours des expériences de biolixiviation et d'adhésion bactérienne

II.- INFLUENCE ET ÉVOLUTION DES ESPÈCES MINÉRALES SUPERFICIELLES

Les pyrites ES et K2, de fraction granulométrique donnée (32-53 μm) ont été soumises à l'oxydation bactérienne par *T. ferrooxidans*. Dans cette expérience, une culture bactérienne adaptée à la croissance sur Fe^{2+} et récoltée en phase stationnaire a servi d'inoculum.

A.- EVOLUTION DES BACTÉRIES ET DISSOLUTION DES PYRITES AU COURS DU PROCESSUS DE BIOOXYDATION

Pour chacune des pyrites, la superposition des courbes de croissance bactérienne à celles de la solubilisation du fer, des sulfates et du Fe^{2+} (Figures VIII.2, 3 et 4) montre des évolutions comparables à celles obtenues dans l'expérience en contact bactérie-minéral (Chapitre V). Ces résultats montrent que pour les deux pyrites, le processus d'oxydation se déroule en quatre étapes que l'on peut suivre sur les figures VIII.2. 3 et 4 et qui sont résumées au tableau VIII.2.

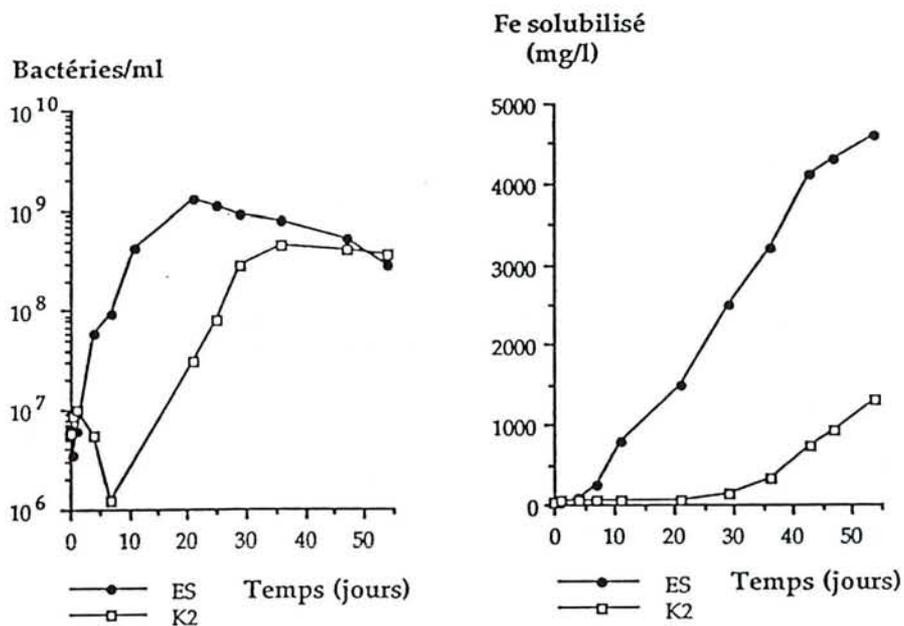
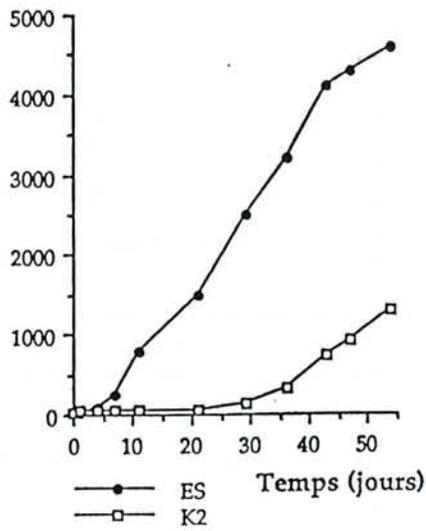


Figure VIII.2. - Evolution de la croissance des bactéries en suspension au cours de la biooxydation des pyrites ES et K2 : fraction 32-53 μm .

Tableau VIII.2.- Différentes étapes de la solubilisation des pyrites ES et K2 (fraction 32-53 μm).

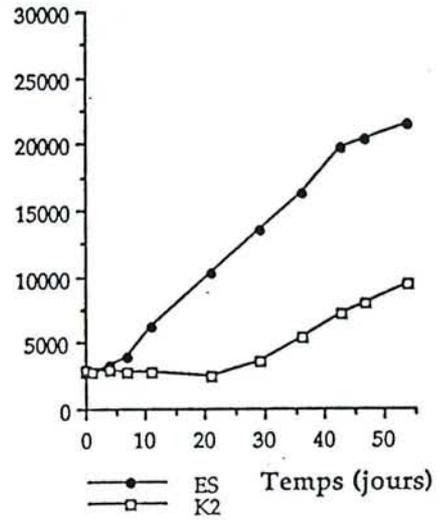
	Pyrite ES	Pyrite K2
Phase de latence		
Durée	1 jour	environ 20 jours
Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> • adhésion bactérienne immédiate et tenace (Chapitre IV) • 70% de bactéries fixées fortement 	<ul style="list-style-type: none"> • coïncide avec une phase de latence de la croissance bactérienne qui montre une adhésion importante des bactéries au minéral
Phase d'amorce de l'oxydation		
Durée	1 à 7 jours	environ 20 à 36 jours
Caractéristiques	<p><i>Phase exponentielle de croissance et oxydation de Fe^{2+} en solution par les bactéries en suspension</i></p> <p>Le nombre de bactéries fixées est constant tout au long de l'oxydation (Chapitre IV)</p>	
Phase optimale d'oxydation		
Durée	7 à 43 jours	à partir de 36 jours
Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> • Bactéries successivement en fin de phase exponentielle puis en phase stationnaire <p>• <i>l'augmentation du Fe^{2+} en solution montre une diminution de l'activité bactérienne. La vitesse d'oxydation est maximale et constante</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • bactéries en phase exponentielle
Phase de déclin		
	<p>Après 43 jours</p> <p>Elle résulte probablement de la précipitation de composés de type jarosite, du fait de concentrations élevées de Fe^{3+} et de sulfates (Monroy, 1993)</p>	

Fe solubilisé
(mg/l)



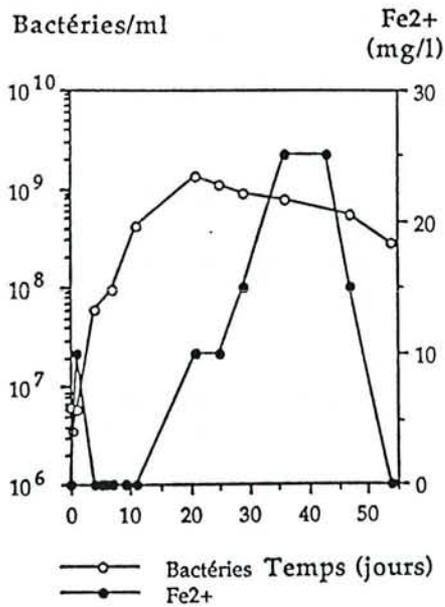
VIII.3.a.

Sulfates solubilisés
(mg/l)

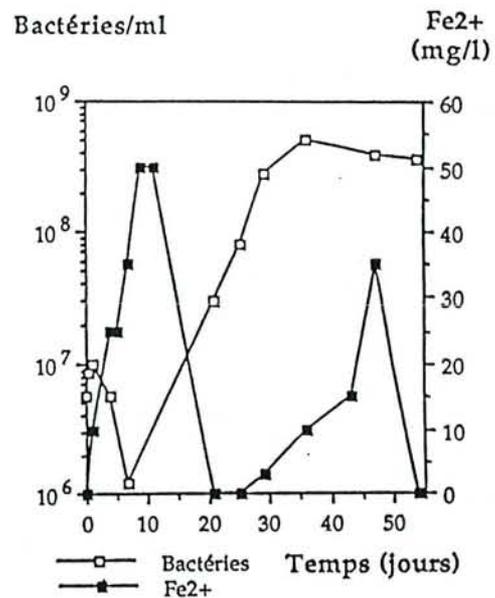


VIII.3.b.

Figure VIII.3.- Solubilisation du fer (a) et du soufre (b) au cours des biooxydations des pyrites ES et K2 (fraction 32-53 μm).



VIII.4.a.



VIII.4.b.

Figure VIII.4.- Evolution de la croissance des bactéries en suspension et du Fe²⁺ en solution au cours des biooxydations des pyrites ES (a) et K2 (b) (fraction 32-53 μm).

1.- Phase de latence initiale

Au cours de cette phase, la solubilisation du minéral est faible ou nulle, et les bactéries adhèrent au minéral (Figures VIII.2 et 3.). Pour la pyrite K2, cette phase d'environ 20 jours est bien mise en évidence par la chute importante de la concentration des bactéries en suspension et l'absence de solubilisation du minéral. Pour la pyrite ES, l'évolution de la population bactérienne montre une adhésion durant le premier jour de contact. L'amplitude de cette adhésion est soulignée par la désorption des bactéries fixées par le Tween 80, qui montre qu'au premier jour de contact, 70 % des bactéries sont fixées fortement au minéral (Chapitre IV).

La durée de cette phase de latence pour la pyrite K2 par rapport à la pyrite ES montre que la pyrite K2 est plus difficile à oxyder et suggère aussi que l'interaction bactérie-minéral est probablement plus complexe sur la surface de cette pyrite.

2.- Phase de démarrage de l'oxydation minérale

Elle est caractérisée par une solubilisation lente du fer et du soufre (Figure VIII.3.). Elle s'accompagne du début de la croissance exponentielle bactérienne en solution et de l'oxydation du Fe^{2+} par les bactéries en suspension, favorisant ainsi les réactions d'oxydation chimique (Figure VIII.4.). A ce stade, la solubilisation du minéral peut être expliquée donc d'une part, par des réactions d'oxydation chimique auxquelles participent les bactéries en suspension, mais aussi par les réactions d'oxydation directe réalisées par les bactéries fixées, puisque, comme il l'a été souligné dans le chapitre V, la vitesse d'oxydation est plus importante avec contact bactérie-minéral que sans contact. La faible concentration en Fe total solubilisé (< 500 mg/l) suggère une participation encore faible des réactions d'oxydation chimique (Figure VIII.3.).

3.- Phase de solubilisation optimale

Cette solubilisation optimale indique l'absence de facteur limitant tant au niveau bactérien qu'au niveau chimique. Cette étape est complexe. Elle fait intervenir :

- l'oxydation directe par les bactéries fixées,
- l'oxydation bactérienne du Fe^{2+} solubilisé en Fe^{3+} par les bactéries en suspension,
- l'oxydation chimique du minéral par le Fe^{3+} .

Cette étape se manifeste encore alors que les bactéries ont déjà atteint la phase stationnaire de croissance. D'un point de vue chimique, la concentration en fer total solubilisé est supérieure à 700 mg/l, ce qui suppose des réactions d'oxydation chimique optimales (Figure VIII.3.). Les bactéries atteignent la phase stationnaire de croissance et leur croissance ne limite plus le processus. L'augmentation de la concentration en Fe^{2+} suggère une diminution progressive de la participation

des bactéries au processus qui est à la fin de cette étape probablement en grande partie chimique (Figure VIII.4.).

4.- Phase de ralentissement

Elle correspond à la fin de la phase stationnaire et à la phase de ralentissement de la croissance bactérienne, au cours de laquelle se poursuit, mais en étant ralentie, la dissolution du fer sous forme Fe^{3+} qui doit être essentiellement une oxydation chimique.

Les résultats fondamentaux de ces expériences sont la mise en évidence d'une phase de latence et d'adhésion bactérienne longue pour la pyrite K2 et plus courte pour la pyrite ES, ce qui suggère que les réactions mises en jeu à l'interface bactérie-minéral sont probablement différentes pour les deux pyrites et que l'oxydation est plus difficile à amorcer dans le cas de la pyrite K2.

B.- EVOLUTION DE L'ÉTAT DE SURFACE DES PYRITES AU COURS DU PROCESSUS DE BIOXYDATION

1.- Pyrite ES

Les spectres obtenus par SIRTf en réflexion diffuse (Figure VIII.5.) sont pratiquement plats, ce qui indique que cette pyrite est peu oxydée.

Le dosage du S^0 sur la surface minérale montre initialement (jusqu'à 20 jours) une production importante de S^0 qui coïncide avec la phase exponentielle de croissance bactérienne et le début de l'oxydation du minéral (Figure VIII.6.). Cette formation de S^0 , espèce résultant de l'oxydation partielle des sulfures, met en évidence l'oxydation à la surface minérale, qui s'accompagne de la mise en solution de fer et de sulfates (Figure VIII.7.).

Entre 20 et 43 jours de culture pour la pyrite ES, la quantité de S^0 diminue alors que les bactéries sont en phase stationnaire. Cependant, l'oxydation est optimale (Fer total > 700 mg/l), ce qui suggère qu'elle pourrait être en grande partie chimique.

La mesure du S^0 présent à un moment donné à la surface minérale correspond au bilan, d'une part, de la production de S^0 par les réactions d'oxydation chimique, et d'autre part de son utilisation, probablement par les bactéries fixées. Jusqu'à 20 jours, la formation de soufre est majoritaire, sans que l'on puisse distinguer si la consommation est importante. La coïncidence de cette production avec la phase exponentielle de croissance des microorganismes en suspension suggère que le soufre pourrait être en partie d'origine bactérienne. Entre 20 et 43 jours, la diminution de la quantité de soufre superficiel suggère une consommation bactérienne majoritaire. Après 43 jours, une nouvelle phase de production apparaît dont l'origine sera à préciser.

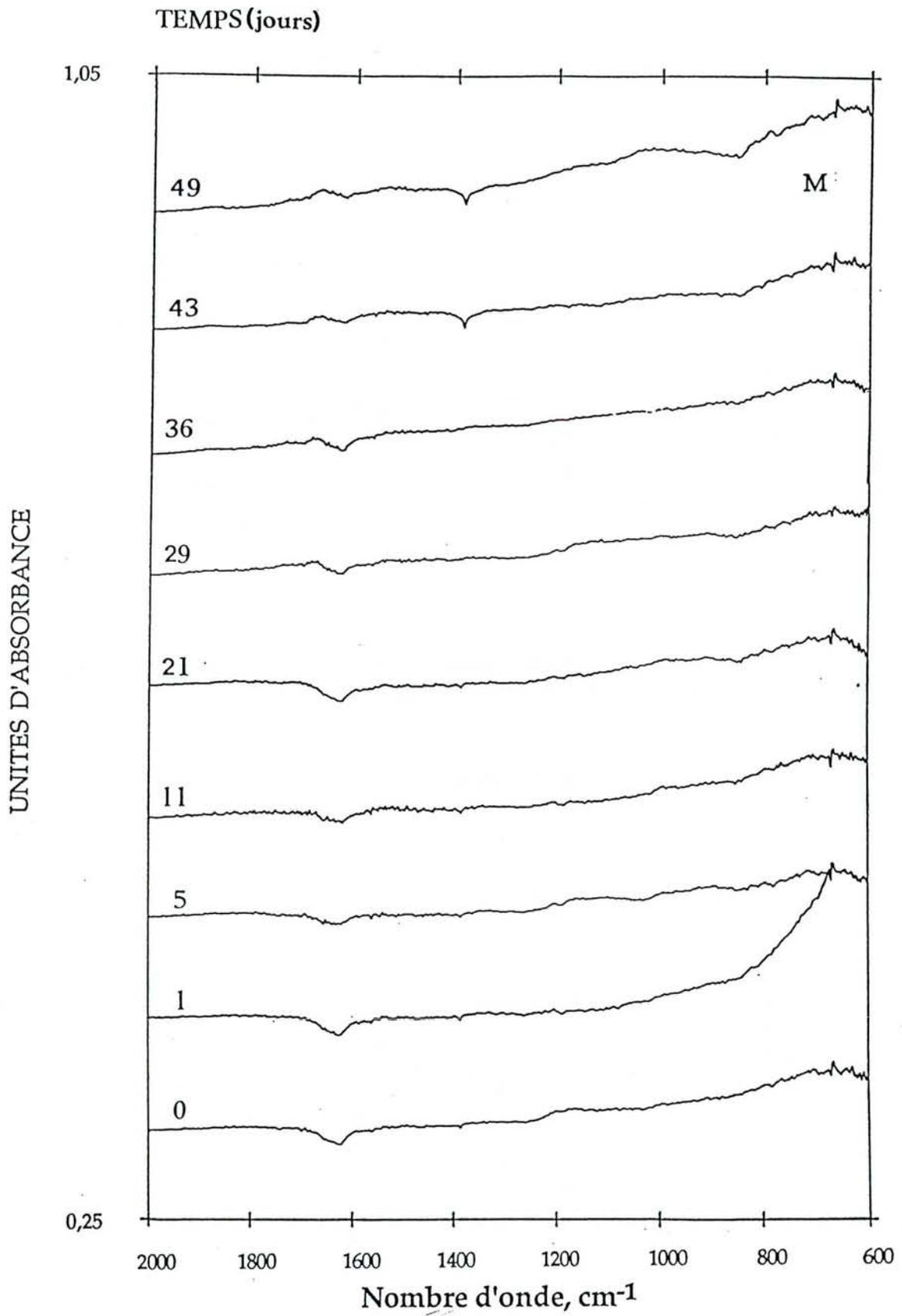
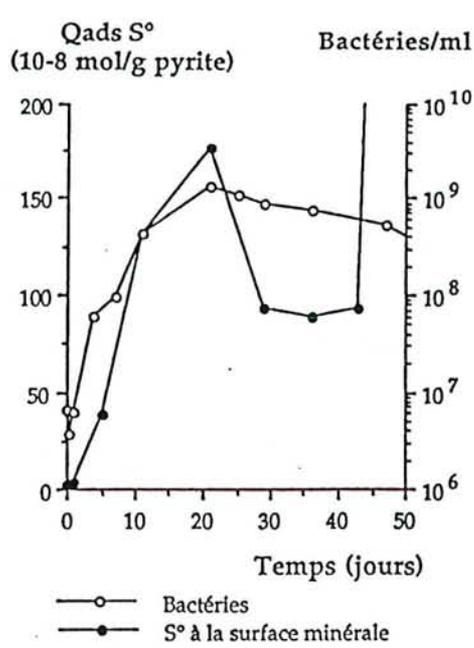
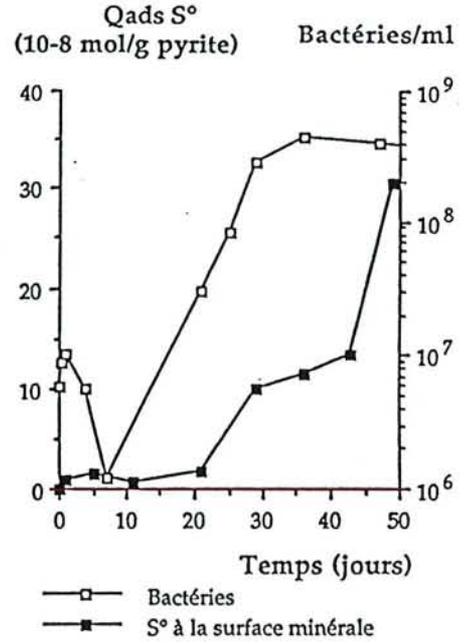


Figure VIII.5.- Evolution des spectres infra-rouges en réflexion diffuse de la surface de la pyrite ES, au cours du cycle de biolixiviation (fraction 32-53 μm).

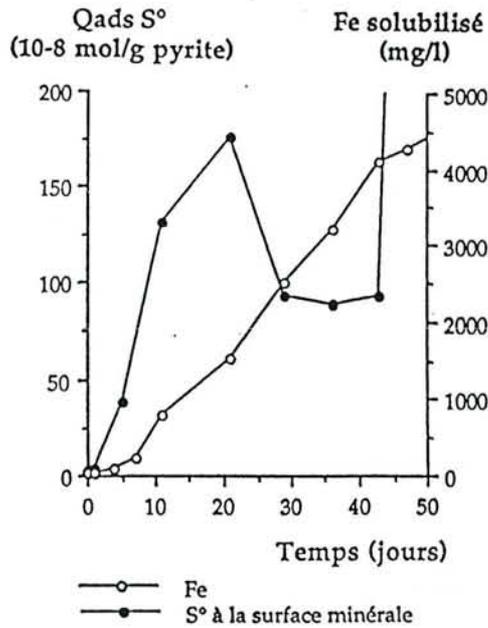


VIII.6.a.

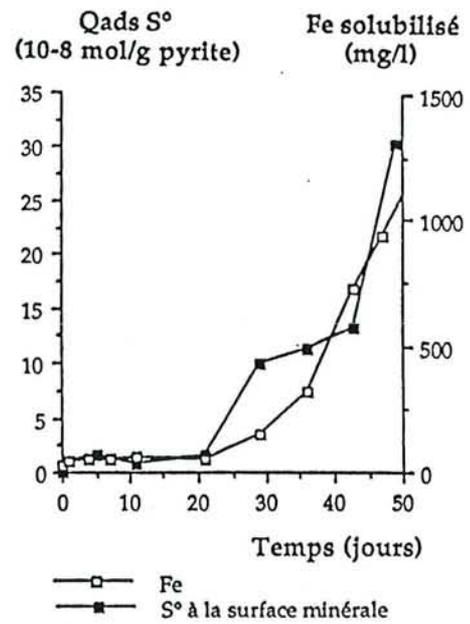


VIII.6.b.

Figure VIII. 6.- Evolution du film de soufre superficiel et de la croissance des bactéries en suspension au cours des biooxydations des pyrites ES (a) et K2 (b) (fraction 32-53 μ m).



VIII.7.a.



VIII.7.b.

Figure VIII.7.- Evolution du film de soufre superficiel et de la solubilisation du fer au cours des biooxydations des pyrites ES (a) et K2 (b) (fraction 32-53 μ m).

2.- Pyrite K2

La spectrométrie IR (Figure VIII.8.) indique une réduction des sulfates ferriques au cours du premier jour, suivie d'une diminution de la quantité de sulfates à la surface minérale. L'intensité des bandes d'absorption de ces espèces reste faible jusqu'à 21 jours. Ces phénomènes se produisent également, mais plus lentement, en l'absence de contact, ce qui indique qu'ils sont au moins en partie d'origine chimique. Ils ont lieu au cours de la phase de latence. Parallèlement, l'absence de production de S^0 à la surface minérale au cours de cette phase (Figures VIII.6. et 7) confirme l'absence d'oxydation.

A partir de 21 jours, l'oxydation du minéral et la croissance bactérienne commencent, accompagnées d'une faible production de S^0 et, en spectrométrie IR, de la production de sulfate ferreux, résultant sans doute de réactions d'oxydation directe (Figures VIII. 6b, 7b et VIII.8.). La coïncidence de la phase exponentielle de croissance des microorganismes et de la production de soufre suggère là encore que le S^0 pourrait être en partie d'origine bactérienne. Le développement du S^0 et de sulfate ferreux met également en évidence l'oxydation préférentielle des sulfures de la surface du minéral.

La formation de S^0 s'arrête après 29 jours alors que l'oxydation du minéral s'accélère. Parallèlement, le massif M1 s'aplatit et les bactéries entrent en phase stationnaire. Ces résultats suggèrent une diminution de l'activité bactérienne et une augmentation de la participation des réactions d'origine chimique.

Une seconde phase de production de S^0 s'amorce ensuite (après 43 jours), comme pour la pyrite ES ; celle-ci pourrait être d'origine chimique.

C.- DISCUSSION

L'évolution de la solubilisation du fer et du soufre des deux pyrites et de la croissance bactérienne confirment le comportement très différent des deux pyrites, lié à des différences cristallographiques peu marquées, mais à des états de surface (présence d'espèces superficielles) plus distincts (Mustin *et al.*, 1993 b). L'absence de phase de latence pour la pyrite ES montre que ce sulfure est plus facilement oxydé que la pyrite K2. La voltamétrie cyclique explique, au moins en partie ce résultat : les courants d'échange anodique sont plus importants pour ES que pour K2 (Mustin, 1992). La présence d'arsenic (0,3%) pourrait catalyser la corrosion minérale, et notamment les réactions d'oxydation chimique et la production de soufre à la surface minérale, en mettant en jeu des phénomènes de couplage galvanique. Elle peut également induire des modifications physiques fragilisantes pour la pyrite (désordre cristallin, lacunes). Marion *et al.* (1991) ont mis en évidence l'effet stimulant de l'arsenic sur la corrosion, par l'utilisation d'une pyrite présentant une zonation

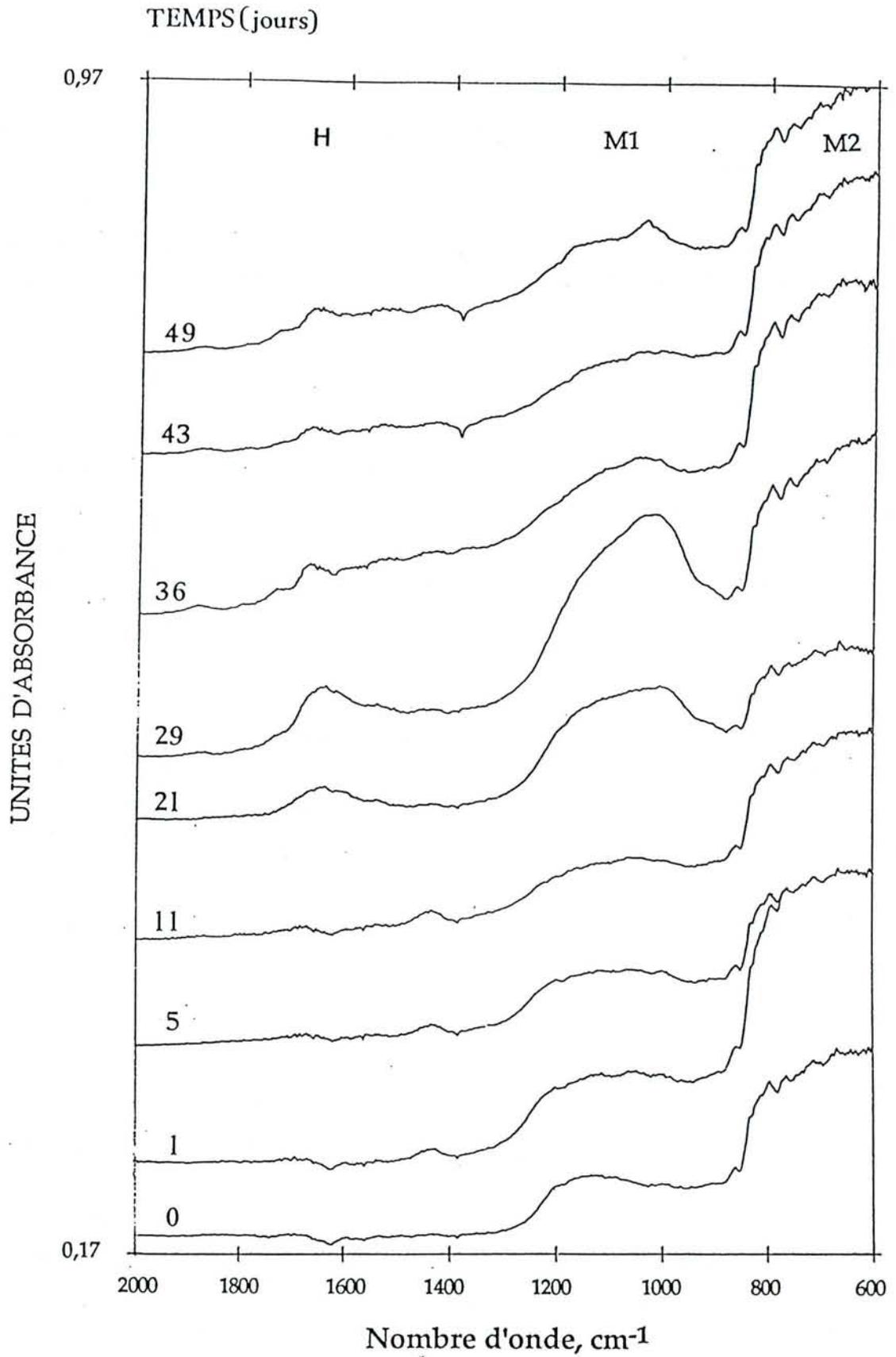


Figure VIII.8.- Evolution des spectres infra-rouges en réflexion diffuse de la pyrite K2 (fraction 32-53 μm) au cours du cycle de biolixiviation.

en arsenic. L'observation par MEB en électrons rétrodiffusés a montré que les zones riches en arsenic sont plus rapidement et intensément corrodées que celles contenant peu ou pas d'arsenic et que ces phénomènes de couplage galvanique sont stimulés dans les systèmes mixtes arsénopyrite/pyrite, par l'oxydation préférentielle de l'arsénopyrite (Monroy, 1993).

Le soufre qui se forme abondamment à la surface de la pyrite ES au cours de sa biooxydation est également un agent promoteur de l'oxydation bactérienne (Mustin *et al.*, 1993 a).

La pyrite K2, d'une plus grande pureté, présente une surface initialement plus oxydée que celle de la pyrite ES. Parallèlement, l'oxydation du minéral et la croissance bactérienne nécessitent une phase de latence plus longue, ce qui suggère que l'oxydation naturelle de la surface de la pyrite K2 pourrait constituer une barrière pour sa biooxydation. La phase de latence de durée différente et les produits d'oxydation majoritaires différents (sulfate ferreux pour K2 et soufre élémentaire pour ES) qui se forment en début de biolixiviation suggèrent que les phases initiales d'oxydation des deux pyrites ES et K2 mettent en jeu des réactions différentes, qui dépendraient de l'état de surface initial du minéral, reflet des propriétés cristalochimiques et électrochimiques du minéral.

L'initiation de l'oxydation du minéral, qui s'accompagne de la production de sulfates ferreux, en particulier pour la pyrite K2, est, comme le montrent les expériences sans contact bactérie-minéral (Chapitre V), déterminée au moins en partie par les bactéries fixées. La formation et l'évolution du S^0 et du sulfate ferreux témoignent de l'oxydation sur la surface du minéral des sulfures et de la participation de ces formes du soufre aux phénomènes de biooxydation. Même s'il est communément admis que la production de S^0 est d'origine chimique (Kawakami *et al.*, 1988 ; Mustin *et al.*, 1993), le parallélisme observé pour la pyrite ES entre la formation initiale de S^0 et la phase de croissance exponentielle des bactéries, alors que la dissolution du fer est faible, suggère une origine au moins en partie bactérienne de ce soufre élémentaire. Des expériences en réacteurs à compartiments séparés pourraient aider à préciser cette origine.

III.- INFLUENCE DE LA GRANULOMÉTRIE DU MINÉRAL

L'influence de la taille des particules a été étudiée en comparant la biooxydation de deux fractions granulométriques de la pyrite K4, les fractions 32-53 μm et 10-32 μm , inoculées par des bactéries récoltées en phase stationnaire après une culture d'adaptation au minéral.

A.- TAILLE ET SURFACE SPÉCIFIQUE DES PARTICULES

En complément de la mesure de la taille des particules par les méthodes classiques de tamisage et de sédimentation, et par la méthode plus fine de granulométrie laser, l'estimation de la surface spécifique, par granulométrie laser et par la méthode BET, fournissent des informations sur la surface maximale accessible au milieu réactionnel (solution) (Tableau VIII.3.).

Tableau VIII.3.- Estimation de la granulométrie et de la surface spécifique des particules de pyrite K4, fractions granulométriques 32-53 μm et 10-32 μm par la granulométrie laser et la méthode BET.

Méthodes	Tamisage en voie humide	Granulométrie laser	Méthode BET appliquée aux isothermes d'absorption d'azote
32-53 μm			
Estimation de la taille moyenne des particules (μm)	32-53	d (0,5) = 65 μm	-
Estimation de la surface spécifique (m^2/g)	-	0,019	0,041
10-32 μm			
Estimation de la taille moyenne des particules (μm)	Tamisage en voie humide suivi d'une sédimentation 10-32	Distribution à deux modes centrés sur 5 et 30 μm	-
Estimation de la surface spécifique (m^2/g)	-	0,103	0,516

Ces deux méthodes conduisent à des résultats différents parce que leur échelle d'exploration est différente. La granulométrie laser est une méthode d'exploration particulière, alors que la méthode BET est une méthode d'exploration à l'échelle moléculaire. Dans ce cas, la présence d'espèces chimiques à la surface minérale sous forme de massifs provoque une surestimation de la surface spécifique. Cependant, bien que les résultats obtenus soient différents pour une même fraction, ils montrent très logiquement une augmentation de la surface spécifique quand la taille des

particules diminue et, par conséquent, une augmentation de la surface disponible et donc, pour *T. ferrooxidans*, de la quantité de substrat disponible dans le réacteur. En raison de la surface spécifique faible des pyrites ($<1 \text{ m}^2/\text{g}$), la méthode BET se trouve à la limite de son utilisation et encore plus avec l'azote que le krypton comme adsorbant : des mesures de surfaces spécifiques par la méthode BET en utilisant le krypton donnaient pour des pyrites de ces fractions granulométriques, des surfaces de l'ordre du m^2/g ou légèrement supérieures (Mustin, 1992).

B.- INFLUENCE DE LA TAILLE DES PARTICULES SUR L'OXYDATION DES PYRITES

Les résultats présentés par la figure VIII.9. montrent une grande différence entre la dissolution en conditions biotiques et abiotiques : les bactéries accélèrent considérablement la dissolution des pyrites. Cela confirme bien le rôle particulièrement important des bactéries *T. ferrooxidans*, dans l'oxydation des pyrites.

Mais il est ici plus important de souligner l'influence de la taille des particules sur la dissolution, tant chimique que bactérienne. Des granulométries plus fines ($10\text{-}32 \mu\text{m}$) favorisent très significativement l'oxydation chimique et encore plus l'oxydation bactérienne des pyrites, mesurée ici par l'oxydation et la dissolution du fer (Figure VIII.9.).

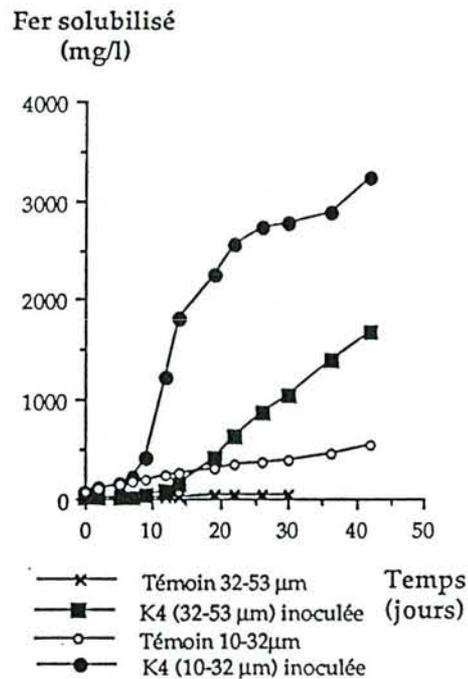


Figure VIII.9.- Solubilisation du fer au cours de biooxydations de la pyrite K4 par *T. ferrooxidans*.

Cette influence de la taille des particules mérite d'autant plus d'être remarquée que l'état de surface des pyrites de plus petite taille est plus oxydé, comme le montrent les spectres infra-rouge en réflexion diffuse présentés à la figure VIII.10.

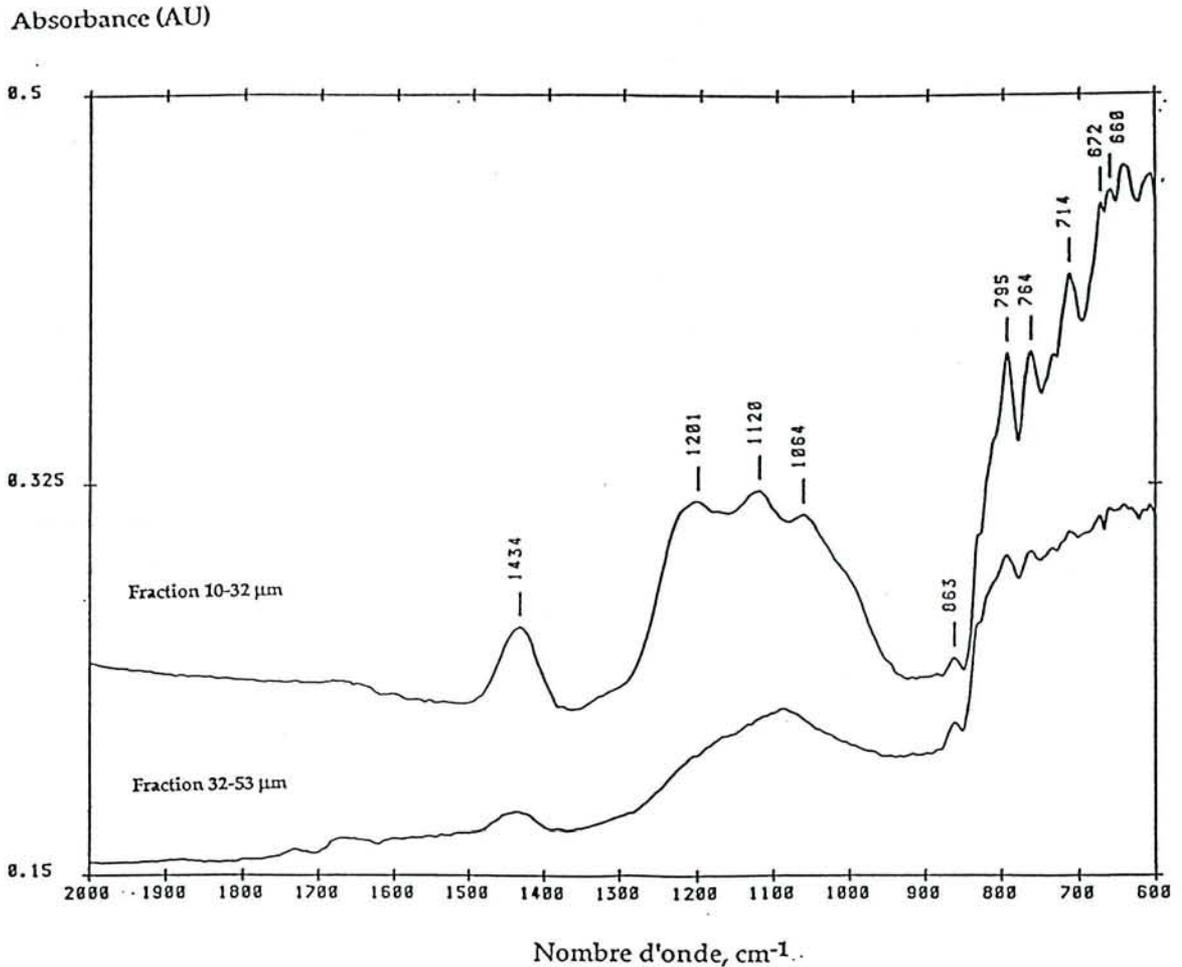


Figure VIII.10.- Spectres infra-rouges en réflexion diffuse de la pyrite K4 à l'état initial (après autoclavage) : fractions 32-53 μm et 10-32 μm .

On constate, en effet, que la fraction 10-32 μm présente des massifs plus importants de sulfate ferreux et ferriques et d'oxydes qui, comme nous l'avons vu précédemment, pourraient ralentir au moins pendant une phase initiale, l'oxydation bactérienne des pyrites. L'amplification de l'oxydation avec la diminution granulométrique suggère que l'effet des espèces oxydées est ici limité et dominé par l'effet stimulateur dû à l'augmentation de la quantité de substrat disponible pour les bactéries.

C.- ADHÉSION ET CROISSANCE DES BACTÉRIES

Pour les particules de pyrite de taille 32-53 μm , l'oxydation bactérienne optimale est obtenue avec un inoculum apportant $1,5$ à 2.10^7 bactéries/ml dans le milieu. Pour la fraction 10-32 μm , elle nécessite un inoculum apportant 7.10^7 bactéries/ml de milieu.

L'évolution des bactéries en suspension, déterminée par comptage en cellule de Thoma, montre une adhésion bactérienne plus importante (Figure VIII.11.a.) pour la fraction 10-32 μm que pour la fraction 32-53 μm . Un nombre important de *T. ferrooxidans* se fixe très rapidement sur les particules de taille 10-32 μm . Cette fixation plus importante sur la fraction fine 10-32 μm est confirmée par les mesures indirectes d'adhésion effectuées avec la technique du nombre le plus probable après un jour de contact bactérie-minéral (Figure VIII.11.b.). Cette adhésion plus importante s'explique par la plus grande surface spécifique des particules de petites tailles.

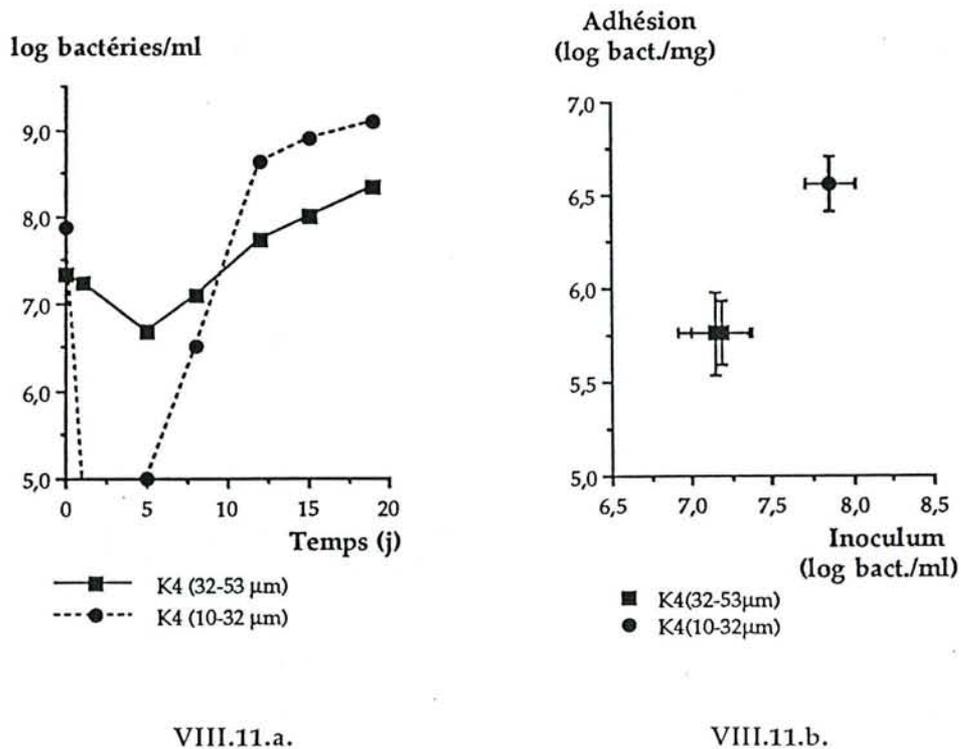


Figure VIII.11.- Evolution de la croissance des bactéries en suspension (VIII.11.a.) et estimation de l'adhésion bactérienne (VIII.11.b.) après un jour de contact au cours des biooxydations des fractions granulométriques 32-53 μm et 10-32 μm de la pyrite K4.

D.- OXYDATION DU FER FERREUX ET CROISSANCE DES BACTÉRIES

La dissolution du fer ferreux en conditions abiotiques (Figure VIII.12.) est plus importante avec les fractions fines (10-32 μm) qu'avec les fractions grossières. Mais ce fer ferreux est, dès le deuxième ou troisième jour, rapidement oxydé par les bactéries en présence de la fraction fine, alors qu'il faut attendre le cinquième jour pour observer une décroissance de la concentration du Fe^{2+} en solution avec la fraction 32-53 μm .

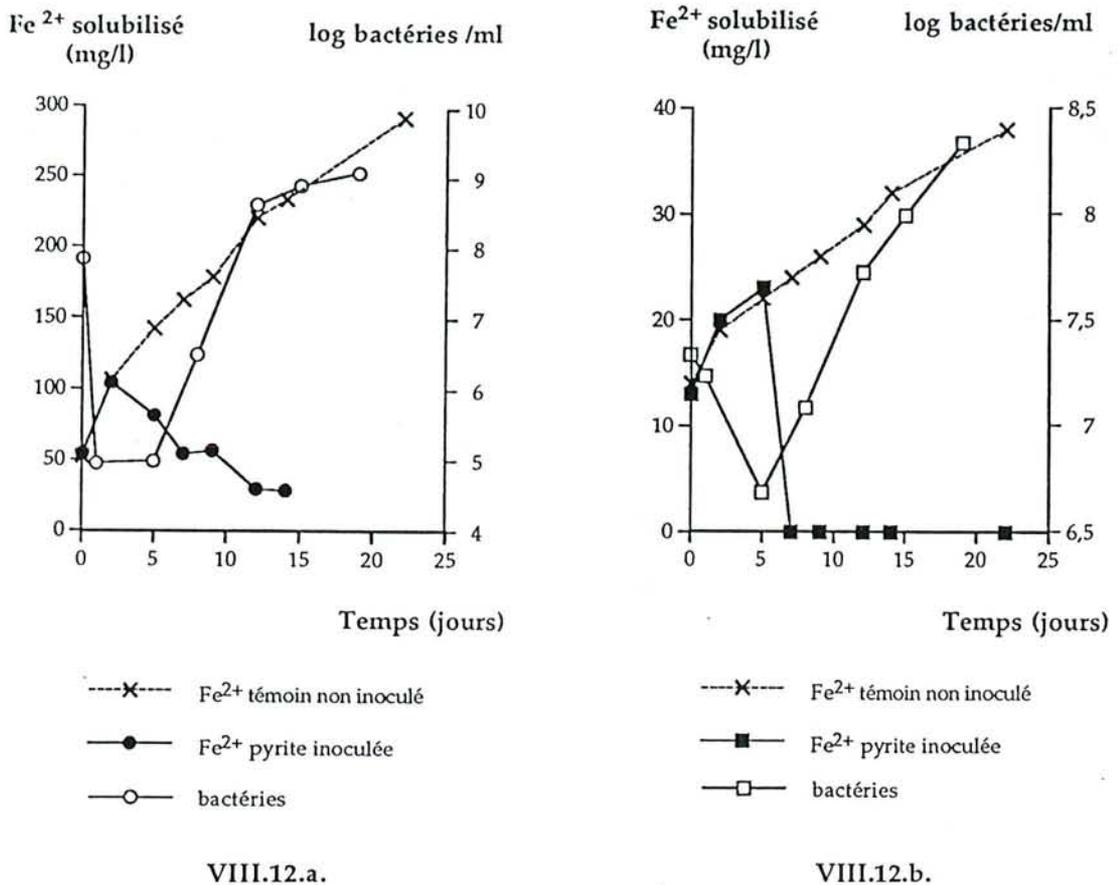


Figure VIII.12.- Evolution du fer ferreux en solution et des bactéries en suspension au cours des biooxydations de la pyrite K4 (fractions 10-32 μm : a et 32-53 μm : b).

A cette disparition, ou diminution très sensible du fer ferreux, correspond la reprise de la croissance des bactéries en suspension (Figure VIII.12). Les bactéries fixées semblent participer à cette oxydation dans la mesure où, en particulier avec la fraction 10-32 μm , on observe une diminution de la quantité de Fe²⁺ en solution, sans constater de suite une augmentation du nombre de bactéries en suspension (Figure VIII.12.). Avec la fraction fine, on observe aussi une croissance beaucoup plus importante, de 10⁵ à 10⁹ bactéries/ml, alors qu'elle ne se manifeste qu'entre 5.10⁶ et moins de 5.10⁸ bactéries/ml avec la fraction de pyrite plus grossière (Figure VIII.12.). La multiplication cellulaire est aussi plus rapide avec la fraction fine.

L'ensemble de ces résultats met donc en évidence une amplification du processus d'oxydation lorsque la taille des particules minérales diminue. Elle résulte d'une augmentation de la surface spécifique, donc de la concentration en substrat et d'une adhésion bactérienne plus importante aux particules fines. Ces résultats impliquent également une participation accrue des réactions d'origine chimique, comme l'avait déjà proposé Brierley (1978). Comme l'accélération de l'oxydation quand la taille des particules diminue, est en partie due à une adhésion bactérienne plus importante, ces

résultats suggèrent aussi que la biooxydation est catalysée par les bactéries fixées, dont le substrat est la surface minérale.

IV.- CONCLUSION

Comme les résultats de Mustin (1992) et Mustin *et al.* (1993 b) l'ont déjà montré, de très faibles différences des propriétés chimiques ou des états de surfaces, qui n'apparaissent pas de manière évidente d'un point de vue minéralogique, voire cristallographique, peuvent modifier très significativement les cinétiques et les taux de biolixiviation des pyrites par *T. ferrooxidans*. Des phases oxydées de natures différentes stimulent (S^0) ou pourraient ralentir ($Fe_2(SO_4)_3$, $FeOOH$) l'oxydation bactérienne. Mustin *et al.* (1993 a) ont effectivement montré que le soufre élémentaire formé au cours de l'oxydation des pyrites, et formé en quantité plus importante à la surface de la pyrite ES que K2, stimule l'oxydation du minéral. Nos travaux et ceux de Mustin *et al.* (1993 b) suggèrent également que les espèces oxydées du fer ($Fe_2(SO_4)_3$, $FeOOH$), présentes initialement en quantité importante sur la surface de la pyrite K2, pourraient ralentir l'oxydation minérale.

La formation d'espèces superficielles différentes (dans le cas des pyrites ES et K2), qui sont le reflet des propriétés cristallographiques et électrochimiques du minéral, et la phase de latence de durée différente suggèrent que les phases initiales d'oxydation et les mécanismes mis en jeu sont différents pour les pyrites ES et K2. La bactérie *T. ferrooxidans* pourrait favoriser, dans une phase initiale à la surface de la pyrite et sous l'influence du contact bactérie-minéral, soit la formation de soufre élémentaire (cas de la pyrite ES) et développer des phénomènes d'oxydation rapide, soit la formation de $FeSO_4$, dans le cas de phénomènes d'oxydation plus lents. La croissance de *T. ferrooxidans* est aussi plus rapide dans le premier système (pyrite avec développement de soufre élémentaire en surface), que dans le second (pyrite avec de plus nombreuses espèces oxydées en surface et avec développement de sulfate ferreux).

Même s'il est communément admis que la production de S^0 est d'origine chimique (Kawakami *et al.*, 1988 ; Mustin *et al.*, 1993 a), la coïncidence de la formation initiale de S^0 avec la phase exponentielle de croissance des bactéries (pyrite ES), alors que la dissolution du fer est faible, suggère une origine au moins en partie bactérienne de ce soufre élémentaire. Des expériences en réacteurs à compartiments séparés pourraient aider à préciser cette origine.

La taille des particules joue aussi un rôle de premier plan. Pour une même pyrite, même si un broyage fin conduit au développement de plus grandes quantités d'espèces oxydées en surface, on observe une biolixiviation plus rapide pour des fractions fines (10-32 μm) que pour des fractions légèrement plus grossières (32-53 μm). On peut relier cette biooxydation plus rapide à l'adhésion d'un plus grand nombre de bactéries et à leur croissance plus rapide et plus importante.

Chapitre IX

Influence de l'activité oxydante
de l'inoculum bactérien

Influence de l'activité oxydante de l'inoculum bactérien

La capacité des bactéries à utiliser divers substrats solubles et solides, les différences de rendement énergétique prévisibles en fonction de la nature de ces donneurs d'électrons, l'instabilité génétique de *T. ferrooxidans* suggèrent une forte capacité d'adaptation de la bactérie, qui mérite d'être précisée, en particulier vis-à-vis des pyrites qui sont des substrats dont les propriétés de surface peuvent être très différentes d'une pyrite à l'autre.

C'est la raison des études dont les résultats sont présentés dans ce chapitre.

I.- COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ DE BACTÉRIES RÉCOLTÉES EN PHASE EXPONENTIELLE ET EN PHASE STATIONNAIRE DE CROISSANCE

Dans des expériences où la pyrite K4 (10-32 μm) est mise en présence d'inoculum provenant soit de phases stationnaires soit de phases exponentielles de croissance dans des conditions décrites au chapitre VII, des différences significatives de dissolution du fer sont observées.

Dans le cas d'un inoculum récolté en phase exponentielle, une oxydation optimale du minéral est obtenue à partir d'une concentration initiale de $1,1 \cdot 10^7$ bactéries/ml et la quantité maximale de fer solubilisé est atteinte en 15 jours d'incubation (Figure IX.1.).

En revanche, pour l'inoculum provenant d'une phase stationnaire, l'oxydation de la pyrite nécessite un inoculum plus abondant ($7,3 \cdot 10^7$ bactéries/ml). La solubilisation maximale n'est atteinte qu'après 25 jours. L'accélération de l'oxydation minérale dans le premier cas s'explique, entre autres, par une phase de latence très courte et non par une accélération de la vitesse de solubilisation, qui est voisine avec les deux inoculums.

L'estimation de l'adhésion bactérienne indique que, pour les bactéries provenant d'une phase exponentielle de croissance, la quantité de bactéries fixées est relativement faible et ne correspond pas à la saturation du minéral (Figure IX.2.). Cette adhésion n'a pas besoin d'être élevée pour qu'une activité significative se manifeste rapidement. L'état physiologique des bactéries est alors un critère plus important. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont plus efficaces, car elles ont un potentiel enzymatique plus élevé que les bactéries en phase stationnaire.

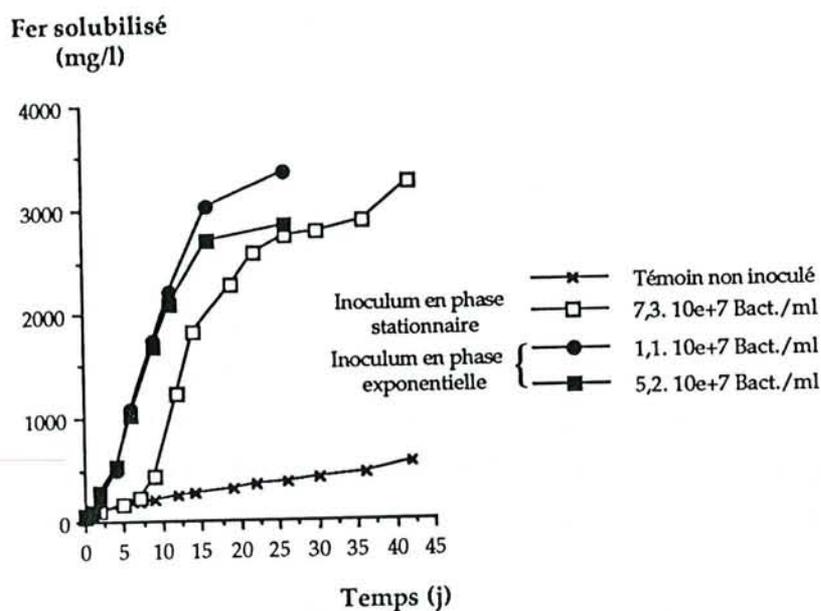


Figure IX.1.- Solubilisation du fer au cours de biolixivations de particules de pyrite K4 (fraction 10-32 μm), inoculées par des cellules adaptées au minéral, récoltées en phase stationnaire ou en phase exponentielle.

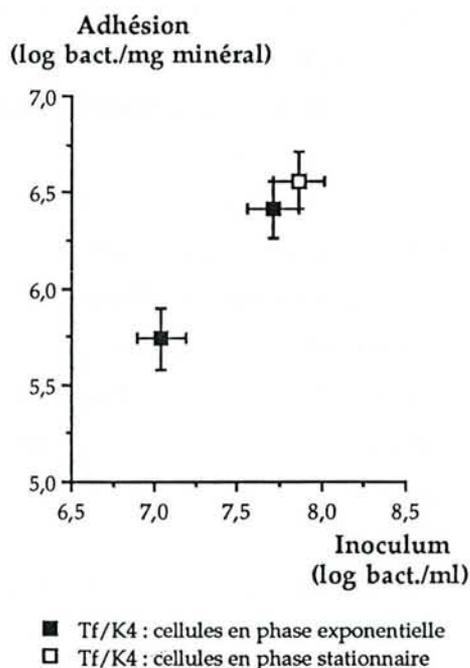


Figure IX.2.- Estimation de l'adhésion bactérienne de cellules en phase stationnaire ou en phase exponentielle, après un jours de contact avec des particules de pyrite K4 (10-32 μm).

II.- INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT (S^0 , Fe^{2+} , pyrite) SUR L'ACTIVITÉ OXYDANTE DE *T. ferrooxidans* ET CONSÉQUENCES SUR LE PROCESSUS DE BIOXYDATION

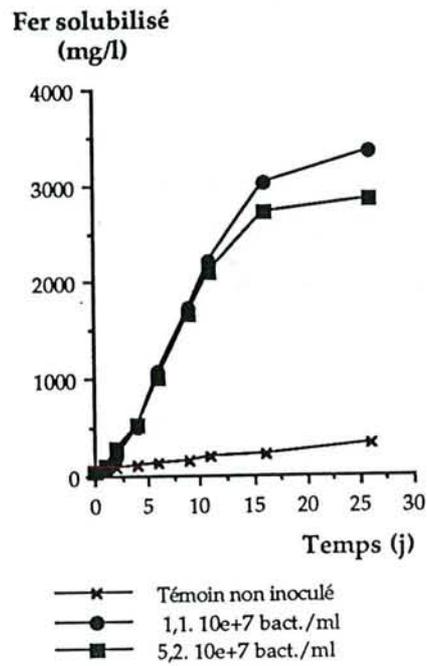
Pour déterminer l'influence du substrat énergétique sur la croissance de *T. ferrooxidans* et ses capacités à oxyder des pyrites, mais aussi l'adaptabilité de cette bactérie à divers substrats et l'intérêt de cette adaptation, plusieurs expériences de biooxydation ont été effectuées avec des inoculums cultivés (ou ayant subi une préculture) sur différents substrats (S^0 ou Fe^{2+} ou pyrite).

Les bactéries utilisées proviennent de récoltes effectuées au cours des phases exponentielles de croissance. Ces expériences ont nécessité la mise au point d'une méthode de mesure de l'activité oxydante du fer (Fe^{2+}), dont le protocole a été décrit précédemment.

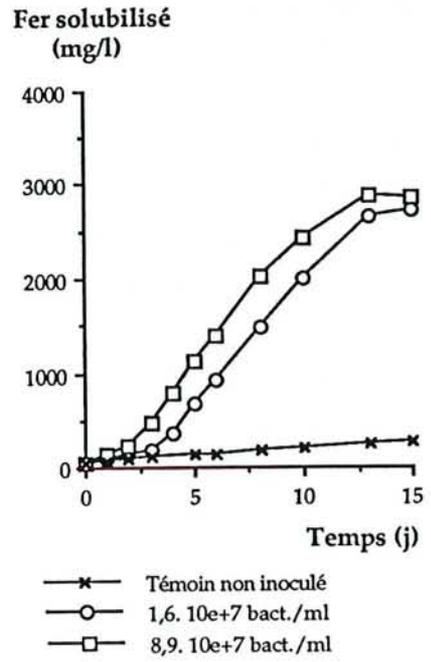
A.- COMPARAISON PRÉLIMINAIRE DE L'APTITUDE DE *T. ferrooxidans* À OXYDER UNE PYRITE (K4) APRÈS CULTURES PRÉALABLES SUR Fe^{2+} , S^0 ET PYRITE K4

Après culture sur S^0 , Fe^{2+} et pyrite (K4), *T. ferrooxidans* a été inoculé à la pyrite (K4). L'oxydation bactérienne de cette pyrite dépend, dans un premier temps, de la quantité initiale de bactéries apportées dans l'inoculum. Pour les bactéries "précultivées" sur pyrite, une biooxydation optimale s'observe aussi bien pour un inoculum de $1,1 \cdot 10^7$ bact./ml que pour $5,2 \cdot 10^7$ bact./ml (Figure IX.3.a et c), bien que le nombre de bactéries adhérentes, donc la quantité de catalyseur enzymatique, soit légèrement plus faible avec l'inoculum le moins abondant. Pour des bactéries précultivées sur sulfate ferreux, une oxydation optimale nécessite un apport bactérien ($5 \cdot 10^7$ à $1 \cdot 10^8$ bact./ml), et une quantité de bactéries adhérentes plus importants (Figure IX.3.b et c). Ces résultats suggèrent que les bactéries adaptées à la pyrite sont plus efficaces que celles adaptées au Fe^{2+} pour oxyder la pyrite K4.

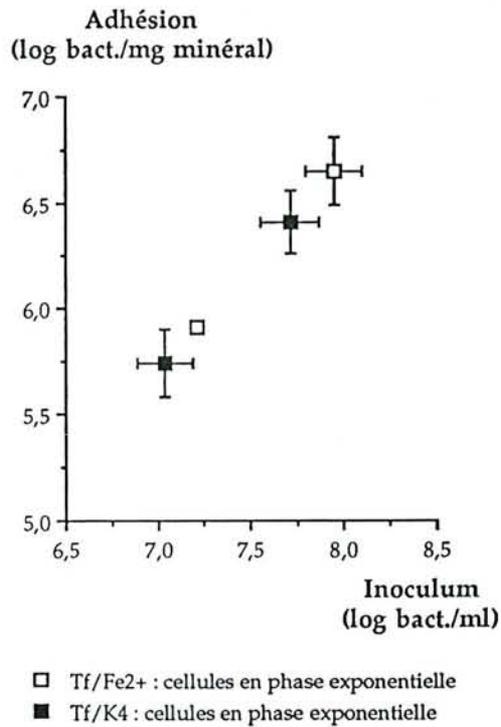
Ces aptitudes différentes à oxyder la pyrite ont été comparées dans une autre expérience mettant en œuvre trois inoculums différents obtenus sur pyrite, Fe^{2+} et S^0 . Avec un inoculum apportant $3,5 \cdot 10^7$ bact./ml, on observe une oxydation plus rapide de la pyrite K4 avec les cellules adaptées à la pyrite et au S^0 , qu'avec les cellules provenant de cultures sur Fe^{2+} (Figure IX.4.a.). Ce résultat confirme l'hypothèse précédente et montre que les cellules précultivées sur S^0 semblent être aussi efficaces que celles précultivées sur pyrite. La solubilisation du minéral, plus faible pour les bactéries précultivées sur Fe^{2+} , peut aussi être due à l'utilisation d'un inoculum insuffisamment abondant avec ce type d'inoculum préparé sur sulfate ferreux.



IX.3.a.



IX.3.b.



IX.3.c.

Figure IX.3.- Influence de la quantité de cellules de *T. ferrooxidans* adaptées à la pyrite (a) ou ayant subi une préculture sur Fe²⁺ (b) sur la biooxydation de la pyrite K4 (10-32µm) et l'adhésion bactérienne (c).

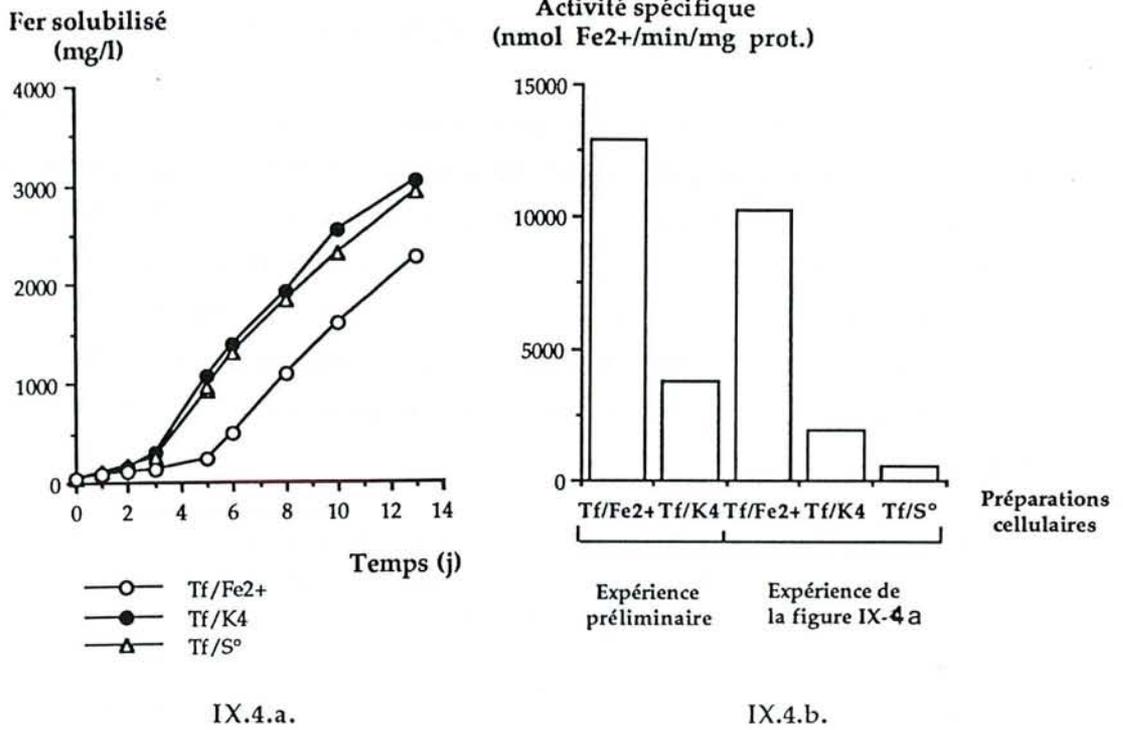


Figure IX.4.- Influence de l'origine de l'inoculum sur la biooxydation de la pyrite (10-32 µm) (IX.4.a.) et activité spécifique d'oxydation du Fe²⁺ de ces inoculum (IX.4.b.). *T. ferrooxidans* a subi une culture préalable sur Fe²⁺ (notée Tf/Fe²⁺), sur S⁰ (notée Tf/S⁰) ou sur pyrite (notée Tf/K₄).

Comme observé précédemment, l'efficacité plus importante des cellules ayant subi une culture préliminaire sur S⁰ ou sur pyrite se manifeste non pas par une vitesse de solubilisation plus importante, mais par une phase de latence plus courte. Ces résultats soulignent le rôle déterminant de l'activité de *T. ferrooxidans* au cours des réactions d'amorce de l'oxydation des minéraux sulfurés, qui mettent en jeu les bactéries fixées et les propriétés de surface du minéral.

Dans cette expérience, le suivi de l'oxydation du minéral s'est accompagné de mesures de l'activité spécifique d'oxydation du Fe²⁺ des trois inoculums bactériens utilisés (Figure IX.4.b.). Parmi ces bactéries, toutes récoltées en phase exponentielle de croissance au cours des précultures, les cellules cultivées sur Fe²⁺ présentent l'activité oxydatrice du fer la plus importante. Cette dernière est 5 fois plus importante que celle des cellules cultivées sur la pyrite et 17 fois supérieures à celle des bactéries cultivées sur S⁰. Cette faible activité spécifique d'oxydation du fer Fe²⁺ par un inoculum provenant de culture sur S⁰ ne pénalise pas la cinétique d'oxydation de la pyrite, comme nous venons de le voir (Figure IX.4.a.).

Des résultats identiques ont déjà été observés pour d'autres souches de *T. ferrooxidans* par Suzuki *et al.* (1990) et Hallmann *et al.* (1992). Ils suggèrent une répression du système d'oxydation du

fer par la présence de S_0 ou de composés soufrés. Cette hypothèse peut être vérifiée en cultivant *T. ferrooxidans* en présence de ($S_0 + Fe^{2+}$) (Oliver et Vans Slyke, 198).

La solubilisation plus importante observée avec les bactéries "précultivées" sur le minéral et sur S_0 montre qu'elles ont un potentiel enzymatique plus important que les bactéries préalablement cultivées sur Fe^{2+} , même si ces dernières présentent l'activité spécifique d'oxydation du fer la plus importante. Ces résultats suggèrent donc un rôle déterminant de l'oxydation du S^0 et des composés soufrés par les bactéries, dans la catalyse de l'oxydation et de la biolixiviation du minéral. Comme le proposent Suzuki *et al.* (1990), l'efficacité plus importante des bactéries "adaptées" au minéral viendrait du fait qu'elles possèdent des activités oxydatrices du fer et du soufre relativement élevées.

B.- CROISSANCE DE *T. ferrooxidans* ET ACTIVITÉS OXYDANTES, VIS-À-VIS D'UNE PYRITE ET DE SES COMPOSÉS DE SURFACE, APRÈS CULTURE D'ADAPTATION SUR DIVERS SUBSTRATS (S^0 , Fe^{2+} , PYRITE)

Des bactéries cultivées sur soufre élémentaire, sulfate ferreux et pyrite, comme indiqué précédemment, ont été récoltées en phase exponentielle de croissance et utilisées pour fournir des inoculum de 5.10^7 bact./ml. Un tel apport de bactéries dans l'inoculum effacera les variabilités qui pourraient être dues à une inoculation trop faible. Dans ces expériences, dont seule la principale d'entre elles sera rapportée dans ce mémoire, la biolixiviation de la pyrite sera mesurée par les modifications observées dans la solution (dissolution du fer, adhésion et croissance des bactéries), pour les propriétés des bactéries (activité spécifique d'oxydation du fer) et pour les composés présents à la surface du minéral (soufre élémentaire, sulfate ferreux et ferrique).

Les essais de biolixiviation mis en place avec des bactéries ayant subi des précultures d'adaptation différentes sont notés respectivement F1 et F2 pour les précultures sur Fe^{2+} (sulfate ferreux), K1 et K2 pour celles effectuées sur pyrite et S pour celle effectuée sur soufre. Un essai a également été réalisé en utilisant un inoculum plus faible (1.10^7 bact./ml) de cellules adaptées au Fe^{2+} (essai F0).

1.- Adhésion et croissance bactérienne

La mesure de l'adhésion bactérienne, après 3h30 de contact (mesure indirecte par la méthode du NPP) indique que le nombre de bactéries fixées sur la pyrite K4 est pratiquement identique et toujours élevé dans tous les cas où l'inoculation est abondante, c'est-à-dire pour l'ensemble des traitements, sauf F0. Cette adhésion est comprise entre 3.10^6 et 1.10^7 bactéries/mg de minéral (Figure IX.5.). Elle est significativement plus importante que dans le cas d'un inoculum plus faible, comme pour le traitement F0 où seulement 8.10^5 bactéries sont fixées par mg de pyrite. Toujours plus de 90 % des bactéries sont fixées avec ces divers inoculums.

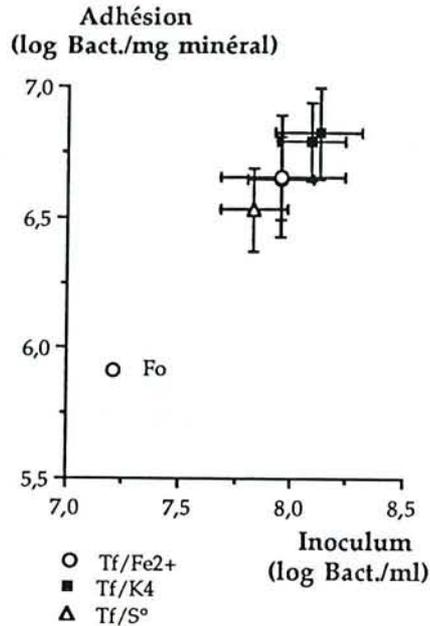


Figure IX.5.- Estimation indirecte de l'adhésion sur la pyrite K4 de *T. ferrooxidans* ayant subi une préculture sur Fe^{2+} (notée Tf/ Fe^{2+}), S^0 (notée Tf/ S^0) ou adaptée à la pyrite K4 (notée Tf/K4) par la méthode du MPN.

Le suivi de la croissance bactérienne (Figure IX.6.a et b.) fait apparaître des différences de comportement qui peuvent être reliées à la préculture des cellules. Les bactéries qui ont subi des précultures sur soufre et sulfate ferreux présentent la croissance la plus rapide, alors que celles provenant de précultures sur pyrite présentent la croissance la moins rapide.

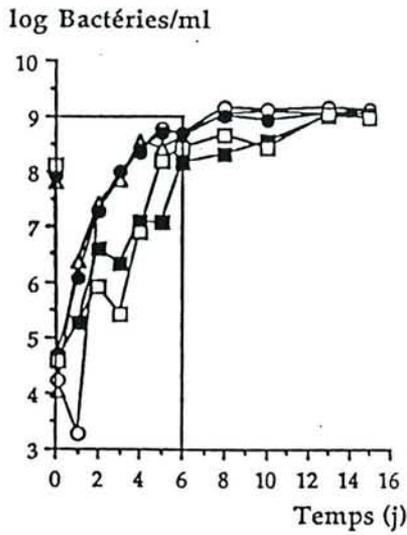
Les différences de croissance que l'on observe au cours des premiers jours de culture s'atténuent rapidement et les quantités de bactéries produites dans tous les traitements sont identiques après cinq-six jours de culture.

2.- Solubilisation du fer

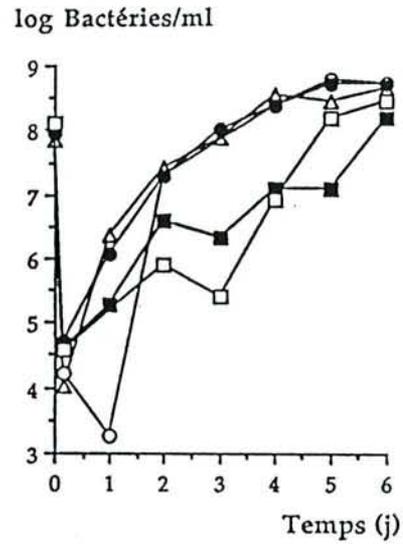
Les mesures de la solubilisation de fer total dans le milieu (Figure IX.6.c et d.) montrent que l'oxydation du minéral débute dès le premier jour en raison de la qualité (cellules en phase exponentielle) et de l'abondance des inoculums.

Au cours des cinq premiers jours, cette solubilisation est sensiblement meilleure avec l'inoculum K1, alors que la croissance bactérienne avec cet inoculum n'était pas la plus rapide. L'évolution et l'intensité de la dissolution du fer sont voisines pour les essais K2, F1, F2 et S. Pour le traitement F0, l'oxydation qui débute après une phase de latence plus importante que dans les essais F1 et F2, indique que la quantité de bactéries apportées initialement était trop faible.

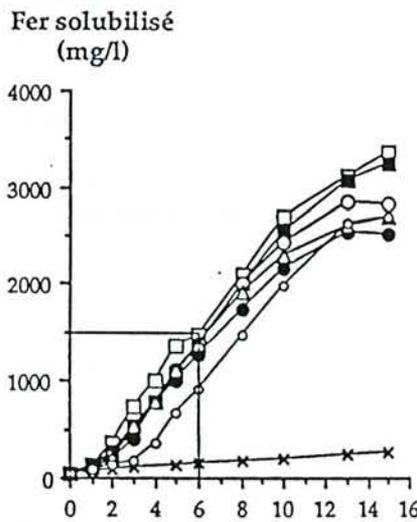
Après cinq jours de culture, on observe une solubilisation du fer forte pour K1, légèrement plus faible pour K2, F1, F2 et S, et nettement plus faible pour F0.



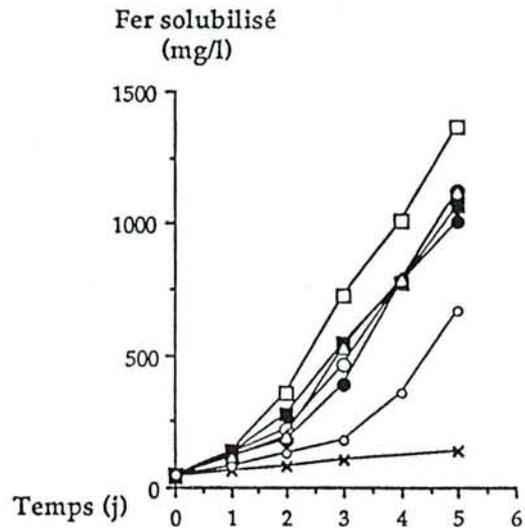
IX.6.a.



IX.6.b.



IX.6.c.



IX.6.d.

—x— Témoin non inoculé
Culture préliminaire sur pyrite :

—□— K1 : $1,3 \cdot 10^8$ bact/ml
—■— K2 : $1,2 \cdot 10^8$ bact/ml

Culture préliminaire
sur Fe^{2+}

—○— F0 : $2,10 \cdot 10^7$ bact/ml
—○— F1 : $8,9 \cdot 10^7$ bact/ml
—●— F2 : $9,1 \cdot 10^7$ bact/ml

Culture préliminaire
sur S^0

—△— S = $7 \cdot 10^7$ bact/ml

Figure IX.6.- Evolution de la croissance des bactéries en suspension et de la solubilisation du fer au cours de la biooxydation de la pyrite K4 (fraction 10-32 μ m) par des cellules précultivées sur des substrats différents.

Après 15 jours, les meilleures dissolutions du fer sont observées pour les bactéries ayant été "précultivées" sur pyrite.

3.- Activité spécifique d'oxydation du Fe^{2+}

Les mesures de l'activité spécifique d'oxydation du Fe^{2+} par des suspensions cellulaires, provenant des inoculums obtenus par culture sur Fe^{2+} et sur pyrite, ou provenant des traitements F1, F2, K1 et S et prélevées en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance, respectivement après 5 et 15 jours de biolixiviation sont présentées Figure IX.7.

Les résultats obtenus pour les cellules provenant des inoculums confirment l'existence d'une activité spécifique d'oxydation du Fe^{2+} plus importante pour les cellules adaptées au Fe^{2+} , comparativement à celles cultivées sur pyrite. Elle est ici 2,6 fois plus importante que celle des cellules adaptées au minéral (Figure IX.7.). L'efficacité des bactéries adaptées à la pyrite, mise en évidence par la solubilisation de fer plus importante dans l'essai K1, ne peut être attribuée à une meilleure capacité à oxyder le fer Fe^{2+} apporté sous forme de sulfate ferreux.

La mesure réalisée pour les cellules récoltées en fin de phase exponentielle de croissance (5 jours) montre que ces cellules présentent des activités spécifiques d'oxydation du fer identiques, quelle que soit l'origine de l'inoculum (culture sur S^0 , Fe^{2+} ou pyrite). Cette activité est également voisine de celle observée pour les bactéries précultivées sur pyrite (inoculum Tf/K4).

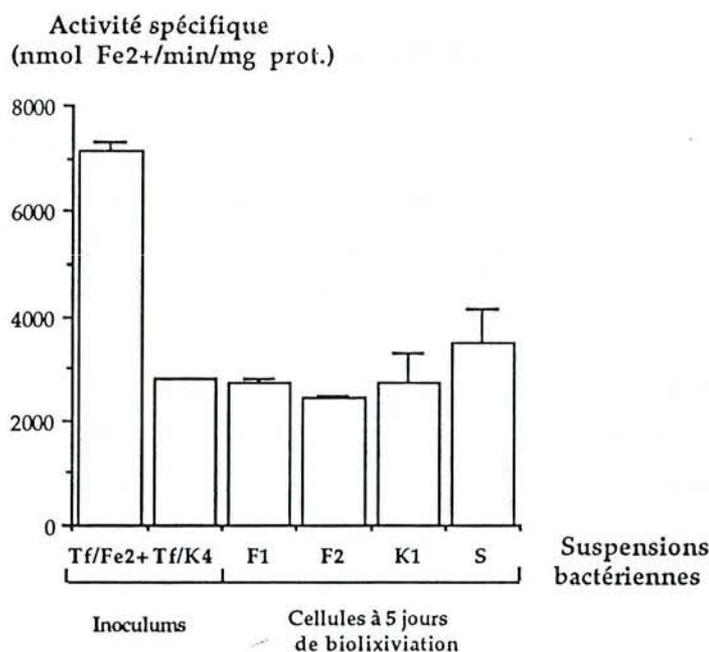


Figure IX.7.- Activité spécifique d'oxydation du Fe^{2+} des inoculums bactériens (cellules précultivées sur Fe^{2+} (Tf/ Fe^{2+}) ou sur la pyrite K4 (Tf/K4) et des cellules récoltées après 5 jours de biolixiviation dans les essais F1, F2, K1 et S.

Un tel résultat montre, comme l'ont proposé Suzuki *et al.* (1990) et Mustin (1992), que la surface du minéral conditionne l'activité bactérienne et suggère, comparativement à l'activité spécifique d'oxydation du fer mesurée dans les inocula, une répression de l'activité oxydante du fer par la présence de S^0 ou de composés soufrés.

La mesure effectuée pour les cellules prélevées en phase stationnaire de croissance (15 jours) a montré une activité oxydante du fer nulle pour l'ensemble des réacteurs (résultats non présentés), qui expliquerait l'augmentation de la concentration en Fe^{2+} dans les réacteurs en fin de biolixiviation, observée au chapitre V. Ce résultat ne signifie pas que les cellules sont totalement inactives. Elles peuvent conserver une activité oxydatrice du soufre qu'il faudrait vérifier. Les bactéries fixées peuvent aussi intervenir dans le processus d'oxydation du fer sans que l'on ait pu ici vérifier précisément cette activité : elles pourraient recycler le Fe^{3+} nécessaire aux réactions d'oxydation chimique.

4. Evolution de l'état de surface du minéral

a. Etudes par SIRT en réflexion diffuse

L'analyse des constituants minéraux présents sur la surface de la pyrite au cours des traitements avec les inoculums de trois origines (précultures sur soufre élémentaire, sulfate ferreux et pyrite) met en évidence une modification de l'état de surface concernant les sulfates ferreux et ferrique représentés par le massif M1 (figures IX.8. à IX.11.).

*** Spectres obtenus pour l'essai F1 (Figure IX.8.)**

Au premier jour, le spectre est différent de celui du témoin non inoculé. L'amplitude du massif M1 a augmenté et l'intensité des bandes d'absorption correspondant au sulfate ferreux (centrées sur 1060 cm^{-1}) est devenue relativement plus importante que celle du sulfate ferrique. Cette allure se prolonge jusqu'à 3 jours. Ces résultats indiquent la production de sulfate ferreux à la surface du minéral.

A partir de 4 jours, l'amplitude du massif diminue et les intensités relatives des bandes d'absorption du sulfate ferreux et du sulfate ferrique sont identiques. Ces observations indiquent qu'à partir de ce moment, la quantité de sulfates est moins importante à la surface de la pyrite.

A 15 jours, à la fin de l'oxydation du minéral, le massif M1 est pratiquement plat, ce qui indique que la quantité de sulfates est faible.

Le fait que le massif M1 évolue dès le premier jour indique le début de l'oxydation de la surface du minéral. L'évolution se caractérise par une production importante de sulfates ferreux. Les expériences en cas de contact bactérie-minéral (cf. Chapitre V) ont mis en évidence une évolution

semblable et ont permis de montrer que cette production initiale de sulfates ferreux est d'origine bactérienne.

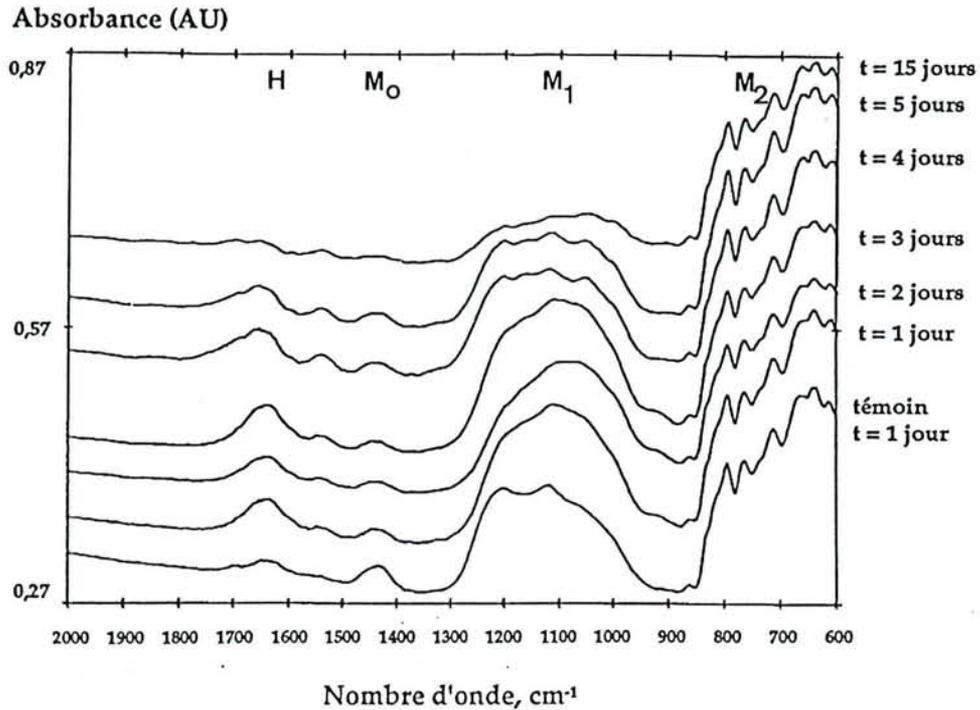


Figure IX.8.- Evolution des spectres infra-rouge en réflexion diffuse au cours du cycle de biolixiviation de la pyrite K4 (10-32 μm) inoculée par des cellules précultivées sur Fe^{2+} (essai F1).

* Spectres obtenus pour les essais S et K2 (Figures IX.9. et IX.10.)

Le spectre obtenu au premier jour est légèrement différent de celui de l'essai F1. L'amplitude de l'ensemble du massif M1 a augmenté par rapport à celle du témoin ; l'intensité des bandes d'absorption du sulfate ferreux a augmenté et celle du sulfate ferrique aussi, indiquant une oxydation du Fe^{2+} à la surface du minéral. Comparativement au spectre de l'essai F1, ce spectre indique que le début de l'oxydation met en jeu non seulement une oxydation des composés réduits du soufre pour donner lieu à la production de sulfate ferreux, mais également une oxydation du Fe^{2+} , pour conduire à la formation de sulfate ferrique.

A partir du deuxième jour, l'évolution des spectres est peu différente de celle observée pour l'essai F1.

* Spectres obtenus pour l'essai K1 (Figure IX.11.)

Leur évolution est semblable à celle observée pour l'échantillon F1, cependant elle est plus rapide : l'état de surface atteint à 3 jours est identique à celui atteint seulement à 4 jours pour l'essai F1 ainsi que pour les essais K2 et S. Ce résultat indique, comme la solubilisation de fer total, que le début de l'oxydation est plus rapide dans le cas de l'essai K1 que dans les autres cas. Cette

transformation plus rapide ne peut pas être attribuée, comme nous venons de le voir, à une activité spécifique d'oxydation du fer plus grande (Figure IX.7.).

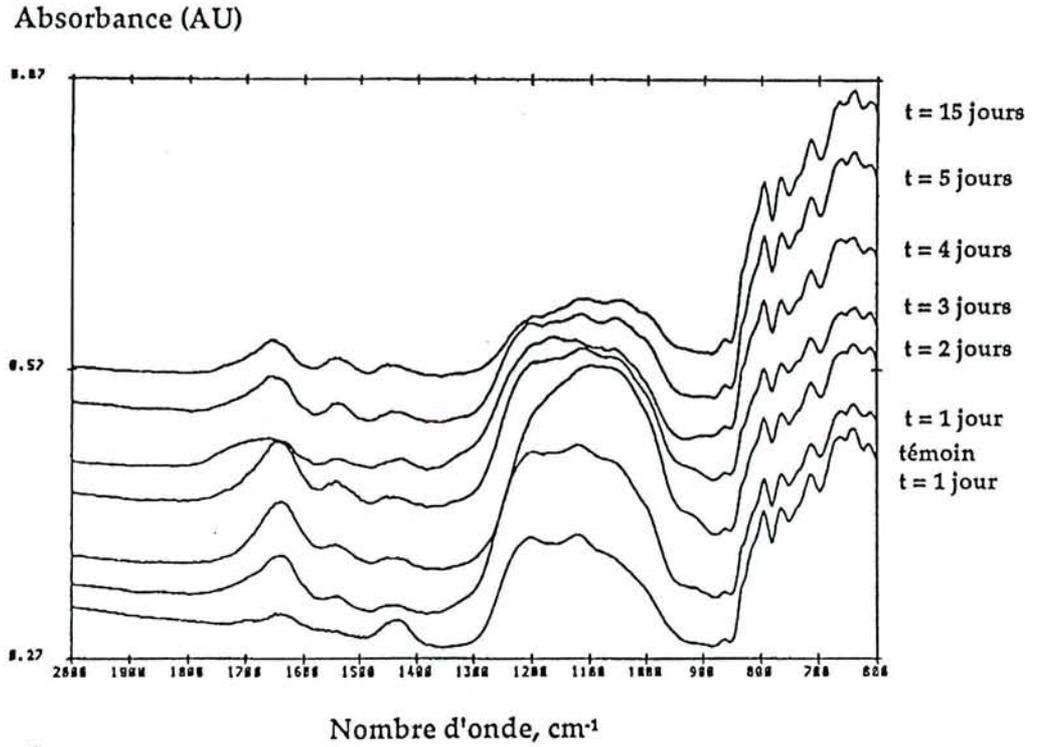


Figure IX.9.- Evolution des spectres infra-rouge en réflexion diffuse au cours du cycle de biolixiviation de la pyrite K4 (10-32 μm) inoculée par des cellules précultivées sur S^0 (essai S).

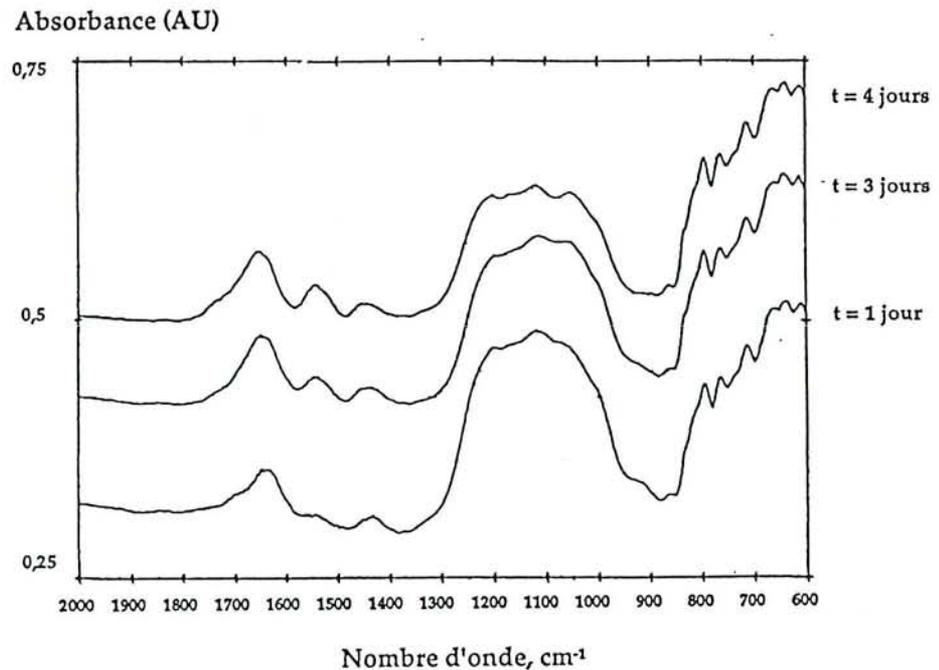


Figure IX.10.- Evolution des spectres infra-rouge en réflexion diffuse au cours du cycle de biolixiviation de la pyrite K4 (10-32 μm) inoculée par des cellules adaptées à la pyrite (essai K2).

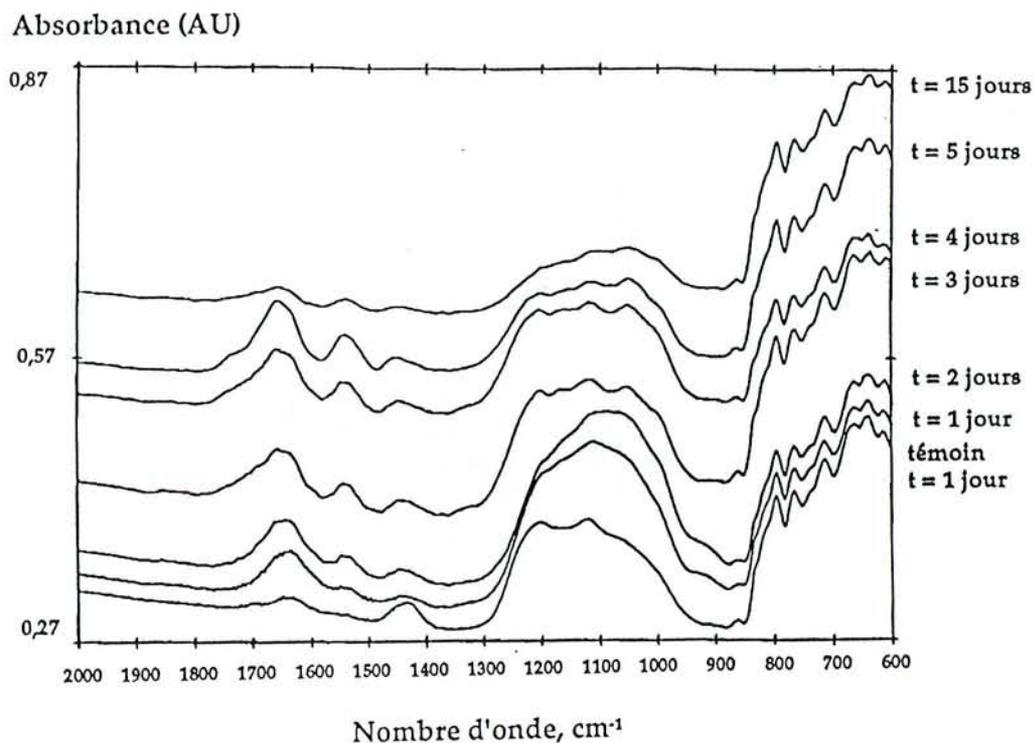


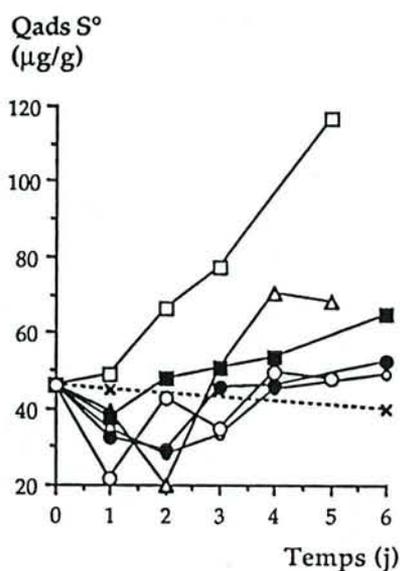
Figure IX.11.- Evolution des spectres infra-rouge en réflexion diffuse au cours du cycle de biolixiviation de la pyrite K4 (10-32 μm) inoculée par des cellules adaptées à la pyrite (essai K1).

b.- Dosage du soufre à la surface du minéral

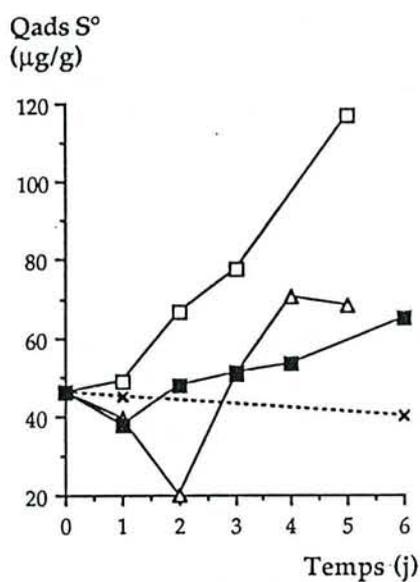
Cet autre constituant des phases superficielles des pyrites, qui peut provenir de l'oxydation chimique et bactérienne des sulfures et qui est une source d'énergie pour *T. ferrooxidans*, mérite d'être étudié précisément. Son dosage à la surface du minéral fournit en fait un bilan entre sa production et sa consommation.

Pour les essais Fo, F1 et F2 réalisés à partir des bactéries cultivées préalablement sur sulfate ferreux, ces dosages indiquent une chute initiale de la quantité de soufre au cours des 2 premiers jours, suivie d'une augmentation entre 2 et 6 jours. Ils suggèrent que les cellules consomment le soufre au cours des 2 premiers jours et qu'une production de soufre, par oxydation chimique et peut-être également bactérienne, des composés réduits du soufre (sulfures, polysulfures) a lieu après 2 jours.

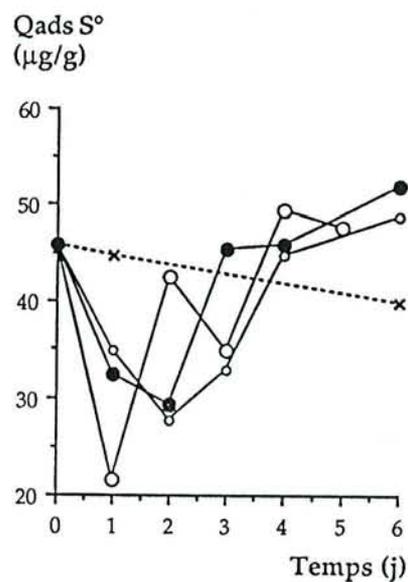
Pour l'essai S, réalisé à partir de bactéries adaptées au soufre élémentaire, on observe d'abord une consommation, puis une production rapide du soufre. Cette production, qui est relativement plus rapide que pour les essais Fo, F1 et F2 suggère que la préculture sur soufre semble plus favorable à l'oxydation des sulfures, que les précultures sur sulfate ferreux.



IX.12.a.



IX.12.b.



IX.12.c.

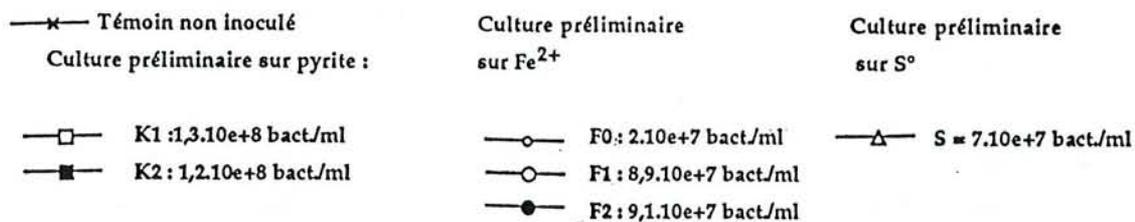


Figure IX.12.- Evolution du film de soufre superficiel au cours de la biooxydation de pyrite K4 (fraction 10-32 μm) par des cellules de *T. ferrooxidans* pré-cultivées sur des substrats différents.

Pour les essais K1 et K2, l'évolution est différente des précédentes. Pour le traitement K2, la chute initiale de la quantité de soufre est légèrement plus faible que précédemment et se limite au premier jour. Pour l'essai K1, le dosage permet de constater une faible production de soufre dès les premières 24 heures. Elle s'accélère ensuite. La production de soufre est, dans ce traitement, plus rapide et importante que dans les autres essais.

Ces résultats indiquent que les cellules consomment initialement le soufre présent à la surface minérale ; cette consommation est visible pour les essais F0, F1, F2 et S. Elle est faible dans l'essai K2 et non apparente dans l'essai K1, ce qui suggère dans ce cas, une production de soufre par oxydation, plus importante que la consommation par les cellules. Le moment à partir duquel cette production devient relativement importante par rapport à la consommation dépend de l'origine de l'inoculum, ce qui suggère que la production de soufre pourrait être due en partie aux bactéries : elle pourrait résulter de l'oxydation par les bactéries fixées, des composés réduits du soufre présents à la surface du minéral.

Les bactéries précultivées en présence de pyrite (traitements K1 et K2) montrent une activité importante, ou au moins plus importante, de production de soufre et donc d'oxydation des sulfures (Figure IX.12.b.). La dissolution du fer et l'évolution des sulfates présents à la surface minérale étaient également plus rapides pour l'essai K1 (Figure IX.6.), ce qui suggère que l'oxydation et la biolixiviation globale des pyrites seraient aussi rapides que le sont l'oxydation des sulfures et la production de soufre en surface des pyrites.

Pour les bactéries adaptées au Fe^{2+} , le fait que la production de soufre ne débute qu'après 2 jours suggère qu'une phase d'adaptation pour oxyder les sulfures serait nécessaire aux cellules.

— Dans tous ces traitements, quelle que soit l'origine de l'inoculum, les bactéries utiliseraient comme substrat énergétique de choix le soufre présent sur la surface des pyrites.

III.- ADHÉSION BACTÉRIENNE À LA FRACTION GRANULOMÉTRIQUE 10-32 μm

La jonction des points correspondant aux différentes mesures d'adhésion réalisées sur les particules fines (fraction 10-32 μm), avec des cellules de *T. ferrooxidans* récupérées en phase exponentielle, stationnaire, et cultivées sur des substrats différents permet d'obtenir une droite (Figure IX.13.). Ce résultat indique que les biooxydations correspondantes n'ont pas été réalisées dans des conditions de saturation physico-chimique du minéral par les bactéries, bien que la solubilisation minérale ait été optimale, à partir d'une inoculation de 5.10^7 bactéries/ml pour des cellules en phase exponentielle. Ces résultats sont en accord avec les expériences de biooxydation de Konishi *et al.* (1990 et 1992) et de Asai *et al.* (1992), dans lesquelles une concentration bactérienne non saturante a également été utilisée. Le modèle proposé par Asai *et al.* (1992) suggère aussi

l'obtention de lixiviations optimales en l'absence de saturation minérale, et l'inhibition du processus de biooxydation par une inoculation trop importante.

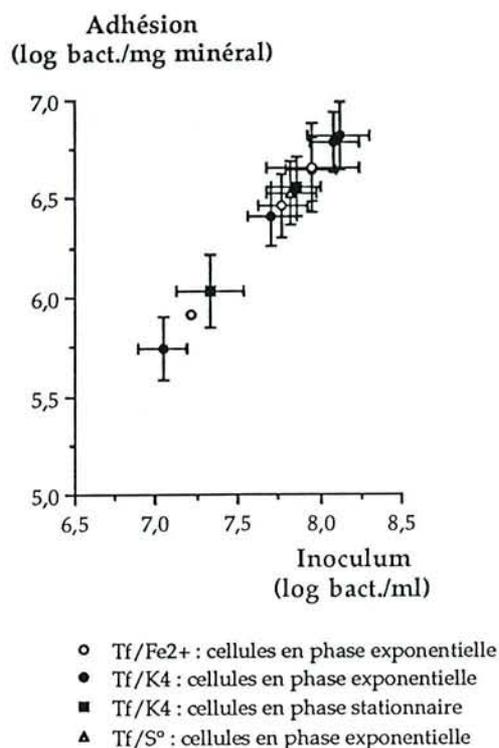


Figure IX.13.- Ensemble des mesures d'adhésion bactérienne à la pyrite K₄ (fraction 10-32 μm), de cellules de *T. ferrooxidans* récupérées en phase stationnaire ou exponentielle, et ayant subi des précultures sur des substrats différents.

Ce résultat montre également que le comportement de bactéries d'origines différentes est identique au cours du processus d'adhésion vis-à-vis de la surface du minéral. Cependant, l'évolution de la croissance bactérienne a montré une interaction Bactérie-Minéral différente, selon que les bactéries sont ou non adaptées au minéral. Cette différence se traduit par l'obtention d'une croissance des cellules non-adhérentes plus rapide pour les bactéries qui ont subi des précultures sur soufre et sulfate ferreux que pour celles précultivées sur pyrite, mais l'oxydation est meilleure si les bactéries ont été précultivées sur pyrite et sur soufre que sur sulfate ferreux. L'établissement d'isothermes d'adsorption, complétées par la mesure des bactéries fixées au cours des premiers jours de biooxydation, pourraient permettre de comprendre ces comportements différents.

IV.- CONCLUSION

Si la saturation du minéral en bactéries n'est pas nécessaire, l'induction de l'activité bactérienne par des précultures sur pyrite ou sur soufre paraît déterminante pour réaliser une biolixiviation optimale.

Les bactéries adaptées, par préculture, aux pyrites, voire au soufre élémentaire, présenteraient des activités potentielles meilleures pour l'oxydation et la biolixiviation des pyrites. Paradoxalement, les précultures sur sulfate ferreux favorisent l'activité spécifique d'oxydation du fer Fe^{2+} des bactéries *T. ferrooxidans*, mais ne favorisent pas du tout la biolixiviation des sulfures. Les réactions d'oxydation bactérienne des pyrites empruntent sans doute avantagement les voies d'oxydation des sulfures et du soufre qui apparaissent comme des voies privilégiées d'un point de vue énergétique. La production d'espèces oxydées : soufre élémentaire, sulfate ferreux, à la surface des pyrites au cours des premières phases de biolixiviation est très certainement d'origine bactérienne, car parallèle à la croissance des bactéries et se manifestant préférentiellement quand il y a possibilité de contact bactérie-minéral (Chapitres VIII et V).

Enfin, le dosage du soufre élémentaire présent à la surface du minéral au cours des premiers jours d'oxydation représente sans doute une approche originale de l'estimation de l'activité oxydante des bactéries vis-à-vis des sulfures.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion Générale et Perspectives

Les résultats de ce travail de recherche contribuent à l'acquisition de connaissances nouvelles sur les phénomènes interactifs entre microorganismes et minéraux, qui concernent ici plus particulièrement les mécanismes d'oxydation et lixiviation des minéraux sulfurés par *Thiobacillus ferrooxidans*. On peut distinguer plusieurs grands domaines qui portent sur : la mise en évidence, la mesure et la dynamique de l'adhésion ; l'incidence et la contribution du contact direct *T. ferrooxidans*-pyrite sur les processus de biooxydation ; la nature de certaines des réactions d'oxydo-réduction entre les bactéries fixées et les espèces minérales présentes à la surface de la pyrite.

Les principaux résultats peuvent être regroupés en trois grandes rubriques.

LA RENCONTRE *T. ferrooxidans*-PYRITE ET L'ADHÉSION BACTÉRIENNE

Mesures directe et indirecte de l'adhésion

L'adhésion bactérienne a été étudiée pour des concentrations bactériennes initiales (voisines de 10^7 bactéries/ml) permettant d'obtenir une lixiviation optimale de pyrite de granulométrie relativement fine, le plus souvent comprise entre 32 et 53 μm . Elle a d'abord été mesurée indirectement par les méthodes classiques de dénombrement (numération au microscope par cellule de Thoma, dénombrement des bactéries viables par la technique du NPP en milieu liquide et dénombrement par dilution sur milieux solides), en estimant la différence des concentrations des bactéries non-adhérentes avant et après contact. Ces concentrations ne sont pas toujours significativement différentes, et ces mesures indirectes ne mettent pas vraiment en évidence l'adhésion et conviennent peu à son estimation. Dans le but, non seulement d'étudier le phénomène d'adhésion, mais aussi de suivre plus spécifiquement la fixation et l'évolution des bactéries fixées de l'espèce *T. ferrooxidans* au cours de processus de biolixiviation, nous avons développé une méthode originale immunoenzymatique ELIFA (Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay) s'inspirant des méthodes ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Cette réaction met en évidence l'adhésion de *T. ferrooxidans* sur la pyrite et permet d'estimer directement la quantité de bactéries fixées au minéral. On obtient des résultats homogènes de fixation, voisins de ceux obtenus par les méthodes indirectes de mesure d'adhésion : une différence moyenne de 0,5 log apparaît entre les deux types de méthodes. Cette méthode est également précise, les intervalles de confiance étant inférieurs à 0,3 log. Elle est sensible et permet de détecter au minimum 10^4 bactéries/puits de plaque de microtitration. Les résultats obtenus semblent sous-estimer légèrement les bactéries fixées comparativement à l'estimation indirecte. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les anticorps ne réagissent pas avec la "face" bactérienne en contact avec les particules de pyrite, d'où cette sous-estimation de l'adhésion. On peut également envisager que l'élimination des bactéries du liquide interstitiel par lavage peut contribuer à cette différence : dans l'estimation indirecte de la fixation, ces bactéries sont en effet comptabilisées comme des bactéries adhérentes. Cette méthode ELIFA devrait permettre de réaliser des isothermes d'adsorption des bactéries à la pyrite et à d'autres sulfures, pour estimer une éventuelle affinité des cellules et la quantité maximale de bactéries capables de s'adsorber aux sulfures. Dans ce dernier cas, il y aura lieu de vérifier l'absence de saturation de la réaction immunoenzymatique en présence d'un nombre élevé de cellules adhérentes.

Estimation de la "Force" d'adhésion des bactéries au minéral

Les bactéries fixées ont également été estimées après désorption par un traitement physique et physico-chimique développé par Monroy *et al.* (1994) qui combine l'action mécanique du vortex et celle, physico-chimique, du Tween 80. Cette méthode permet d'étudier l'évolution des bactéries fixées au cours de la biooxydation et de distinguer deux classes de bactéries en fonction de leur "force" d'adhésion au minéral :

- les bactéries adhérant faiblement au minéral et récoltées par lavage de la pyrite à l'aide du milieu M2 (solution minérale) utilisé pour les cultures bactériennes,
- les bactéries adhérant fortement au minéral et désorbées par le Tween 80 et par action mécanique.

On constate ainsi qu'à 1 jour de contact, 68% des bactéries, soit environ $3,5 \cdot 10^5$ bactéries/mg étaient fortement fixées. Les estimations indirectes et directes de l'adhésion avaient mis en évidence de 10^5 à 10^6 bactéries fixées/mg de pyrite au cours des premières 24 h de contact. La coïncidence des résultats obtenus par ces deux méthodes au premier jour de contact montre qu'au cours du premier jour, l'adhésion bactérienne est forte et que la méthode de désorption permet de récolter la majorité des bactéries fixées.

Taux de recouvrement des pyrites en bactéries

Les mesures directe et indirecte ont permis d'estimer l'adhésion en moyenne à 5.10^5 bactéries/mg et conduisent à évaluer le taux de recouvrement à 1,3%, qui représente 350 bactéries par grain ou particule de pyrite. Ce taux de recouvrement devrait suffire à une détection et à une observation des bactéries en microscopie électronique à balayage (MEB).

Ces valeurs de taux de recouvrement (1 à 2 %) sont faibles par rapport à celles de 20 à 45 % déterminées par Ohmura *et al.* (1993) pour des particules de granulométrie voisine. Ce résultat serait dû à l'absence de saturation du minéral par les bactéries dans les conditions optimales de biolixiviation adoptées dans nos expériences. Ohmura *et al.* (1993) au contraire, s'étaient placés en conditions de saturation, en utilisant des inoculums beaucoup plus importants (1.10^9 bactéries/ml).

Réflexions sur les mécanismes d'adhésion

L'étude des propriétés électrochimiques de la pyrite et des bactéries, abordée par la mesure du potentiel ζ , indique que *Thiobacillus ferrooxidans* et le minéral ont des charges nettes de surface légèrement positives dans le milieu NaCl et à pH < 2 (+ 5 à + 10 mV), et légèrement négatives (- 5 à - 10 mV) dans le milieu de lixiviation M1. L'acquisition d'une charge négative dans le milieu M1, indique que les deux surfaces ont fixé en excès des anions, qui peuvent être les sulfates et/ou phosphates du milieu et que dans ce milieu de biolixiviation, les interactions électrostatiques entre les deux particules sont de nature répulsive.

Pour que l'adhésion et les interactions à courte distance (liaisons hydrogène, ioniques, covalentes) puissent s'établir, cette répulsion électrostatique doit être supprimée ou franchie. Ces conditions pourraient être remplies par l'action d'un liant multivalent qui réalise un pontage entre les cellules et la surface minérale et qui supprime les répulsions. Selon Blake *et al.* (1994), celui-ci pourrait être le Fe^{3+} en solution présent dans le milieu de biooxydation.

On pourrait également proposer un mécanisme dans lequel les bactéries interagiraient directement avec le fer (Fe^{3+} , Fe^{2+}) présent à la surface du minéral sous forme de sulfates ou d'oxyhydroxydes, mis en évidence par SIRTF. De telles interactions d'adhésion pourraient faire intervenir des récepteurs spécifiques du fer.

L'ensemble de ces réflexions suggère que l'interaction bactérie-minéral serait contrôlée par l'**Affinité** des cellules pour le Fe^{3+} ou le Fe^{2+} présent à la surface minérale. Cette affinité pourrait être due à une ou plusieurs protéines ou macromolécules de la membrane bactérienne qui seraient agents du mécanisme d'adhésion.

Les expériences en condition de contact total bactérie-minéral (totalité de la pulpe en contact avec les microorganismes) et de semi-contact (où la moitié de la pyrite est en contact avec les microorganismes) réalisées à l'aide d'un réacteur à deux compartiments séparés par une membrane

microporeuse, et les expériences en réacteur classique réalisées sur la fraction granulométrique 10-32 μm ont permis d'observer une solubilisation optimale de la pyrite quand les bactéries sont en nombre suffisant au contact du minéral. De tels résultats suggèrent la saturation des "sites actifs" du minéral par les cellules bactériennes, conduisant à l'obtention de la vitesse maximale d'oxydation. Ces "sites réactionnels" ou "sites biologiques" pourraient être considérés comme les sites engagés dans le processus d'oxydation à la suite du contact bactérie-minéral.

Mais des estimations de l'adhésion ont montré l'absence de saturation "physico-chimique" de la surface minérale, aux concentrations bactériennes initiales mises en jeu pour obtenir une oxydation efficace, ce qui suggère que, parmi l'ensemble des sites physico-chimiques de la surface du minéral impliqués dans l'adhésion bactérienne, on pourrait distinguer des sites biologiques qui seraient les sites actifs peut-être occupés en priorité par les bactéries, qui auraient pour eux une affinité la plus importante. Ces sites pourraient correspondre à des sites cristallographiques particuliers, dont il faudrait préciser la nature en étudiant par exemple l'affinité des bactéries pour les différentes espèces minérales pouvant exister à la surface de la pyrite. Ces expériences pourraient être effectuées en travaillant sur des surfaces modifiées ou avec des espèces minérales pures (S^0 , Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, Fe^0 , pyrite synthétique) ou avec d'autres sulfures (chalcopyrite Cu FeS_2 , galène PbS , covellite CuS , molybdénite MoS , sphalérite ZnS).

EVOLUTION DES BACTÉRIES ET DE LA SURFACE DU MINÉRAL AU COURS DE LA BIOOXYDATION

Le dénombrement des bactéries fixées après leur désorption par la méthode au Tween (Monroy *et al.*, 1994) montre que si la proportion de ces bactéries est importante (jusqu'à plus de 95 %) en début de lixiviation, elle devient faible en cours de biooxydation (5 à 10 %), mais la quantité de cellules fixées reste cependant constante (10^5 à 10^6 bactéries/mg de pyrite).

Les observations au MEB révèlent que l'état des bactéries sur la surface de la pyrite et l'état de surface du minéral évoluent au cours de la biooxydation.

Sur des échantillons de pyrite prélevés au cours de la phase d'amorce d'oxydation, on observe des bactéries à la surface du minéral. La fixation de l'échantillon en milieu liquide dans une solution de glutaraldéhyde a montré qu'une grande partie des cellules a été détachée par ce traitement, mais que des cellules restaient fortement fixées et présentaient même des figures de division, indiquant qu'une multiplication bactérienne se produit à la surface du minéral.

Au cours de la phase optimale d'oxydation, de nombreuses particules qui présentent la morphologie de bactéries, une surface grumeleuse, formant des amas et sont enrobées dans une phase superficielle, apparaissent nettement. Certaines d'entre elles possèdent un orifice à leur extrémité. Elles pourraient correspondre à des cellules entourées d'une gaine de précipités. Cette gaine empêche

probablement l'accès des nutriments aux bactéries et peut bloquer l'activité bactérienne, ce qui suggère que les cellules pourraient être en mauvais état physiologique ou mortes, et qu'une partie de ces particules pourrait en fait être des "fossiles" bactériens. Le nombre important des particules observé à la surface du minéral pourrait être dû à la persistance de ces gaines après la mort des cellules. Leur répartition en amas dans une phase superficielle suggère que les bactéries se sont multipliées à la surface minérale, mais aussi que des phénomènes de coprécipitation ont pu se produire. Parallèlement à ces dépôts ou amas bactériens, des bactéries actives doivent être présentes, puisque ces phénomènes sont observés en phase optimale d'oxydation. La nature de ces dépôts pourrait être vérifiée en les récoltant sans les modifier et en effectuant des observations au MET pour étudier leur structure et leur contenu, et des analyses élémentaires, par exemple par EELS (Energy Electron Loss Spectroscopy), pour préciser la composition de la gaine.

La présence de ces amas ou coprécipités bactériens suggère, si les cellules sont encore viables, que les dénombrements des bactéries fixées se font toujours par défaut, quelle que soit la méthode adoptée. Toutefois, l'incubation des cellules désorbées, en présence de pyrite ou de Fe^{2+} , permettrait de vérifier leur viabilité.

Pour vérifier que les bactéries se multiplient à la surface du minéral, il suffirait de réaliser une expérience de biooxydation dans laquelle la pyrite serait prélevée après avoir permis l'adhésion bactérienne, puis lavée pour éliminer les bactéries du liquide interstitiel, et remise en suspension dans du milieu stérile ne contenant pas de cellules. La mise en solution de bactéries et l'obtention d'une croissance montreraient qu'une multiplication cellulaire se produit à la surface minérale.

L'observation du minéral montre que certains grains étaient recouverts d'une phase pelliculaire grossière et de bactéries dès la phase optimale d'oxydation, alors que d'autres grains apparaissaient nus. Ces observations révèlent une hétérogénéité de la biooxydation qui pourrait être due à des propriétés différentes des particules minérales, liées entre autre au broyage, qui modifie les propriétés cristallographiques et le comportement électrochimique du minéral.

Au cours du ralentissement de l'oxydation, la surface apparaît totalement différente de celle observée au cours de la phase optimale. Les phases pelliculaires grossières, observées au cours de la phase optimale, ont disparu. Les bactéries fixées apparaissent également moins nombreuses. L'ensemble de ces observations suggère des modifications de propriétés de surface de la pyrite (charge de surface, propriétés électrochimiques), au cours de la biooxydation. L'étude des courbes intensité-potentiel d'échantillons de pyrite prélevés aux différentes étapes de biooxydation, comme l'ont déjà fait Mustin (1992) et Mustin *et al.* (1993a) pour des états initiaux et finaux de pyrites biolixiviées, apporterait des renseignements complémentaires intéressants. Il serait également important de déterminer la charge de surface des particules minérales aux différentes étapes de l'oxydation, par l'étude du potentiel ζ .

Un élément nouveau apparaît également à partir de la phase de ralentissement de l'oxydation : des agrégats volumineux qui semblent se développer progressivement au cours de la

phase stationnaire. Les observations au microscope optique après coloration au bleu de toluidine suggèrent qu'ils se sont formés par agrégation de bactéries et de précipités minéraux, autour de particules minérales corrodées, et qu'ils "séquestrent" des bactéries, en les empêchant d'être actives à la surface de la pyrite ou en solution. Le ralentissement de l'oxydation pourrait être lié à la formation de ces agrégats.

L'ensemble de ces résultats montre que, pour comprendre les réactions à l'interface Bactérie-Minéral, il est nécessaire de préciser la nature, la teneur, la localisation et l'évolution des espèces chimiques présentes à la surface minérale (par SIRT, ESCA ou XPS = spectroscopie de rayons X).

ETUDE DES RÉACTIONS À L'INTERFACE BACTÉRIE-MINÉRAL

Rôle du contact bactérie-minéral

Dans des expériences de biooxydation en réacteur classique, le début de l'oxydation et de la solubilisation de la pyrite fait suite à une adhésion forte (de 50 à 95 %) des bactéries *T. ferrooxidans* à la pyrite, suggérant un rôle déterminant des réactions d'oxydation directes réalisées par les bactéries fixées. L'utilisation d'un réacteur à deux compartiments séparés par une membrane microporeuse, séparant les bactéries du minéral, sans empêcher la diffusion des ions et molécules solubles, a bien mis en évidence que le contact bactérie-minéral, sans être nécessaire à l'oxydation des pyrites, accélère de façon très significative les processus. La phase de latence ou d'amorce de l'oxydation est beaucoup plus courte (3 jours contre 19 jours) qu'en l'absence de contact. Les vitesses initiales d'oxydation sont deux à trois fois plus élevées en phase exponentielle. Les expériences en condition de contact total et de semi-contact ont également montré que la vitesse d'oxydation dépend directement de la quantité de pyrite en contact avec les bactéries. Les bactéries fixées et au contact direct ont donc un rôle fondamental au cours de la phase d'amorce et au début de la phase optimale d'oxydation. Elles sont donc vraiment les catalyseurs de ce processus.

Le contact bactérie-minéral se traduit également par une production de biomasse plus importante qu'en l'absence de contact, ce qui souligne son aspect bénéfique du point de vue de la nutrition des cellules.

L'interaction des bactéries de l'espèce *T. ferrooxidans* avec la surface minérale conduit au développement à la surface minérale, de composés spécifiques du contact microorganisme-minéral, correspondant soit à des sulfates ferreux, soit à du soufre élémentaire, tous deux (Fe^{2+} et S^0) substrats énergétiques. Ces espèces seraient à la fois un produit de l'oxydation bactérienne et un substrat pour celle-ci. Elles résulteraient de l'oxydation bactérienne des sulfures (S^{2-}) et polysulfures (S_5S^{2-}). Ceci signifierait que *T. ferrooxidans* oxyderait préférentiellement les espèces soufrées réduites par

rapport au fer. L'oxydation des composés réduits du soufre par les bactéries fixées pourrait constituer l'un des rôles catalytiques essentiels des cellules adhérentes.

Influence de l'activité oxydante des cellules

Pour préciser l'importance des diverses activités "oxydantes" des bactéries, des expériences de biooxydation ont été effectuées en utilisant des inoculum cultivés préalablement sur des substrats différents (Fe^{2+} , S° , pyrite). L'activité oxydante potentielle du Fe^{2+} était la plus importante pour les cellules cultivées initialement sur Fe^{2+} . Cependant, les cellules ayant subi une préculture sur minéral ou sur S° étaient plus efficaces pour oxyder la pyrite K4. Le dosage du soufre à la surface minérale a montré que l'oxydation s'accompagne d'une production initiale de S° , qui est d'autant plus rapide que le processus d'oxydation est lui-même rapide. Les cellules adaptées à la pyrite assurent la production la plus rapide de soufre et celle de sulfate ferreux qui semble être caractéristique de l'activité des bactéries fixées. Ces résultats suggèrent que l'efficacité d'un inoculum et son adaptation à oxyder les pyrites sont directement liées à une aptitude importante des cellules à oxyder les composés réduits du soufre. Ces activités de production de soufre élémentaire et de sulfate ferreux seraient primordiales au cours des réactions d'amorce de l'oxydation du minéral. Bien qu'il soit communément admis que la production de soufre à la surface des pyrites soit exclusivement d'origine chimique, nos résultats suggèrent qu'elle peut être, au moins en partie, d'origine bactérienne. Cette hypothèse nécessite une démonstration plus précise en utilisant un réacteur à compartiments séparés. Si elle est vérifiée, elle indiquera que le dosage du soufre à la surface des pyrites est un moyen original d'estimer la capacité des bactéries à oxyder les pyrites.

Influence de la cristallogénie, de l'état de surface et de la granulométrie du minéral

Cette partie de l'étude a été abordée en comparant la biooxydation de deux pyrites ES et K2 ou K4, minéralogiquement pures (99 %) mais présentant des propriétés cristallogéniques légèrement différentes, et surtout des états de surface différents d'un point de vue quantitatif pour les espèces oxydées présentes.

Les différences cristallogéniques reposent essentiellement sur des différences de concentrations en arsenic (impureté minéralogique) qui sont de 0,3 % pour la pyrite ES, réparties de façon homogène dans la matrice cristalline, et seulement de 0,02 et 0,009 % pour les pyrites K2 et K4.

La pyrite ES présente, en surface, des quantités moindres d'espèces oxydées (sulfates ferreux et ferriques et oxyhydroxydes) que K2 et K4.

La pyrite K2, d'une plus grande pureté et contenant des espèces minérales oxydées en plus grande quantité que la pyrite ES, est oxydée plus lentement par la bactérie. La croissance et l'oxydation bactériennes nécessitent une phase de latence plus longue, ce qui suggère que les constituants de surface de la pyrite K2 pourraient constituer une barrière pour sa biooxydation.

Des phases de latence très différentes, tant pour la croissance que pour les phénomènes de dissolution et la formation en surface de produits d'oxydation majoritaires différents (sulfate ferreux pour K2 et soufre élémentaire pour ES) qui apparaissent en début de biolixiviation, suggèrent que les phases initiales d'oxydation des deux pyrites ES et K2 mettent en jeu des réactions différentes, qui dépendraient de l'état de surface initial du minéral, reflet des propriétés cristallographiques et électrochimiques.

Comme déjà montré par les résultats de Mustin (1992) et Mustin *et al.*, (1993 b), ces deux pyrites ont en effet, un comportement très différent qui se manifeste par une solubilisation du fer et des sulfates plus rapide pour la pyrite ES que pour la pyrite K2 et qui s'explique, au moins en partie, par des courants d'échange anodique plus importants pour ES que pour K2 (Mustin, 1992). La présence d'arsenic (0,3 %) pourrait catalyser la corrosion minérale, et notamment les réactions d'oxydation chimique et la production de soufre à la surface minérale, en mettant en jeu des phénomènes de couplage galvanique. Elle peut également induire des modifications physiques fragilisantes pour la pyrite (désordre cristallin, lacunes) qui constituent des sites de corrosion préférentiels.

Le soufre qui se forme abondamment à la surface de la pyrite ES au cours de sa biooxydation est également un agent promoteur de l'oxydation bactérienne (Mustin *et al.*, 1993 a).

La taille des particules joue aussi un rôle de premier plan. Pour une même pyrite, même si un broyage fin conduit au développement de plus grandes quantités d'espèces oxydées en surface, on observe une biolixiviation plus rapide pour des fractions fines (10-32 μm) que pour des fractions légèrement plus grossières (32-53 μm). Elle est due à une augmentation de la surface spécifique, donc de la concentration en substrat disponible et, sans doute, à une adhésion bactérienne plus importante. En même temps que l'oxydation bactérienne, l'oxydation chimique est amplifiée.

Mécanismes d'oxydation chimique et bactérienne

Les expériences réalisées au moyen du réacteur à compartiments séparés ont permis d'observer des vitesses d'oxydation et également des évolutions différentes des constituants superficiels pour les phénomènes d'origine bactérienne (oxydation mixte) et chimique *sensu stricto*. Lorsque la pyrite est en contact de *T. ferrooxidans*, des espèces de type sulfate ferreux se développent sur la surface du minéral en début d'oxydation (pour une solubilisation de 500 à 700 mg/l de fer). En revanche, pour la pyrite oxydée par mécanisme indirect, la quantité de sulfates diminue progressivement et le sulfate ferrique de la surface est réduit au contact de l'espèce FeS_2 . Ces résultats traduisent l'existence de deux mécanismes d'oxydation. L'oxydation chimique par le sulfate ferrique Fe^{3+} et l'oxydation bactérienne par les bactéries fixées ne s'adresseraient pas aux mêmes espèces présentes à la surface du minéral. L'existence de figures de corrosion différentes en cas d'oxydation bactérienne et chimique (Keller et Murr, 1982) conduit également à envisager des processus différents.

PERSPECTIVES

Pour bien définir les relations entre l'activité initiale des bactéries et les phases initiales de l'oxydation des pyrites, il semble particulièrement important de déterminer l'affinité des bactéries pour les espèces présentes sur la surface du minéral et de préciser les réactions d'oxydation des composés réduits du soufre en vérifiant l'origine de la production du soufre élémentaire, par l'utilisation de réacteurs à compartiments séparés. Ces études pourront s'accompagner du développement de méthodes de mesure et de suivi des espèces présentes à la surface des pyrites, comme les polysulfures, peu connus à l'heure actuelle (Lizama et Suzuki, 1989 ; Mustin, 1992).

La part de ces processus revenant aux bactéries fixées pourrait sans doute aussi être précisée dans des expériences en réacteurs à compartiments séparés.

La présence et l'évolution des espèces superficielles au cours des phénomènes de biooxydation seront à préciser en relation avec l'évolution des propriétés électrochimiques du minéral.

Les recherches à caractère appliqué, visant à l'extraction de métaux à partir de minerais sulfurés, devront être orientées vers :

- la détermination de la granulométrie permettant d'obtenir leur extraction optimale,
- la caractérisation des agrégats formés à partir de la phase de ralentissement de l'oxydation, pour éviter la "passivation" des surfaces et maintenir l'activité bactérienne,
- la détermination des "consortia" de microorganismes acidophiles conduisant aux meilleures rendements de biooxydation.

Bibliographie

Bibliographie

- Achouak W., Thomas F., and Heulin T., 1994. Physico-chemical surface properties of rhizobacteria and their adhesion to rice roots. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 3 : 131-137.
- Asai S., Konishi, Y. and Yoshida, K., 1992. Kinetic model for batch bacterial dissolution of pyrite particles by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Chem. Engin. Sci.*, 47 : 133-139.
- Attia Y.A. and Elzeky M., 1991. Effect of bacterial adaptation and solution replacement on bioleaching of sulfidic gold ores. *Minerals and Metallurgical Processing (August)* : 122-127
- Bailey L.K. and Peters, E., 1976. Decomposition of pyrite in acids by pressure leaching and anodization : the case of an electrochemical mechanism. *Can. Met. Quart.*, 15 : 333-344.
- Bailey A. D. and Hansford, G.S., 1993. Factors affecting bio-oxidation of sulfide minerals at high concentrations of solids : a review. *Biotechnol. Bioengin.*, 42 : 1164-1174.
- Battaglia F., 1994. Optimisation de la lixiviation bactérienne d'un concentré de pyrite cobaltifère. *Thèse Univ. Aix-Marseille I* : 191 p.
- Berthelin J., 1976. Etude expérimentale de mécanismes d'altération des minéraux par des microorganismes hétérotrophes. *Thèse Doctorat ès Sciences Naturelles, Univ. Nancy I*.
- Berthelin J., 1987. Les bactéries pour extraire des métaux. *La Recherche*, 188 : 720-725.
- Blake II R., Shute E.A., Waskovsky J. and Harrison Jr. A.P., 1992. Respiratory components in acidophilic bacteria that respire on iron. *Geomicrobiol. J.*, 10 : 173-192.
- Blake II R.C. and McGinness S., 1993. Electron-transfer proteins of bacteria that respire on iron. In Torma A.E., Apel M.L. and Brierley C.L. (Ed.), "Biohydrometallurgical Technologies" Vol. 2 "Fossil Energy Materials, Bioremediation, Microbial physiology", TMS Publ., Pennsylvania, 615-629.
- Blake II R.C., Shute E.A. and Howard G.T., 1994. Solubilization of minerals by bacteria : electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 : 3349-3357.
- Brierley C.L., 1978. Bacterial leaching. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 6 : 207-262.
- Boogerd F. C., van den Beemd, C., Stoelwinder, T., Bos, P. and Kuenen, J. G., 1991. Relative contributions of biological and chemical reactions to the overall rate of pyrite oxidation at temperatures between 30°C and 70°C. *Biotechnol. Bioengin.*, 38 : 109-115.
- Buonfiglio V., Polidoro M., Flora L., Citro G., Valenti P., and Orsi N., 1993 a. Identification of two outer membrane proteins involved in the oxidation of sulphur compounds in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 11 : 43-50.
- Buonfiglio V., Polidoro M., Valenti P., English R.S., Lorbach S.C., and Shively J.M., 1993 b. Characterization of outer membrane proteins involved in the oxidation of sulfur in *Thiobacillus spp.* In Torma A.E., Apel M.L. and Brierley C.L. (Eds.), "Biohydrometallurgical

Technologies" Vol. 2 "Fossil Energy Materials, Bioremediation, Microbial physiology", TMS Publ., Pennsylvania : 587-595.

- Busscher H.J. and Weerkamp A.H., 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46** : 165-173.
- Collinet-Latit M.N., 1989. Lixiviation bactérienne par *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxydans* d'un concentré de flottation arsénopyriteux aurifère (réfractaire à la cyanuration directe). Thèse Univ. Aix-Marseille I.
- Corbett C.M. and Ingledew W.J., 1987. Is Fe³⁺/Fe²⁺ cycling an intermediate in sulphur oxidation by Fe²⁺-grown *Thiobacillus ferrooxidans*? *FEMS Microbiol.Lett.*, **41** :1-6.
- Criado M. T., Suarez, B. and Ferreiros, C. M., 1994. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. *Food Technol.*, **48** : 123-126.
- Crundwell, F.K., 1988. The influence of the electronic structure of solids on the anodic dissolution and leaching of semi-conducting sulfide minerals. *Hydrometallurgy*, **21** : 155-190.
- Cwalina B., Weglarz L., Dzierzewicz Z., and Wilczok T., 1988. Dependence of effectiveness of leaching of metallic sulphides on enzymes involved in iorganic sulphur metabolism in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28** : 100-102.
- Cwalina B., and Dzierzewicz Z., 1991. Adaptation dependent metabolic activity of bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. *Acta Biologica Cracoviensia Series : Botanica*. Vol. XXXIII : 1-11.
- Das A., Mishra A.K. and Roy P., 1992. Anaerobic growth on elemental sulfur using dissimilar iron reduction by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol.Lett.*, **97** : 167-172.
- de Donato Ph., Mustin, C., Berthelin, J. and Marion, Ph., 1991. An infrared investigation of pellicular phases observed on pyrite by scanning electron microscopy during its bacterial oxidation. *C.R. Ac. Sci. Paris*, **312**, série II : 241-248.
- de Donato Ph., Mustin, C., Benoit, R., and R. Erre., 1993. Surface oxidised species, a key factor in the study of bioleaching processes. Part I : an approach to spatial distribution of iron and sulphur species present on pyrite surface. *In* Torma A.E., Wey, J.E., and V.I. Lakshmanan (Eds.), "Biohydrometallurgical Technologies volume 1 : Bioleaching Processes", TMS Publ., Pennsylvania : 163-174.
- Devasia P., Natarajan K.A., Sathyanarayana D.N. and Rao R., 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ.Microbiol.*, **59** : 4051-4055.
- Dommergues Y., et Mangenot, F., 1970. *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cie, Paris.
- Dziurla, M.A., Monroy, M., Lam, B.T., Picquot, S. and Berthelin, J., 1992. A method to estimate the acidophilic bacteria (*Thiobacillus ferrooxidans*) attached to pyrite. Comparison with counts of non-adhering bacteria on solid media. *In* "Proc. 6th Int. Symp. on Microbial Ecology (ISME-6)", Barcelona : 288.
- Ehrlich H.L., 1990. *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ehrlich, H.L., and C.L. Brierley. 1990. *Microbial Mineral Recovery*. Mac Graw-Hill, U.S.A.
- Ehrlich H.L., Ingledew, W.J. and Salerno, J.C., 1991. Iron- and manganese oxidizing bacteria. *In* J.M. Shively and L.L. Barton (Eds), "Variations in autotrophic life". Academic Press, London : 147-170.

- Fletcher M., 1991. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv. Microb. Physiol.*, 32 : 53-85.
- Gouzou L., 1992. Devenir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante : cas de *Bacillus polymyxa*. Thèse de Doctorat Univ. Nancy I.
- Halfmeier H., Schäfer-Treffenfeldt W. and Reuss M., 1993a. Potential of *Thiobacillus ferrooxidans*. for waste gas purification . Part 1. Kinetics of continuous ferrous iron oxidation. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 40 : 416-420.
- Halfmeier H., Schäfer-Treffenfeldt W. and Reuss M., 1993b. Potential of *Thiobacillus ferrooxidans*. for waste gas purification . Part 2. Increase in continuous ferrous iron oxidation kinetics using immobilized cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40 : 582-587.
- Hallmann R., Friedrich A., Koops H.P., Pommerening A., Rohde K., Zenneck C. and Sand W., 1992. Physiological characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* and physicochemical factors influence microbial metal leaching. *Geomicrobiol. J.*, 10 : 193-206.
- Harrisson A.P. Jr., 1984. The acidophile *Thiobacilli* and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Ann. Rev. Microbiol.*, 38 : 265-292.
- Hazeu W., Schmedding D.J., Goddijn O., Bos P. and Kuenen J.G., 1987. The importance of the sulfur oxidizing capacity of *Thiobacillus ferrooxidans* during leaching of pyrite. In Neijssel O.M., Van Der Neek R.R., Luyben K.Ch.A.M. (Eds.), "Proc. 4th Europ. Cong. on Biotechnology, 3 ", Elsevier, Amsterdam : 497-499
- Holmes, D.S. and Ul Haq, R., 1989. L'adaptation de *Thiobacillus Ferrooxidans* à des fins industrielles . In Salley J., Mc Gready R.G.L. and Wichlacz P. L. (Eds.), "Biohydrometallurgy-1989", Canmet, Ottawa, Canada : 115-123.
- Hooper A.B. and Dispirito A.A., 1985. In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol. Rev.*, 49 : 140-157.
- Hugues B. and Plantat J.L., 1982. Calcul du nombre le plus probable et de son intervalle de confiance dans le cas où le nombre d'inoculum par dilution est important. *Chemosphère*, 11 : 1135-1140
- Ingledeu W.J., Cox, J.C. and Halling, P.J., 1977. A proposed mechanism for energy conservation during Fe²⁺ oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* ; chemiosmotic coupling to net H⁺ influx. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2 : 193-197.
- Ingledeu W.J., 1982. *Thiobacillus ferrooxidans* : The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta*, 683 : 89-117.
- Jensen A. B. and Webb C., 1994. A trickle bed reactor for ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Techniques*, 8 : 87-92.
- Jerez C. A., and R. Arredondo. 1990. Immunological Methods for the quantification of the industrially important bioleaching microorganisms. *Arch. Biol. Med. Exp.*, 23 : 89-92.
- Johnson D. B., Macvicar J.H.M. and Rolfe S., 1987. A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus Ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 7 : 9-18

- Johnson D. B. and McGinness S., 1991. A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **13** : 113-122
- Johnson D. B., S. McGinness and M.A. Ghauri. 1993. Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiol.Rev.* **11**, 63-70.
- Karamanev D. G. and Nikolov L. N., 1988. Influence of some physicochemical parameters on bacterial activity of biofilm : ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioengin.*, **31** : 295-299.
- Kawakami K., Sato, J., Kusunoki, K., Kusakabe, K. and S. Morooka, 1988. Kinetic study of oxidation of pyrite slurry by ferric chloride. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **27** : 571-576.
- Keller L. and Murr L. E., 1982. Acid-bacterial and ferric sulfate leaching of pyrite single crystals. *Biotechnol. Bioengin.*, **24** : 83-96.
- Konishi, Y., Asai, S. and Katoh H., 1990. Bacterial dissolution of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*.. *Bioprocess Engin.*, **5** : 231-237.
- Konishi, Y., Kubo, H. and Asai, S., 1992. Bioleaching of zinc sulfide concentrate by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioengin.*, **39** : 66-74.
- Kuenen J.G., Pronk J.T., Hazeu W., Meulenber R. and Bos P., 1993. A review of Bioenergetics and enzymology of sulfur compound oxidation by acidophilic Thiobacilli. In Torma A.E., Apel M.L. and C.L. Brierley (Ed.), "Biohydrometallurgical Technologies" Vol. 2 "Fossil Energy Materials, Bioremediation, Microbial Physiology", TMS Publ., Pennsylvania : 487-495.
- Kulpa C.F., Mjoli, N. and M.T. Roskey, 1986. Comparison of iron and sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* : inhibition of iron oxidation by growth on sulfur. In Ehrlich, H.L. and D.S. Holmes (Eds.), "Workshop on biotechnology for the mining, metal refining and fossil-fuel processing industries. Biotechnology and bioengineering symposium n° 16", John Wiley and Sons Publ. : 289-295.
- Larsson L., Olsson, G., Holst, O. and Karlsson, H. T., 1993. Oxidation of pyrite by *Acidianus brierleyi* : importance of close contact between the pyrite and the microorganisms. *Biotechnol.Lett.*, **15** : 99-104.
- Leduc L.G. and Ferroni G.D., 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* . *FEMS Microbiol. Rev.*, **14** : 103-120.
- Lizama H. M. and Suzuki, I., 1989. Rate equations and kinetic parameters of the reactions involved in pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55** : 2918-2923.
- Lorbach S.C., Buonfiglio V., Bauld J.M. and Shively J.M., 1993. Oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans* 23270 and *Thiobacillus ferrooxidans* FC. In Torma A.E., Apel M.L. and Brierley C.L. (Ed.), "Biohydrometallurgical Technologies" Vol. 2 "Fossil Energy Materials, Bioremediation, Microbial Physiology", TMS Publ., Pennsylvania, 443-453.
- Marion P., Mustin, C., Monroy, M. and Berthelin, J., 1991. Effect of auriferous sulfide minerals structure and composition on their bacterial weathering. In Pagel, M., and Leroy, J. (Eds.), "Source, Transport and Decomposition of Metals", Balkerma, Rotterdam, 561-564.
- Matin A., 1990. Keeping a neutral cytoplasm ; the bioenergetics of obligate acidophiles. *FEMS Microbiol. Rev.*, **75** : 307-318.

- Mackintosh M.E., 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol*, **105** : 215-218.
- McNulty T.P. and Thompson D.L., 1990. Economics of bioleaching. In Ehrlich, H.L. and Brierley, C.L. (Eds.). "Microbial Mineral Recovery". McGraw-Hill Publ. Co., 171-182.
- Monroy M. G., 1993. Biolixiviation - cyanuration de minerais sulfurés aurifères réfractaires en dispositifs de percolation : comportement des populations de *Thiobacillus ferrooxidans* et influence de la minéralogie et des conditions opératoires. **Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy** : 238 p.
- Monroy M. G., Dziurla, M. A., Lam, B.-T., Berthelin, J. and Marion P., 1994. A laboratory study on the behavior of *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite bioleaching in percolation columns. In Galindo E. and Ramirez O. T. (Eds) : "Advances in Bioprocess Engineering", Kluwer Academic Publ., Netherlands : 509-517.
- Mustin C., 1992. Approche physico-chimique et modélisation de l'oxydation bactérienne de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans*.: rôle déterminant de la phase minérale. **Thèse Univ. Nancy I** : 222 p.
- Mustin C., de Donato Ph., Berthelin J. and Marion Ph., 1993a. Surface sulphur as promoting agent of pyrite leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEM'S Microbiol. Rev.*, **11** : 71-78.
- Mustin C., de Donato, Ph. and J. Berthelin, 1993 b. Surface oxidised species, a key factor in the study of bioleaching processes. Part II : Investigation of superficial oxidised species developed during the bacterial oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. In Torma A.E., Wey, J.E. and V.I. Lakshmanan (Eds.), "Biohydrometallurgical Technologies" Vol. 1 "Bioleaching processes", TMS Publ., Pennsylvania : 175-184.
- Muyzer G., de Bruyn A.C., Schmedding D.J.M., Bos P., Westbroek P. and Kuenen G.J., 1987. A combined immunofluorescence-DNA-fluorescence staining technique for enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* in a population of acidophilic bacteria. *Appl. Environ Microbiol*, **53** : 660-664.
- Natarajan K. A., 1990. Electrochemical aspects of bioleaching of base-metal sulfides. In Ehrlich H. L. and Brierley C. L. (Eds) : "Microbial Mineral Recovery" McGraw-Hill, Inc., New York : 79-106.
- Nikolov L. N. and Karamanev D. G., 1992. Kinetics of the ferrous iron oxidation by resuspended cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Prog.*, **8** : 252-255.
- Nunzi F., 1993. Relations structure/fonction de la rusticyanine chez *Thiobacillus ferrooxidans* : du fermenteur au cristal. **Thèse Univ. Aix-Marseille I**.
- Ohmura N., Kitamura K. and Saiki H., 1993a. Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** : 4044-4050.
- Ohmura N., Kitamura K. and Saiki H., 1993 b. Mechanism of Microbial flotation using *Thiobacillus ferrooxidans* for pyrite suppression. *Biotechnol. Bioengin.*, **41** : 671-676.
- Oliver D. J., VanSlyke J.K., 1987. In Norris P.R. and Kelly D.P. (Eds.), "BioHydroMetallurgy", *Proc. Intern. Symp.*, Warwick 1987, Antoni Rowe Ltd, Chippenham, Wiltshire, UK, : 119-126.
- Osorio G., Varela P., Arrendondo R., Seeger M., Amaro A.M. and Jerez C.A., 1993. Changes in global gene expression of *Thiobacillus ferrooxidans* when grown on elementary sulphur. In Torma A.E., Apel M.L., and C.L. Brierley (Eds.), "Biohydrometallurgical Technologies. Vol. 2 "Fossil Energy Materials, Bioremediation, Microbial Physiology", TMS Publ., Pennsylvania : 565-575.

- Pichuantes S., Garrido J., Leighton V., and Rodriguez M., 1986. Studies on native strains of *Thiobacillus ferrooxidans* : II. comparative fine structure. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 8 : 284-291.
- Pistaccio L., Curutchet G., Donati E. and Tedesco P., 1994. Analysis of molybdenite bioleaching by *Thiobacillus ferrooxidans*.in the absence of iron^{II}. *Biotechnol.Lett.*, 16 : 189-194.
- Pogliani C., Curutchet G., Donati, E. and Tedesco P. H., 1990. A need for direct contact with particle surfaces in the bacterial oxidation of covellite in the absence of a chemical lixiviant. *Biotechnol. Lett.*, 12 : 515-518.
- Pronk J.T., Meulenberg R., Hazeu W., Bos P. and Kuenen J.G., 1990. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.*, 75 : 293-306.
- Pronk J.T., De Bruyn J.C., Bos P. and Kuenen J.G., 1992. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 2227-2230.
- Pronk, J.T., and D.B. Johnson. 1992. Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. *Geomicrobiol. J.*, 10, 153-171.
- Pulgar V. Nunez L., Moreno F., Orellana O. and Jedlicki E., 1993. Expression of rusticyanin gene is regulated by growth condition in *Thiobacillus ferrooxidans*. In Torma A.E., Apel M.L. and C.L. Brieley (Eds.), "Biohydrometallurgical Technologies" Vol. 2 "Fossil Energy Materials, Bioremediation, Microbial Physiology", TMS Publ., Pennsylvania : 541-548.
- Rawlings D.E. and Kusano T., 1994. Molecular Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.*, 58 : 39-55.
- Rosenberg M. and Doyle R.J., 1990. Microbial cell surface hydrophobicity : history, measurement and significance. In Doyle R.J. and Rosenberg M. (Eds) : "Microbial cell surface hydrophobicity", Amer. Soc. for Microbiol. : 1-37.
- Rouas C., 1988. Production de solutions de sulfate ferrique par *Thiobacillus ferrooxidans*, à partir de pyrite. Application à la lixiviation d'un minerai d'Uranium. Thèse Univ. Aix-Marseille I .
- Solari J.A., G. Huerta B. Escobar T. Vargas, R. Badilla-Ohlbaum and J. Rubio. 1992. Interfacial Phenomena affecting the Adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to Sulphide Mineral Surfaces. *Colloids and Surfaces* 69 : 159-166.
- Somlev V. and Tishkov, S., 1994. Anaerobic corrosion and bacterial sulfate reduction : application for the purification of industrial wastewater. *Geomicrobiol. J.*, 12 : 53-60.
- Southam G., and T. J. Beveridge. 1992. Enumeration of *Thiobacilli* within pH-Neutral and acidic Mine Tailings, and their role in the development of Secondary Mineral Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 1904-1912.
- Spor H., 1994. Contribution à l'étude de l'intervention des microorganismes sur la mobilité de radioéléments fixés dans des matériaux de confinement de déchets radioactifs. Thèse Univ. Nancy I : 138 p.
- Stenström T.A., 1989. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 : 142-147
- Sugio T., Domatsu C., Munakata O., Tano T. and Imai K., 1985. Role of a ferric ion-reducing system in sulfur oxidation of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 1404-1406.

- Sugio T., Wada K., Mori M., Inagaki K. and Tano T., 1988a. Synthesis of an iron-oxidizing system during growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on sulfur-basal salts medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** : 150-152.
- Sugio T., Katagiri T., Moriyama M., Li Zhen Y., Inagaki K. and Tano T., 1988b. Existence of a new type of sulfite oxidase which utilizes ferric ions as an electron acceptor in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** : 153-157.
- Sugio T., Katagiri T., Inagaki K. and Tano T., 1989. Actual substrate for elemental sulfur oxidation by sulfur : ferric ion oxidoreductase purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **973** : 250-256.
- Sugio T., Suzuki H., Oto A., Inagaki K., Tanaka G. and Tano T., 1991. Purification and some properties of a hydrogen sulfide-binding protein that is involved in sulfur oxidation of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Agric. Biol. Chem.*, **55** : 2091-2097.
- Sugio T., White K.J., Shute E., Choae D. and Blake II R.C., 1992. Existence of a hydrogen sulfide : ferric ion oxidoreductase in iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** : 431-433.
- Suzuki I., Takeuchi T.L., Yuthasastrakosol T.D., and Key Oh J., 1990. Ferrous iron and sulfur oxidation and ferric iron reduction activities of *Thiobacillus ferrooxidans* are affected by growth on ferrous iron, sulfur, or a sulfide ore. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56** : 1620-1626.
- Thomas F., 1987. Mécanismes de rétention à l'interface Alumine-solution aqueuse. Thèse Doctorat ès Sciences, Université Nancy I.
- Thomas F., 1998 Bases et méthodes physico-chimiques pour l'étude de l'adhésion des microorganismes. Communication personnelle. Laboratoire d'Environnement et de Minéralogie.
- Tuovinen O.H., Kelly D.P., 1973. Studies on the Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Mikrobiol.*, **88** : 285-298.
- van Loosdrecht M.C.M., Liklema J., Norde W., Schraa G. and Zehnder A.J.B., 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial stems of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53** : 1898-1901.
- van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W. and Zehnder A.J.B., 1990. Influence of interfaces on microbiol activity. *Microbiol. Rev.*, **54** : 75-87.
- Yamanaka T., Yano T., Kai M., Tamegai H. and Fukumori Y., 1991. The electron transfert system in an acidophilic iron-oxidizing bacterium. In Y. Mukohata (Ed.), "New era of bioenergetics", Academic Press, Tokyo : 223-246.
- Yamanaka T., Yano T., Kai M., Tamegai H. and Fukumori Y., 1993. The electron transport system coupled to the oxidation of Fe²⁺ in *Thiobacillus ferrooxidans*. In Torma A.E., Apel M.L., and C.L. Brieley (Eds.), "Biohydrometallurgical Technologies" Vol. 2 "Fossil Energy Materials, Bioremediation, Microbial Physiology", TMS Publ., Pennsylvania : 453-461.
- Yeh T.Y., J.R. Godshalk, G.J. Olson, and R.M. Kelly. 1987. Use of Epifluorescence Microscopy for characterizing the Activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on Iron Pyrite. *Biotechnol. Bioengin.*, **30** : 138-146.
- Yelloji Rao, M. K., K.A. Natarajan, and P. Somasundaran. 1992. Effect of biotreatment with *Thiobacillus ferrooxidans* on the floatability of sphalerite and galena. *Minerals and Metallurgical Processing* **9** : 95-100.

Zottola, E. A., 1994. Microbial attachment and biofilm formation : a new problem for the food industry. *Food Technol.*, 48 : 107-114.

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

EDS = Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy

EELS = Energy Electron Loss Spectroscopy

ELISA = Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ELIFA = Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay

ESCA = XPS = Spectroscopie de photons X

MEB = Microscopie Electronique à Balayage

MET = Microscopie Electronique en Transmission

NPP = Nombre le Plus Probable

SIRTF = Spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

SIRD = Spectrométrie Infra-Rouge (à Transformée de Fourier) en Réflexion Diffuse



Nom: DZIURLA

Prénom: Marie-Antoinette

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I
en GÉOMICROBIOLOGIE



VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 29 DEC. 1995 n° 525

Le Président de l'Université



RÉSUMÉ

La lixiviation bactérienne des minéraux sulfurés a été étudiée en abordant essentiellement trois aspects des interactions de *Thiobacillus ferrooxidans* avec des pyrites pures en réacteur agité :

- l'adhésion ou la "fixation" bactérienne au minéral,
- la contribution du contact direct bactérie-minéral aux processus d'oxydation de la pyrite,
- les réactions d'oxydo-réduction se produisant à l'interface bactérie-minéral.

La mise au point d'une méthode immunoenzymatique ELIFA (Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay) a permis de mettre en évidence et d'estimer directement l'adhésion de *T. ferrooxidans* à la pyrite. La désorption des bactéries (Monroy *et al*, 1994) a conduit à observer que si 60 à 95 % des bactéries sont fortement fixées au premier jour de contact, leur proportion devient faible au cours de la biooxydation (5 à 10 %) mais leur quantité reste cependant constante (10^5 à 10^6 bactéries/mg de pyrite). La mesure des charges nettes des bactéries et du minéral par électrophorèse (mesure du potentiel électrocinétique, ζ) a amené à discuter du mécanisme d'adhésion. De l'observation en MEB des pyrites, on a également pu constater une évolution des bactéries fixées au cours de la biooxydation.

L'utilisation d'un réacteur à deux compartiments séparant les bactéries du minéral par une membrane microporeuse a permis d'établir que le contact bactérie-minéral, sans être nécessaire à l'oxydation des pyrites, accélère de façon très significative le processus. Les vitesses initiales d'oxydation dépendent directement de la quantité de minéral en contact avec les bactéries, ce qui souligne encore le rôle fondamental de ce contact direct au cours des phases initiales d'oxydation. Ce contact se traduit par exemple par la production à la surface minérale, de sulfate ferreux (substrat énergétique), ce qui suggère déjà que *T. ferrooxidans* oxyde préférentiellement les espèces sulfurées réduites (sulfures) par rapport au fer.

L'utilisation d'inocula cultivés sur des substrats différents (Fe^{2+} , S^0 , pyrite) montre que les bactéries ayant subi une préculture sur pyrite ou sur S^0 sont les plus efficaces pour oxyder la pyrite. L'oxydation s'accompagne d'une production simultanée de S^0 sur la surface du minéral ; les cellules adaptées à la pyrite ont permis d'obtenir la production la plus rapide de soufre et de sulfate ferreux. Ces résultats suggèrent que l'adaptation bactérienne au minéral et l'efficacité d'un inoculum sont directement liées à la capacité des bactéries à oxyder les composés réduits du soufre. Bien qu'il soit communément admis que la production de soufre à la surface du minéral soit exclusivement d'origine chimique, ces résultats suggèrent qu'elle peut être en partie d'origine bactérienne.

Mots clef : *T. ferrooxidans*, pyrite, adhésion bactérienne, contact Bactérie-Minéral, activité oxydante des bactéries, biolixiviation.