



HAL
open science

Microflore bactérienne des milieux riches en métaux et métalloïdes

Fabienne Battaglia-Brunet

► **To cite this version:**

Fabienne Battaglia-Brunet. Microflore bactérienne des milieux riches en métaux et métalloïdes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Provence - Aix-Marseille I, 2010. tel-00628067

HAL Id: tel-00628067

<https://theses.hal.science/tel-00628067>

Submitted on 30 Sep 2011

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.



Université de Provence (Aix-Marseille I)
UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches présenté par
Fabienne Battaglia-Brunet (BRGM)

Microflore bactérienne des milieux riches en métaux et métalloïdes

Soutenue le 16 juin 2010 à l'ESIL

Membres du Jury :

M. Jean-Claude SIGOILLOT (ESIL), Professeur, Président du Jury et Rapporteur
Mme Florence ARSENE-PLOETZE (Université de Strasbourg), Maître de Conférences, Rapporteur
M. Christophe DAGOT (ENSIL), Professeur, Rapporteur
M. Bernard OLLIVIER (IRD), Directeur de Recherche, Garant d'Habilitation
M. Alain DOLLA (CNRS), Directeur de Recherche
M. Dominique MORIN (BRGM), Responsable d'Unité



Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien de la Direction de la Recherche du BRGM.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'égard de Dominique Morin et Bernard Ollivier qui m'ont d'abord encouragée à rédiger un mémoire, puis aidée à l'améliorer, et enfin m'ont épaulée dans les démarches de finalisation de cette Habilitation à Diriger les Recherches. Un grand merci à mon mari, Jean-François, qui a relu et corrigé ce mémoire.

Je voudrais adresser tous mes remerciements à mes collègues, techniciennes, techniciens, ingénieurs et chercheurs, à tous les chercheurs d'autres institutions avec qui j'ai eu la chance de collaborer, et à tous les étudiants stagiaires qui ont très largement contribué à l'obtention des résultats décrits dans le présent mémoire.

Microflore bactérienne des milieux riches en métaux et métaalloïdes

1. Introduction	1
2. Bactéries des milieux aérobies riches en métaux et métaalloïdes.....	4
3. Milieux anaérobies : précipitation de métaux et métaalloïdes par les BSR..	25
4. Projet de Recherche : Biogéochimie des réacteurs naturels et artificiels..	42
5. Bibliographie	50
6. Curriculum Vitae	68

1. Introduction

Les environnements naturellement riches en métaux et métalloïdes sont aujourd'hui considérés comme des niches écologiques très intéressantes, voire stratégiques, pour des domaines aussi divers que les sciences environnementales, la géomicrobiologie, l'étude de l'évolution des micro-organismes et l'exobiologie. Les organismes extrémophiles issus de ces milieux sont susceptibles de recéler des enzymes originales pour diverses applications. Cet ensemble de biotopes naturels riches en métaux comprend (1) les régions volcaniques à sources chaudes ou lacs acides, dont le parc de Yellowstone aux Etats-Unis est l'exemple le plus célèbre ; (2) les sources hydrothermales profondes ; et (3) les zones d'affleurement naturel de gisements métallifères, dont l'altération peut générer des eaux acides chargées en métaux.

L'intérêt particulier suscité par les fluides hydrothermaux d'origine volcanique et les sources hydrothermales profondes est lié à la théorie selon laquelle ils pourraient représenter des modèles de l'environnement primitif qui aurait abrité les premières formes de vie (Miller and Bada, 1988 ; Shock et al., 1998). Certains lacs salins ou hyper-salins et formations évaporitiques peuvent également contenir de fortes concentrations en métaux. Ainsi, les lacs alcalins Mono et Searle en Californie sont des modèles pour le cycle de l'arsenic (Oremland et al., 2005). La combinaison de processus géothermaux et évaporitiques peut conduire à des dépôts très riches en sulfures d'arsenic, comme à Salar de Ascotan au Chili (Demergasso et al., 2007).

En exploitant les ressources minérales depuis des millénaires, les hommes ont créé de nouveaux environnements riches en métaux et métalloïdes. L'extraction des minerais a mis en contact les couches géologiques, ou les déchets miniers, avec de l'eau et de l'oxygène, induisant l'oxydation sulfures de métaux et métalloïdes par des bactéries chimiolithotrophes acidophiles (Ledin and Pedersen, 1996 ; Johnson et al., 2002). Ce phénomène, appelé drainage minier acide, peut avoir un impact non négligeable sur l'environnement dans les régions où l'activité minière est, ou a été, importante. Les eaux de surfaces sont acidifiées et enrichies en métaux dissous, des particules chargées en métaux sont formées et transportées, et les sédiments des cours d'eau sont pollués sur de longues distances. En Europe, le site du Rio Tinto est exceptionnel à plusieurs titres. Ce cours d'eau traverse sur 100 km la plus large formation géologique pyriteuse au monde, qui est également une région minière depuis 4 500 ans (Leblanc et al., 2000). Cette rivière acide (pH 2) doit sa couleur rouge à une forte concentration en fer ferrique, pouvant atteindre 20 g.l⁻¹. L'écosystème du Rio Tinto est donc particulièrement intéressant, puisqu'il a évolué d'abord sur un fond géologique original et ensuite sous la contrainte d'une activité minière très ancienne (Lopez-Archilla et al., 2001 ; Zettler et al., 2003). Le cas d'Iron Mountain, en Californie, est également particulier : dans cette ancienne mine de cuivre, située dans une zone aride, les processus bactériens classiques se combinent à l'évaporation pour générer une eau extrêmement chargée en acide sulfurique et en métaux. Des valeurs de pH négatives (-3,6) et des concentrations en métaux atteignant 200 g.l⁻¹ ont été relevées dans les fluides de résurgence des anciennes galeries de cette mine (Nordstrom et al., 2000). Les biofilms d'Iron Mountain se développent à des valeurs de pH comprises entre 0,5 et 1 (Bond et al., 2000), et des archéobactéries oxydant le fer, capables de croître à pH 0, colonisent activement ces eaux extrêmement acides (Edwards et al., 2000). Au-delà de ces exemples spectaculaires, le drainage minier acide est rencontré sur tous les continents, partout où des minerais sulfurés ont été exploités (<http://www2.brgm.fr/DMA/>). Il pose un réel problème, car jusqu'à présent aucune

solution n'a été trouvée pour stopper ce phénomène et éviter d'avoir à traiter les eaux polluées pendant des dizaines, voire des centaines d'années. Parmi les environnements naturels enrichis en métaux et métalloïdes par les activités humaines, citons également les sédiments (portuaires, marins, fluviaux), biotopes souvent anaérobies au sein desquels les métaux sont soit séquestrés sous forme de sulfures par les bactéries sulfato-réductrices, soit utilisés par des micro-organismes comme accepteurs finaux d'électrons (Elsken et al., 1991 ; Tebo et Obratzova, 1998).

D'autres environnements riches en métaux et générés par les activités humaines sont beaucoup plus confinés et contrôlés. Des bactéries, apparentées aux micro-organismes des drainages miniers acides, sont mises en œuvre pour extraire des métaux (or, cuivre, cobalt) à partir des minerais sulfurés (Morin, 2007). Ainsi, des bioréacteurs de taille imposante (1350 m³) sont par exemple utilisés pour extraire du cobalt par biolixiviation à Kasese, en Ouganda (Morin et D'Hugues, 2006). D'autres types de bioréacteurs sont conçus pour réaliser à l'inverse la précipitation de sulfures métalliques dans le but de traiter des eaux ou effluents chargés en métaux ou métalloïdes. Dans ces systèmes, des bactéries sulfato-réductrices induisent une augmentation de pH et produisent du sulfure d'hydrogène (Lens et al., 2002). Dans les procédés dynamiques à faible temps de séjour, les bactéries qui produisent du sulfure d'hydrogène ne sont généralement pas directement en contact avec l'acidité et les fortes teneurs en métaux des effluents, grâce à un dispositif de précipitation en amont du bioréacteur (Rowley, 1997). Par contre, certains systèmes passifs de grande dimension peuvent être directement alimentés avec une eau de drainage minier acide (Johnson et Hallberg, 2005).

Tous ces biotopes très divers, riches en métaux et métalloïdes, sont actuellement restreints à des zones géographiques isolées de l'environnement occupé par la biosphère des organismes supérieurs. Cela est probablement lié au fait que de nombreux éléments métalliques présentent une solubilité élevée à pH acide, mais beaucoup plus faible dans des valeurs de pH proches de la neutralité en conditions oxydantes. Or, les ressources en eau occupées et utilisées par les organismes supérieurs sont aérées et présentent un pH neutre. Le fer, le cuivre, le nickel, le cobalt, le zinc, présents sous forme cationique dans les eaux et effluents acides issus d'activités minières, précipitent sous forme d'hydroxydes ou d'autres composés solides lorsque le pH s'élève. Par contre, certains éléments métalliques ou métalloïdes qui se trouvent sous la forme de complexes anioniques, tels que l'arsenic, le chrome, le sélénium et l'uranium, peuvent être présents en concentrations élevées dans des eaux à pH neutre. Ces éléments posent donc un problème particulier en cas de contamination des ressources en eau. En effet, si la plupart des métaux et métalloïdes sont indispensables au bon fonctionnement du métabolisme des organismes supérieurs à faible, voire très faible dose, ils deviennent extrêmement toxiques lorsqu'ils s'accumulent dans les cellules. A titre d'exemple, le fer et le cuivre sont d'importants cofacteurs dans les processus de transport d'électrons et dans de nombreuses métallo-enzymes. Le zinc est un élément catalytique dans plus de 300 enzymes et joue un rôle critique dans la structuration de diverses protéines (Eide, 2001). Mais, lorsque leur concentration est élevée dans l'eau, les aliments ou dans les poussières inhalées, les métaux ou métalloïdes induisent diverses pathologies aiguës ou chroniques. Pour mémoire, les teneurs maximales tolérées dans les eaux destinées à la consommation humaine (décret no 2001-1220 du 20 décembre 2001) s'élèvent à 1 mg.l⁻¹ pour le cuivre, 200 µg.l⁻¹ pour le fer et l'aluminium, 50 µg.l⁻¹ pour le manganèse et le chrome, 25 µg.l⁻¹ pour le plomb, 10 µg.l⁻¹ pour l'arsenic et 5 µg.l⁻¹ pour l'antimoine et le cadmium.

Les mécanismes par lesquels ces espèces chimiques perturbent le métabolisme sont extrêmement divers et demeurent en cours d'élucidation. Le cas de l'arsenic est exemplaire, car des études épidémiologiques ont été menées sur de larges populations exposées à de l'arsenic par l'intermédiaire de l'eau de boisson, au Bangladesh, en Inde, mais aussi au Chili, en Argentine et à Taiwan (Hopenhayn, 2006). Une image simplifiée des effets induits par l'arsenic inorganique est généralement donnée de la façon suivante : l'As(V), analogue du phosphate, perturbe le métabolisme énergétique, et l'As(III) se fixe aux groupements thiols des protéines. En fait, les processus par lesquels l'arsenic affecte la santé humaine sont beaucoup plus nombreux et complexes. Il apparaît que les études sur animaux ne sont pas de bons modèles et ne peuvent être extrapolées au genre humain. L'arsenic cause ou augmente le risque de nombreuses maladies, dont certaines sont observées dans différentes régions affectées par la présence d'arsenic dans les ressources en eaux : des kératoses et cancers de la peau, des cancers internes (poumon, vessie), des formes de diabète, des maladies vasculaires, de l'hypertension, des désordres neurologiques et des impacts négatifs sur la reproduction. Les mécanismes biologiques par lesquels l'arsenic induit ces diverses pathologies ne sont pas entièrement élucidés, mais le rôle de certains processus a été démontré. L'arsenic ingéré ne cause pas directement de mutations génétiques, mais agit indirectement par induction d'altérations chromosomiques, de stress oxydatif, de prolifération cellulaire, et d'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN. Les épidémies de ces différentes maladies touchent les populations dont les ressources en eau potable sont contaminées par l'arsenic inorganique présent à des concentrations de l'ordre de 0,1 à 1 mg.l⁻¹.

L'arsenic est toxique pour la plupart des organismes supérieurs, mais les micro-organismes ont développé diverses stratégies pour résister à ce métalloïde. Certains d'entre eux peuvent même l'utiliser en tant que substrat de croissance. Les bactéries acidophiles présentent des niveaux de résistances aux métaux et métalloïdes, dont l'arsenic, beaucoup plus élevés que ceux des micro-organismes neutrophiles (Dopson et al., 2003). Dans les bioréacteurs réalisant la biolixiviation des minerais d'or contenant de l'arsénopyrite, des micro-organismes acidophiles se développent en présence de 10 g.l⁻¹ d'arsenic. Leurs principaux substrats énergétiques sont les formes réduites du soufre et du fer, et jusqu'à présent, il n'a pas été montré que l'arsenic peut être utilisé par ces bactéries comme source d'énergie. Certains mécanismes de résistance à l'arsenic, tels que ceux conférés par l'opéron *ars*, sont utilisés à la fois par les bactéries neutrophiles et par les organismes acidophiles, tels que *Acidithiobacillus caldus* (Tuffin et al., 2005) et *Leptospirillum ferriphilum* (Tuffin et al., 2006). L'opéron *ars* permet aux cellules de réduire l'As(V) puis d'expulser l'As(III) par une pompe à efflux énergie-dépendante (Rosen, 1999). Cependant, certains mécanismes de résistance demeurent inconnus, comme par exemple celui qui permet à l'archéobactérie acidophile *Ferroplasma acidarmanus* de résister à l'As(V). Bien que ne possédant pas l'As(V)-réductase de l'opéron *ars* dans son génome (Baker-Austin et al., 2007), cette bactérie n'est pas affectée par 10 g.l⁻¹ d'As(V) dans son milieu de croissance. Chez certaines bactéries neutrophiles ou acido-tolérantes, l'As(III) peut être utilisé comme source d'énergie (Santini et al., 2000) et l'As(V) comme accepteur terminal d'électrons (Saltikov et Newman, 2003). Les bactéries participent alors activement au cycle biogéochimique de l'arsenic à travers leur métabolisme.

Les micro-organismes possèdent donc des mécanismes leur permettant de résister à des teneurs en métaux et métalloïdes bien supérieures à celles qui sont tolérées par la plupart des autres organismes vivants (mis à part certains végétaux hyper-accumulateurs,

Pollard 2008). La capacité de certaines bactéries à intégrer les réactions d'oxydo-réduction des métaux et métalloïdes dans leur métabolisme énergétique leur confère un rôle actif dans le cycle biogéochimique de ces éléments. Quelques procédés mettant en œuvre ces micro-organismes sont très anciens, puisque la biolixiviation des minerais est appliquée depuis des siècles. Cependant, certains mécanismes biogéochimiques potentiellement exploitables sont encore en cours d'élucidation ou demeurent à explorer. Dans cette perspective, le développement et l'optimisation de nouveaux procédés dans les domaines du traitement d'eau ou de la récupération des métaux seraient envisageables. Les études effectuées dans le contexte de la microbiologie classique décrivent les réactions bactériennes dans des milieux riches autorisant une croissance cellulaire rapide. La mise en œuvre de procédures expérimentales simulant les conditions géochimiques des milieux réels devrait permettre l'identification de processus originaux, ouvrant la voie à de nouvelles applications en bioréacteur.

Le BRGM s'est investi depuis plusieurs dizaines d'années dans la mise au point de procédés innovants dans les domaines de l'exploitation des ressources minérales et de la réhabilitation des sites pollués. L'objectif principal de ces recherches est de proposer des technologies peu coûteuses, économes en énergie, et dont l'impact négatif sur l'environnement serait minimal.

Le présent mémoire présente les travaux auxquels j'ai contribué au BRGM, de 1994 à 2009, dans les domaines de la biolixiviation des minerais, du traitement biologique des eaux chargées en métaux et métalloïdes en conditions aérobies ou anaérobies, et de la compréhension des processus biogéochimiques dans certains environnements miniers.

2. Bactéries des milieux aérobies riches en métaux et métalloïdes

2.1 Concentrations en fer et microflore de la biolixiviation

(référence aux articles 1, 2, 4, 5, 8 et 10)

La biolixiviation des minerais sulfurés est une technologie permettant de récupérer des métaux de valeur (or, cuivre, cobalt...) à pression atmosphérique et température modérée (de 10 à 80°C) à partir des minerais sulfurés et permet de traiter des minerais pauvres. Ce procédé présente divers avantages environnementaux par rapport aux techniques classiques de minéralurgie (oxydation sous pression ou grillage des minerais). Pendant de nombreuses années, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (anciennement nommé *Thiobacillus ferrooxidans*) a été considérée comme la principale bactérie responsable de la biolixiviation. Cette bactérie utilisant la réaction d'oxydation du fer ferreux comme source d'énergie a d'ailleurs fait l'objet du premier brevet relatif à la biolixiviation (Zimmerley et al., 1958), et de nombreux travaux de recherche depuis son isolement en 1951 (Temple et Colmer, 1951). Un des principaux mécanismes responsables de l'oxydation rapide des sulfures au cours de la biolixiviation est en effet la régénération rapide du fer ferrique (Fe^{3+}) qui est chimiquement converti en Fe^{2+} lors de sa réaction avec les sulfures solides (Schéma 1). La méthode la plus couramment appliquée pour enrichir une population bactérienne en bactéries capables d'oxyder le fer ferreux, dans le but de les isoler ultérieurement, est d'ensemencer un milieu contenant du fer ferreux en quantité suffisante pour faire se développer des bactéries utilisant ce substrat comme source d'énergie. Cette méthode classique, appliquée à l'isolement de bactéries acidophiles ferro-oxydantes, autotrophes et mésophiles à partir d'échantillons d'environnements miniers (drainages miniers acides, bioréacteurs de biolixiviation...) conduit

de façon quasi-systématique à la sélection puis à l'isolement de souches d'*Acidithiobacillus ferrooxidans*. Cependant, l'utilisation de plus en plus fréquente de méthodes moléculaires pour identifier les micro-organismes présents et actifs au sein des réacteurs de biolixiviation a révélé qu'*Acidithiobacillus ferrooxidans* n'est pas l'acteur principal du processus de biolixiviation, il ne fait même pas partie de l'ensemble des organismes dominants dans ces milieux. Plusieurs études ont montré que les bactéries majoritairement présentes dans les bioréacteurs appartiennent aux espèces *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* et au genre *Sulfobacillus* (Pizzaro et al., 1996 ; De Wulf-Durand et al., 1997 ; Rawlings et al., 1999a). Ce sont des bactéries appartenant au genre *Leptospirillum* qui réalisent le plus souvent l'oxydation du fer ferreux dans les bioréacteurs.

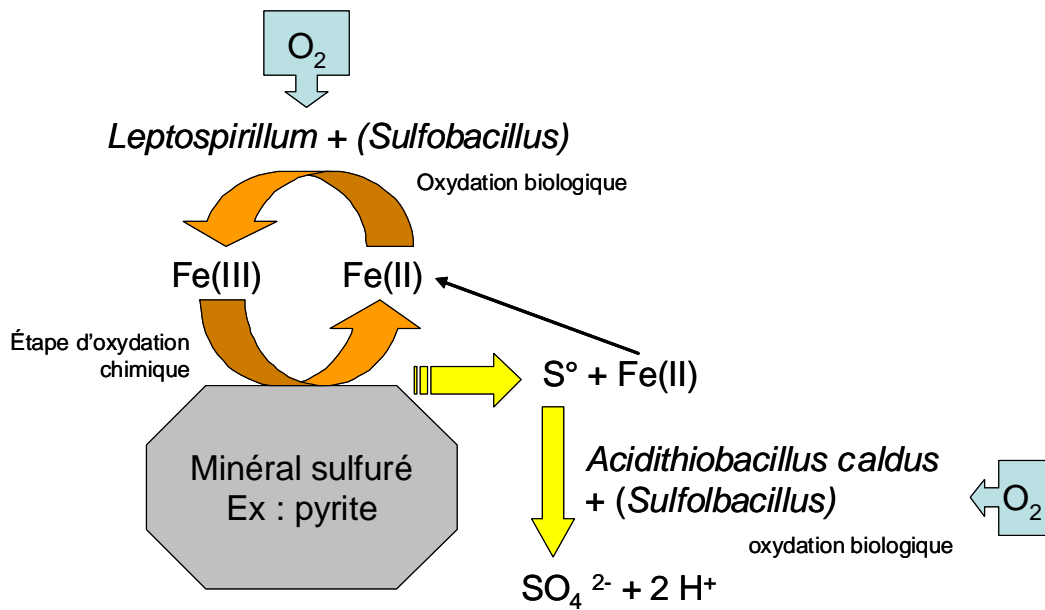
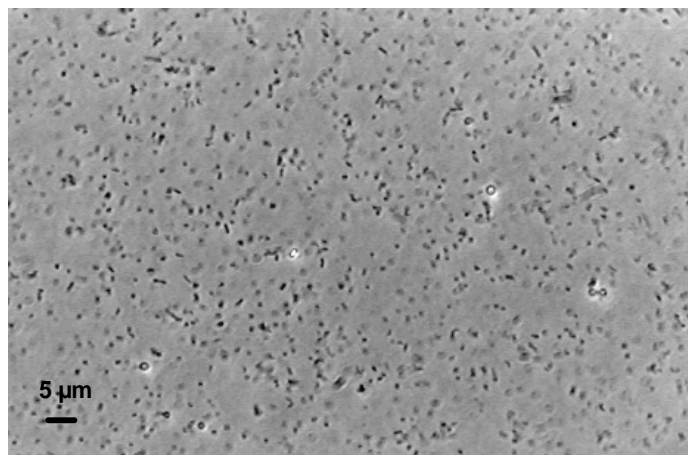


Schéma 1 : Principe de l'oxydation de la pyrite par les principales espèces bactériennes présentes dans les réacteurs de biolixiviation.

La photographie 1 montre un état frais observé au microscope optique (grossissement x 400) de la phase liquide d'un bioréacteur de biolixiviation.



Photographie 1. Phase liquide d'un réacteur de biolixiviation observée au microscope optique (grossissement x 400), état frais. La concentration bactérienne est de l'ordre de 10^9 bactéries par ml.

Pour quelle raison l'utilisation d'un milieu d'enrichissement contenant du fer ferreux en concentration élevée conduit-elle à faire émerger un organisme minoritaire, *Acidithiobacillus ferrooxidans*? Il semblerait que le rapport Fe^{2+}/Fe^{3+} ait une influence sur les vitesses de croissance relatives de *Acidithiobacillus ferrooxidans* et de *Leptospirillum*. La première souche de *Leptospirillum*, *L. ferrooxidans*, a été isolée par Markosyan en 1972, dans une mine de cuivre en Arménie. Cette bactérie se développe sous plusieurs formes, cocci, vibrios ou spirilles. A part *Leptospirillum*, aucun autre genre bactérien se présentant sous forme de vibrio ou de spirille n'a pour l'instant été identifié dans les bioréacteurs de biolixiviation.

Plusieurs auteurs ont remarqué la présence d'organismes morphologiquement apparentés à *Leptospirillum* dans des cultures mixtes utilisant la pyrite (FeS_2) comme source d'énergie (Norris, 1983 ; Helle and Onken, 1988). La pyrite est un des minéraux les plus riches en fer au sein des minerais sulfurés. Bien que *Leptospirillum* ne soit pas capable d'oxyder le soufre, certaines souches de *Leptospirillum* peuvent directement utiliser la pyrite comme substrat de croissance (Sand, 1992). Un des principaux caractères qui expliqueraient la prédominance de *Leptospirillum* dans les réacteurs de biolixiviation est sa plus grande affinité pour le fer ferreux ($K_m = 0,25$ mM) que celle d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* pour le même substrat ($K_m = 1,34$ mM ; Norris et al., 1987). Or, le milieu de biolixiviation contient beaucoup de fer ferrique et très peu de fer ferreux, principalement à proximité de la surface de la pyrite, sur laquelle adhère facilement *Leptospirillum* (Norris et al., 1987). Si *Acidithiobacillus ferrooxidans* possède une activité spécifique d'oxydation du fer ferreux supérieure à celle de *Leptospirillum* à faible potentiel d'oxydo-réduction (rapport Fe^{2+}/Fe^{3+} élevé), sa capacité à oxyder le fer s'amenuise lorsque le potentiel augmente, jusqu'à s'annuler lorsque le potentiel est supérieur ou égal à 840 mV (Rawlings et al., 1999b).

Lorsque nous avons commencé à travailler au BRGM sur la biolixiviation de la pyrite cobaltifère de Kasese (Ouganda), en 1989, l'inoculum utilisé n'était supposé contenir que des organismes apparentés à *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Acidithiobacillus thiooxidans* (Collinet-Latil, 1989). A cette époque, les méthodes de suivi des populations bactériennes par biologie moléculaire étaient peu répandues. Au cours des expériences d'optimisation du procédé d'extraction de cobalt à partir de la pyrite cobaltifère, des organismes présentant des morphologies typiques de *Leptospirillum* sp., vibrios et spirilles, ont été détectés à l'occasion des observations au microscope optique de la population bactérienne biolixivante. Etant donné que la croissance de *Leptospirillum* au sein de populations mixtes semblait favorisée par les substrats pyriteux, nous avons supposé qu'il pouvait exister un lien entre la concentration en fer ferrique et la croissance de *Leptospirillum*. Norris et al. (1987) et Johnson (1991) avaient déjà observé que *Leptospirillum* supportait mieux qu'*Acidithiobacillus* de fortes concentrations en fer ferrique. En se basant sur cette hypothèse, nous avons utilisé un milieu de culture contenant des quantités équivalentes de fer ferreux et de fer ferrique afin de sélectionner puis d'isoler des souches de *Leptospirillum* à partir de la population bactérienne utilisée pour biolixivier la pyrite cobaltifère (**article 1, Annexe 1**). Au cours des repiquages successifs dans ce milieu contenant initialement du fer ferrique, les formes typiques de *Leptospirillum* deviennent majoritaires. Nous avons ensuite montré que les souches de *Leptospirillum* isolées (L6 et L8) sont davantage résistantes au fer ferrique que la population totale et que leur développement est plus rapide en présence de fer ferrique, jusqu'à 14 g.l⁻¹ pour L6 et jusqu'à 8 g.l⁻¹ pour L8 (**articles 1 et 2**). La stimulation de la croissance de L6 et L8 par le fer ferrique est un phénomène intéressant, qui n'a jamais été mentionné par ailleurs, ni

antérieurement ni ultérieurement à la parution de l'**article 1**. Nous avons ensuite dénombré sélectivement au microscope optique (bactéries fixées entre lame et lamelle par de la gélose, observation au grossissement $\times 1000$) les cellules présentant des morphologies typiques de *Leptospirillum* (vibriosis et spirilles) et les cellules présentant des morphologies en bâtonnets. Cette méthode a deux défauts : elle ne permet pas d'assigner les cellules coccoïdes à l'un ou l'autre des deux groupes, et elle ne permet de dénombrer que les cellules libres dans la phase liquide. Nous l'avons utilisée pour étudier la composition de la population bactérienne au cours de deux opérations de biolixiviation de la pyrite cobaltifère en pilote de 100 litres, réalisées en 1994 et 1995 (**article 5**). Nous avons pu montrer que la concentration en cellules présentant la morphologie typique de *Leptospirillum* augmente exponentiellement dans la phase liquide avec la concentration en fer ferrique jusqu'à 60 g.l^{-1} (figure 1) alors que la concentration en bâtonnets n'évolue pas au-dessous de 60 g.l^{-1} de Fe^{3+} , puis diminue pour les concentrations en fer ferrique supérieures. Au cours d'expériences réalisées ultérieurement, il a été possible de comparer les pourcentages de bactéries apparentées à *Leptospirillum* déterminés par la méthode directe au microscope optique et par une méthode moléculaire semi-quantitative, la Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP, **articles 8 et 10**). La technique SSCP est fondée sur la structure secondaire propre qu'adopte un fragment d'ADN simple brin, en conditions non dénaturantes, en fonction de sa séquence nucléotidique. Ainsi des fragments d'ADN de séquence nucléotidique différant même d'une seule base adopteront une conformation unique qui permettra de les séparer par électrophorèse grâce à leur différence de mobilité. Cette comparaison indique une corrélation grossière entre les deux méthodes, les pourcentages obtenus étant souvent plus importants avec la méthode SSCP qu'avec la méthode directe, surtout lorsque *Leptospirillum* devient l'organisme majoritaire dans le milieu.

En 2002, une séparation des espèces *Leptospirillum ferrooxidans* et *Leptospirillum ferriphilum* a été proposée sur la base d'études moléculaires (séquences d'ARNr 16S, hybridations ADN-ADN, GC%), aucune différence physiologique n'ayant été identifiée entre les deux espèces à cette époque (Coram et Rawlings, 2002). Depuis, un caractère physiologique majeur qui différencie les deux espèces de *Leptospirillum* a été mis en évidence : *L. ferrooxidans* est capable de fixer l'azote gazeux (N_2) et possède un gène codant pour une nitrogénase, alors que *L. ferriphilum* ne fixerait pas la molécule de di-azote (Moreno-Paz et Parro, 2006 ; Garcia-Moyano et al., 2008). D'après Coram et Rawlings, le GC% des souches de *L. ferrooxidans* est compris entre 49 et 52%, et celui des souches de *L. ferriphilum* entre 55 et 58%. Les souches L6 et L8 (**article 1**) ont été perdues, cependant le GC% élevé de la souche L8 (55,6%) suggère qu'elle appartenait à l'espèce *L. ferriphilum*. Les séquences d'ARNr 16S obtenues au cours des expériences ultérieures ont confirmé la présence de *L. ferriphilum*, en tant qu'espèce majoritaire, et l'absence de *L. ferrooxidans* dans les réacteurs de biolixiviation du BRGM (**articles 8 et 10**, D'Hugues et al., 2008).

Dans une étude récente, D'Hugues et al. (2008) ont trouvé que *L. ferriphilum* est l'organisme majoritaire dès le premier réacteur du pilote de biolixiviation en cascade comportant quatre réacteurs en série, et que sa présence tend à diminuer un peu au profit de *Sulfobacillus* entre le premier et le dernier réacteur. Ces résultats semblent contradictoires avec ceux qui avaient été obtenus précédemment (**article 5**) qui indiquaient une augmentation de la proportion de cellules morphologiquement apparentées à *Leptospirillum* au cours de l'avancée de l'oxydation de la pyrite. Deux explications à cette apparente contradiction peuvent être données. La première est liée au fait que les analyses SSCP de 2008 ont été réalisées sur la population totale, alors que les études antérieures se focalisaient sur les cellules de la phase liquide. Or, *Leptospirillum* se fixe efficacement à la surface de la pyrite.

D'ailleurs, l'article 8 a montré que lors d'une expérience en batch, la proportion de cellules de *Leptospirillum* représente toujours entre 70 et 90% de la population bactérienne totale associée à la phase solide. Dans la phase liquide, la proportion de cellules de *Leptospirillum* augmentait régulièrement avec l'avancée de l'oxydation du substrat.

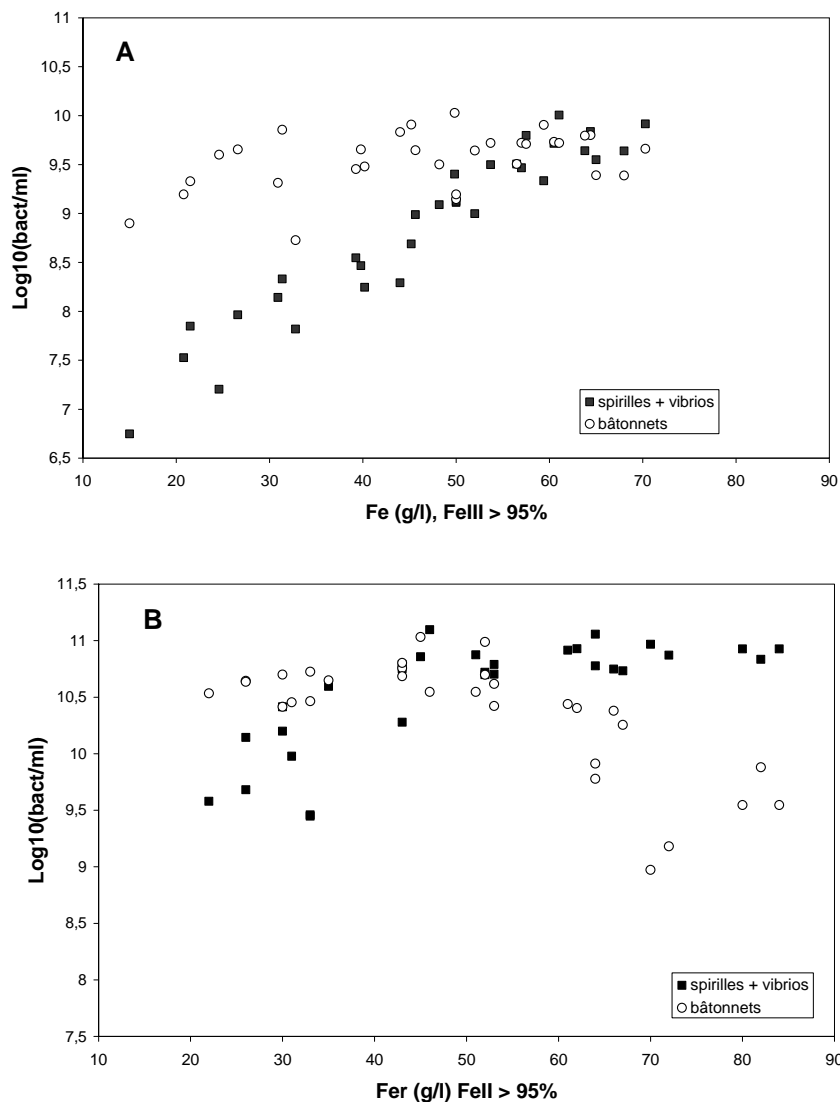


Figure 1. Comparaison du pourcentage de cellules morphologiquement apparentées à *Leptospirillum* et de bâtonnets dans les réacteurs de biolixiviation (phase liquide) en fonction de la concentration en fer au cours de deux opérations pilote de 100 L. Dénombrements au microscope optique de cellules fixées dans de l'agar 1%, observation au grossissement x 1000. Bactéries comptées sur 4 champs sur chaque lame, 2 lames préparées pour chaque échantillon. A : sans recyclage de bio-solution, B : avec recyclage de bio-solution. La bio-solution est la phase liquide dont on a retiré le fer (par ajout de calcite et filtration) mais pas le cobalt.

La seconde hypothèse qui permettrait d'expliquer pourquoi, lors de l'expérience de 2008, *Leptospirillum* est l'organisme majoritaire dès les premières phases de la réaction de biolixiviation est liée à la disponibilité en ions ammoniums (NH_4^+) dont D'Hugues a souligné l'importance (**article 4** et D'Hugues et al., 2008). En effet, lors des expériences pilote décrites dans l'article 5, un milieu de culture industriel contenant de l'urée comme source d'azote avait été utilisé (**article 4** et Mémoire de thèse de F. Battaglia, 2004). Or, l'urée s'hydrolyse en ammonium mais cette hydrolyse n'est pas instantanée, et il est probable que la croissance

de *L. ferriphilum* était limitée par la disponibilité de l'ammonium lors de ces expériences. L'expérience pilote récente (D'Hugues et al., 2008) a été réalisée avec le milieu OKm classique contenant de l'ammonium, ce qui pourrait expliquer que *L. ferriphilum* soit l'espèce bactérienne majoritaire dès le premier réacteur de la cascade. D'ailleurs, une des conditions testées en 2008 était la limitation en ammonium, dont une des conséquences a été une diminution de la proportion de *L. ferriphilum* dans la population bactérienne. La concentration en fer ferrique n'est donc pas le seul facteur qui influence la proportion de *Leptospirillum* au sein du consortium bactérien réalisant la biolixiviation. Il faut également souligner le fait que les deux facteurs ayant une influence sur le développement de *L. ferriphilum*, concentrations en fer ferrique et en ammonium, ne sont pas indépendants. En effet, l'ammonium entre dans la composition d'un précipité de fer ferrique, la jarosite ($X_2Fe_3(SO_4)_2(OH)_6 - X = \text{cation}$) et les concentrations en fer ferrique du milieu sont plus faibles lorsque l'ammonium n'est pas limitant (D'Hugues et al., 2008). Ainsi, lors des expériences de 2008, la concentration en fer ferrique maximale s'élevait à 69 g.l⁻¹ alors que des teneurs atteignant 85 g.l⁻¹ avaient été obtenues au cours des expériences pilotes antérieures (**article 5**). A part *L. ferriphilum*, les deux principaux autres organismes détectés dans le milieu de biolixiviation appartiennent au genre *Sulfobacillus* et à l'espèce *Acidithiobacillus caldus* (**articles 8 et 10**, D'Hugues et al., 2008). *At. caldus* utilise exclusivement les espèces réduites du soufre comme source d'énergie. Il est présent principalement dans la phase liquide du milieu de biolixiviation. *Sulfobacillus* peut consommer à la fois le soufre et le fer ferreux comme sources d'énergie. Contrairement à *Leptospirillum* et *Acidithiobacillus*, il n'est pas autotrophe strict et peut utiliser des substrats carbonés (Golovacheva et Karavaiko, 1978). En ce qui concerne *Sulfobacillus*, les résultats obtenus récemment par D'Hugues et al. (2008) sont en parfait accord avec les études précédentes (**articles 8 et 10**) qui suggéraient que *Sulfobacillus* se trouverait davantage en association avec la phase solide que dans la phase liquide, comme *Leptospirillum*, et serait donc davantage en compétition avec *Leptospirillum* pour l'utilisation du fer ferreux qu'avec *Acidithiobacillus* pour les espèces réduites du soufre. Toutes les modifications de conditions opératoires qui affectent la proportion relative de *L. ferriphilum* (limitation de la concentration en NH₄⁺, limitation de l'apport en CO₂, augmentation de température) induisent une augmentation de la proportion de *Sulfobacillus* (D'Hugues et al., 2008). Dans les **articles 8 et 10**, il avait été montré qu'un mode de culture air-lift (moindre attrition) avait favorisé le développement de *Sulfobacillus* au détriment de *L. ferriphilum* par rapport aux cultures en bioréacteur agité mécaniquement. Le fait qu'une limitation en CO₂ favorise le développement de *Sulfobacillus* est facilement expliqué par la capacité de cet organisme, dans le milieu de biolixiviation, à utiliser le carbone organique (carbone excrété par les bactéries autotrophes ou provenant de leur lyse).

En ce qui concerne les autres paramètres étudiés, le résultat de la compétition entre *Sulfobacillus* et les deux autres micro-organismes majoritaires n'est pas expliqué. La souche de *Sulfobacillus* présente dans les bioréacteurs du BRGM fait partie d'une espèce originale, *Sulfobacillus benefaciens*, qui a été récemment caractérisée dans le cadre d'une collaboration entre l'Université de Bangor et le BRGM (Johnson et al., 2008). Cependant, les résultats de cette étude de caractérisation ne permettent pas d'expliquer les similitudes de comportement observées entre *S. benefaciens* et *L. ferriphilum*, ni pourquoi cette espèce se développe aux dépens d'autres espèces de *Sulfobacillus* introduites dans les bioréacteurs. Johnson et al. ont montré que *S. benefaciens* résiste sans problème à 5,6 g.l⁻¹ de fer ferrique, comme d'autres espèces du genre *Sulfobacillus*, mais des teneurs plus élevées en fer ferrique n'ont pas été testées. La vitesse spécifique d'oxydation du fer ferreux par *S. benefaciens* a été déterminée, mais pas son affinité pour le fer ferreux. Il est probable que l'affinité pour le fer ferreux de *Sulfobacillus* est très proche de celle de *Leptospirillum*, mais des données précises sur ce

paramètre, ainsi que l'influence de la concentration en fer ferrique sur cette affinité, permettraient de mieux comprendre le phénomène de compétition qui existe entre les deux principaux acteurs de la biolixiviation. L'adhésion des cellules au substrat pyriteux est également un processus très important, puisqu'il permet aux micro-organismes d'accéder aux traces du précieux substrat énergétique, le fer ferreux. Le rôle non négligeable des précipités de fer (en relation avec la concentration en NH_4^+) dans le phénomène d'adhésion a déjà été mentionné par D'Hugues. L'étude approfondie des mécanismes d'adhésion chez les deux principaux micro-organismes en compétition serait une voie de recherche à privilégier pour élucider la dynamique des populations bactériennes de la biolixiviation. La connaissance de la physiologie des bactéries impliquées dans la biolixiviation est non seulement utile pour maîtriser le procédé en bioréacteur (photographie 2), mais également pour expliquer les processus biogéochimiques impliqués dans la génération des drainages miniers acides (photographie 3, Garcia-Moyano et al., 2008).



Photographie 2. Bioréacteurs de 1350 m³ permettant d'extraire du cobalt à partir de la pyrite de Kasese (Ouganda) fonctionnant depuis 1999 sur la base du procédé mis au point au BRGM



Photographie 3. Eau de drainage minier acide sur l'ancien site minier de Chessy (Rhône)

2.2 Biogéochimie des sites de CHENI et Lopérec

(référence aux articles 7 et 17)

Si le drainage acide pose de graves problèmes environnementaux dans la plupart des régions minières, de nombreux sites d'extraction de minerais présentent également des eaux de surface ou souterraines peu acides, ou dont le pH est proche de la neutralité. En conditions acides, l'oxydation chimique du fer ferreux par l'oxygène est lente, ce substrat est donc disponible pour les organismes aérobies cités dans le chapitre 2.1, mais la vitesse d'oxydation chimique du fer ferreux augmente avec le pH. Par conséquent, le fer ferreux est généralement absent (ou présent en concentrations très faibles) dans les eaux oxygénées à pH neutre. Certaines bactéries sont cependant capables d'utiliser le fer ferreux comme source d'énergie à pH neutre, en conditions de micro-aérophilie. Des organismes appartenant au genre *Gallionella*, par exemple, possèdent cette caractéristique physiologique (Hallbeck et al., 1990). L'arsenic, en revanche, ne s'oxyde pas rapidement en présence d'oxygène à pH neutre ; l'As(III) est donc un substrat énergétique utilisable par les bactéries aérobies des environnements peu acides ou neutres. Jusqu'à une date relativement récente, il était admis que les transformations de l'arsenic, imputables aux organismes résistant à cet élément, étaient des mécanismes de détoxification. Lorsque nous avons commencé à travailler sur le site de CHENI (Saint-Yriex, Haute Vienne) en 1997, certaines bactéries capables d'utiliser l'arsenic en tant que donneur ou accepteur d'électrons venaient d'être décrites. Ahman et al. (1994) avaient mis en évidence la respiration anaérobie de l'As(V). L'utilisation de l'As(III) comme source d'énergie par des bactéries autotrophes avait été découverte par Ilyaetdinov et Abdrashitova (1981) avec une souche bactérienne malheureusement perdue. Le processus biogéochimique d'oxydation de l'As(III) en absence de substrat organique avait été mise en évidence dans les eaux souterraines (Hamsch et al., 1995). Une nouvelle théorie concernant le cycle de l'arsenic suggérait que la métabolisation active des diverses formes de l'arsenic, associée à la croissance bactérienne, serait le moteur dominant du cycle microbien de l'arsenic.

Nous avons alors décidé de focaliser nos travaux sur les bactéries utilisant l'arsenic inorganique (principale forme d'arsenic sur les sites miniers) comme substrat de croissance. Nous avons utilisé quatre types de milieux de culture : aérobie (contenant de l'As(III)) ou anaérobie (contenant de l'As(V)), autotrophe ou hétérotrophe. Ces différents milieux ont étéensemencés avec des échantillons de sédiment prélevés sur le site de CHENI (photographie 4). Les cultures ont été repiquées plusieurs fois dans les mêmes conditions, puis des dosages des différentes formes d'arsenic ont été réalisés. En conditions aérobies, seul le milieu autotrophe supportait la croissance de bactéries oxydant l'As(III), et en conditions anaérobies, seul le milieu hétérotrophe avait conduit à la sélection de micro-organismes respirant l'As(V). Nous avons optimisé la composition du milieu autotrophe permettant l'oxydation de l'As(III) : de façon à s'assurer que seul l'As(III) pouvait être utilisé comme source d'énergie dans ce milieu, la concentration en ammonium (source d'azote) a été diminuée jusqu'à 10 mg.l⁻¹ de NH₄. Les deux milieux de culture optimisés ont ensuite été utilisés pour étudier l'activité globale As(III)-oxydante et As(V)-réductrice dans les différentes zones du site de CHENI (communications 42, 47, 50, 54). Les activités ont été déterminées en incubant des échantillons de matériaux prélevés dans les trois zones rédox, zone aérobie, zone anaérobie et zone de battement de la nappe, dans les conditions optimales pour le développement des deux types de populations bactériennes, As(III)-oxydante ou As(V)-réductrice. Des tests d'activité ont été réalisés sur ces expériences : des échantillons prélevés dans les microcosmes étaient utilisés pour ensemercer les milieux de cultures contenant soit de l'As(III) pour les tests d'oxydation, soit de l'As(V) pour les tests de réduction. Nous avons montré que des

populations bactériennes autotrophes utilisant l'As(III) comme source d'énergie étaient omniprésentes dans les trois principales zones du site, et que des populations As(V)-réductrices étaient détectables dans la zone anaérobie et dans la zone de battement de la nappe. Les activités bactériennes les plus intenses, pour l'oxydation et la réduction de l'arsenic, ont été détectées dans la zone de battement de la nappe. C'est également dans cette zone que les concentrations en arsenic ont toujours été les plus élevées dans l'aquifère, jusqu'à 95 mg.l⁻¹ (Bodenan et al., 2004), ce qui suggère que l'alternance de conditions aérobies et anaérobies combinée à une activité bactérienne intense favorise la mobilisation de l'arsenic. Nous nous sommes ensuite intéressés à la composition des populations bactériennes As(III)-oxydante et As(V)-réductrices sélectionnées à partir des échantillons du site de CHENI, nommées respectivement CAsO1 (CHENI As Oxydante 1) et CAsR1 (CHENI As Réductrice 1). Des inventaires de gènes ribosomaux 16S ont été réalisés sur ces deux populations. Chacune était dominée par un organisme largement majoritaire :

- **Population As(V)-réductrice CAsR1.** La principale bactérie composant CAsR1 était un *Bacillus* très proche d'organismes déjà caractérisés.
- **Population As(III)-oxydante CAsO1.** Cette population oxydante contenait une bactérie dont la séquence 16S était assez éloignée (5,9% de divergence) de celles des organismes les plus proches (**article 7**). D'après sa phylogénie, cette bactérie appartenait probablement au genre *Thiomonas*, qui rassemblait des organismes capables de métaboliser le soufre à pH neutre. Sa présence dans un environnement riche en minéraux sulfurés et en arsenic pouvait donc s'expliquer par ses caractères physiologiques. L'isolement (**article 7**), puis la caractérisation (**articles 14 et 26**, cf. chapitre 2.4) de cet organisme devaient confirmer cette hypothèse.



Photographie 4. Prélèvements effectués en 1997 sur l'ancien site minier de CHENI (St-Yriex-la-Perche, Haute-Vienne) où 500 000 tonnes de déchets contenant 0,5 % d'arsenic ont été accumulés. Ce site est actuellement en cours de réhabilitation.

L'oxydation chimique de l'As(III) par l'oxygène étant très lente, il était facile de démontrer le rôle catalytique des bactéries dans l'environnement de CHENI au sein duquel les concentrations en arsenic étaient relativement élevées (de 10 à 100 mg.l⁻¹). Dans des environnements plus pauvres en arsenic, le rôle direct des micro-organismes sur la spéciation de cet élément est plus délicat à démontrer. En effet, lorsque la concentration en arsenic est inférieure à 1 mg.l⁻¹, et que cet élément n'est pas l'espèce majoritaire dans le milieu, diverses réactions peuvent être évoquées pour expliquer l'oxydation de l'As(III) : réaction avec le manganèse, co-oxydation chimique avec le fer ferreux, photo-oxydation... Les expériences en batch, telles que celles qui avaient été mises en œuvre pour l'étude du site de CHENI, ne sont pas adaptées pour la compréhension de ce type de systèmes.

Lorsque nous avons commencé à étudier le site de Lopérec (Finistère), en 2000, nous avons donc adopté une nouvelle stratégie. L'histoire de ce site est la suivante : entre 1986 et 1987, une campagne de prospection minière a découvert un petit gisement filonien d'arsénopyrite aurifère à Lopérec. Une galerie creusée entre 1991 et 1992 pour les besoins de l'exploration de la minéralisation a induit une résurgence (photographie 5) qui s'écoule continûment à un débit moyen de 15 m³.h⁻¹. Cette eau, dont le pH est proche de la neutralité et dont la température varie entre 11 et 13 °C, contient quelques mg.l⁻¹ de fer ferreux et de 20 à 1800 µg.l⁻¹ d'As total, avec des proportions variables d'As(III) et d'As(V). Jusqu'à ce jour, l'eau de résurgence est collectée dans un bassin de décantation où précipitent les oxydes de fer et une grande partie de l'arsenic, puis elle est canalisée sur 650 m environ avant d'être rejetée dans le milieu naturel. L'objectif de nos travaux (**articles 17 et 27**) était de comprendre le mécanisme de précipitation de l'arsenic sur le site de Lopérec afin de proposer un procédé qui permettrait d'éliminer efficacement l'arsenic de façon passive dans ce type d'effluent. Il était nécessaire de déterminer si l'élimination de l'arsenic était seulement due à une oxydation chimique du fer par l'oxygène, suivie de la co-précipitation du Fe(III) avec l'arsenic, ou bien si des phénomènes biologiques participaient au phénomène d'atténuation naturelle constaté. Nous avons dans un premier temps vérifié, grâce à des tests d'activité d'oxydation similaires à ceux qui avaient été effectués sur le site de CHENI, que des bactéries capables d'oxyder 100 mg.l⁻¹ d'As(III) étaient présentes sur le site (**article 17**). Ensuite, au laboratoire, nous avons réalisé une expérience (photographie 6) utilisant deux petites colonnes de 20 ml, remplies de pouzzolane (pierre volcanique poreuse utilisée en traitement d'eau comme support bactérien), et alimentées en continu avec un effluent de Lopérec synthétique « reconstitué ». Les colonnes, leur remplissage et l'effluent synthétique étaient stériles. Une des colonnes a été inoculée avec un peu d'eau du site contenant les bactéries naturellement présentes dans le bassin de décantation. De l'air était injecté dans les deux colonnes. Le débit d'alimentation a été réglé de façon à ce que le temps de séjour dans les colonnes soit proche de celui de l'effluent réel dans le bassin de décantation (30 min). Les résultats de cette expérience ont montré sans ambiguïté que les bactéries participent à l'oxydation de l'As(III) dans les conditions du site. La solution contenait moins d'As(III) et plus d'As(V) en sortie de colonne inoculée qu'en sortie de colonne stérile. Par contre, au niveau de l'oxydation du Fe(II), la colonne inoculée ne s'est pas comportée différemment de la colonne stérile. Nous avons isolé deux souches bactériennes possédant une activité d'oxydation de l'As(III) élevée à partir de l'eau et des sédiments du site de Lopérec. La première possède une séquence d'ADNr 16S très proche (99%) de celle de *Variovorax paradoxus*. La seconde est plus éloignée du point de vue phylogénétique des organismes caractérisés les plus proches. Il s'agit de la souche S1.1 faisant partie d'un groupe de bactéries comprenant le genre *Leptothrix*, connu pour participer à l'oxydation du fer et du manganèse dans l'environnement. Or, le fer et le manganèse sont les principaux métaux accompagnant l'arsenic dans la composition de

l'eau de Lopérec. Nous avons également constaté que la souche de *Leptothrix* la plus proche de S1.1 au niveau des séquences d'ADNr 16S, *L. cholodnii*, n'est pas capable d'oxyder l'As(III). Sa croissance est même complètement inhibée par 100 mg.l⁻¹ d'As(III).



Photographie 5. Prélèvements sur le site de Lopérec (Finistère)



Photographie 6. Expérience en continu (colonnes de 20 ml) ayant permis de mettre en évidence l'oxydation bactérienne de l'As(III) dans des conditions très proches de celles du site de Lopérec.

2.3 Etude en réacteurs de l'oxydation de l'As(III)

(référence aux articles 7, 17, 25, 26, 30 et brevet 27)

L'étude de la biogéochimie du site de CHENI nous a conduit à la sélection d'une population bactérienne, nommée CASO1, capable d'oxyder l'As(III) en conditions de chimio-litho-autotrophie et contenant une bactérie appartenant au genre *Thiomonas* comme principal micro-organisme dans ces conditions de croissance. Cette capacité à oxyder l'As(III) dans un milieu pauvre en nutriments nous a semblé intéressante, en termes de procédés de traitement d'eau. En effet, lorsqu'une eau polluée contient de l'As(III), il est généralement nécessaire d'oxyder cet As(III) en As(V) avant de pouvoir éliminer efficacement l'As total par des méthodes physico-chimiques (article 33). Actuellement, cette oxydation est effectuée avec des réactifs oxydants forts (permanganate de potassium, chlore, ozone) coûteux et susceptibles de générer des sous-produits toxiques. Nous avons donc décidé d'entreprendre des travaux visant à évaluer le potentiel de la population CASO1 dans le domaine des procédés de traitement d'eau. La population CASO1 a été cultivée, tout d'abord dans un réacteur en verre agité mécaniquement et en conditions stériles, puis dans un réacteur PVC à lit fixé en conditions non stériles. Ces expériences ont montré que la population CASO1 était capable d'oxyder entièrement 100 mg.l⁻¹ d'As(III) en moins d'1 heure dans le réacteur à lit fixé, avec un milieu minéral simplifié contenant 50 mg.l⁻¹ seulement de chaque nutriment (Figure 2).

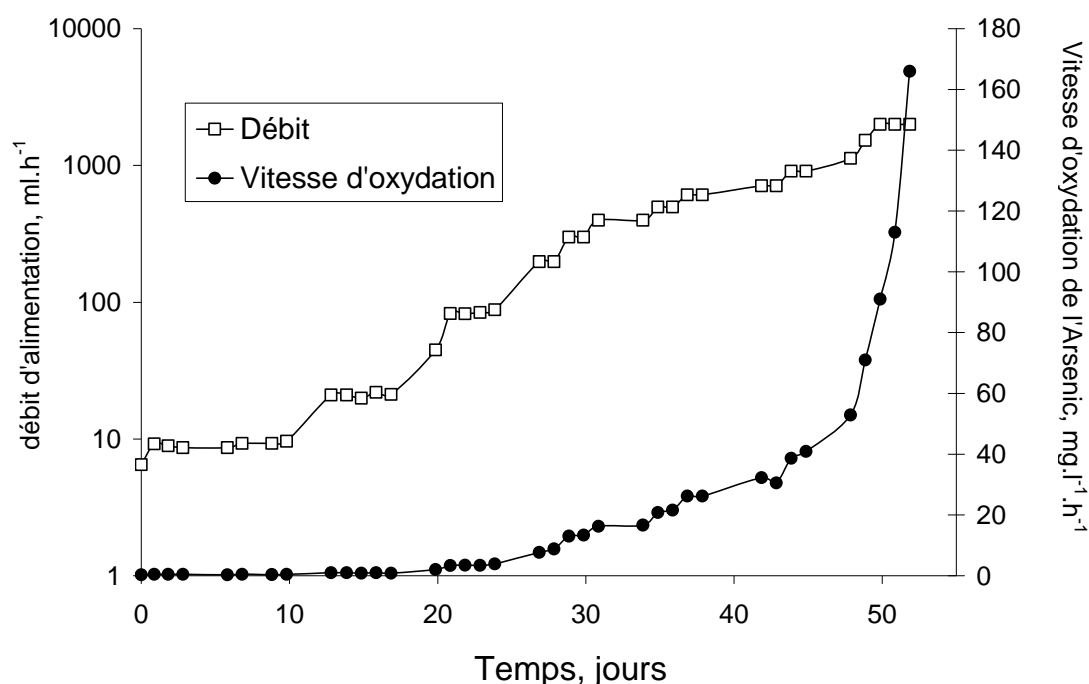


Figure 2. Oxydation de l'As(III) par la population CASO1 en réacteur colonne à lit fixé, alimenté par un milieu minéral simplifié contenant 100 mg.l⁻¹ d'As(III) (article 7).

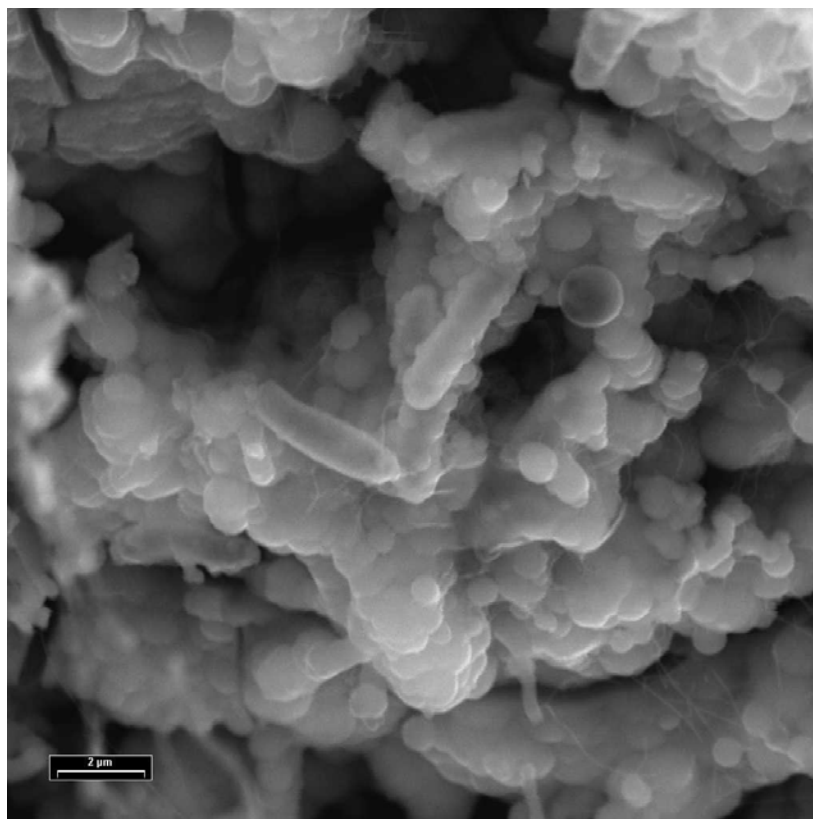
Ces résultats ont tout d'abord fait l'objet d'une protection industrielle (**brevet** référence 30) puis d'une publication scientifique (**article 7**). Nous avons constaté que la vitesse d'oxydation de l'As(III) par CASO1 atteignait 166 mg.l⁻¹.h⁻¹ en présence de 100 mg.l⁻¹ d'As(III), mais pour le traitement des eaux potabilisables, contenant moins de 100 µg.l⁻¹ d'As, il était nécessaire d'étudier le comportement de CASO1 à très faibles concentrations en

As(III). Ce travail a été entrepris dans le cadre du projet As-Thiox labellisé RITEAU, en collaboration avec l'Université de Limoges. Nous avons pu montrer qu'en utilisant une eau dopée avec 0,1 mg.l⁻¹ d'As(III), un taux d'oxydation de 95% pouvait être obtenu en une heure de séjour dans un bioréacteur à lit fixé (**articles 22 et 33**). Un tel niveau d'oxydation permet d'atteindre une concentration en As(III) résiduelle inférieure à 5 µg.l⁻¹, le seuil d'As total dans l'eau potable étant fixé à 10 µg.l⁻¹. Nous poursuivons actuellement ces travaux, en collaboration avec l'Université de Limoges, dans l'objectif de réduire le temps de séjour nécessaire pour l'oxydation biologique de l'As(III) dans le bioréacteur de potabilisation (projet ANR COBIAS, <http://cobias.brgm.fr>).

En parallèle à ces travaux visant à potabiliser des eaux arséniées, nous avons entrepris le développement de procédés passifs pour traiter les eaux d'environnements miniers polluées par l'arsenic. L'étude biogéochimique du site de Lopérec avait montré que les bactéries participent à l'oxydation de l'As(III) *in-situ*. Nous avons ensuite travaillé au laboratoire, dans des bioréacteurs de 2 litres remplis de pouzzolane et inoculés avec l'eau du site de Lopérec. Ces colonnes ont été alimentées en continu avec un effluent synthétique, afin d'optimiser le procédé de traitement. Nous avons pu montrer que l'activité d'oxydation de l'As(III) et du Fe(II) conduit dans le bioréacteur à une élimination efficace de l'arsenic par adsorption de l'As(V) sur les précipités de ferrihydrite, des oxy-hydroxydes de Fe(III) amorphes (**article 17, Annexe 2**). La concentration en As total en sortie de bioréacteur est inférieure à 100 µg.l⁻¹, limite de concentration admise au point de rejet, pour un temps de séjour égal à 30 minutes. L'analyse de la population bactérienne associée à la pouzzolane (photographie 7) a été réalisée par un inventaire des gènes ribosomaux codant pour l'ARNr 16S. Cette analyse a révélé la présence d'une population bactérienne diverse : des microorganismes affiliés à huit groupes phylogénétiques appartenant pour la plupart au phylum des Protéobactéries ont colonisé la pouzzolane. La collection de clones est dominée par des phylotypes très proches des espèces *Pseudomonas rhodesiae* et *Curvibacter gracilis*. Le consortium bactérien comprend également des micro-organismes fortement apparentés à *Ralstonia spp.*, *Sphingomonas capsulata* et *Methylobacterium fujisawaense*. Deux phylotypes sont affiliés de façon plus distante à *Gallionella ferruginea* et *Methylophilus methylotrophus*. Un phylotype forme une branche parallèle au groupe *Herbaspirillum-Janthinobacterium*. Enfin, un phylotype appartenant au phylum des *Bacteroidetes* est affilié de façon distante à *Flavobacterium spp.*. Toutes les espèces bactériennes auxquelles sont apparentés les organismes qui ont colonisé notre bioréacteur sont aérobies, et généralement trouvées dans des environnements tels que les eaux de surface ou souterraines. Des souches bactériennes appartenant aux espèces *Pseudomonas* et *Ralstonia* sont connues pour posséder le gène *aoxB* codant pour une sous-unité de l'enzyme responsable de l'oxydation de l'As(III), l'arsenite oxydase (Quémeneur et al., 2008), et les bactéries appartenant au genre *Gallionella* utilisent le Fe(II) comme source d'énergie (Hallbeck et Pedersen, 1990). Il a été montré que des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Flavobacterium* peuvent produire des formes d'arsenic méthylées à partir d'arsenic inorganique (Bentley et Ghasteeen, 2002). La présence de bactéries méthylotrophes (*Méthylobacterium* et *Methylophilus*) pourrait être liée à un tel processus.

Dans la continuité des expériences de laboratoire, deux bioréacteurs ont été installés simultanément sur le site de Lopérec, et alimentés en parallèle avec l'effluent réel : le bioréacteur inoculé au laboratoire, et un nouveau bioréacteur non inoculé. L'objectif de cette expérience était de vérifier que les performances obtenues avec un effluent synthétique peuvent être au moins égalées avec l'effluent réel, et d'évaluer le temps nécessaire pour qu'un lit de pouzzolane neuve soit colonisé par les bactéries présentes dans l'eau du site. Dès le

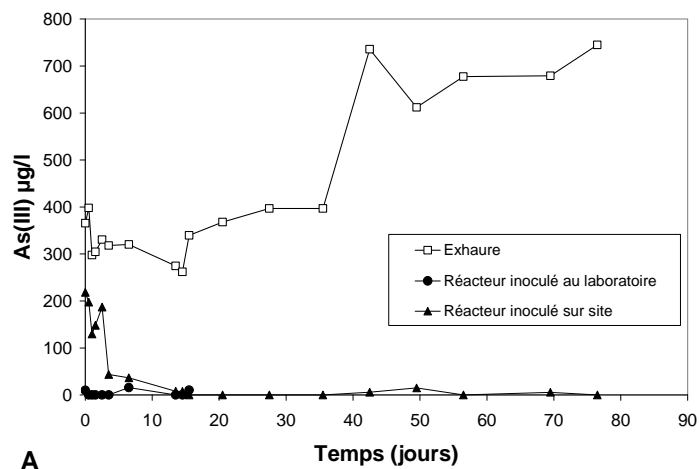
premier jour de fonctionnement sur site, le bioréacteur inoculé au laboratoire oxydait efficacement l'As(III), et l'eau en sortie de bioréacteur contenait moins de $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'As total (Figure 3). A la sortie du bioréacteur non inoculé, la concentration en As(III) était proche de $200 \mu\text{g.l}^{-1}$ au début de l'expérience, puis diminua pour atteindre des valeurs inférieures à $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ après 15 jours de fonctionnement. Alors que de l'activité bactérienne As(III)-oxydante se mettait en place, la concentration en As total chutait de 300 à moins de $10 \mu\text{g.l}^{-1}$. L'oxydation totale du Fe(II) a été immédiate dans le réacteur inoculé au laboratoire, et 15 jours de fonctionnement ont été nécessaires pour obtenir la même efficacité d'oxydation avec le réacteur contenant de la pouzzolane fraîche, qui a été inoculé *in-situ* par les bactéries présentes dans l'eau à traiter.



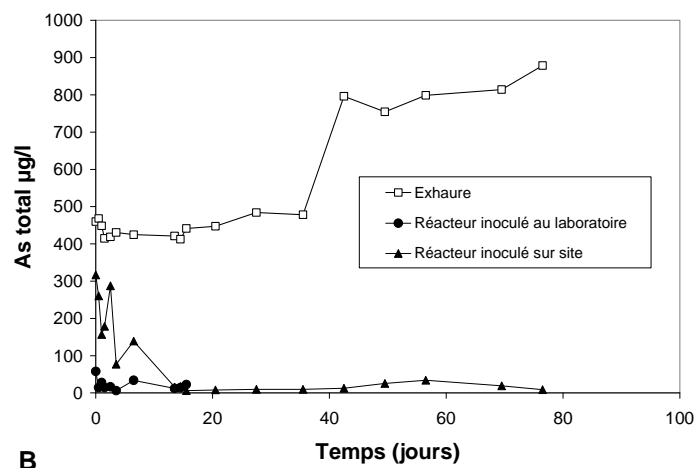
Photographie 7. Observation au Microscope Electronique à Balayage de la pouzzolane colonisée par les bactéries dans le bioréacteur de laboratoire utilisé pour mettre au point le procédé de traitement biologique de l'eau du site de Lopérec (barre d'échelle = $2 \mu\text{m}$).

Au cours de nos différents projets portant sur le développement de procédés de traitement d'eau arséniées en bioréacteur, nous avons pu constater que la réaction d'oxydation biologique de l'As(III) ne nécessite pas une concentration en oxygène très élevée. La croissance de CASO1 n'est pas affectée en présence de 100mg.l^{-1} d'As(III) tant que la concentration en O_2 est supérieure ou égale à 10% de la saturation (communication 55). Dans le cas du traitement de l'eau de Lopérec, l'efficacité d'oxydation de l'As(III) et du Fe(II) est toujours optimale lorsque la concentration en O_2 dissous est supérieure ou égale à 2mg.l^{-1} (article 27). Cette capacité des bactéries à catalyser l'oxydation de l'As(III) dans des conditions d'oxygénation limitée est un avantage pour le développement de traitements passifs. Ainsi, sur le site de Lopérec, une simple cascade de 1 m de dénivelé suffit à apporter les 2mg.l^{-1} d'oxygène nécessaires à l'élimination du fer et de l'arsenic, bien que l'eau soit anoxique au niveau de l'exhaure. Actuellement, un système de traitement passif pilote (volume total 9m^3) basé sur le principe exposé dans les articles 17 et 27 a été installé sur le

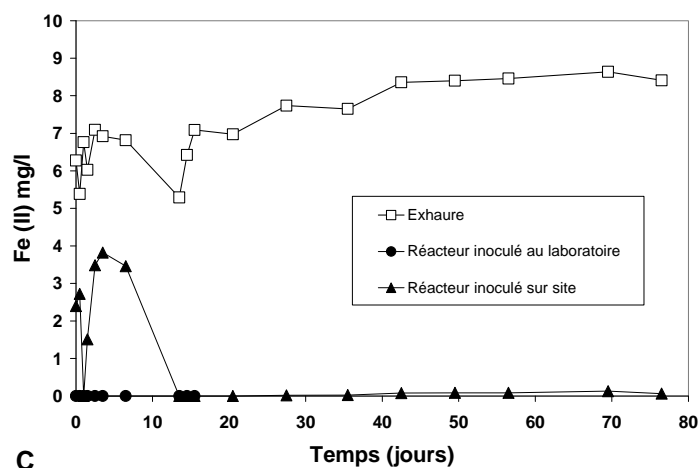
site. Les performances de ce pilote (photographie 8) ainsi que la composition du biofilm actif sont étudiées dans le cadre du projet ANR COBIAS.



A



B



C

Figure 3. Expérience de traitement biologique de l'eau de Lopérec sur site. A : concentrations en As(III), B : concentrations en As total, C : concentrations en Fe(II).



Photographie 8. Pilote de traitement biologique passif installé sur le site de Lopérec

2.4 Comparaison de souches de *Thiomonas* et rôle présumé de l'activité d'oxydation de l'As(III)

(référence aux articles 14 et 24)

La population bactérienne CAsO1, issue du site minier de CHENI, est capable de se développer dans un milieu minimum contenant de l'As(III) comme seule source d'énergie. Des analyses SSCP ont montré que cette population contenait une bactérie très majoritaire. Après avoir isolé une souche de ce micro-organisme majoritaire, nommée b6, nous avons montré que cette bactérie est phylogénétiquement rattachée au genre *Thiomonas* (**article 7**, 2002). A cette époque, la bactérie caractérisée la plus proche de b6 du point de vue phylogénétique était *Thiomonas intermedia*, avec laquelle b6 partageait seulement 95% de similitude au niveau de la séquence des gènes d'ARNr 16S. Cependant, b6 présentait 98% de similitude avec deux souches bactériennes isolées mais non caractérisées : NO115 issue d'une ancienne mine de cuivre en Norvège, et PK44, isolée d'une autre mine de cuivre, située au Pays de Galles (**article 26**). Nous avons alors caractérisé la souche b6 (**article 14**). Bien que b6 possède plusieurs traits communs à toutes les bactéries appartenant au genre *Thiomonas*, elle se distingue par sa capacité à utiliser l'As(III) comme unique source d'énergie dans un mode de croissance chimio-litho-autotrophe. Comme les autres *Thiomonas*, b6 se développe sous la forme de petits bâtonnets aérobies, en autotrophie, hétérotrophie ou mixotrophie. Les milieux contenant une source de soufre inorganique associée à un substrat organique complexe (de type extrait de levure) permettent d'obtenir les meilleurs taux de croissance et concentrations cellulaires des souches de *Thiomonas* (Moreira & Amils, 1997). Nous avons montré que diverses autres souches de *Thiomonas* sont capables d'oxyder l'As(III), mais il est nécessaire de leur fournir d'autres substrats (extrait de levure et/ou thiosulfate) pour les cultiver en présence d'arsenic (**article 26**). Depuis, d'autres souches de *Thiomonas* capables d'oxyder l'As(III) en présence d'un substrat organique ont été isolées de l'ancien site minier de Carnoulès (Gard). Elles sont issues d'un ruisseau dont le pH varie de 2,7 à 3,4, et dont la

concentration en arsenic varie de 80 à 350 mg.l⁻¹ (Bruneel et al., 2003 ; Duquesne et al., 2007). En 2006, la souche b6 du BRGM présentait suffisamment de caractères originaux, en particulier la capacité à utiliser l'As(III) comme source d'énergie en chimio-litho-autotrophie, pour être proposée en tant que souche type d'une nouvelle espèce nommée « *Thiomonas arsenivorans* » (**article 14, Annexe 3**). Cependant, quelques mois après la parution de l'article **14**, la séquence codant pour l'ARN ribosomal 16S de *Thiomonas delicata* (anciennement *Thiobacillus delicata*) a été déterminée et publiée (Katamaya et al., 2006). Cette bactérie provient de la mine de cuivre de Tsuchihata au Japon (Mizogushi et al., 1976). Sa séquence d'ARN ribosomal 16S présente une similitude supérieure à 99% avec celle de « *Thiomonas arsenivorans* ». Enfin, en 2007, Kelly et al. ont montré que la séquence d'ARN ribosomal 16S de la bactérie *Thiomonas cuprina* présente un taux de similitude égal à 99,8% avec celles de *Thiomonas cuprina* et « *Thiomonas arsenivorans* ». Une séquence d'ARN ribosomal 16S de *Tm. cuprina* avait déjà été publiée en 1997 (Moreira et al., 1997), cependant cette première séquence présentait de nombreuses erreurs et il était alors impossible d'établir la parenté phylogénétique de cette bactérie avec les autres souches de *Thiomonas*. *Tm. cuprina*, isolée d'une mine d'Uranium en Allemagne, est capable d'utiliser comme sources d'énergie des sulfures métalliques tels que l'arsénopyrite et la chalcopyrite (Huber et Stetter, 1990). Sur la base des différences physiologiques entre *Tm. cuprina*, *Tm. delicata* et « *Tm. arsenivorans* », mises en évidence par la comparaison de leurs descriptions respectives issues de la littérature, Kelly et al. (2007) ont proposé de conserver aux trois espèces leur identité. Le BRGM étant à l'origine de l'isolement et de la caractérisation de « *Tm. arsenivorans* », nous avons décidé d'effectuer une comparaison de ces trois micro-organismes en étudiant, dans des conditions expérimentales identiques, leur physiologie et leur chimio-taxonomie (article en cours de rédaction **101**). Nous avons constaté que *Tm. cuprina* est capable de se développer en conditions de chimio-litho-autotrophie avec de l'As(III) comme source d'énergie de la même façon que « *Tm. arsenivorans* », alors que chez *Tm. delicata* cette capacité est exprimée de façon beaucoup plus faible en termes de taux de croissance et de vitesse d'oxydation de l'As(III) (Figure 4). « *Tm. arsenivorans* » et *Tm. cuprina* ont également un comportement assez proche au niveau de l'utilisation de substrats autres que l'As(III), et *Tm. delicata* se distingue par son incapacité à utiliser les acides organiques testés (Tableau 1). Les trois souches sont capables de se développer au contact de l'arsénopyrite (FeAsS), qui est une source d'As(III), de soufre et de fer ferreux. Il a été montré que toutes les souches de *Thiomonas* testées sont capables d'oxyder le fer ferreux (**article 26**). Seule *Tm. cuprina* est capable de se développer au contact de la chalcopyrite (CuFeS₂). Il est possible que cette bactérie soit plus résistante au cuivre que les deux autres organismes.

Tableau 1. Utilisation de substrats par « *Tm. arsenivorans* », *Tm. cuprina* et *Tm. delicata*. Résultats de la troisième sous-culture en milieu minimum CSM complété par un substrat.

Substrats	« <i>Tm. arsenivorans</i> »	<i>Tm. cuprina</i>	<i>Tm. delicata</i>
Aspartate	+	+	-
Glutamate	+	+	-
Pyruvate	+	+	-
Succinate	+	+	-
Glucose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Thiosulfate	+	-	+
Arsenopyrite	+	+	+
Chalcopyrite	-	+	-

Les hybridations ADN/ADN entre les trois organismes ont fourni des valeurs de similarité proches de la limite au-dessous de laquelle des espèces sont considérées comme différentes, fixée à 70% (Wayne et al., 1987). Les profils d'acides gras des trois souches ont également été comparés. Les trois bactéries possèdent les mêmes acides gras majeurs, et des différences entre acides gras minoritaires. De telles différences sont couramment rencontrées entre souches appartenant à une même espèce bactérienne (Walcott *et al.*, 2000).

Au niveau de leurs capacités à utiliser diverses sources d'énergie, *Tm. cuprina* et « *Tm. arsenivorans* » sont très proches. Par ailleurs, « *Tm. arsenivorans* » et *Tm. cuprina* sont mobiles, alors que *Tm. delicata* ne l'est pas. Les phénotypes de « *Tm. arsenivorans* » et de *Tm. cuprina* sont donc globalement très proches et se distinguent de *Tm. delicata*. Il sera donc suggéré, dans une note soumise au journal IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) de regrouper « *Tm. arsenivorans* » et *Tm. cuprina* avec *Tm. delicata* dans une même espèce, regroupant des bactéries capables de se développer, en mode de croissance chimio-litho-autotrophe, avec des sources d'énergies inorganiques présentes sur la plupart des sites miniers : formes réduites du soufre, fer ferreux, et/ou As(III). *Tm. arsenivorans* » et *Tm. cuprina* seront présentées comme sous-espèces de *Tm. delicata*.

Les premières bactéries appartenant au genre *Thiomonas*, *Tm. perometabolis* et *Tm. intermedia*, ont été obtenues à partir d'échantillons de sol (London, 1963 ; London et Rittenberg, 1967). Par la suite, la plupart des nouvelles souches de *Thiomonas* ont été isolées de sites miniers, probablement parce que ces environnements sont riches en soufre et en fer, et que les souches de *Thiomonas* supportent des conditions modérément acides. La souche b6 de « *Tm. arsenivorans* » est le premier micro-organisme appartenant au sous-groupe des β -protéobactéries, isolé et caractérisé, capable d'oxyder l'As(III) en conditions de chimio-litho-autotrophie. D'autres bactéries capables d'utiliser l'As(III) comme source d'énergie tout en fixant le CO₂ ont été isolées de sites miniers en Australie. Ces organismes appartiennent tous au sous-groupe des α -protéobactéries (Santini et al., 2000; Santini et al., 2002) et sont apparentés aux genres *Rhizobium*, *Agrobacterium*, and *Sinorhizobium*. La principale différence entre les milieux de cultures utilisés pour isoler les souches de *Thiomonas* et ceux utilisés pour isoler les α -protéobactéries utilisant l'As(III) comme source d'énergie est le pH. Les milieux de Santini et al. (2000, 2002) présentent un pH compris entre 7 et 8, alors que *Tm. arsenivorans* et les autres souches de *Thiomonas* qui oxydent l'As(III) ont été isolées à pH 6 et sont acido-tolérantes. Le pH pourrait avoir une influence sur le type de micro-organisme chimio-litho-autotrophe capable d'utiliser l'As(III) comme source d'énergie dans l'environnement. Il serait intéressant de tester de façon systématique cette hypothèse, en inoculant des milieux d'enrichissement sélectifs à différents pH avec des échantillons issus de divers sites miniers et de sols. Deux facteurs pourraient favoriser le développement de souches de *Thiomonas* capables d'utiliser l'As(III) comme source d'énergie : la présence simultanée de soufre et d'arsenic, et un pH modérément acide. De très nombreux sites miniers présentent des environnements réunissant ces deux caractéristiques.

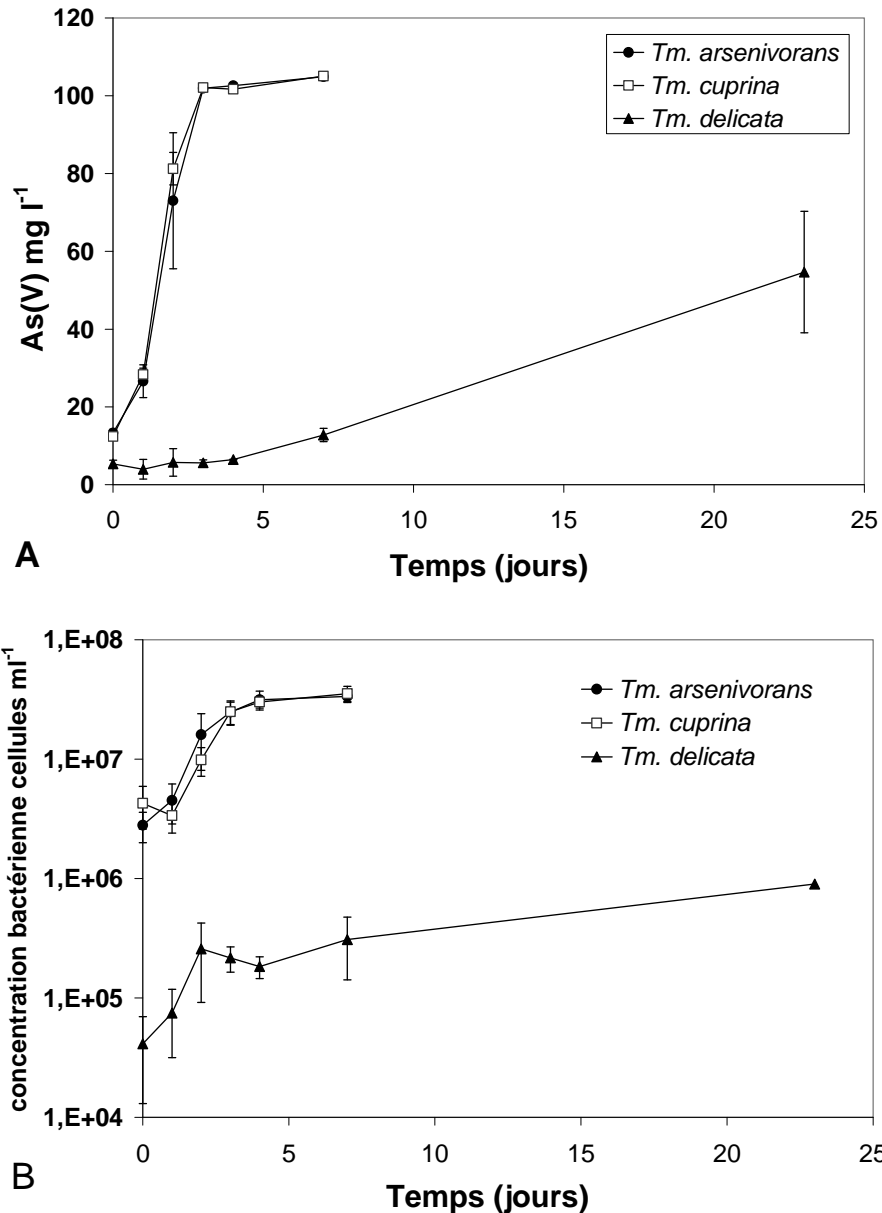


Figure 4. Croissance de *Tm. cuprina*, «*Tm. arsenivorans*» et *Tm. delicata* sur milieu minimum (MCSM, Battaglia-Brunet et al., 2002) contenant 100 mg.l⁻¹ d'As(III), résultats du 8^{ème} repiquage. A : oxydation de l'As(III) ; B : concentration bactérienne.

Nous avons favorisé la croissance d'une souche de *Thiomonas* sur un milieu d'enrichissement autotrophe à pH 6 contenant de l'As(III) comme unique source d'énergie, à partir d'échantillons issus du site de CHENI. Un résultat similaire a ensuite été obtenu sur le site de Carnoules, géographiquement éloigné de CHENI, et nous avons vu que diverses autres souches de *Thiomonas* capables d'oxyder l'As(III) ont été isolées de sites miniers. Cependant, le rôle exact des bactéries appartenant au genre *Thiomonas* dans la biogéochimie de l'arsenic demeure indéterminé. Nous avons vu précédemment que les procédures d'isolement d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* ont conduit à une surestimation du rôle de cette bactérie dans les processus de biolixiviation des minerais. Il est donc important de vérifier, par des méthodes d'écologie moléculaire, la présence et l'activité liée à l'arsenic des bactéries appartenant au genre *Thiomonas* dans l'environnement. Hallberg et al. (2006) ont mis au point des sondes FISH spécifiques à deux groupes de bactéries appartenant au genre

Thiomonas. Ils ont utilisé ces sondes pour étudier la composition de biofilms flottants, se développant dans des eaux de drainages miniers acides, sur deux anciens sites miniers au Pays de Galle. Ces auteurs ont constaté que, bien que les procédures d'isolement aient conduit à l'obtention de souches de *Thiomonas*, les bactéries marquées par les sondes spécifiques aux bactéries appartenant au genre *Thiomonas* représentaient moins de 0,1 % de la population totale. De même, Bruneel et al. (2006) ont étudié la population bactérienne présente dans l'eau acide et chargée en arsenic du site de Carnoulès par des méthodes moléculaires (inventaire de séquences 16S et T-RFLP) et n'ont pas détecté la présence d'organismes apparentés au genre *Thiomonas*, alors que plusieurs souches de *Thiomonas* capables d'oxyder l'As(III) ont été isolées à partir d'échantillons d'eau prélevés sur ce site. Curieusement, les études de Hallberg et al. (2006) et de Bruneel et al. (2006) ont été effectuées en parallèle, sur des sites différents présentant des eaux dont le pH est compris entre 2 et 3, et leurs résultats sont très proches. Les deux équipes ont observé indépendamment la présence majoritaire de bactéries apparentées au genre *Gallionella*. D'après leur description originale, les bactéries appartenant au genre *Gallionella* utilisent le fer ferreux comme source d'énergie en chimio-litho-autotrophie dans des environnements dont le pH est proche de la neutralité. Ces micro-organismes n'ont jamais été obtenus en culture pure et leur éventuelle activité vis-à-vis de l'arsenic n'a jamais été étudiée. Pour l'instant, aucune méthode n'a été mise au point pour cultiver des souches de *Gallionella* sur milieu solide, ce qui pourrait expliquer pourquoi seules des espèces minoritaires, mais capables de se développer sur milieu solide, aient été isolées par Hallberg et al. (2006). Il pourrait être judicieux de rechercher les *Thiomonas* dans les populations bactériennes associées aux phases solides. En effet, nous avons vu que les organismes étroitement apparentés à « *Tm. arsenivorans* » peuvent utiliser des minéraux sulfurés comme substrat de croissance. Or, les études de Hallberg et al. (2006) et Bruneel et al. (2006b) étaient focalisées sur la phase aqueuse des environnements étudiés. Une autre étude, portant sur l'écologie microbienne et sur la géochimie d'une source géothermale riche en arsenic (Macur et al., 2004), a mis en évidence un lien spatio-temporel entre le phénomène d'oxydation de l'As(III) et la présence de micro-organismes apparentés à *Thiomonas*. L'aptitude des bactéries étroitement apparentées à « *Tm. arsenivorans* » à utiliser l'As(III) comme unique source d'énergie en conditions d'autotrophie pourrait permettre à ces organismes de subsister dans certaines niches environnementales très particulières.

Dans des milieux pauvres en substrat organique, des communautés bactériennes peuvent être constituées de bactéries litho-autotrophes fournissant un peu de matière organique pour des bactéries hétérotrophes. Ainsi, il est possible que de nombreux organismes, incapables de se développer sous forme de souche pure dans un milieu minimum contenant de l'As(III) comme seule source d'énergie, puissent se maintenir et oxyder l'As(III) dans un biofilm, sans apport particulier de substrat organique. Ainsi, nous avons détecté des organismes appartenant aux genres *Ralstonia* et *Pseudomonas* dans le biofilm de l'étude Lopérec (**article 17**), et des bactéries, hétérotrophes sous forme de souches pures, participent à l'oxydation de l'As(III) dans des bioréacteurs de potabilisation en présence d'une eau très pauvre en matière organique (Casiot et al., 2006). Quel est le rôle du mécanisme d'oxydation de l'As(III) chez ces bactéries hétérotrophes? D'après différents auteurs, l'oxydation de l'As(III) serait un mécanisme de détoxification chez les bactéries qui ont besoin d'un substrat organique pour se développer (Weeger et al., 1999, Bruneel et al., 2006). En effet, l'As(V) est un peu moins toxique que l'As(III), et surtout il s'adsorbe facilement sur divers matériaux solides : il est donc moins bio-disponible. Cependant, Anderson et al. (2003) ont suggéré qu'il est possible que certaines bactéries hétérotrophes puissent tirer de l'énergie de l'oxydation de l'As(III). Qu'en est-il pour les différentes souches de *Thiomonas* incapables d'utiliser l'As(III) comme source d'énergie en chimio-litho-autotrophie ? Nous avons cherché à mettre

en évidence l'utilisation de l'As(III) dans le métabolisme énergétique de diverses souches de *Thiomonas* appartenant soit au groupe 1 (proches de *Tm. intermedia* et incapables d'utiliser l'As(III) en milieu minimum), soit au groupe 2 (proches de « *Tm. arsenivorans* » et capables d'utiliser l'As(III) en milieu minimum). L'extrait de levure était apporté comme substrat organique en complément de l'As(III). Nous avons observé une grande variabilité de réponses d'une souche à l'autre.

Trois phénomènes, dont l'importance relative varie d'une souche à l'autre, peuvent influencer la croissance des bactéries :

- l'inhibition du métabolisme de l'arsenic par l'extrait de levure,
- l'inhibition de la croissance sur extrait de levure par l'arsenic,
- un effet protecteur de l'extrait de levure vis-à-vis de la toxicité de l'arsenic.

L'influence de ces trois effets combinés sur la croissance des différentes souches en présence de 100 mg.l⁻¹ d'As(III) est récapitulée dans le Tableau 2. De façon générale, les bactéries du groupe 1 sont plus sensibles à la toxicité de l'As(III) que celles du groupe 2. Cependant, pour une des bactéries de ce groupe (B1), la présence d'As(III) a un léger effet stimulant de la croissance en présence de 0,2 g.l⁻¹ d'extrait de levure.

Tableau 2. Effet de 100 mg.l⁻¹ d'As(III) sur la croissance de différentes souches de *Thiomonas* en présence de 0,1 ou 0,2 g.l⁻¹ d'extrait de levure. Effet sur la D.O. finale à 620 nm (essais réalisés en triplicats et en parallèle, seuls les effets d'amplitude supérieure à l'écart-type sont mentionnés)

Concentration en extrait de levure (g.l ⁻¹)	0,2	0,1
3AS (Carnoulès, Duquesne et al., 2007) Groupe 1	- 67% inhibition	- 69 % inhibition
B1 (Carnoulès, Casiot et al., 2003) Groupe 1	+ 8% stimulation	- 56% inhibition
« <i>Tm. arsenivorans</i> » Groupe 2	Pas d'effet	+ 25% stimulation
<i>Tm. cuprina</i> Groupe 2	+ 14% stimulation	+ 38% stimulation

Bryan *et al.* (article 21) ont étudié neuf souches différentes de *Thiomonas*, dont 3AS, B1 et « *Tm. arsenivorans* », aux niveaux génétiques et métaboliques. Parmi ces neuf souches, deux sont très sensibles à la toxicité de l'As(III) : *Tm. perometabolis* et Ynys1. Ces deux souches se distinguent des sept autres par le fait qu'elles sont incapables d'oxyder l'As(III) et qu'elles ne possèdent pas le gène *aoxB* codant pour la sous-unité catalytique de l'arsenite-oxydase. Il est possible que des souches se développant dans un milieu pauvre en arsenic et riche en matière organique aient perdu le gène *aoxB*. Nous avons constaté que la souche de *Tm. perometabolis*, fournie par la collection de l'Institut Pasteur, maintenue dans un milieu contenant 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure et sans arsenic, ne possédait pas de gène *aoxB* et était sensible à l'As(III), alors que la souche de *Tm. intermedia*, fournie par la banque de souches DSMZ et maintenue dans un milieu contenant 1 g.l⁻¹ d'extrait de levure est capable d'oxyder l'As(III) et possède le gène *aoxB*. Par ailleurs, la souche de *Thiomonas* 3AS, lors de son isolement, était capable de se développer sur milieu minimum en présence d'As(III) comme source d'énergie (Duquesne, 2004), capacité qu'elle a perdue au cours du temps et des repiquages dans des milieux contenant de l'extrait de levure. Il semblerait même que dans certaines conditions de croissance elle ait perdu le gène *aoxB* par délétion (Bonney V.,

communication personnelle). Des études de génomique comparative, effectuées sur *Tm. 3AS* ainsi que sur quatre autres souches de *Thiomonas* issues du site de Carnoulès et sur « *Tm. arsenivorans* », suggèrent une plasticité importante du génome des organismes appartenant au genre *Thiomonas* (article 99 soumis). Ces observations mettent en évidence les limites des études effectuées sur des souches isolées et cultivées au laboratoire, dans des conditions éloignées de celles de l'environnement duquel elles sont issues.

Lebrun et al. (2003) ont émis l'hypothèse selon laquelle l'arsenite-oxydase serait une enzyme bio-énergétique ancienne. Il est probable que l'oxydation de l'arsenic via cette enzyme peut avoir deux fonctions différentes, chez des organismes différents ou dans un même organisme, en fonction des conditions physico-chimiques : soit une fonction énergétique, soit un mécanisme de résistance. Les principaux paramètres susceptibles d'orienter la fonction de l'arsenite-oxydase seraient la présence ou non d'autres sources d'énergie (organiques ou inorganiques), la concentration en As(III), le pH et le potentiel redox.

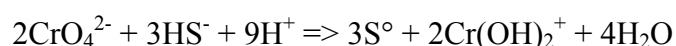
3. Milieux anaérobies : précipitation de métaux et métalloïdes par les BSR

3.1 Traitement d'eaux chargées en Cr(VI)

(référence aux articles 9, 12, 13, 16, 18, 23)

Le Cr(VI), CrO_4^{2-} est un anion très toxique et mutagène. Le Cr(III), Cr^{3+} , est beaucoup moins toxique que le Cr(VI) et très peu soluble à pH neutre, contrairement au Cr(VI) : il précipite généralement sous forme d'hydroxyde $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Des travaux portant sur la bio-réduction du Cr(VI) ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre le BRGM, le Laboratoire de Microbiologie IRD de Marseille et le Laboratoire de Bio-ingénierie et Bio-énergétique des Protéines (BIP) du CNRS de Marseille. Cette collaboration a été soutenue dans un premier temps par l'Action de Recherche Concertée (ARC CNRS) Bactéries Sulfato-réductrices, puis par le projet Européen (5^{ème} PCRD) Metalbioréduction (<http://metalbio-reduction.brgm.fr>). L'IRD de Marseille apportait dans cette collaboration ses connaissances en microbiologie dans le domaine des bactéries sulfato-réductrices (BSR). Le BIP travaillait sur la réduction des métaux, et en particulier du Cr(VI), par des enzymes de type cytochromes ou hydrogénases extraites des BSR. Le BRGM complétait cet éventail de compétences par son expérience dans le domaine des bio-procédés, et co-finançait avec l'ADEME la thèse réalisée par C. Michel au BIP. L'objectif de cette collaboration était de développer des procédés de traitement d'eaux polluées par du Cr(VI) en utilisant des BSR en bioréacteur. Diverses bactéries sont connues pour leur capacité à réduire le Cr(VI) efficacement dans un milieu contenant des concentrations élevées en substrats organique. Un des avantages des BSR, par rapport à ces organismes, serait leur capacité à utiliser l'hydrogène comme source d'énergie. En effet, la consommation d'hydrogène ne génère pas de sous-produit polluant et la croissance des BSR peut être contrôlée par l'apport en source de carbone. Le BRGM avait sélectionné une population mixte contenant des BSR, nommée CH10, et l'IRD a montré que dans cette population, les BSR sont majoritairement des bactéries apparentées à *Desulfomicrobium norvegicum*. C. Michel a comparé l'activité

enzymatique Cr(VI)-réductrice de plusieurs souches de BSR appartenant aux genres *Desulfomicrobium* et *Desulfovibrio* (Michel et al., 2001). Ces travaux ont montré que les cellules entières de *De. norvegicum* DSM 1741 possèdent une activité enzymatique Cr(VI)-réductrice plus élevée que les autres souches testées, y compris une souche isolée de CH10 par l'IRD. C. Michel a également montré avec des enzymes purifiés que le cytochrome c3 de *De. norvegicum* possède une activité Cr(VI)-réductrice plus élevée que celle du cytochrome c3 de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DSM 644). Parmi toutes les enzymes purifiées testées, celle dont l'activité Cr(VI)-réductrice est la plus élevée est la [Fe]-hydrogénase de *D. vulgaris* Hildenborough, dont l'activité spécifique est dix fois supérieure à celle du cytochrome c3 de *De. norvegicum*. C. Michel a donc montré que les BSR possèdent des enzymes capables de réduire le Cr(VI). Ces enzymes sont susceptibles de participer à la réduction du Cr(VI) par les BSR en milieu réel. La capacité de certaines BSR à utiliser le Cr(VI) comme accepteur terminal d'électrons, bien que controversée, a été suggérée par certains travaux (Tebo et Obratsova, 1998). La respiration du Cr(VI) par divers micro-organismes, autres que les BSR, est mentionnée dans la littérature. La mise en évidence de ce phénomène est délicate en raison de la toxicité du Cr(VI). Il est nécessaire d'apporter du Cr(VI) à faible concentration, mais en mode continu ou fed-batch, afin de pouvoir observer une croissance cellulaire (Tebo et Obratsova, 1998). C. Michel n'a pas observé de croissance de *De. norvegicum* dans un milieu contenant du Cr(VI) et dépourvu de sulfate. En présence de sulfate, les BSR produisent de l'H₂S capable de réduire chimiquement le chromate selon la réaction :



Dans un premier temps, nous avons voulu estimer les ordres de grandeur relatifs des réactions de réduction directe (enzymatique) et indirecte (par le sulfure d'hydrogène). Pour cela, nous avons utilisé des biofilms de la population CH10 sur un support de pouzzolane, fréquemment utilisé comme support bactérien dans nos bioréacteurs à lit fixé. En batch, nous avons comparé les vitesses de réduction du Cr(VI) obtenues avec le biofilm seul, le biofilm immergé dans le milieu de culture chargé en sulfure comme en fin de culture batch (500 mg.l⁻¹), et 500 mg.l⁻¹.h⁻¹ de sulfure sans biofilm. Un essai témoin mettait en contact le Cr(VI) avec la pouzzolane, sans biofilm ni sulfure. La concentration initiale en Cr(VI) était égale à 60 mg.l⁻¹. Les résultats de cette expérience montrent que le Cr(VI) est réduit beaucoup plus rapidement par le sulfure que par le biofilm (**article 9**) : 200 mg.l⁻¹.h⁻¹ par le sulfure, et 16 mg.l⁻¹.h⁻¹ par le biofilm (Figure 5). Nous avons ensuite effectué une expérience en continu, dans un petit réacteur (450 ml) à lit fixé rempli de pouzzolane ou de tubes de céramique. Des biofilms de CH10 et de la souche pure *De. norvegicum* Hildenborough ont été préparés en mode fed-batch en utilisant un milieu de culture industriel, de l'acétate et de l'hydrogène étant apportés en tant que sources de carbone et d'énergie. Après croissance du biofilm, les colonnes ont été alimentées en continu avec une solution de NaCl (eau physiologique) contenant 13 mg.l⁻¹ de Cr(VI). L'alimentation en hydrogène était maintenue pendant cette étape de l'essai. En fin d'expérience, la densité du biofilm a été estimée par un dosage de protéines totales. Cette expérience a montré que les biofilms possédaient une activité Cr(VI)-réductase, légèrement plus élevée chez *De. norvegicum* que chez CH10 (Figure 6). La vitesse de réduction est proche de 10 mg.l⁻¹.h⁻¹ en début d'expérience avec le support de pouzzolane, et diminue de 50% en 100 min, peut-être en raison de l'inactivation des systèmes enzymatiques. La vitesse spécifique, rapportée à la concentration en protéines totales, est supérieure avec le support de céramique qu'avec la pouzzolane (Figure 7), mais elle diminue aussi plus rapidement. Ces expériences ont donc montré que les biofilms de BSR réduisent effectivement le Cr(VI) en absence d'HS⁻, mais que cette activité enzymatique directe décroît rapidement lorsque les cellules ne sont pas dans le milieu de culture complet. Par ailleurs, le

sulfure d'hydrogène d'origine biologique peut participer efficacement à la réduction du Cr(VI).

Nous avons ensuite réalisé des expériences en continu pendant 5 mois dans des bioréacteurs à lit fixé contenant divers supports bactériens (**articles 12 et 13**). Le milieu d'alimentation contenait du sulfate, et les sources d'énergie et de carbone étaient $H_2 + CO_2 +$ acétate. Ces bioréacteurs (photographie 9) ont été inoculés avec *De. norvegicum* Hildenborough, mais fonctionnaient en conditions non stériles, comme dans une unité de bio-traitement réelle. Leur démarrage a été effectué en conditions de sulfato-réduction classique, sans Cr(VI), puis le chromate a été introduit en concentration croissante dans la solution d'alimentation (jusqu'à 40 ou 100 $mg.l^{-1}$ en fonction du matériau de remplissage). Enfin, le temps de séjour a été diminué en augmentant le débit d'alimentation. La figure 8 montre l'évolution des principaux paramètres au cours de l'expérience réalisée dans le bioréacteur contenant de la pouzzolane.

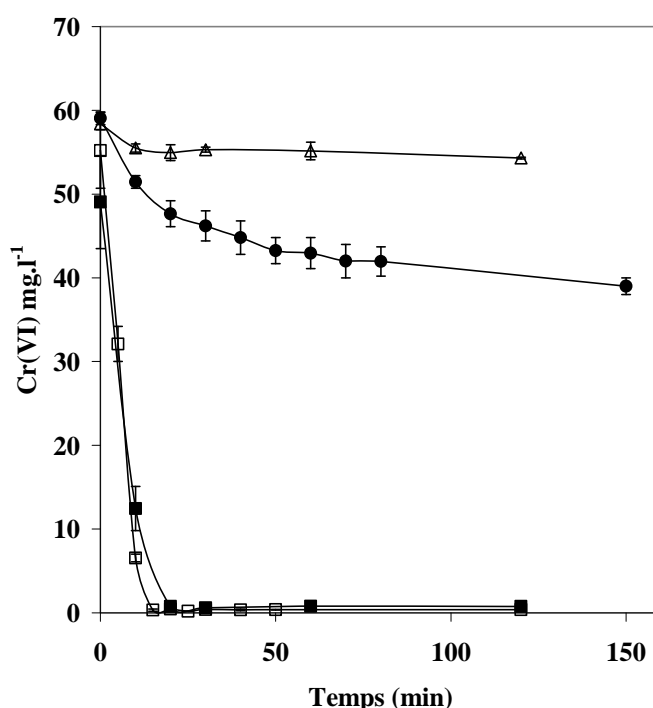


Figure 5. Réduction du Cr(VI) en batch dans des flacons contenant de la pouzzolane, sous pression d'hydrogène. (Δ) eau sans biofilm ni sulfure ; (●) biofilm sans sulfure ; (■) biofilm + sulfure ; (□) sans biofilm, surnageant de culture débarrassé des bactéries mais chargé en sulfure.

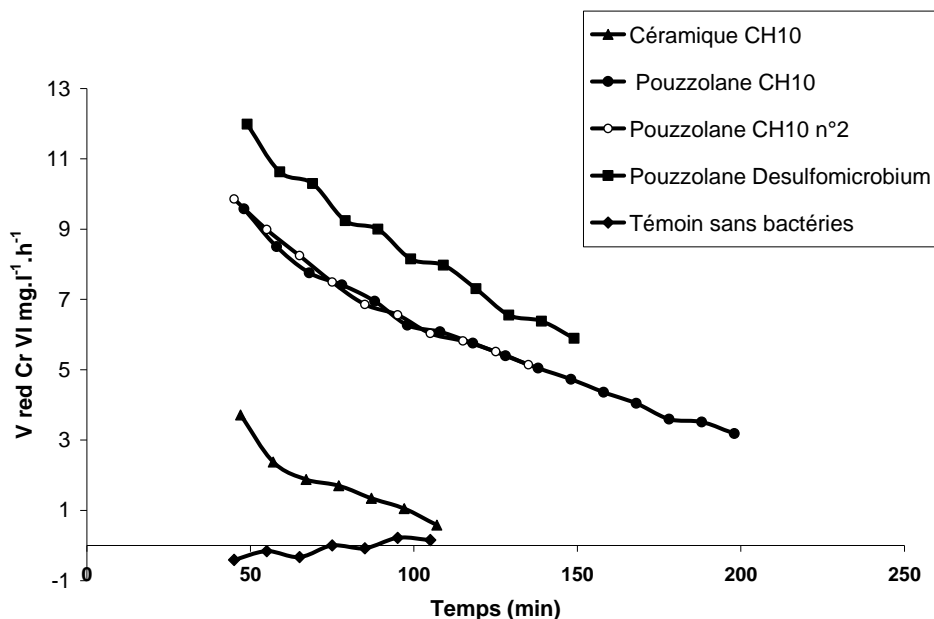


Figure 6. Vitesse de réduction du Cr(VI) en continu (biofilm sans sulfure ni sulfate) dans des réacteurs à lit fixé colonisés soit par la population CH10, soit par *De. norvegicum* et alimentés en hydrogène.

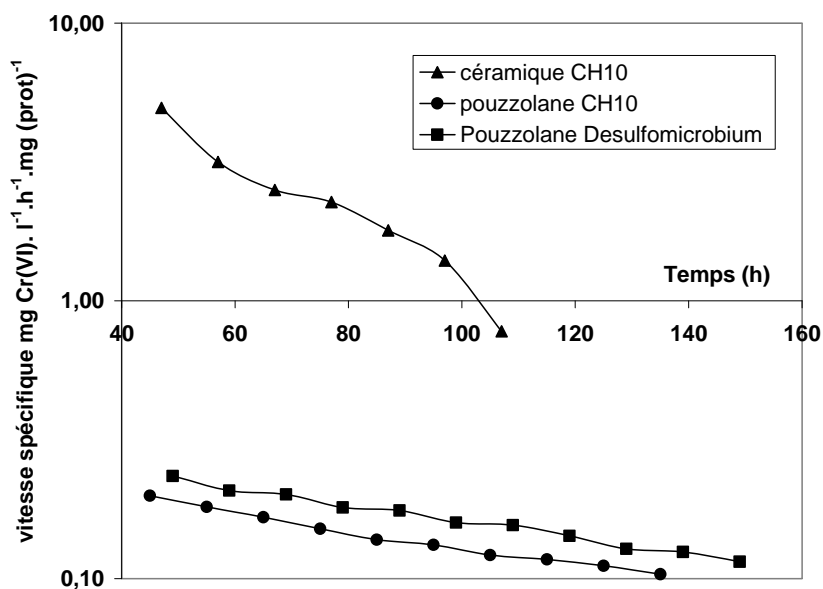


Figure 7. Vitesse spécifique de réduction du Cr(VI) en continu (biofilm sans sulfure ni sulfate) dans des réacteurs à lit fixé colonisés soit par la population CH10, soit par *De. norvegicum* et alimentés en hydrogène.

Quel que soit le matériau de remplissage des bioréacteurs, une inhibition de l'activité de sulfato-réduction par le Cr(VI) a été observée. Lorsque le temps de séjour a été diminué jusqu'à une valeur « limite », la concentration en Cr(VI) a commencé à augmenter en sortie de bioréacteur. Cette valeur limite dépendait du type de remplissage, et semblait corrélée à la surface spécifique du matériau. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la pouzzolane, dont la surface spécifique est très supérieure à celles de la céramique poreuse et du garnissage PVC testés en parallèle. Dans tous les cas, lorsque cette valeur était atteinte, du Cr(VI) était détecté en sortie de réacteur et sa concentration ne cessait d'augmenter tant que le débit

d'alimentation ou la concentration en Cr(VI) dans l'alimentation n'était pas réduit : le système était alors dans un état d'inhibition croissante. Il est intéressant de noter que les vitesses de réduction du Cr(VI) maximales obtenues dans ces bioréacteurs sont de l'ordre de 5 à 6 $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figure 9, **article 13**). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur, et même plus faibles que les vitesses maximales obtenues avec des biofilms de BSR sans sulfure (cf. Figures 5 et 6). La production de sulfure étant inhibée dès que le flux de Cr(VI) augmente dans le bioréacteur, la réduction indirecte du Cr(VI) par l' HS^- n'améliore pas de façon significative l'efficacité du système. Cependant, l'activité de réduction est maintenue dans la durée, contrairement à ce qui était observé lors des essais de simple contact d'un biofilm avec le Cr(VI).



Photographie 9. Bioréacteurs à lit fixe inoculés avec *D. norvegicum* Hildenborough et alimentés avec un mélange H_2/CO_2 pour le traitement en continu des eaux polluées par du Cr(VI). Comparaison de différents types de remplissages.

Nous avons observé que lorsque le temps de séjour était proche de la valeur « limite » au-dessous de laquelle du Cr(VI) est détecté en sortie, l'activité de sulfato-réduction et la concentration en sulfure dissous en sortie de bioréacteur étaient très faibles, et que le ratio entre les vitesses de sulfato-réduction et de Cr(VI)-réduction était tel qu'il semblait impossible d'expliquer la réduction du Cr(VI) uniquement par la réaction indirecte avec HS^- . Cependant, divers phénomènes (incertitudes d'analyses, évaporation, ré-oxydation du sulfure en sulfate par le Cr(VI)) pouvaient induire une sous-estimation de l'activité de sulfato-réduction. Nous avons donc effectué, sur un des bioréacteurs, un essai d'alimentation sans sulfate pendant 20 jours (**article 18, Annexe 4**). Durant cette période, l'activité de réduction du chrome a été réduite de 50%, mais est demeurée stable à cette faible valeur ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) pendant 10 jours (Figure 10).

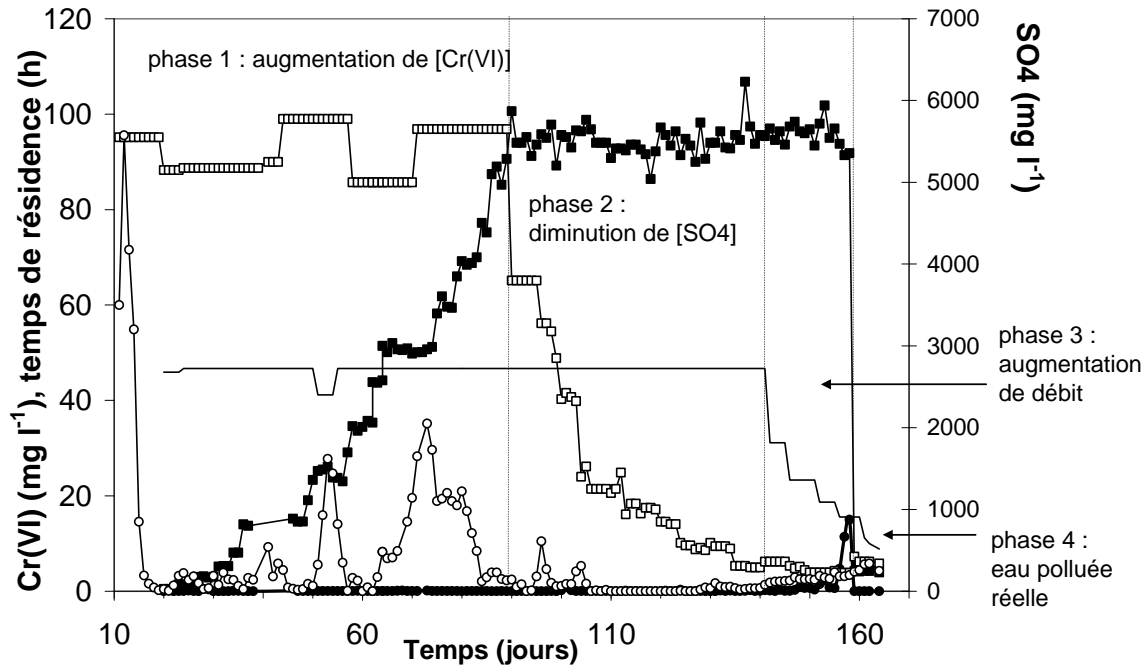


Figure 8. Evolution des principaux paramètres au cours de l'expérience dans le bioréacteur à remplissage de pouzzolane. (■) concentration en Cr(VI) dans l'alimentation ; (◆) concentration en Cr(VI) en sortie ; (□) concentration en SO₄²⁻ dans l'alimentation ; (○) concentration en SO₄²⁻ en sortie ; (-) temps de séjour.

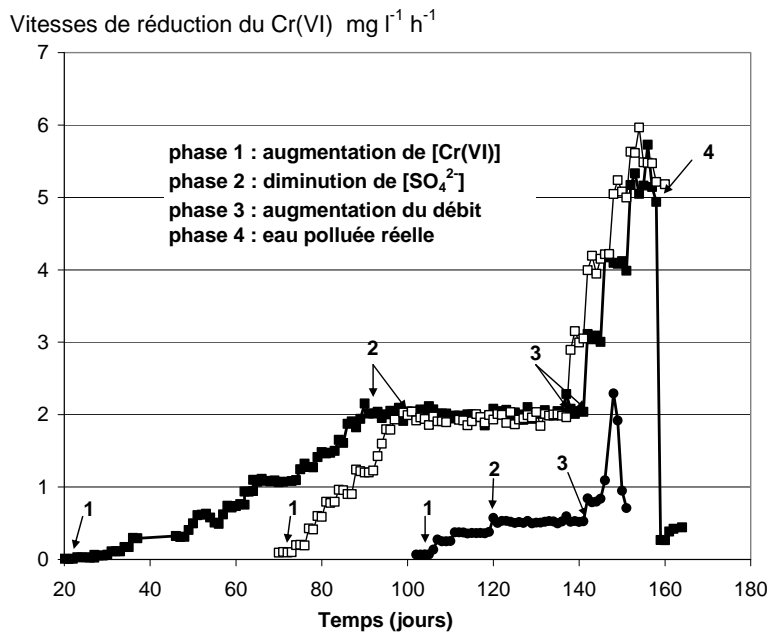


Figure 9. Comparaison des vitesses de réduction du Cr(VI) obtenues en réacteurs de 2 litres. (●) support PVC ; (□) céramique poreuse ; (■) pouzzolane.

Des interruptions volontaires de l'alimentation en hydrogène ont induit une nouvelle diminution de cette activité de réduction du Cr(VI). Nous avons analysé la composition de la population bactérienne en sortie de ce bioréacteur, avant et pendant l'expérience d'alimentation en sulfate. Un inventaire basé sur les séquences d'ARNr 16S, et un second basé sur les séquences du gène *dsrAB* qui cible spécifiquement les BSR, ont été réalisés.

Toutes les séquences *dsrAB* obtenues avant et pendant l'essai sans sulfate sont apparentées à la séquence de *De. norvegicum* : aucun autre genre de BSR ne s'est développé dans le bioréacteur. Par contre, l'inventaire basé sur le gène de l'ARNr 16S montre que de nombreuses autres bactéries étaient présentes dans l'effluent. Parmi les séquences obtenues (Tableau 3), certaines sont apparentées à des organismes anaérobies, et sont susceptibles de participer à la réduction du Cr(VI) dans le bioréacteur. *Acetobacterium* avait déjà été mis en évidence dans des consortia réduisant le Cr(VI) issus de sédiments contaminés (Arias et Tebo, 2003). Cette bactérie acétogène a trouvé des conditions favorables à son développement dans nos systèmes alimentés en H₂ + CO₂. *Rhodocyclus* est susceptible de se développer de façon anaérobie en utilisant l'HS⁻ comme source d'énergie (Sinha et Banerjee, 1997), et peut métaboliser l'acétate (Zilles et al., 2002). Stewart et al. (2007) ont détecté des micro-organismes apparentés à *Rhodocyclus* dans leurs microcosmes de sol contaminé au Cr(VI) et additionnés d'acétate. D'autres séquences d'ARNr 16S sont apparentées à des micro-organismes aérobies, qui peuvent soit avoir colonisé le tuyau de sortie du bioréacteur, soit avoir été présents dans la solution d'alimentation non stérile. Diverses souches appartenant au genre *Acinetobacter*, auquel sont affiliées certaines séquences citées dans le Tableau 3, sont connues pour leur capacité à réduire le Cr(VI) (Zakaria et al., 2007, Dmytrenko et al., 2007).

Tableau 3. Affiliation et distribution des gènes codant pour la petite sous-unité 16S des ribosomes détectés dans l'effluent d'un bioréacteur de 2 l avant et pendant l'expérience d'alimentation sans sulfate.

Phylotypes	Avant l'alimentation sans sulfate	Pendant l'alimentation sans sulfate
	Nombre de clones	Nombre de clones
Organismes anaérobies		
MBR114-36 MBR114-38	8 (25,8%)*	8 (28,6%)
<i>Acetobacterium</i> (anaérobie stricte)		
<i>Rhodocyclus</i> (anaérobie stricte)	3 (9,7%)	6 (21,4%)
<i>Sedimentibacter</i> (anaérobie stricte)	MBR283-55 1 (3,2%)	0
<i>Prevotella</i> (anaérobie stricte)	MBR283-102 1 (3,2%)	1 (3,6%)
Organismes se développant en conditions aérobies ou en micro-aérophilie		
MBR114-45 MBR283-100		
<i>Delftia</i>	8 (25,8%)	4 (14,3%)
<i>Acinetobacter</i>	MBR114-46 5 (16,1%)	4 (14,3%)
<i>Aquaspirillum</i>	MBR114-8 2 (6,4%)	2 (7,1%)
<i>Delftia-Aquaspirillum Group</i>	MBR283-61 1 (3,2%)	0
<i>Stenotrophomonas</i>	MBR283-121 1 (3,2%)	3 (10,7%)
<i>Chryseobacterium</i>	MBR283-99 1 (3,2%)	0

* pourcentage de chaque phylotype entre parenthèses

Notre étude suggère que *De. norvegicum*, sélectionnée au début de nos travaux pour ses capacités à réduire enzymatiquement le Cr(VI), a été maintenue dans le bioréacteur qui a fonctionné plusieurs mois en conditions non stériles. Cependant, de nombreuses autres bactéries n'appartenant pas au groupe des BSR se sont développées dans notre système et peuvent avoir participé à la réduction du Cr(VI). La contribution de chacune à la réduction globale du Cr(VI) n'est toujours pas quantifiée. Nous avons cependant observé un phénomène intéressant : lorsque nous avons de nouveau alimenté en sulfate le bioréacteur sur lequel nous avons effectué notre expérience de réduction du Cr(VI) sans sulfate, des vitesses de Cr(VI)-

réduction **et de sulfato-réduction** plus élevées qu'avant ont été obtenues (Figure 10). De plus, la vitesse de réduction du Cr(VI), au cours de cette période, a pu atteindre une valeur proche de $9 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, la vitesse la plus élevée jamais observée dans aucun de nos bioréacteurs fonctionnant en continu (Figure 11, photographies 10-12). Cette observation est d'autant plus remarquable que le bioréacteur dans lequel cette expérience a été réalisée contenait un support PVC, à faible surface spécifique. La vitesse de réduction du Cr(VI) avait été très médiocre dans ce bioréacteur jusqu'à l'expérience d'alimentation sans sulfate.

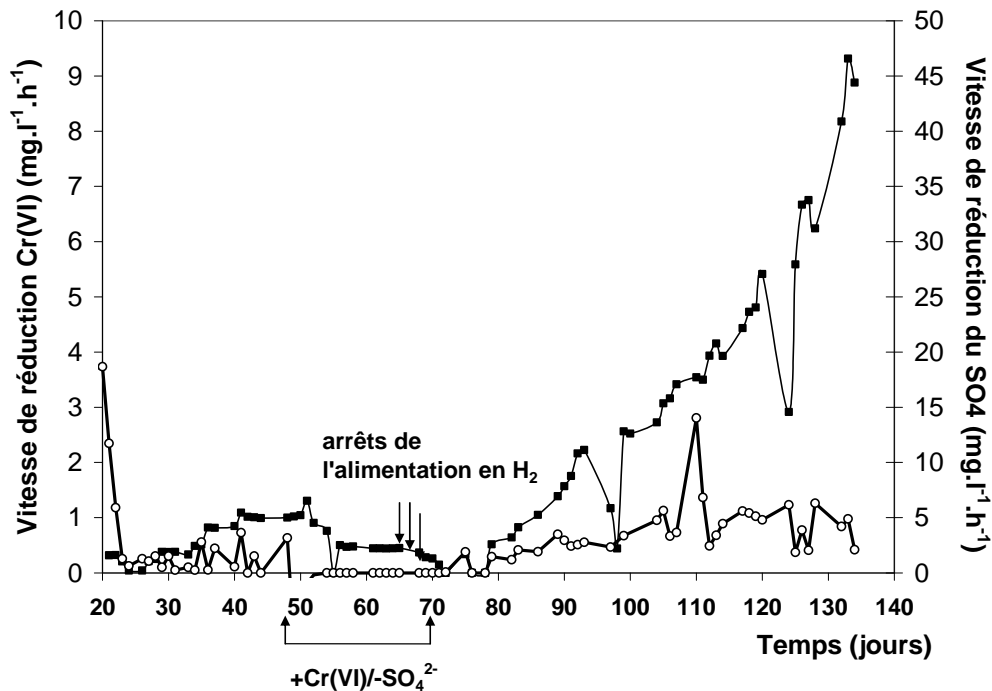


Figure 10. Evolution des vitesses de réduction du Cr(VI) et du sulfate dans un bioréacteur de 2 l rempli de support PVC, avant, pendant et après l'expérience d'alimentation sans sulfate. (■) vitesse de réduction du Cr(VI) ; (○) vitesse de réduction du sulfate.

Le chromate, analogue du sulfate, entre dans les cellules via le système de transport du sulfate (Cervantes, 1991). Il est donc possible que l'absence de sulfate amplifie la toxicité du Cr(VI) pour les cellules bactériennes, et que la pression de sélection exercée pendant la période d'alimentation sans sulfate ait favorisé la croissance des organismes les plus résistants.

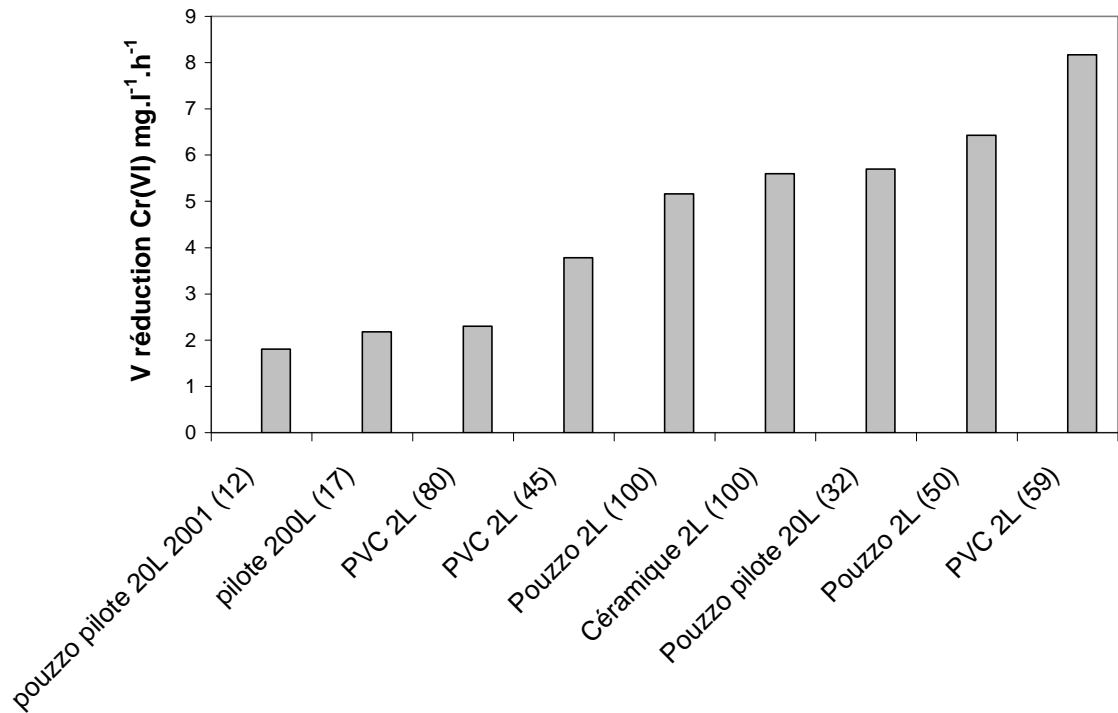


Figure 11. Vitesses maximales de réduction du Cr(VI) obtenues en bioréacteurs inoculés avec une population mixte contenant *De. norvegicum*, à différentes échelles (de 2 à 200 L, **articles 12, 13 et 18**). La concentration en Cr(VI) dans l'alimentation, pour chaque expérience, est donnée entre parenthèses.



10



11



12

Photographies 10, 11 et 12. Bioréacteurs utilisés pour traiter des eaux polluées par du Cr(VI) en utilisant l'hydrogène comme source d'énergie. 10 : réacteur de 2 litres. 11 : réacteur de 20 litres. 12 : réacteur de 200 litres.

Plusieurs études ont montré que, dans des consortia naturels, issus de sédiments ou d'aquifères, les BSR sont plus sensibles que d'autres groupes bactériens à la toxicité du Cr(VI) (Marsh et al., 2000 ; Arias et Tebo, 2003). En microcosmes, les BSR ne se développent pas pendant la phase de réduction du Cr(VI) (Arias et Tebo, 2003 ; Stewart et al., 2007), mais seulement lorsque le Cr(VI) a été entièrement réduit. Du point de vue purement thermodynamique, la consommation des accepteurs d'électrons dans le milieu devrait se dérouler selon la séquence suivante (Marsh et al., 2000) : nitrate, chromate, fer ferrique, sulfate, carbonate. Effectivement, Stewart et al. (2007) ont constaté la réduction successive du nitrate, du chromate, puis du fer ferrique et enfin du sulfate, dans leurs microcosmes de sol pollué, en présence d'acétate comme donneur d'électrons. Dans nos bioréacteurs, l'inhibition de la sulfato-réduction n'était donc peut-être pas liée uniquement à l'effet de toxicité du Cr(VI), mais aussi à sa présence en tant qu'accepteur d'électrons plus intéressant que le sulfate du point de vue énergétique.

Il est possible que les BSR soient particulièrement sensibles à la toxicité du Cr(VI) pour les deux raisons suivantes :

- En milieu naturel, le Cr(VI) étant un accepteur d'électrons plus intéressant du point de vue énergétique que le sulfate a généralement déjà été réduit par d'autres bactéries avant de parvenir dans la zone de sulfato-réduction,
- le sulfure d'hydrogène produit par les BSR les protège, par sa capacité à réduire chimiquement le Cr(VI).

En ce qui concerne les procédés en bioréacteurs « dynamiques », les BSR ne sont donc peut-être pas, en tant que culture pure, les organismes les plus intéressants pour la réduction directe du Cr(VI). Un procédé indirect, découplant la production du sulfure et la réduction indirecte du Cr(VI) par le sulfure, serait sans doute plus économique. Cependant, pour certains types de traitements in-situ (barrières, zones réactives), l'utilisation de BSR « résistantes » en association avec d'autres types de bactéries pourrait s'avérer efficace. Des trois consortia étudiés par Arias et Tebo (2003), celui qui réduisait le plus rapidement le Cr(VI) était le seul qui contenait des BSR, bien que celles-ci ne se soient pas développées pendant la phase de réduction du Cr(VI). Nos travaux ont montré qu'il serait possible d'améliorer, par évolution dirigée, l'activité de certaines BSR en présence de Cr(VI). Bien sûr, de nombreuses questions demeurent encore sans réponse, et des travaux complémentaires aux études déjà réalisées permettraient d'affiner nos interprétations. Il serait intéressant de pouvoir isoler, de la population finale « améliorée », des souches de *De. norvegicum*, *Acetobacterium* et *Rhodocyclus*, afin de les étudier séparément. L'idéal serait de pouvoir les cultiver en continu en tant que souches pures, afin de déterminer si elles utilisent le Cr(VI) comme accepteur d'électrons.

3.2 Traitement anaérobie des effluents miniers

(référence aux articles 6, 19 et 20)

Nous venons de voir que le sulfure d'hydrogène peut convertir la forme la plus toxique du chrome, le Cr(VI), en Cr(III) moins toxique, par réduction chimique. Le produit de la respiration anaérobie du sulfate par les BSR peut également être utilisé pour faire précipiter efficacement de nombreux éléments toxiques souvent présents dans les effluents miniers, tels que As, Cu, Cd, Ni, Zn, Co. En général, les effluents miniers et industriels chargés en métaux sont traités par neutralisation à la chaux. Au cours de ce traitement, les métaux précipitent sous forme d'hydroxydes. Cependant, la plupart hydroxydes de métaux lourds sont plus

solubles à pH neutre que les sulfures formés par les mêmes métaux en conditions oxydantes (Tableau 4). De plus, le traitement à la chaux génère des volumes très importants de déchets.

Tableau 4. Solubilité théorique de quelques métaux sous forme hydroxydes ou de sulfures, à pH 7 dans l'eau pure (de Vegt et al., 1996)

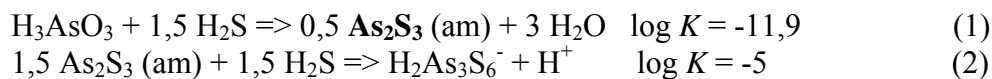
Métal	Solubilité des hydroxydes (mg.l ⁻¹)	Solubilité des sulfures (mg.l ⁻¹)
Cd	$2,35 \times 10^{-5}$	$6,73 \times 10^{-10}$
Cu	$8,42 \times 10^{-4}$	$5,83 \times 10^{-18}$
Fe	$8,91 \times 10^{-1}$	$3,43 \times 10^{-5}$
Pb	$4,02 \times 10^{-3}$	$5,48 \times 10^{-10}$
Ni	$6,92 \times 10^{-3}$	$6,90 \times 10^{-8}$
Ag	13,3	$7,23 \times 10^{-12}$
Zn	1,1	$2,31 \times 10^{-7}$

Les sulfures de métaux précipitent à des valeurs de pH différentes, autorisant la récupération sélective de certains éléments de valeur sous une forme plus concentrée que dans les hydroxydes. Contrairement aux sulfures, les hydroxydes sont souvent hydratés et leur récupération par filtration est problématique. Des procédés utilisant le sulfure d'hydrogène produit par des BSR ont donc été développés, de l'échelle du laboratoire jusqu'à l'application industrielle (Huisman et al., 2006). La croissance des BSR induit une consommation de l'acidité et une production de sulfure d'hydrogène. Différentes configurations de procédés peuvent être envisagées. En général, lorsque l'effluent à traiter contient plusieurs métaux que l'on souhaite récupérer sélectivement, les étapes de production de sulfure d'hydrogène et de précipitation des métaux sont réalisées séparément. La solution chargée en sulfure issue du bioréacteur peut être mélangée à l'effluent minier brut afin de faire augmenter son pH jusqu'à une valeur précise permettant de faire précipiter un métal de valeur. Ensuite, l'effluent débarrassé de ses métaux mais riche en sulfate peut être injecté dans le bioréacteur. Lorsque le substrat énergétique fourni aux BSR est de l'hydrogène (généralement un mélange (H₂/CO₂), il est possible de faire buller le mélange gazeux sortant du bioréacteur, et enrichi en H₂S, dans le réacteur de précipitation. Nous avons testé cette configuration avec un bioréacteur pilote de 20 l (**article 6**), qui a produit de l'H₂S utilisé pour récupérer sélectivement le cuivre et le zinc dans un effluent minier réel. Les deux stratégies, mélange des liquides et bullage des gaz, ont été combinées lors d'une opération pilote au cours de laquelle nous avons mis en œuvre un bioréacteur de 200 l alimenté par un effluent minier réel (**article 19**). Lorsque la récupération sélective des métaux n'est pas rentable et que le seul objectif du traitement est d'éliminer efficacement les métaux, l'effluent peut être directement injecté dans le bioréacteur. Quand la solution à traiter n'est pas trop acide (pH 3-4), un temps de séjour relativement court peut être appliqué, et l'activité bactérienne maintient le pH à une valeur proche de la neutralité dans le bioréacteur. Nous avons détecté une population diverse de BSR dans un tel bioréacteur, utilisé pour éliminer simultanément le zinc et le fer dans un effluent (**article 20**) : des micro-organismes affiliés aux genres *Desulfomicrobium*, *Desulfobacter*, *Desulfovibrio* et *Desulfobulbus* ont été mis en évidence grâce à un inventaire de séquences du gène *dsrAB*.

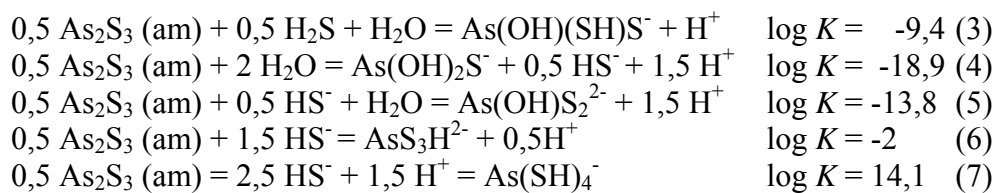
Lorsque l'effluent à traiter est très acide, il devient délicat de l'injecter directement dans un bioréacteur réalisant la sulfato-réduction. En effet, les BSR sont généralement sensibles à l'acidité. En conditions acides, le sulfure d'hydrogène se trouve majoritairement sous sa forme non dissociée, l'H₂S, qui pénètre facilement dans les cellules bactériennes et endommage les composants cellulaires. Les acides organiques utilisés par la plupart des BSR comme source d'énergie se trouvent également sous forme neutre, non dissociée, ce qui les

rend toxiques pour les bactéries. Cependant, des activités bactériennes de sulfato-réduction ont été mises en évidence dans divers environnements acides (Praharaj et Fortin, 2004; Church et al., 2007). Au laboratoire, des BSR ont pu être cultivées à faible pH grâce à l'utilisation de substrats énergétiques n'appartenant pas au groupe des acides organiques : le glycérol, le méthanol ou l'hydrogène. Des bioréacteurs fonctionnant à pH acide, alimentés en continu avec du glycérol, ont été mis en œuvre pour précipiter du sulfure de zinc grâce à un consortium comprenant une BSR et une bactérie (*Acidocella*) consommant l'acétate produit au cours de la dégradation du glycérol (Kimura et al., 2006; Johnson et al., 2006). Les BSR détectées dans ces environnements acides appartiennent généralement au genre *Desulfosporosinus* (Kimura et al., 2006; Church et al., 2007).

La mise en œuvre de BSR capables de produire de l'H₂S en conditions acides serait particulièrement intéressante pour la précipitation de sulfure d'arsenic. En effet, l'orpiment As₂S₃, est très peu soluble à faible pH, mais forme des complexes solubles nommés thioarsenites quand le pH augmente. Les données de solubilité sont liées aux équilibres suivants (Eary, 1992) :



Clarke et Helz (2000), ainsi que Wilkin et al. (2003), ont décrit d'autres équilibres impliqués dans la solubilité de l'orpiment à travers la formation de thioarsenite et d'oxothioarsenites :



- Dans des solutions acides et peu concentrées en sulfure d'hydrogène, la réaction (1) domine et les précipités d'As₂S₃ sont formés.
- En présence de sulfure en excès, les réactions (2) à (7) jouent un rôle dominant (Smieja and Wilkin, 2003). Ces réactions sont favorisées à pH croissant. En général, si la concentration en sulfure d'hydrogène est supérieure à 1 mg.l⁻¹, des thio-arsenites solubles sont formés à pH neutre ou basique.

La précipitation du sulfure d'arsenic est un processus particulièrement intéressant, car il permet d'obtenir une phase solide contenant 60% en masse d'arsenic. Or, les procédés classiques utilisés pour traiter les eaux acides chargées en arsenic produisent des volumes importants de déchets, dans lesquels l'arsenic est dilué. La stabilisation puis le stockage de ces déchets sont coûteux. Il serait donc utile de développer un procédé qui produirait un déchet très concentré en arsenic. Nous avons entrepris la mise au point d'un procédé de précipitation biologique de l'arsenic sous forme de sulfure, dans le cadre du projet Européen BioMine (6^{ème} PCRD, NMP1-CT-500329-1, <http://biomine.brgm.fr>). Une population bactérienne capable de réduire le sulfate à pH 4,5, contenant des organismes appartenant au genre *Desulfosporosinus* a été sélectionnée, puis utilisée pour ensemercer deux bioréacteurs à lit fixé de pouzzolane, dont le volume utile était égal à 400 ml. L'un d'entre eux était équipé de dispositifs permettant de faire des prélèvements à différentes hauteurs dans la colonne. Ces

bioréacteurs ont ensuite été alimentés en continu avec des milieux de culture dont le pH était compris entre 2 et 5. La photographie 13 montre l'accumulation du précipité d'orpiment, de couleur jaune, dans les colonnes. La nature du précipité a été confirmée par des caractérisations effectuées au MEB-SDE (photographie 14) et par EXAFS. L'influence de divers paramètres a été testée : la forme d'As présente dans l'alimentation, As(III) ou As(V), le substrat énergétique (glycérol ou hydrogène), la concentration en glycérol. La solution d'alimentation a toujours contenu 100 mg.l^{-1} d'As total. La figure 12 montre l'évolution des principaux paramètres dans la première colonne.

L'efficacité du bioréacteur, en termes d'élimination de l'arsenic, a été améliorée quand le temps de résidence et le pH de l'alimentation ont été diminués. Une très bonne efficacité d'élimination, correspondant à une concentration en As en sortie de bioréacteur inférieure à 1 mg.l^{-1} , a pu être maintenue dans le bioréacteur pendant 35 jours lorsqu'il a été alimenté avec une solution à pH 2, pour un temps de résidence égal à 48 h. Cependant, le bioréacteur ne fonctionnait pas de façon parfaitement stable au cours de cette période. En effet, une migration du front « jaune » de dépôts de sulfure, du bas de la colonne vers le haut, a été observée, ainsi qu'une chute progressive du pH en sortie de bioréacteur. Du point de vue purement chimique, la faible valeur de pH en entrée de bioréacteur a favorisé la précipitation de l'orpiment, ce qui explique la faible valeur de concentration en arsenic en sortie de colonne.



Photographie 13. Bioréacteurs utilisés pour étudier la précipitation du sulfure d'arsenic par l'hydrogène sulfuré produit par des BSR

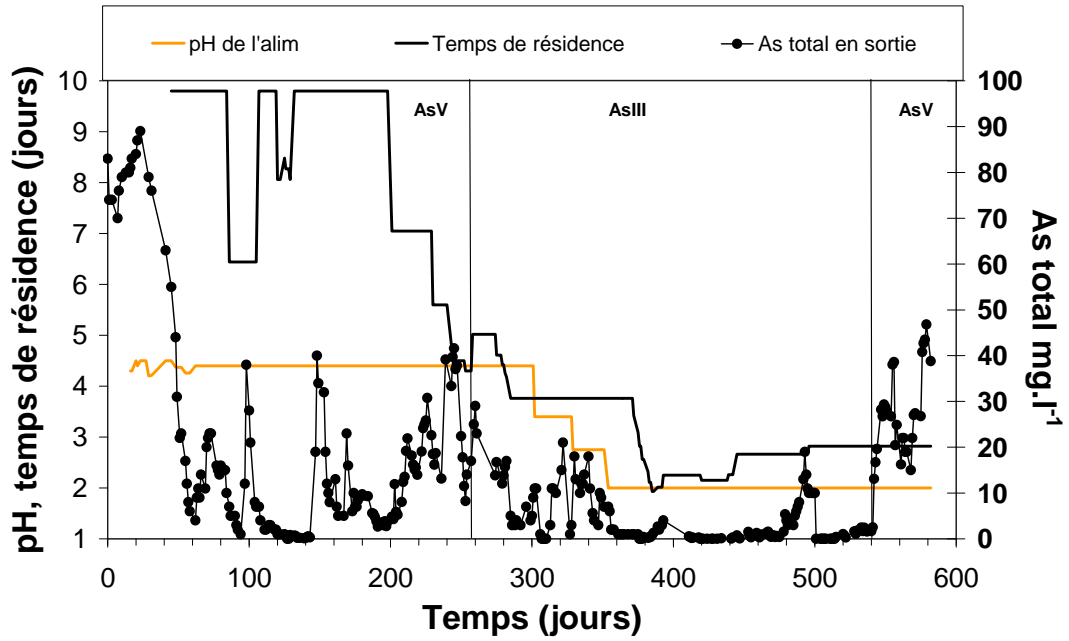
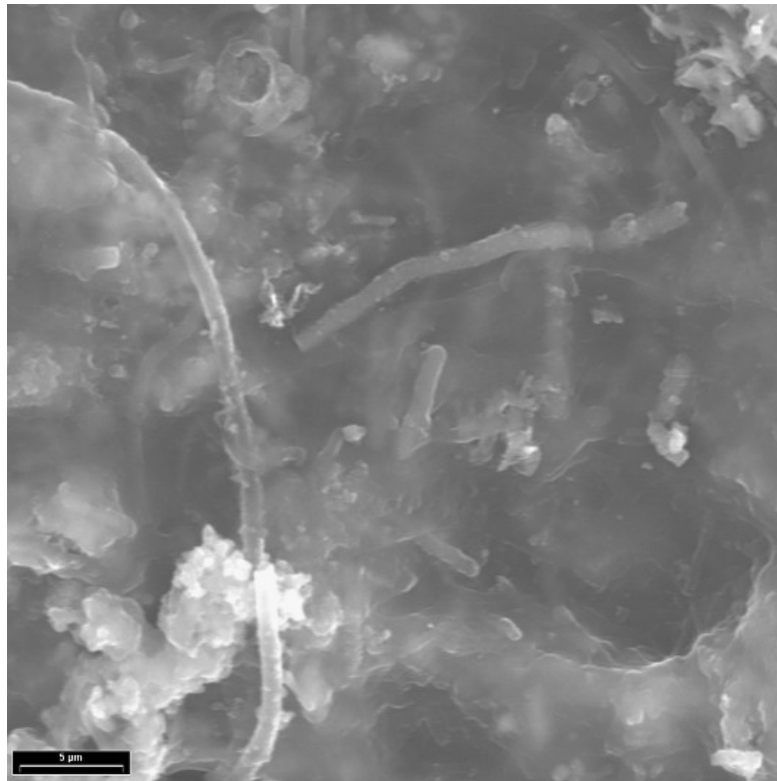


Figure 12. Précipitation de l'arsenic sous forme de sulfure dans un bioréacteur à lit fixé, évolution de la concentration en As en sortie, pH de l'alimentation et temps de séjour.



Photographie 14. Observation au MEB de la phase solide (jaune) prélevée dans un bioréacteur à lit fixé au sein duquel des bactéries sulfato-réductrices induisent la précipitation de sulfure d'arsenic. Longs bâtonnets enchevêtrés dans du As₂S₃ amorphe (barre d'échelle : 5 μm).

Cependant, les bactéries qui produisent le sulfure ne sont pas réellement actives à pH 2 : elles se développent et demeurent actives au-dessus de la zone de précipitation chimique, et leur inhibition progressive a induit une migration du front de précipitation vers le haut (la sortie) du bioréacteur. Les zones de production de l' H_2S peuvent également être situées dans des niches protégées, à l'intérieur du bioréacteur, étant donné que le flux n'est pas réparti de façon parfaitement homogène dans le lit de pouzzolane. Des zones noires à pH plus élevé, où l' H_2S était produit, côtoient les dépôts de précipité jaune-orangé correspondant aux chemins préférentiels du flux acide, où précipite le sulfure d'arsenic (photographie 15). Lorsque le pH de la solution d'alimentation était égal à 2,8, le pH en sortie de bioréacteur n'évoluait pas, ce qui suggère que l'activité bactérienne n'était pas inhibée. Cependant, l'efficacité du bioréacteur, liée à la cinétique de précipitation, était moins bonne. Une valeur optimale de pH, permettant d'améliorer la cinétique de précipitation de l'orpiment tout en préservant les zones d'activité bactérienne, pourrait être recherchée entre pH 2,0 et pH 2,8.



Photographie 15. Répartition des zones de précipitation du sulfure d'arsenic (jaune-orangé) et de production d' H_2S (noires) au démontage du bioréacteur, après 582 jours de fonctionnement.

La deuxième colonne, équipée de septa permettant d'effectuer des prélèvements à différentes hauteurs, a été utilisée pour comparer deux substrats énergétiques : le glycérol et l'hydrogène. Nous avons supposé que la cinétique de précipitation du sulfure d'arsenic pourrait être limitée par la vitesse de réduction du sulfate, qui était toujours très faible quand le glycérol était utilisé comme source d'énergie. La figure 13 montre que lorsque le glycérol a été remplacé par l'hydrogène, une amplification de l'activité de sulfato-réduction a effectivement été observée, mais que cette activation a eu pour conséquence une augmentation brutale et très importante de la concentration en arsenic en sortie de bioréacteur, pouvant s'élever jusqu'à 200% de la concentration en entrée. La production massive de sulfure d'hydrogène, accompagnée de l'augmentation de pH, a induit la

dissolution de l'orpiment accumulé dans la colonne, et la formation de complexes thioarséniés (réactions 2 à 7). Ce phénomène a pu être amoindri par une diminution du temps de séjour et du pH en entrée de réacteur. Finalement, la vitesse maximale d'élimination de l'arsenic au cours de cette expérience a atteint $2,5 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Cette valeur est plus élevée que celles qui sont généralement données dans la littérature. Cependant, le procédé de précipitation de l'As par précipitation de sulfure est généralement utilisé pour traiter des eaux très peu chargées en As (moins de 1 mg.l^{-1}). Nos résultats sont originaux par le fait qu'ils ont été obtenus avec des solutions contenant 100 mg.l^{-1} d'As.

Les profils de concentration en arsenic et de pH dans la colonne montrent que l'arsenic est précipité dans la première moitié du bioréacteur (Figure 14). La concentration en As en sortie de bioréacteur est liée à la solubilité de l'As dans les conditions de pH et de concentration en sulfure qui règnent dans le bioréacteur. C'est pour cette raison que l'élimination de l'As était complète dans le premier bioréacteur, lorsque le pH de l'alimentation était très faible (pH 2).

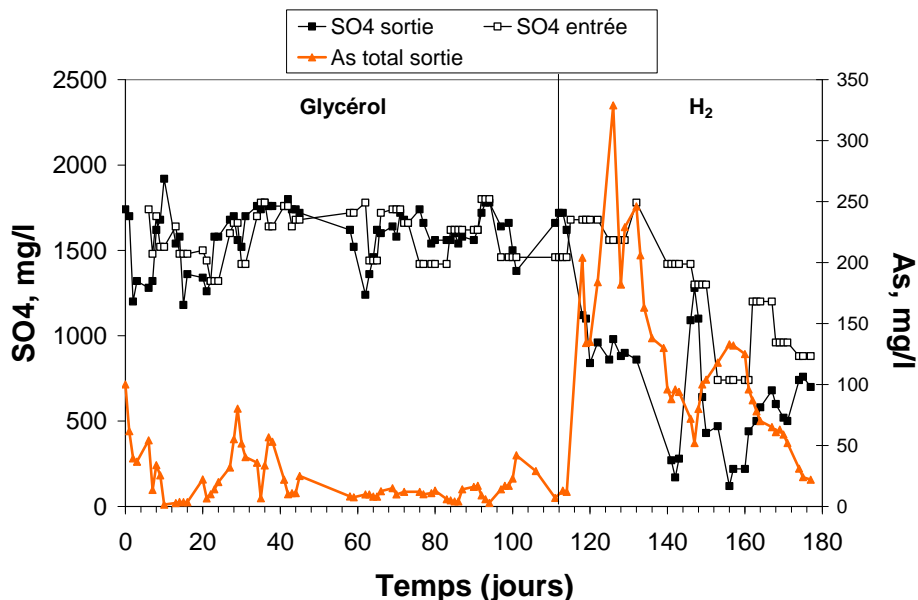


Figure 13. Influence du substrat énergétique, glycérol ou hydrogène, sur la précipitation de l'arsenic sous forme de sulfure dans un bioréacteur fonctionnant en continu. Concentration en arsenic dans l'alimentation : 100 mg.l^{-1} .

Ainsi, lorsque le glycérol était utilisé comme substrat, le pH dans le bioréacteur était proche de 5, et la concentration résiduelle en As comprise entre 5 et 10 mg.l^{-1} . Avec le substrat hydrogène, la concentration en arsenic était égale à 160 mg.l^{-1} pour un pH de 7,5, et à 23 mg.l^{-1} pour un pH de 6,5.

Nous avons donc montré qu'il n'est pas souhaitable d'obtenir une activité de sulfato-réduction très élevée pour éliminer efficacement l'arsenic sous forme de sulfure. Il vaut mieux maintenir une activité de sulfato-réduction faible mais stable, à pH acide.

La composition bactérienne de l'inoculum et des bioréacteurs (phase liquide et biofilm lors du démontage) a été suivie en utilisant plusieurs méthodes de biologie moléculaire : inventaires de séquences d'ARNr 16S, de gènes *dsrAB* (gènes de la sulfite-réductase), *arrA* (gènes de la réduction dissimilatrice de l'As(V)) et profils SSCP. L'inoculum, population capable de réduire le sulfate à pH 4,5, contenait principalement des espèces

appartenant aux genres *Bacillus* et *Desulfosporosinus*. Par la suite, une population plus diverse d'est développée dans les bioréacteurs, mais toutes les bactéries sulfato-réductrices détectées au cours de cette étude sont apparentées au genre *Desulfosporosinus*, auquel appartiennent presque toutes les BSR se développant dans des milieux acides (Kimura et al., 2006; Church et al., 2007). Les séquences correspondantes sont éloignées de séquences d'espèces caractérisées. Par ailleurs, les profils SSCP indiquent une bonne correspondance entre les populations présentes dans la phase liquide et celles qui sont fixées au support bactérien de pouzzolane.

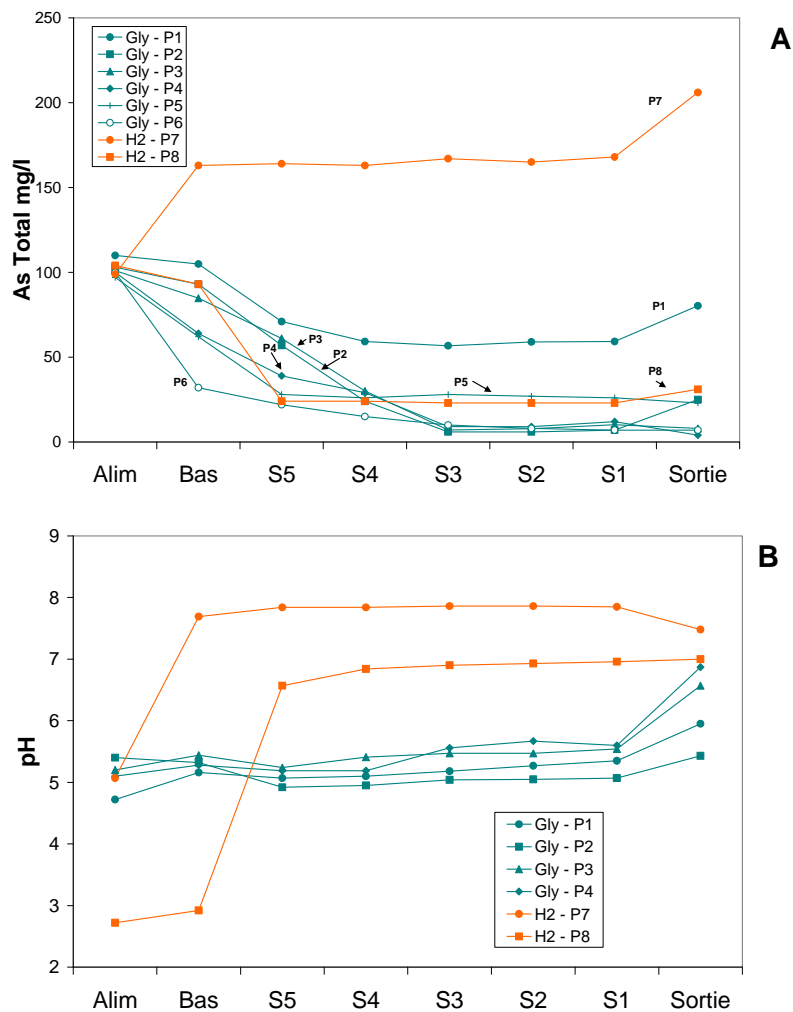


Figure 14. Précipitation de l'arsenic sous forme de sulfure dans un bioréacteur fonctionnant en continu. Profils de concentration en arsenic (A) et de pH (B) dans le bioréacteur colonne. Bleu : substrat glycérol. Orange : substrat hydrogène.

Une séquence de gène *arrA* a pu être amplifiée à partir de l'ADN extrait de la population bactérienne qui a colonisé le second bioréacteur. Cette séquence est affiliée à la séquence *arrA* de la bactérie *Desulfosporosinus* Y5 (Liu et al., 2004) connue pour sa capacité à réduire l'As(V). Ce résultat suggère qu'au moins un des organismes appartenant au genre *Desulfosporosinus* ayant colonisé le bioréacteur est capable de réduire à la fois le sulfate et l'arsénate. Jusqu'à présent, aucun organisme capable de respirer l'As(V) en conditions acide n'a été décrit. Il serait donc particulièrement intéressant d'obtenir une souche possédant cette capacité. Nous avons isolé une BSR de la

population ayant colonisé le second réacteur. Cette bactérie, apparentée à *Desulfosporosinus* Y5, est acido-tolérante mais ne semble pas posséder le gène *arrA*.

L'ensemble de nos travaux portant sur la bio-précipitation de sulfure d'arsenic a fait l'objet de communication à congrès (communications **93, 94 et 96, article de proceedings 29**) et un article à soumettre dans une revue internationale est en cours de rédaction (**102**).

4. Projet de Recherche : Biogéochimie des réacteurs naturels et artificiels

Les différents travaux de recherche auxquels j'ai eu la chance de contribuer depuis 18 ans ont porté soit sur la biogéochimie d'environnements pollués, soit sur la mise au point de procédés de bioremédiation de ces environnements. L'exploration de ces deux domaines d'activités, à finalités plus ou moins appliquées, est passionnante lorsqu'elle est effectuée de façon simultanée et interactive. En effet, l'élucidation de processus biogéochimiques conduit à la formulation de nouveaux concepts en termes de procédés. En retour, les bioréacteurs artificiels, en particulier lorsqu'ils fonctionnent en mode continu, fournissent des informations précieuses sur le comportement des populations bactériennes soumises à des conditions extrêmes en termes de pH, de concentrations en métaux, de potentiel redox ou de température.

Les différentes réactions biogéochimiques citées dans le présent mémoire sont rassemblées dans le schéma 2.

Mon projet de recherches pour les années à venir conservera donc cette dualité processus/procédés, et s'intéressera de façon simultanée aux bioréacteurs naturels et artificiels. En effet, les milieux naturels peuvent être considérés comme des bioréacteurs, si l'on s'intéresse aux réactions catalysées par les micro-organismes. Ce projet de recherche sera focalisé sur les réactions qui modifient les formes des métaux et métalloïdes en présence de catalyseurs microbiens. Le projet s'efforcera de considérer les réactions sous l'aspect du bénéfice potentiel pour le micro-organisme en terme de thermodynamique. Une collaboration étroite entre microbiologistes et géochimistes modélisateurs sera nécessaire pour tenter de répondre aux questions suivantes :

- Quelles réactions d'oxydation peuvent fournir de l'énergie aux micro-organismes en fonction des conditions de pH, de potentiel redox, de pression, de concentrations en sels dissous et en oxygène ?
- Quels métaux ou métalloïdes pourraient être utilisés comme accepteurs d'électrons dans ces différentes conditions?

La réflexion sera menée en termes d'équilibres et de cinétiques. Par exemple, lorsque le système contient à la fois du Fe(II) et de l'As(III), ces deux espèces chimiques peuvent servir de source d'énergie en présence d'oxygène (l'enthalpie de leur réaction d'oxydation par l'oxygène est négative). Cependant, l'énergie qui pourra être tirée par les bactéries de chacune des réactions d'oxydation dépendra étroitement du pH. En effet, à pH neutre, la cinétique d'oxydation chimique du Fe(II) est rapide, alors que la cinétique d'oxydation de l'As(III) est très lente. Cette « compétition » entre réactions spontanées abiotiques et réactions catalysées biologiquement influence l'amplitude du bénéfice potentiellement retiré du substrat par les micro-organismes, et sans doute le type de micro-organisme qui pourra se développer aux dépens de ce substrat, en fonction de son affinité pour ce dernier. Ce type de travaux

répondrait au besoin très souvent exprimé au BRGM de créer un lien entre les activités de géo-microbiologie et de modélisation.

Les principaux mots-clefs de ce Projet de Recherche seront les suivants : métaux et métalloïdes, réaction, catalyse biologique, métabolisme énergétique, respiration, affinité.

Du point de vue pratique, les expériences en continu seront privilégiées. Elles permettent d'observer un système à la fois actif et « figé ». De plus, elles permettent de travailler avec de très faibles concentrations en substrat apporté en continu, concentrations qui ne permettraient pas d'obtenir une croissance bactérienne significative en batch. On a vu par exemple que *Leptospirillum* se développait au détriment des autres organismes utilisant le fer ferreux, en continu, en présence de concentrations très faibles en fer ferreux. On a vu également que la toxicité du Cr(VI) est un obstacle pour l'étude de l'utilisation de cette espèce chimique comme accepteur d'électron. Une expérience en continu à très faible concentration en Cr(VI) devrait permettre de surmonter ce problème. Un programme-type comprendra les étapes suivantes : (1) établir les conditions expérimentales par le modèle géochimique et thermodynamique en se basant sur les caractéristiques d'un environnement d'intérêt, (2) mener en parallèle deux expériences en continu, une abiotique et la seconde en présence de catalyseur bactérien, (3) affiner le modèle avec les données expérimentales. Cette démarche pourra être appliquée aux différents thèmes de recherche du programme, avec soit des populations bactériennes, soit des souches pures, en fonction des objectifs à atteindre.

Divers outils disponibles au BRGM pourront être mis en œuvre pour le suivi des expériences :

- Les outils de biologie moléculaire de type clonage/séquençage de gènes ARNr16S, *aoxB*, *dsrAB*...
- Les outils d'écologie moléculaire : SSCP, DGGE, FISH
- Des tests d'activité d'oxydation/réduction
- Des analyses de carbone organique, de métaux et métalloïdes
- Des spéciations (As(III), As(V), thio-arsenites...)
- Des caractérisations de solides par MEB/EDS, DRX, IR...

Les programmes expérimentaux seront souvent réalisés (comme c'est le cas actuellement) en collaboration avec plusieurs organismes de recherches, qui pourront appliquer des techniques qui ne sont pas disponibles au BRGM, et apporter aux thématiques abordées un éclairage complémentaire.

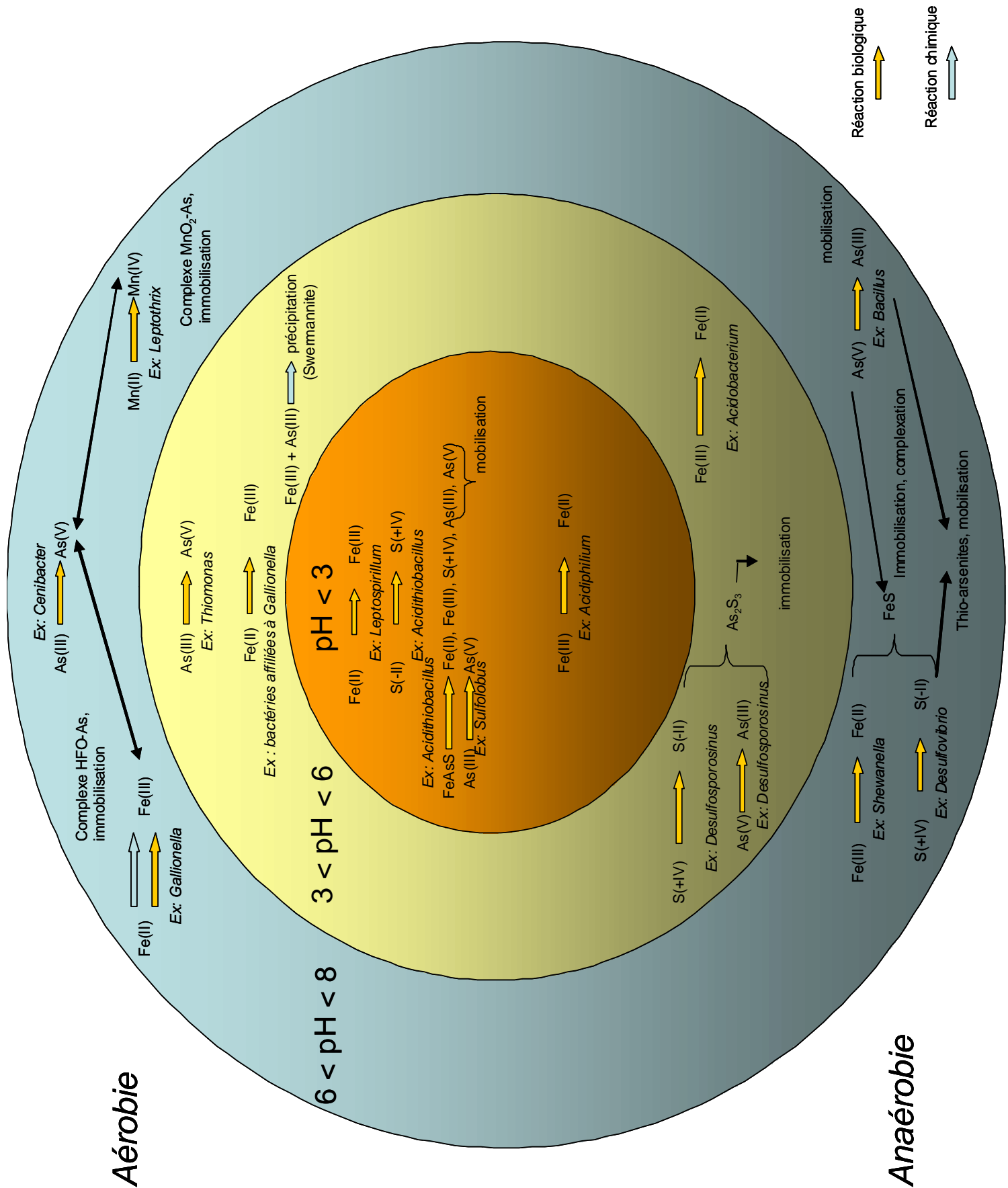


Schéma 2 : Diagramme des différentes réactions biogéochimiques citées dans le présent mémoire.

4.1 Le système arsenic – fer – manganèse en milieu naturel et dans les réacteurs de biotraitement

La biofiltration est un procédé en cours d'étude pour l'élimination de l'arsenic dans les eaux contenant du fer et du manganèse dans un but de potabilisation. Dans ce type de procédé, les bactéries Fe(II)-oxydantes et Mn(II)-oxydantes jouent un rôle majeur. En effet, l'arsenic est adsorbé par les oxy-hydroxydes de fer et de manganèse formés grâce à l'activité bactérienne. Une catalyse biologique de l'oxydation de l'As(III) dans ces systèmes est supposée (Casiot et al., 2006). Par ailleurs, dans de nombreux environnements miniers, les eaux riches en arsenic contiennent également du fer et/ou du manganèse. Nous participons actuellement à des projets portant soit sur la potabilisation d'eaux contenant de l'arsenic, soit sur le traitement d'eaux de mines contenant de l'arsenic, du fer et du manganèse. Il serait très intéressant de comprendre le fonctionnement biogéochimique de ces systèmes, naturels ou artificiels. Nous savons que des bactéries portant le gène *aoxB* sont présentes et participent à l'oxydation de l'As(III) dans les systèmes que nous avons déjà étudiés (Lopérec, CHENI). Le fer ferreux est en général bien oxydé. Nous soupçonnons que cette oxydation est au moins en partie catalysée par des bactéries, mais étant donné que le fer ferreux s'oxyde chimiquement à pH proche de la neutralité, l'intervention des bactéries dans ce processus doit être démontrée. L'oxydation chimique du manganèse par l'oxygène est très lente quand le pH est inférieur à 9. L'oxydation biologique du manganèse à pH neutre ou légèrement acide est possible (Katsoyiannis et Zouboulis, 2006 ; Mariner et al., 2008), mais il s'agit d'un processus délicat à mettre en place. Étant donné que les précipités d'oxy-hydroxydes de fer et de manganèse peuvent adsorber de l'As(V), les réactions d'oxydation du Fe(II) et du Mn(II) participent au piégeage de l'arsenic dans les milieux naturels et en bioréacteurs. L'objectif du programme de recherche relatif au système arsenic – fer – manganèse sera de répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les contributions relatives des réactions chimiques et biologiques dans le processus global d'oxydation/précipitation/adsorption d'As, Fe et Mn en fonction des domaines de pH, de disponibilité de l'oxygène et de concentrations des trois éléments ?
- Le fer, le manganèse et l'arsenic sont-ils utilisés comme sources d'énergie par les bactéries dans ces différentes conditions ? Par exemple, dans un système de potabilisation biologique, est-ce que l'As(III) peut être une source d'énergie pour les bactéries lorsque sa concentration est inférieure à $20 \mu\text{g.l}^{-1}$?
- Quel est le rôle des populations bactériennes dans la structuration des précipités d'oxy-hydroxydes de fer et de manganèse jouant le rôle de pièges à arsenic ? D'après Katsoyiannis et al. (2006), les oxy-hydroxydes de fer d'origine biologique adsorbent plus efficacement l'arsenic que les oxy-hydroxydes précipités chimiquement. Quelles différences existe-t-il entre les deux types de précipités (en termes de morphologie et de surface spécifique). La morphologie des précipités est également importante pour le développement des procédés car elle aura une influence sur le mode de décantation de ces solides, et sur les phénomènes de colmatage dans les bioréacteurs à lit fixe.

Les expériences en continu, couplées à une modélisation géochimique, seront réalisées avec des populations naturelles issues d'aquifères et de sites miniers, mais également avec des souches pures afin de déterminer leur affinité pour les trois substrats énergétiques potentiels. Avec les populations naturelles, il sera intéressant d'observer l'évolution des contributions de chaque organisme au sein des consortia en fonction des conditions. La caractérisation des

précipités pourra être réalisée en partie au BRGM (MEB-EDS, DRX, IR), et en partie en collaboration avec d'autres équipes de recherche ayant accès à des techniques d'analyses complémentaires (Spectroscopie Mössbauer, EXAF-XANES).

Ces travaux pourront également ouvrir de nouvelles perspectives de recherche, davantage focalisées sur les mécanismes biologiques, aux niveaux biochimiques et génétiques. En effet, si l'oxydation du fer ferreux par les bactéries chimio-litho-autotrophes a été bien décrite en milieu acide, peu d'éléments sont disponibles sur ce type de métabolisme à des pH proches de la neutralité. *Galionella*, le principal organisme connu pour utiliser Fe(II) comme source d'énergie à pH neutre, est très difficile à isoler. Les bactéries appartenant au genre *Leptothrix* sont connues pour synthétiser des protéines catalysant l'oxydation de Fe(II) et de Mn(II), mais ces enzymes sont peu caractérisées. Une avancée des connaissances dans ce domaine serait fort utile, car le fer et le manganèse sont deux éléments très fréquemment présents dans les eaux de surface et souterraines.

4.2 Distribution de l'activité d'oxydation biologique de l'As(III) dans les populations bactériennes

Nous avons vu que des bactéries appartenant au genre *Thiomonas* capables d'utiliser l'As(III) comme source d'énergie ont été isolées de divers environnements miniers. Il semble que lorsqu'un milieu minimum, à pH modérément acide et contenant de l'As(III) comme source d'énergie, est inoculé avec un échantillon issu d'un site minier, des souches de *Thiomonas* sont très souvent isolées. Cependant, les quelques études d'écologies microbiennes disponibles semblent indiquer que le genre *Thiomonas* n'est pas présent de façon majoritaire dans les eaux de mines. D'autres bactéries capables d'oxyder l'As(III) de façon chimio-litho-autotrophes ont été isolées avec des milieux de culture à pH supérieur à 7. Cependant, le rôle de ces bactéries utilisant l'As(III) comme source d'énergie dans le cycle de l'arsenic n'est pas quantifié. Certains auteurs suggèrent que le mécanisme de résistance à l'arsenic via la réduction de l'As(V) en As(III) et l'expulsion de cette espèce chimique (gènes *ars*), très répandu dans le monde microbien (Achour et al., 2006), pourrait être dominant et participer à la mobilisation de l'arsenic dans l'environnement. Par ailleurs, si l'As(III) est une source d'énergie intéressante pour la microflore, il est possible que son oxydation soit réalisée par des micro-organismes ayant une forte affinité pour l'As(III) (de façon similaire à *Leptospirillum* pour le fer ferreux) et qui ne seraient pas isolés car la procédure d'enrichissement en batch favoriserait la croissance d'autres organismes, de type *Thiomonas*.

Le présent projet de Recherche a pour objectif de répondre aux questions suivantes :

- Dans les environnements naturels, les bactéries oxydent-elles l'As(III) pour obtenir de l'énergie, ou pour détoxifier le milieu ? Quelle est l'influence des conditions physico-chimique sur la contribution relative de ces deux fonctions de l'activité As(III)-oxydase ?
- Si l'As(III) est une source d'énergie, quelles sont les principales bactéries se développant aux dépens de ce substrat inorganique dans différentes conditions de pH, de concentrations en O₂ dissous, de concentration en carbone organique ?

Cet objectif sera atteint par la réalisation d'expériences en continu au laboratoire utilisant des populations bactériennes naturelles. La modélisation thermodynamique devrait nous permettre de prévoir l'énergie utilisable par les bactéries. La production de biomasse sera

estimée par des bilans de carbone organique. En parallèle, une étude d'écologie bactérienne sera menée dans des environnements pollués par l'arsenic (sites miniers et industriels). Les bactéries appartenant au genre *Thiomonas* seront recherchées par la méthode FISH (des sondes spécifiques aux deux groupes de *Thiomonas* sont disponibles), dans les eaux et à la surface des phases solides (sédiments, parois des galeries). Nous avons constaté que les bactéries appartenant au groupe 2 (groupe de « *Tm. arsenivorans* ») pouvaient se développer aux dépens des sulfures de métaux. Les surfaces solides pouvant servir de substrat sont peut-être des niches écologiques favorables au développement de ces bactéries, qui n'ont pas été détectées en abondance dans les milieux liquides. Parallèlement à la méthode FISH permettant de rechercher spécifiquement les bactéries apparentées à *Thiomonas* par observation directe, les bactéries capables d'oxyder l'As(III) seront recherchées par l'amplification et le clonage-séquençage des gènes *aoxB*, dont la diversité et l'abondance pourront également être évalués par DGGE et PCR quantitative. La confrontation des résultats des deux études, réacteurs de laboratoire favorisant spécifiquement la croissance des bactéries utilisant l'As(III) comme source d'énergie, et écologie des populations naturelles, devrait contribuer à l'élucidation du rôle de la fonction arsenite-oxysade dans les milieux naturels.

4.3 Métabolisme bactérien de l'arsenic dans les sédiments marins

La plupart des bactéries capables d'oxyder ou de réduire l'arsenic et d'utiliser ces réactions dans leur métabolisme ont été jusqu'à présent détectées ou isolées à partir d'échantillons de sols, de déchets miniers, d'eaux de mines ou hydrothermales, d'eaux de surface ou d'aquifères non salins. Le milieu marin et en particulier certains sédiments ont été contaminés dans de nombreuses régions par de l'arsenic d'origine anthropique. Cette pollution est due soit aux activités portuaires, soit à des industries côtières ou au déversement de cours d'eaux impactés par des sites miniers. Le présent projet de recherche comprend un volet relatif à l'étude du cycle bactérien de l'arsenic dans les sédiments marins pollués. Des tests d'activité As(III)-oxydante et As(V)-réductrice seront menés à partir d'échantillons de sédiments. Des milieux sélectifs seront utilisés pour rechercher des micro-organismes marins capables d'utiliser l'arsenic dans leur métabolisme. Nous nous efforcerons ensuite d'isoler et de caractériser ces micro-organismes. Nous vérifierons que ces micro-organismes possèdent des gènes identiques à ceux qui sont impliqués dans le métabolisme de l'arsenic en milieu non main (gènes *aox* et *arrA*). Leur rôle dans les phénomènes de transformation des formes de l'arsenic dans les sédiments sera étudié grâce à des microcosmes de sédiments incubés dans différentes conditions.

4.4 Réactivité de l'arsenic avec le sulfure d'hydrogène d'origine biologique : piégeage ou mobilisation

Nous avons vu que la réactivité de l'arsenic avec le sulfure d'hydrogène peut conduire soit au piégeage du métalloïde toxique sous forme de sulfure d'arsenic, soit à sa mobilisation sous forme de thio-arsenites. Les contributions relatives de ces deux processus dépendent du pH et de la concentration en sulfure d'hydrogène. Le présent volet du projet de recherche a pour objectif de préciser dans quelles conditions l'activité bactérienne de sulfato-réduction peut conduire à une immobilisation efficace de l'arsenic, en bioréacteur, ou bien participer à la mobilisation de l'arsenic dans les aquifères naturels, via la formation de thio-arsenites.

Des travaux de recherche à but appliqué pourraient aboutir à la mise au point d'un procédé efficace pour faire précipiter l'arsenic sous une forme concentrée, réduisant ainsi les volumes de déchets toxiques à stocker à l'issue du traitement d'eaux acides et chargées en arsenic. L'optimisation du bioréacteur devrait être possible sur la base des résultats déjà obtenus. Nous avons constaté que l'activité de sulfato-réduction, liée à la présence d'organismes appartenant probablement au genre *Desulfosporosinus*, est possible à pH 4,5. Cependant, l'arsenic n'est précipité de façon efficace et complète qu'à des valeurs de pH plus faibles. A pH 2, la concentration résiduelle en arsenic est inférieure à 1 mg.l⁻¹. L'amélioration de l'efficacité et de la cinétique de précipitation doit être basée sur la conception de bioréacteurs originaux, comportant des zones de production d'H₂S et des zones de précipitation d'As₂S₃. La configuration de ces bioréacteurs pourra dépendre du type de substrat énergétique choisi. Si un substrat liquide, de type glycérol, est utilisé, il serait judicieux de prévoir des systèmes d'alimentation séparés pour l'effluent à traiter et pour le substrat énergétique. En effet, dans nos premiers bioréacteurs, le glycérol était injecté dans le même flux que l'arsenic. Or, une partie du glycérol était probablement consommée par des bactéries « parasites », moins sensibles à l'acidité que les BSR. Il serait intéressant de tester un bioréacteur colonne avec un garnissage particulier, qui ménagerait des zones de production d'H₂S dans lesquelles le substrat énergétique serait injecté, avec un type de remplissage à forte porosité, et des zones de précipitation, avec un second type de remplissage, à travers lequel percolerait la solution acide riche en arsenic. Le chemin préférentiel emprunté par la solution acide serait optimisé de façon à maximiser les échanges entre les deux zones. Si un substrat gazeux, de type H₂, était choisi, il serait intéressant de tester un bioréacteur alimenté en gaz par une membrane qui permettrait la diffusion lente du substrat gazeux. Un tel système permettrait de mieux contrôler la disponibilité du substrat et d'éviter l'effet de mélange provoqué par les bulles de gaz. En effet, l'agitation du milieu est un obstacle à la mise en place de zones à pH plus ou moins acide, et favorise le transfert de particules d'As₂S₃ des zones plus acides vers des zones moins acides, conduisant à leur dissolution sous forme de thio-arsenites. Le suivi de ces bioréacteurs originaux comprendrait des analyses SSCP, des inventaires de séquences *dsrAB* et *arrA*, ainsi que les analyses des différentes formes d'arsenic, dont les thio-arsenites. Une méthode d'analyse de ces formes très instables d'arsenic en solution par chromatographie ionique couplée à la détection ampérométrique est en cours de mise au point. L'isolement de micro-organismes possédant des métabolismes originaux, par exemple la respiration de l'As(V) en conditions acides, sera tentée à partir du milieu extrême créé à l'intérieur de ces bioréacteurs.

En parallèle à l'étude de ces réacteurs artificiels, le présent projet de recherche comprend un volet relatif à la réactivité de l'arsenic avec le sulfure en milieu naturel. Les interactions entre l'H₂S d'origine biologique et l'arsenic pourraient induire une mobilisation de ce métalloïde toxique, en particulier dans les aquifères. La présence d'arsenic dans les eaux souterraines dédiées à la consommation humaine est un problème majeur dans de nombreuses régions du monde (Bangladesh, Inde, Chine, Mongolie, Viêt-Nam, Argentine...). L'origine de l'arsenic dans ces eaux souterraines a été corrélée de façon quasi certaine à l'activité biologique de réduction du Fe(III), conduisant à la dissolution des hydroxydes de fer sur lesquels l'arsenic était adsorbé (Swartz et al., 2004 ; Charlet et Polya, 2006) ainsi qu'à la réduction de l'As(V) en As(III) plus mobile (Fan et al., 2007). Cependant, les concentrations en arsenic sont très variables dans un même aquifère. Le rôle des BSR dans la mobilisation ou le piégeage de l'arsenic en milieu naturel demeure peu connu et controversé. A pH proche de la neutralité, le sulfure d'hydrogène d'origine biologique pourrait induire une augmentation de la solubilité de l'arsenic sous forme de thio-arsenites. Diverses réactions peuvent se produire lors de la mise en contact des hydroxydes de fer sur lesquels de l'arsenic est piégé

avec du sulfure d'hydrogène : réduction chimique du Fe(III) et/ou de l'As(V), précipitation de FeS qui peut piéger de l'As, solubilisation de thio-arsenites. La résultante de ces différentes réactions combinée à l'action de diverses classes de micro-organismes conduit-elle à la mobilisation ou au piégeage du métalloïde toxique? Un programme d'expériences en continu sera réalisé dans le but de répondre à cette question. Des colonnes équipées de systèmes de prélèvements à différentes hauteurs seront remplies de matériaux solides de façon à reconstituer le système d'un aquifère. Dans un premier temps, un aquifère synthétique sera reconstitué. Il comprendra deux zones superposées : une zone remplie d'un mélange de matériaux solides sableux uniquement, surmontée d'une zone du même type mais enrichie en hydroxydes de fer sur lesquels de l'arsenic aura été adsorbé. Dans un aquifère réel, des zones plus ou moins riches en hydroxydes de fer peuvent se côtoyer. Or, dans la zone riche en Fe(III), la sulfato-réduction peut être inhibée par la présence du Fe(III). Cependant, il est possible que du sulfure d'hydrogène diffuse d'une zone pauvre en Fe(III), où la sulfato-réduction est active, vers une zone riche en Fe(III). La colonne de laboratoire sera alimentée avec une eau souterraine réelle, provenant d'une nappe contenant de l'arsenic, apportant une microflore indigène. Des additions de substrats susceptibles d'amplifier l'activité de certaines bactéries, telles que les BSR et les bactéries respirant l'As(V) et/ou le Fe(III), seront réalisées. Ce système sera suivi du point de vue géochimique et microbiologique. Les populations bactériennes seront caractérisées par les approches moléculaires disponibles pour la détection des gènes de fonction liés au métabolisme de l'arsenic et du sulfate. Les formes d'arsenic seront suivies au cours de l'expérience dans la phase liquide, et recherchées dans la phase solide lors du démontage de la colonne. L'expérience suivante sera réalisée avec des matériaux solides issus d'aquifères réels. Deux zones, l'une pauvre et l'autre riche en hydroxydes de fer, seront de nouveau superposées. Les résultats des expériences réalisées avec des aquifères synthétiques et naturels, en conditions biotiques et abiotiques, seront comparés. La confrontation des données expérimentales avec les prévisions du modèle géochimique devrait permettre d'évaluer la contribution des processus d'origine microbienne à la mobilisation de l'arsenic dans certains aquifères.

4.5 Métabolisme de métaux et métalloïdes en conditions extrêmes

Ce dernier volet du projet de recherche se présente sous la forme d'une prospection, théorique et expérimentale. Son objectif est de mettre en évidence l'utilisation de métaux dans le métabolisme de certains micro-organismes dans des conditions extrêmes, en termes de pH, de température, de pression, de toxicité. Dans un premier temps, nous délimiterons des zones de conditions (pH, température, pression, potentiel redox, concentrations) dans lesquelles les métaux sont susceptibles d'être utilisés dans le métabolisme énergétique des micro-organismes. Ensuite, nous effectuerons des expériences en continu (sauf pour les expériences sous pression, qui pourront être effectuées en mode fed-batch) dans des bioréacteurs inoculés avec des populations bactériennes prélevées dans des milieux extrêmes naturels. Les sources de micro-organismes pourront être des eaux acides de mines, des eaux géothermales, des carottes issues de forages profonds. Ces travaux pourront être orientés par des applications potentielles, en termes de procédés ou de prédiction des transferts d'éléments toxiques. Ainsi, l'oxydation de l'As(III) en conditions acides et à haute température pourrait être utilisée pour le traitement de certains effluents. Nous avons vu que la réduction dissimilatrice de l'As(V) en milieu acide serait un processus intéressant pour certaines applications en bioremédiation. En ce qui concerne le Cr(VI), il semblerait que son utilisation en tant qu'accepteur terminal d'électrons soit possible mais difficilement détectable en raison de la toxicité de cette espèce chimique. La mise en évidence de ce métabolisme nécessiterait la mise en œuvre de bioréacteursensemencés avec une souche pure et alimentés en continu avec une solution

faiblement concentrée en Cr(VI). Le Cr(III) peut-il être utilisé comme source d'énergie par certains organismes, et dans quelles conditions physico-chimiques ? Cette espèce chimique peu toxique est connue pour être très stable. Cependant, dans certaines conditions, il semblerait que du Cr(VI) soit produit à partir du Cr(III). La toxicité élevée du Cr(VI) justifierait que l'on s'intéresse à l'utilisation éventuelle du Cr(III) comme source d'énergie par les micro-organismes. Enfin, l'étude de l'influence de la pression et de la température sur le métabolisme du soufre, des métaux et des métalloïdes pourrait être utile afin de prévoir l'influence des interventions humaines, de plus en plus nombreuses sur la biogéochimie des couches géologiques profondes (exploitation des réservoirs pétroliers, géothermie, stockages de déchets, stockage de CO₂).

4.5 Conclusions

La capacité de certains micro-organismes à utiliser des substances inorganiques comme substrats de croissance a été mise en évidence il y a plus d'un siècle par Serge Winogradsky. Depuis, des métabolismes bactériens basés sur l'utilisation de métaux et métalloïdes toxiques ont été mis en évidence. L'implication des éléments toxiques dans la croissance des micro-organismes est parfois difficile à démontrer, en raison même du caractère toxique de ces substrats. Ainsi, la respiration du Cr(VI) est encore controversée, et le rôle énergétique de l'oxydation de l'As(III) par l'arsenite-oxydase demeure incertain chez les bactéries qui ont besoin d'un apport de substance organique pour leur croissance. Les différents volets du présent projet de recherche ont pour caractère commun de viser à comprendre pourquoi des organismes vivants sont capables d'utiliser ces substrats toxiques dans leur métabolisme de croissance, en essayant de déterminer quelles niches environnementales ont pu favoriser la conservation ou l'apparition de ces métabolismes. La définition théorique et expérimentale des conditions physico-chimiques permettant à ces métabolismes particuliers de soutenir la croissance de certains micro-organismes devrait contribuer d'une part à comprendre leur rôle au sein des écosystèmes naturels, et d'autre part à la mise au point de procédés originaux.

5. Bibliographie

Articles de base de l'HDR

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

1. Battaglia F., Morin D., Garcia J.-L., Ollivier P. (1994) Isolation and study of two strains of *Leptospirillum*-like bacteria from a natural mixed population cultured on a cobaltiferous pyrite substrate. *Antonie van Leeuwenhoek* 66 : 295-302.
2. Battaglia F., Morin D., Ollivier P. (1994) Dissolution of cobaltiferous pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*: factors influencing bacterial leaching efficiency. *J. Biotechnol.* 32 : 11-16.
3. Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Morin D., Bories.A., Clarens.M. (1997) Biological treatment of gold ore cyanidation wastewater in fixed bed reactors, *Environ. Poll.* 97 : 287-294.

4. D'Hugues P., Cezac P., Cabral T., Battaglia-Brunet F., Truong Meyer X. M., Morin D. (1997) Bioleaching of a cobaltiferous pyrite: a continuous laboratory-scale study at high solids concentration., *Min. Eng.* 10 : 507-527.
5. Battaglia-Brunet F., D'Hugues P., Cabral T., Cezac P., Garcia J.L., Morin D. (1998) The mutual effect of mixed thiobacilli and leptospirilli populations on pyrite bioleaching. *Min. Eng.* 11 : 195-205.
6. Foucher S., Battaglia-Brunet F., Ignatiadis I., Morin D. (2001) Treatment by sulfate-reducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recovery. *Chem. Eng. Sci.* 56 : 1639-1645.
7. Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Clarens M., Baranger P. (2002) An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterisation, and performance in reactors., *J. Appl. Microbiol.* 93 : 656-667.
8. Battaglia-Brunet F., Clarens M., D'Hugues P., Godon J.J., Foucher S., Morin D. (2002) Monitoring of a pyrite-oxidising bacterial population using DNA single-strand conformation polymorphism and microscopic techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 : 206-211.
9. Battaglia-Brunet F., Foucher S., Ignatiadis I., Michel C., Morin D. (2002) Reduction of chromate by fixed films of sulfate-reducing bacteria using hydrogen as an electron source. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28 : 154-159.
10. Foucher S., Battaglia-Brunet F., D'Hugues P., Clarens M., Godon J.J., Morin D. (2003) Evolution of the bacterial population during the batch bioleaching of a cobaltiferous pyrite in a suspended-solids bubble column, and comparison with a mechanically-agitated reactor. *Hydromet.* 71 : 5-12.
11. Michel C., Battaglia-Brunet F., Tran Minh C., Bruschi M., Ignatiadis I. (2003) Amperometric cytochrome C3-based biosensor for chromate determination., in *Enzymes in the Environment: Activity Ecology and Applications*. *Biosens. Bioelec.* 19 : 345-352.
12. Battaglia-Brunet F., Foucher S., Denamur A., Marggraff M., Morin D., Ignatiadis I. (2003) Chromate reduction at low sulphate concentration in hydrogen-fed bioreactors. *Env. Technol.* 1 : 101-110.
13. Battaglia-Brunet F., Foucher S., Morin D., Ignatiadis I. (2004) Chromate (CrO_4^{2-}) reduction in groundwaters by using reductive bacteria in fixed-bed bioreactors., *Wat. Air & Soil Poll.* 4 : 127-135.
14. Battaglia-Brunet F., Joulain C., Garrido F., Dictor M.C., Morin D., Coupland K., Johnson D.B., Hallberg K.B., Baranger P. (2006) Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov., *Antony Van Leeuwenhoek Int. J.* 89 : 99-108.
15. Michel C., Ouerd A., Battaglia-Brunet F., Gignes N., Grasa J.P., Bruschi M., Ignatiadis I., (2006) Cr(VI) quantification using an amperometric enzyme-based sensor: interference and

physical and chemical factors controlling the biosensor response. *Biosens. Bioelec.* 22 : 285-290.

16. Battaglia-Brunet F., Touzé S., Michel C., Ignatiadis I. (2006) Treatment of a chromate-polluted groundwater in a 200-dm³ pilot bio-reactor fed with Hydrogen. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 : 1506-1513.

17. Battaglia-Brunet F., Itard Y., Garrido F., Delorme F., Crouzet C., Greffié C., Joulian C. (2006) A simple biogeochemical process removing arsenic from a mine drainage water. *Geomicrobiol. J.* 23 : 201-211.

18. Battaglia-Brunet F., Michel C., Joulian C., Ollivier B., Ignatiadis I. (2007) Relationship between sulphate starvation and chromate reduction in a H₂-fed fixed-film bioreactor. *Wat. Air & Soil Pol.* 183 : 341-353.

19. Touzé S., Battaglia-Brunet F., Ignatiadis I. (2008) Technical and Economical Assessment and extrapolation of a 200-dm³ pilot bioreactor for reduction of sulphate and metals in acid mine waters. *Wat. Air & Soil Pol.* 187 : 15-29.

20. Remoundaki E., Kousi E., Joulian C., Battaglia-Brunet F., Hatzikioseyan A., Tsezos M. (2008) Characterization, morphology and composition of biofilm and precipitates from a sulphate reducing fixed-bed reactor. *J. Hazard. Mat.* 153 : 514-524.

21. Bryan C. G., Marchal M., Battaglia-Brunet F., Bruneel O., Kugler V., Lemaitre-Guillier C., Lièvremon D., Bertin P. N., Arsène-Ploetze F. (2009) Diverse genetic adaptations and metabolic responses to arsenic observed in *Thiomonas* strains. *BMC Microbiology*. *In press*.

22. Michon J., Dagot C., Deluchat V., Dictor M.-C., Battaglia-Brunet F., Baudu M. (2009) As(III) biological oxidation by CASO1 consortium in fixed-bed reactors. *Process Biochem.* *In press*.

Articles de Proceedings

23. Adam K., Battaglia-Brunet F., Hau J.M., Morin D., Papassiopi N., Tidy N.E., Pooley F. (1997) Biorecovery of refractory gold arsenopyritic concentrate: from batch testwork to cost estimate., in IMPC 20 - International Mineral Processing Congress 1997 - Aachen - Germany - 21-26/09/1997, Edited by H. Hobeltz & H. von Blottnitz Vol. 4, pp. 525-535.

24. D'Hugues P., Battaglia-Brunet F., Clarens M., Morin D. (2004) Microbial diversity of various biorecovery cultures grown in different operating conditions using 16S-rDNA analysis. In *Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution*, Edited by M. Tsezos, A. Hatzikioseyan & E. Remoundaki, National Technical University of Athens, Zografou, Greece. pp.1313-1323. IBS-03, Athens, Greece.

25. Battaglia-Brunet F., Foucher S., Denamur A., Chevard S., Morin D., Ignatiadis I. (2004) Development of a bio-process using sulfate-reducing bacteria to remove metals from surface treatment effluents. In *Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution*, Edited by M. Tsezos, A. Hatzikioseyan & E. Remoundaki, National Technical University of Athens, Zografou, Greece. pp. 549-557. IBS-03, Athens, Greece.

26. Coupland.K., Battaglia-Brunet F., Hallberg K.B., Dictor M.C., Garrido F., Johnson D.B. (2004) Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes: an important role for novel *Thiomonas* spp.. In Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution, Edited by M. Tsezos, A. Hatzikioseyan & E. Remoundaki, National Technical University of Athens, Zografou, Greece. pp. 639-646. IBS-03, Athens, Greece.

27. Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Garrido F., Baranger P., Michel C., Joulian C., Bourgeois F., Itard Y., Morin D. (2005) Remediation processes using biological As(III) oxidation. In: S.T.L. Harrison, D.E. Rawlings, J. Petersen: Proceedings, 16th Int. Biohydrometallurgy Symposium Cape Town South Africa.

28. Battaglia-Brunet F., Houlliot A., Bourgeois F., Crouzet C., Itard Y. (2005) Conception d'un circuit de traitement biologique de l'exhaure minier de Lopérec par piégeage de l'arsenic sur les hydroxydes de fer. In SFGP 2005 - Toulouse - France - 20-22/09/2005

29. Battaglia-Brunet F., Morin D., Coulon S., Joulian C. (2009) Bioprecipitation of arsenic sulphide at low pH. In "Biohydrometallurgy: a meeting point between Microbial Ecology, metal Recovery Processes and Environmental Remediation. Edited by E. R. Donati, M. R. Viera, E. L. Tavani, M. A. Giaveno, T. L. Lavallo, P. A. Chicchiarini. Proceedings of the 18th International Biohydrometallurgy Symposium (IBS). pp. 581-584.

Brevets

30. Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Morin D., Baranger P. (2000) Bactéries utilisables pour oxyder de l'arsenic, procédé pour leur sélection et leurs applications pour traiter des milieux renfermant de l'arsenic. BRG-FR-106 / 00.12579 / 2.814.751

31. Battaglia-Brunet F., Crouzet C., Morin D. (2008) Procédé de traitement biologique des déchets arséniés issus du traitement d'effluents acides. Déposé le 9 décembre 2008.

Articles dans revues techniques

32. Gillaizeau O., Gallone T., Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Foucher S., Hau J.M., Morin D. (1999) Traitement biologique des sables contenant des résines phénoliques. Hommes et Fonderie. Revue de l'Association Technique de Fonderie, N° 292, p. 18-20

33. Battaglia-Brunet F., Dictor M. C., Lett M. C., Bertin P. (2008) Bioremédiation d'eaux contaminées par l'arsenic. Techniques de l'Ingénieur, dossier IN91, Octobre 2008

Communications à Congrès (sans article)

34. Battaglia-Brunet F., Morin D., Ollivier P. (1997) Dissolution of cobaltiferous pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*: factors influencing bacterial leaching efficiency. In Engineering'97 - Santiago - Chili - 07/1997

- 35.** Dictor M.C., Foucher S., Battaglia-Brunet F., Gillaizeau O., Hau J.M., Morin D., Gueguen L., Gallone.T. (1999) Biological treatment of foundry sand using a slurry bioreactor. Génie des Procédés - 2ème congrès européen - Montpellier - France - 5-7/10/1999
- 36.** Ignatiadis I., Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Fabriol.R. (2000) Atténuation du chromate (CrO_4^{2-}) dans le district minier de Sukinda, Orissa, Inde. Journée scientifique Sté Française de Chimie - Université d'Orléans - Orléans - France - 27/02/2000
- 37.** Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F. (2000) Development of technologies using the activity of sulfate-and metal-reducing bacteria (SMRB) to remove heavy metals and metalloids from ground waters and soils (Metalbioreduction). Protection of european water resources. Contaminated sites - landfills-sediments - Venice - Italy - 21-23/06/2000
- 38.** Battaglia-Brunet F., Foucher S., Ignatiadis I., Morin D. (2000) Production of H_2S by sulfate-reducing bacteria in a two gas-liquid column reactor for the purification of metals-containing effluents. IMPC 21 - International Mineral Processing Congress 2000 - Rome - Italie - 07/2000
- 39.** Battaglia-Brunet F., Foucher, Ignatiadis I., Michel.C., Morin D. (2000) Fixed films bioreactor for the reduction of Cr(VI) using chemotrophic sulfate-reducing bacteria. SEGH 18th - Society for Environmental Geochemistry and Health - Glasgow - Scotland - 11-12/09/2000
- 40.** Ignatiadis I., Gail.S., Dictor M.C., Battaglia-Brunet F. (2000) Natural attenuation of chromate (CrO_4^{2-}) in rice paddy irrigation water and soil. SEGH 18th - Society for Environmental Geochemistry and Health - Glasgow - Scotland - 11-12/09/2000
- 41.** Ignatiadis I., Gail S., D Dictor M.C., Battaglia-Brunet F. (2001) Atténuation naturelle du chromate (CrO_4^{2-}) dans les eaux d'irrigations et les sols des rizières. SIM - Séminaire de l'Industrie Minérale - Paris - France - 05-06/02/2001
- 42.** Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Baranger P. (2001) Comportement biogéochimique de l'arsenic dans un ancien site minier (Chéni, France). II : importance des processus microbiens. in Aspects géochimiques - hydrogéochimiques - biogéochimiques - SIM - Séminaire de l'Industrie Minérale - Paris - France - 05-06/02/2001
- 43.** Battaglia-Brunet F., Loiseau C.D., Ignatiadis I., Morin D. (2001) Réduction du Fe (III) par des bactéries sulfato-réductrices dans la perspective d'une biolixiviation des métaux toxiques associés au fer. Atelier international sur l'analyse - les méthodologies de traitement et la réhabilitation des sols et eaux souterraines pollués - Interchimie 2001 - Paris - France - 03/2001
- 44.** Ignatiadis I., Gail.S., Dictor M.C., Battaglia-Brunet F. (2001) Atténuation naturelle du chromate (CrO_4^{2-}) dans les eaux d'irrigations et les sols des rizières. Atelier international sur l'analyse - les méthodologies de traitement et la réhabilitation des sols et eaux souterraines pollués, Interchimie 2001 - Paris - France - 03/2001
- 45.** Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F., Bruschi.M., Dalla.A., Ollivier.B. (2001) Development of technologies using the activity of sulphate -and metal- reducing bacteria (SMRB) to remove heavy metals and metalloids from groundwaters and soils - Metalbioreduction, Atelier

international sur l'analyse - les méthodologies de traitement et la réhabilitation des sols et eaux souterraines pollués, Interchimie 2001 - Paris - France - 03/2001

46. Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F., Bruschi M., Dalla A., Ollivier B. (2001) Development of technologies using the activity of sulphate -and metal- reducing bacteria (SMRB) to remove heavy metals and metalloids from groundwaters and soils. Metalbioreduction. Protection of european water resources. Contaminated sites - landfills-sediments - Harrogate - United Kingdom - 21-23/05/2001

47. Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Baranger P. (2001) Biogeochemical behaviour of arsenic in a disused mine site (Cheni France): influence of microbial processes. ICOBTE 2001 - International Conference on the Biogeochemistry of Trace Element 6th - University of Guelph - Ontario – Canada – 29/07-02/08/2001

48. Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F., Bruschi M., Dalla.A., Ollivier.B. (2001) Development of technologies using the activity of sulphate -and metal- reducing bacteria (SMRB) to remove heavy metals and metalloids from groundwaters and soils - Metalbioreduction, Eurothen 2001 - Stockholm - Suède - 04-06/07/2001

49. Ignatiadis I., Gail.S., Dictor M.C., Battaglia-Brunet F. (2001) Natural attenuation of chromate (CrO_4^{2-}) in rice paddy irrigation water and soil. European Bioremediation Conference - 1st - Chania - Crete - 02-05/07/ 2001, pp. 401-404.

50. Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Baranger P. (2001) Biogeochemical behaviour of arsenic in an old mine site (Cheni, France): influence of microbial processes. ISEB - Biogeochemical processes and cycling of elements in the environment - Wroclaw - Poland - 09/2001

51. Battaglia-Brunet F., Loiseau C.D., Ignatiadis I., Morin D. (2001) Reduction of Fe (III) by sulfate-reducing bacteria for the bioleaching of iron-associated toxic elements. ISEB - Biogeochemical processes and cycling of elements in the environment - Wroclaw - Poland - 09/2001

52. Battaglia-Brunet F., Foucher S., Morin D., Ignatiadis I. (2002) Chromate (CrO_4^{2-}) reduction in groundwaters by using reductive bacteria in fixed-bed bioreactors. Protection and restoration of the environment VI - Skiathos Island - Greece - 01-05/07/2002

53. Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Crouzet C., Clarens M., Baranger P. (2002) Traitement biologique d'eaux arsénisées par une population chimiolithoautotrophe oxydant l'arsenic. APESA - Technique sur l'arsenic - Pau - France - 26/09/2002

54. Baranger P., Bodenan F., Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Kervenan C., Amraouin N., Lassin A., Azaroual M. (2002) Study of arsenic transfer in a former gold mine site (Cheni, France): a bio-hydrogeochemical approach. SWEMP 2002 - International Symposium on Environmental issues and Waste Management in Energy and Mineral Production - 7th - Cagliari - Sardinia - Italy - 07-10/10/2002

55. Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Koch-Mathian S., Baranger P. (2002) Arsenic oxidation by a chemo-autotrophic bacterial population: influence of dissolved oxygen concentration.

SWEMP 2002 - International Symposium on Environmental issues and Waste Management in Energy and Mineral Production - 7th - Cagliari - Sardinia - Italy - 07-10/10/2002

56. Foucher S., D'Hugues P., Battaglia-Brunet F., Morin D. (2002) Comparaison des performances de la biolixiviation dans une série de réacteurs parfaitement agités et dans une colonne à bulles. Réacteurs Gaz-liquide et Gaz-Liquide-Solide - 4ème - Herbeumont-sur-Semois - Belgique - 08/11-10/2002

57. Baranger P., Bodenan F., Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Kerven C., Amraouin N., Lassin A., Azaroual M. (2002) Analyse du transfert de l'arsenic sur un ancien site minier : une approche biohydrogéochimique. Rencontre nationale de la recherche sur les sites et sols pollués : bilan et perspectives - 1ère - Paris - France - 12-13/12/2002

58. Battaglia-Brunet F., Castagné S., Denamur A., Ignatiadis I. (2002) Développement de technologies utilisant l'activité des bactéries métal-réductrices (BMR) pour traiter les sols pollués par les métaux lourds et métalloïdes. Rencontre nationale de la recherche sur les sites et sols pollués : bilan et perspectives - 1ère - Paris - France - 12-13/12/2002

59. Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Crouzet C., Clarens M., Baranger P. (2002) Capacité d'oxydation de l'arsenic par une population bactérienne chimiautotrophe naturelle. Application au traitement des eaux arséniées. Rencontre nationale de la recherche sur les sites et sols pollués : bilan et perspectives - 1ère - Paris - France - 12-13/12/2002

60. Baranger P., Bodenan F., Battaglia-Brunet F., D Dictor M.C., Kerven C., Amraouin N., Lassin A., Azaroual M. (2003) Analyse bio-hydrogéochimique du transfert de l'arsenic sur une ancienne mine d'or (site de Chéni). Après-Mine 2003 - Impacts et Gestion des risques - Nancy - France - 05-07/02/2003

61. Itard Y., Crouzet C., Foucher S., Greffié C., Battaglia-Brunet F., Brunet J. F., Morin D. (2003) Traitement des effluents miniers acides : alternatives au traitement à la chaux. Après-Mine 2003 - Impacts et Gestion des risques - Nancy - France - 05-07/02/2003

62. Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F., Bruschi M., Michel C., Bianco P., Lojou E., Tran Minh C. (2003) Mise au point d'un biocapteur enzymatique utilisant les cytochromes C3 pour la quantification rapide de la bio-disponibilité du chromate dans l'environnement. , in INTERSOL'2003 - Analyse Méthodologies de Traitement et Réhabilitation des Sols et Eaux Souterraines Pollués - Paris - France - 01-03/04/2003

63. Ignatiadis I., Foucher S., Salmon A., Battaglia-Brunet F., Morin D. (2003) Mise au point d'un procédé biologique d'immobilisation in situ du chrome hexavalent contenu dans un sol industriel. INTERSOL'2003 - Analyse Méthodologies de Traitement et Réhabilitation des Sols et Eaux Souterraines Pollués - Paris - France - 01-03/04/2003

64. Battaglia-Brunet F., Duquesne K., D Dictor M.C., Garrido F., Bonnefoy V., Baranger P., Morin D. (2003) Arsenite oxidizing *Thiomonas* strains isolated from different mining sites. Session BG1.09 - Role of prokaryotes and microalgae in the biogeochemical cycling within soils, marine and freshwater ecosystems (co-sponsored by OS) - Convenor: Voytek M., EGS - AGU - EUG joint Assembly - 28th - Nice - France - 06-11/04/2003

- 65.** Battaglia-Brunet F., Castagné S., Denamur A., Ignatiadis I. (2003) Development of technologies using metal-reducing bacteria for the remediation of polluted soils containing toxic metals or metalloids. CONSOIL 2003 - International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil - 8th - Gent - Belgium - 12-16/05/2003
- 66.** Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Crouzet C., Clarens M., Baranger P. (2003) Oxidation capabilities of arsenic by a chemo-autotrophic bacterial population: potential use for treatment of arsenic contaminated waters. CONSOIL 2003 - International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil - 8th - Gent - Belgium - 12-16/05/2003
- 67.** Clozel-Leloup B., Battaglia-Brunet F., Conil P., Ignatiadis I. (2003) Evaluation of physical, biological and chemical techniques applied to the remediation of an arsenic-polluted soil coming from an old mining area (France). CONSOIL 2003 - International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil - 8th - Gent - Belgium - 12-16/05/2003
- 68.** Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Baranger P. (2003) Arsenic oxidation capabilities of a chemoautotrophic bacterial population : use for the treatment of an arsenic contaminated wastewater, ICHMET 2003 - International Conference on Heavy Metals in the Environment 12th - Grenoble - France - 26-30/05/2003, Journal de Physique IV, V. 107 p. 377-380
- 69.** Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Crouzet C., Clarens M., Baranger P. (2003) Oxidation capabilities of arsenic by a chemo-autotrophic bacterial population: potential use for treatment of arsenic contaminated waters. ICOBTE 2003 - International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements 7th - Uppsala - Sweden - 15-19/06/2003
- 70.** Battaglia-Brunet F., Castagné S., Ignatiadis I. (2003) Anaerobic bioreduction of arsenic contained in polluted soils. European Bioremediation Conference - 2nd - Chania -Crete - 30/06-04/07/2003
- 71.** Ignatiadis I., Foucher S., Battaglia-Brunet F., Morin D. (2003) Development of a biological/chemical process for in situ immobilization of the hexavalent chromium contained in an industrial ground. European Bioremediation Conference - 2nd - Chania -Crete - 30/06-04/07/2003
- 72.** Foucher S., D'Hugues P., Battaglia-Brunet F., Morin D. (2003) Bioremediation performances comparison between a series of mechanically agitated tanks in a bubble column. IMPC 22 - International Mineral Processing Congress 2003 - Cape Town - Republic of South Africa - 28/09-03/10/2003
- 73.** Fouillac C., Battaglia-Brunet F., Baranger P., Czernichowski-Lauriol I. (2004) Microbiological CO₂ conversion to methane in sedimentary aquifers. Building on the current technology base to provide viable options to reduce carbon intensity, Carbon capture & sequestration - 3rd annual conference - Alexandria - Washington - USA - 02-06/05/2004
- 74.** Dictor M.C., Touzé S., Nowak C., Battaglia-Brunet F., Guyonnet D. (2004) Production biologique d'hydrogène à partir de déchets ménagers. Production d'hydrogène par des procédés biologiques ou biomimétiques - Cargèse - France - 31/05-04/06/2004

- 75.** Audibert N., Fouillac C., Bailly L., Battaglia-Brunet F., Bodenan F., Bourgeois F., Piantone P., Recoche G., Thomassin J.F., TOUZE.S. (2004) Early results from an LCA-Driven study of mineral carbonation routes, IGC 32nd - International Geological Congress - Florence - Italie - 20-28/08/2004
- 76.** Michel C., Battaglia-Brunet F., Tran.Minh.C., Bruschi.M., Ignatiadis I. (2004) Amperometric enzyme-based sensor for chromate bioavailability determination., ENEA - The 6th Workshop on Biosensors and BioAnalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical analysis (Bio2 μ TECA) - Rome - Italie - 08-12/10/2004
- 77.** Joulian C., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Itard Y. (2005) Etude d'une population microbienne participant à l'oxydation de l'Arsenic et du fer dans un drainage minier, CEM - Colloque d'Ecologie Microbienne - 2ème - Obernai - Alsace - 09-12/05/2005
- 78.** Battaglia-Brunet F., Michel C., J Joulian C., Ollivier B., Morin D., Ignatiadis I. (2005) Influence d'une privation de sulfate sur la réduction biologique du Chromate., CEM - Colloque d'Ecologie Microbienne - 2ème - Obernai - Alsace - 09-12/05/2005
- 79.** Battaglia-Brunet F., Diction M.C., Garrido F., Baranger P., Michel C., J Joulian C., Bourgeois F, ITARD.Y., Morin D. (2005) Mise en oeuvre de l'oxydation biologique de l'As(III) dans des procédés de décontamination. ASEES - Arsenic & Sélénium - Limoges - France - 12-13/05/2005
- 80.** Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F. (2005) Applicability of anaerobic bioleaching as remediation technique for arsenic- contaminated soils: Batch, column and pilot experiments and economic assessment. European Bioremediation Conference - 3rd - Chania - Crête - 04-07/07/2005
- 81.** Battaglia-Brunet F., Touzé S., Michel C., Ignatiadis (2005) Treatment of a chromate polluted groundwater in a 200-I pilot bioreactor fed with hydrogen and carbon dioxide. European Bioremediation Conference - 3rd - Chania - Crête - 04-07/07/2005
- 82.** Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F., Morin D. (2005) Development and in situ implementation of f a biological and chemical process for immobilization of the chromate contained in an industrial groundwater. European Bioremediation Conference - 3rd - Chania - Crête - 04-07/07/2005
- 83.** Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F. (2005) Applicability of anaerobic bioleaching as remediation technique for arsenic- contaminated soils: Batch, column and pilot experiments and economic assessment. CONSOIL 2005 - International FZK/TNO Conference on contaminated soil - 9th - Bordeaux - France - 03-07/10/2005
- 84.** Michon J., Mangeret A., Deluchat V., Diction M.C., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Dagot C. (2006) Oxydation biologique de l'Arsenic (III) par CAsO1 dans les eaux destinées à la consommation humaine. Journées Thématiques du RNB : Les Biofilms dans l'environnement - Orléans - France - 14-15/06/2006
- 85.** Battaglia-Brunet F., Garrido F., Diction M.C., J Joulian C., Itard Y., Morin D., Deluchat V., Michon J., Godon J.J. (2006) Développement de biofiltres pour le traitement des eaux

polluées par de l'arsenite. Journées Thématiques du RNB : Les Biofilms dans l'Environnement - Orléans - France - 14-15/06/2006

86. Battaglia-Brunet F., Esnault-Filet A., Michel C., Ignatiadis I., Lachambre M., Morin D. (2006) Optimization of a biological process for the in-situ treatment of Cr(VI) polluted groundwater in a "panel-and-drain" type bio-barrier. ISEB/ESEB 2006 - International Symposium topic Technical processes and industrial applications (Novel bioreactor systems and process scale up) - Leipzig - Germany - 09-13/07/2006

87. Battaglia-Brunet F., Touzé S., Michel C., Ignatiadis I. (2006) Acidity, sulfate and metal bioreduction and removal from a mining acid water in a 200-L pilot bioreactor fed with hydrogen gas., in ISEB/ESEB 2006 - International Symposium topic Technical processes and industrial applications (Novel bioreactor systems and process scale up) - Leipzig - Germany - 09-13/07/2006

88. Michel C., Ouerd A., Battaglia-Brunet F., Guigues N., Bruschi M., Ignatiadis I. (2006) Développement d'un capteur enzymatique pour le dosage du chromate : interférents et facteurs physicochimiques contrôlant la réponse du biocapteur. Biodépollution et Environnement : Savoir et Savoir Faire - Paris - France - 12-13/09/2006

89. Battaglia-Brunet F., Garrido F., Dictor M.C., Jouliau C., Itard Y., Morin D., Deluchat V., Michon J., Godon J.J. (2006) Développement de biofiltres pour le traitement des eaux polluées par de l'arsenite. Biodépollution et Environnement : Savoir et Savoir Faire - Paris - France - 12-13/09/2006

90. Battaglia-Brunet F., Michel C., J Jouliau C., Morin D., Ignatiadis (2006) Bio-réduction du Cr(VI) en conditions de sulfato-réduction. Biodépollution et Environnement : Savoir et Savoir-faire - Paris - France - 12-13/09/2006

91. Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F. (2006) Applicabilité de la biolixiviation anaérobie comme technique de remédiation des sols pollués par l'arsenic : expérimentation en colonnes et dispositifs pilotes et évaluation économique. Biodépollution et Environnement : Savoir et Savoir-faire - Paris - France - 12-13/09/2006

92. D'Hugues P., Battaglia-Brunet F., Morin D. (2006) La biolixiviation au BRGM: de la R&D jusqu'à l'application industrielle. Serge Winogradsky aujourd'hui - Colombes - France - 12/10/2006

93. Battaglia-Brunet F., Morin D., Coulon S., Jouliau C. (2008) Bio-precipitation of arsenic sulphide at low pH. AS2008 - 2nd International Congress on Arsenic in the environment - Valencia - Espagne - 21-23/05/2008

94. Crouzet C., Delorme F., Battaglia-Brunet F., Burnol A., Morin D. (2008) Characterisation of dissolved thioarsenite complexes and precipitated arsenic species in a low-pH sulphate-reducing bioreactor. AS2008 - 2nd International Congress on Arsenic in the environment - Valencia - Espagne - 21-23/05/2008

95. Battaglia-Brunet F., Breeze D., Ignatiadis I. (2008) Experimental determination and biogeochemical modelling of optimal pH and redox conditions for arsenic sulphide bio-precipitation. 4th European Bioremediation Conference – Chania – Greece – 03-06/09/2008.

- 96.** Battaglia-Brunet F., Morin D., Coulon S., Jouliau C. (2009) Bio-precipitation of arsenic sulphide at low pH. International Mine Water Conference : 19th to 23rd Octobre 2009 – Pretoria, South Africa
- 97.** Battaglia-Brunet F., Crouzet C., Morin D. (2009) Bio-stabilization of arsenic in solid wastes obtained by lime treatment of bioleaching liquors. International Mine Water Conference : 19th to 23rd Octobre 2009 – Pretoria, South Africa
- 98.** Guézennec A.-G., Touzé S., Battaglia-Brunet F. (2009) Biological treatment of mining water containing arsenic: from laboratory to pilot scale. International Mine Water Conference : 19th to 23rd Octobre 2009 – Pretoria, South Africa

Articles soumis ou en préparation (rédaction achevée ou presque)

- 99.** Arsène-Ploetze F., Koechler S., Marchall M., Coppee J.-Y., Chandler M., Bonnefoy V., Barakat M., Barbe V., Battaglia-Brunet F., Brochier-Armanet C., Bruneel O., Bryan C. G., Cleiss J., Heinrich-Salmeron A., Hommais F., Jouliau C., Krin E., Lieutaud A., Lièvreumont D., Michel C., Muller D., Ortet P., Proux C., Siguier P., Roche D., Slyemi D., Talla E., Weiss S., Weissenbach J., Médigue C., Bertin P. N. Structure, Function and Evolution of *Thiomonas* spp. inferred from genome sequencing and comparative genomic analysis. Soumis à PloS genetics
- 100.** Quéméneur M., Cébron A., Billard P., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Leyval C., Jouliau C. Population structure and abundance of aerobic arsenite-oxidizing bacteria along an arsenic pollution gradient in waters of the Upper Isle River Basin, France. Article à soumettre à Appl. Environ. Microbiol.
- 101.** Battaglia-Brunet F., El Achbouni H., Quemeneur M., Jouliau C. Comparison of three genetically close As(III)-oxidising *Thiomonas* strains: *Thiomonas delicata*, *Thiomonas cuprina* and « *Thiomonas arsenivorans* » and reclassification of them in one unique specie. Article à soumettre comme note à IJSEM.
- 102.** Battaglia-Brunet F., Crouzet C., Burnol A., Coulon S., Morin D., Jouliau C. Precipitation of arsenic sulphide from acidic water in a fixed film bioreactor. Article à soumettre à Water Research.
- 103.** Battaglia-Brunet F., Crouzet C., Morin D. Stabilization of solids wastes resulting from lime treatment of bioleaching effluents through bacterial oxidation of As(III). Article à soumettre à J. Hazard. Mat.
- 104.** Battaglia-Brunet F., Michel C., Breeze D., Heinrich-Salmeron A., Lett M.-C., Jouliau C. First evidence of As(III)-oxidation by a strain of the *Leptothrix* genus (*Leptothrix arsenicoxydans* sp. nov.) isolated from arsenic-rich mine-water sediment. Article à soumettre à FEMS Microbiol. Lett.

Autres Références

- Achour A. R., Bauda P., Billard P. (2006) Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* 158 : 128-137.
- Ahmann D., Roberts A.L., Krumholz L.R., Morel F. M.M. (1994) Microbe grows by reducing arsenic. *Nature* 371 : 750.
- Anderson G.L., Love M., Zeider B.K. (2003) Metabolic energy from arsenite oxidation in *Alcaligenes faecalis*. *J. Phys. IV France* 107 : 49-52.
- Arias Y.M., Tebo B.M. (2003) Cr(VI) reduction by sulphidogenic and non-sulphidogenic microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 : 1847-1853.
- Baker-Austin C., Dopson M., Wexler M., Sawers R. G., Stemmler A., Rosen B. P., Bond P. L. (2007) Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* Fer1. *Extremophiles* 11 : 425-434.
- Bentley R., Ghastien T. G. (2002) Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Rev.* 66 : 250-271.
- Bodenan F., Baranger P., Piantone P., Lassin A., Azaroual M., Gaucher E., Braibant G. (2004) Arsenic behaviour in gold-ore mill tailings, Massif Central, France: hydrogeochemical study and investigation of in situ redox signatures. *Appl. Geochem.* 19 : 1785-1800.
- Bond P. L., Smriga S. P., Banfield J. F. (2000) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 3842-3849.
- Bruneel O., Personné J.C., Casiot C., Leblanc M., Elbaz-Poulichet F., Mahler B.J, Le Fleche A., Grimont P.A. (2003) Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. In acid-mine drainage (Carnoulès, France). *J. Appl. Microbiol.* 95 : 492-499.
- Buneel O., Duran R., Casiot C., Elbaz-Poulichet F. (2006) Diversity of micro-organisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 : 551-556.
- Casiot, C., G. Morin, F. Juillot, O. Bruneel, J. C. Personné, M. Leblanc, K. Duquesne, V. Bonnefoy, and F. Elbaz-Poulichet (2003) Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Res.* 37 : 2929-36.
- Casiot C., Pedron V., Bruneel O., Duran R., Personné J.C., Grapin G., Drakides C., Elbaz-Poulichet F. (2006) A new bacterial strain mediating As oxidation in the Fe-rich biofilm naturally growing in a groundwater Fe treatment pilot unit. *Chemosphere* 64 : 492-496.
- Cervantes C. (1991). Bacterial interaction with chromate. *Antonie van Leeuwenhoek* 59 : 229-233.

- Charlet L., Polya D. (2006) Arsenic in shallow, reducing groundwaters in southern Asia: an environmental health disaster. *Elements* 2 : 91-93.
- Church C. D., Wilkin R. T., Alpers C. N., O Rye R., McClesley R. B. (2007) Microbial sulphate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water. *Geochem. Trans.* 8 : 10.
- Clarke M. B., Helz G. R. (2000) Metal-thiometalate transport of biologically active trace elements in sulfidic environments. 1. Experimental evidence for copper thioarsenite complexing. *Environ. Sci. Technol.* 34 : 1477 -1482.
- Collinet-Latil M. N. (1989) Lixiviation bactérienne par *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans* d'un concentré de flottation arsénopyriteux aurifère réfractaire à la cyanuration directe. Mémoire de Thèse, Université d'Aix-Marseille I.
- Coram N. J., Rawlings D. E. (2002) Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 838-845.
- Décret no 2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles.
<http://admi.net/jo/20011222/MESX0100156D.html>
- Demergasso C. S., Chong G. D., Escudero L. G., Pueyo Mur J. J., Pedros-Alio C. (2007) Microbial precipitation of arsenic sulfides in Andean Salt Flats. *Geomicrobiology Journal* 24 : 111-123.
- D'Hugues P., Joulain C., Spolaore P., Michel C., Morin D. (2008) Continuous bioleaching of a pyrite concentrate in stirred reactors: population dynamics and exopolysaccharide production vs. bioleaching performance. *Hydromet.* 94 : 34-41.
- De Vegt A. L. (1996) Elimination des composés sulfurés et des métaux lourds à l'aide de biotechnologies. *Bull. de Biominet*, N°34, 3-4.
- De Wulf-Durand P., Bryant L. J., Sly L. I. (1997) PCR-Mediated detection of acidophilic bioleaching-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 2944-2948.
- Dmytrenko G., M., Ereshko T. V., Konovalova V. V. (2007) Reduction of Cr(VI) by bacteria collection strains of different physiological groups. In "H. J. Heipieder (ed.) Bioremediation of Soils Contaminated with Aromatic Compounds". pp. 125-130, Springer.
- Dopson M., Baker-Austin C., Koppineedi P.R., Bond P. L. (2003) Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* 149 : 1959-1970.
- Duquesne K. (2004) Rôle des bactéries dans la bioremédiation de l'arsenic dans les eaux acides de drainage de la mine de Carnoulès. Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II.

- Duquesne K., Lieutaud A., Ratouchniak J., Yarzabal A., Bonnefoy V. (2007) Mechanisms of arsenite elimination by *Thiomonas* sp. isolated from Carnoulès acid mine drainage. *Eur. J. Soil Biology* 43 : 351-355.
- Eary (1992) The solubility of amorphous As_2S_3 from 25 to 90°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56 : 2267-2280.
- Edwards K. J., Bond P. L., Gihring T. M., Banfield J. F. (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 10 : 1796 – 1799.
- Eide D. J. (2001) Functional genomics and metal metabolism. *Genome Biology* 2 : 1028.1-1028.3
- Elskens M., Leermakers M., Panutrakul S., Monteny F., Baeyens W. (1991) Microbial activity in sandy and muddy estuarine sediments. *Geo-Marine Letters* 11 : 194-198.
- Emerson D., Giorse W. C. (1992) Isolation, cultural maintenance and taxonomy of a sheath-forming strain of *Leptothrix discophora* and characterization of manganese-oxidizing activity associated with the sheath. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 4001-4010.
- Fan H., Su C., Wand Y., Yao J., Zhao K., Wang Y., Wang. G. (2007) Sedimentary arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with high arsenic groundwater from Shanyin, Northwestern China. *J. Appl. Microbiol.* 105 : 529-539.
- Garcia-Moyano A., Gonzales-Toril E., Moreno-Paz M., Parro V., Amils R. (2008) Evaluation of *Leptospirillum* spp. In the Rio Tinto, a model of interest to biohydrometallurgy. *Hydromet.* 94 : 155-161.
- Golovacheva R. S., Karavaiko G.I. (1978) *Sulfobacillus*, a new genus of spore forming bacteria. *Mikrobiologiya* 47 : 815-822
- Hallbeck L., Pedersen K. (1990) Culture parameters regulating stalk formation and growth rate of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.* 136 : 1675-1680.
- Hallberg K. B., Coupland K., Kimura S., Joghanson D. B. (2006) Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in north Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl. Environ; Microbiol.* 72 : 2022-2030.
- Hambsch B., Raue B., Brauch H.J. (1995) Determination of arsenic(III) for the investigation of the microbial oxidation of arsenic(III) to arsenic(V). *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 23 : 166-172.
- Helle U., Onken U. (1988) Continuous bacterial leaching of a pyretic concentrate by *Leptospirillum*-like bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 : 553-558.
- Hopenhayn C. (2006) Arsenic in drinking water: impact on human health. *Elements* 2 : 103-107.
- Huber H. and Stetter K. O. (1990) *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 315-322.

Huisman L. J., Schouten G., Schultz C. (2006) Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry. *Hydromet.* 83 : 106-113.

Ilyaletdinov A.N. et Abdrashitova S.A. (1981) Autotrophic oxidation of arsenic by a culture of *Pseudomonas arsenitoxidans*. *Mikrobiologiya*, 50 : 197-204.

Johnson D. B. (1991) Biological desulfurization of coal using mixed populations of mesophilic and moderately acidophilic bacteria. In: Dugan P. R., Quigley D. R. and Attia Y. A. (Eds) processing and utilization of high-sulfur coals IV (pp. 567-576) Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

Johnson D. B., Dziurla M.-A., Kolmer A., Hallberg K. B. (2002) The microbiology of acid mine drainage: genesis and biotreatment. *South Afr. J. Sci.* 98 : 249-255.

Johnson D. B., Hallberg K. B. (2005) Acid mine drainage remediation options: a review. *Sci. Total Environ.* 338 : 3-14.

Johnson D. B., Sen A. M., Kimura S., Rowe O. F., Hallberg K. B. (2006) Novel bio-sulfidogenic system for selective recovery of metals from acidic leach liquors and waste streams. *Min. Proc. Extract. Met.* 115 : 19-24.

Johnson D. B., Joulain C., D'Huges P., Hallberg K. B. (2008) *Sulfobacillus benefaciens* sp. nov., an acidophilic facultative anaerobic *Firmicute* isolated from mineral bioleaching operations. *Extremophiles*. 12 : 789-798.

Katamaya Y., Uchino Y., Wood A. P., Kelly D. P. (2006) Confirmation of *Thiomonas delicata* (formerly *Thiobacillus delicatus*) as a distinct species of the genus *Thiomonas* Moreira and Amils 1997 with comments on some species currently assigned to the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 : 2553-2557.

Katsoyiannis I. A., Zouboulis A. I. (2006) Use of iron-and manganese-oxidizing bacteria for the combined removal of iron, manganese and arsenic from contaminated groundwater. *Water Qual. Res. J. Canada.* 41 : 117-129.

Kelly D. P., Uchino Y., Huber H., Amils R. & Wood, A. (2007). Reassessment of the phylogenetic relationships of *Thiomonas cuprina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 : 2720-2724.

Kimura S., Hallberg K. B., Johnson D. B. (2006) Sulfidogenesis in low pH (3.8-4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria. *Biodegradation* 17 : 159-167.

Leblanc M., Morales J. A., Borrego J., Elbaz-Poulichet F. (2000) 4,500 year-old mining pollution in southwestern Spain : long-term implications for modern mining pollution. *Econ. Geol.* 95 : 655-662.

Lebrun E., Brugna M., Baymann F., Muller D., Lièvreumont D., Lett M.-C., Nitschke W. (2003) Arsenite Oxidase, an Ancient Bioenergetic Enzyme. *Mol. Biol. Evol.* 20 : 686-693.

- Ledin M., Pedersen K. (1996) The environmental impact of mine wastes – roles of microorganisms and their significance in treatment of mine waste. *Earth-Sci Rev* 41:67-108.
- Lens P., Vallero M., Esposito G., Zandvoort M. (2002) Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1: 311-325.
- Liu A., Garcia-Dominguez E., Rhine E. D., Young L. Y. (2004) A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48 : 323-332.
- London J., Rittenberg S.C. (1967) *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic *Thiobacillus*. *Arch. Mikrobiol.* 59 : 218-225.
- London J. (1963) *Thiobacillus intermedius* nov. sp., a novel type of facultative autotroph. *Arch. Mikrobiol.* 46 : 329-337.
- Lopez-Archilla A. I., Marin I., Amils R. (2001) Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Rio Tinto River, Spain. *Microb. Ecol.* 41 : 20-35.
- Macur R. E., langner H. W., Kocar B. D., Inskip W. P. (2004) Linking geochemical processes with microbial community analysis: successional dynamics in an arsenic-rich, acid-sulphate-chloride geothermal spring. *Geobiol.* 2 : 163-177.
- Mariner R., Johnson D. B., Hallberg K. B. (2008) Characterisation of an attenuation system for the remediation of Mn(II) contaminated waters. *Hydromet.* 94 : 100-104.
- Markosyan G. E. (1972) A new iron-oxidizing bacterium: *Leptospirillum ferrooxidans* nov. gen. nov. sp. *Biol. J. Armenia* 25 : 26-29 (in Russian).
- Marsh T. L., Leon N. M., McInerney M. J. (2000) Physiochemical factors affecting chromate reduction by aquifer materials. *Geomicobiol. J.* 17 : 291-303.
- Michel C., Brugna M., Aubert C., Bernadac A., Bruschi M.(2001) Enzymatic reduction of chromate : comparative studies using sulfate-reducing bacteria: Key role of polyheme cytochromes c and hydrogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 : 95-100.
- Miller S. L., Bada J. L. (1988) Submarine hot springs and the origin of life. *Nature* 334 : 609-611.
- Mizogushi T., Sato T., Okabe T. (1976) New sulfur-oxidizing bacteria capable of growing heterotrophically, *Thiobacillus rubellus* sp. nov. and *Thiobacillus delicatus* sp. nov.. *J. Ferment. Technol.* 54 : 181-191.
- Moreira D., Amils R. (1997) Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 : 522-528.
- Moreno-Paz M., Parro V. (2006) Amplification of low quantity bacterial RNA for microarray studies: time course analysis of *Leptospirillum ferrooxidans* under nitrogen-fixing conditions. *Environ. Microbiol.* 8 : 1064-1073.

- Morin D., D'Hugues P. (2006) Bioleaching of a cobalt containing pyrite in stirred reactors, a case study from laboratory scale to industrial application. in *Biomining*, Berlin : Springer, Chapitre 2, pp. 35-55.
- Morin D. (2007) Bioleaching of sulfide minerals in continuous stirred tanks., in *Microbial Processing of Metal Sulfides*, E.R. Donati and W. Sand Editors - Springer, N° 7, pp.133-150
- Nordstrom D. K., Alpers C. N., Ptacek C. J., Blowes (2000) Negative pH and extremely acidic mine waters at Iron Mountain Mine, California. *Env. Sci. Technol.* 34 : 254-258.
- Norris P. R. (1983) Iron and mineral oxidation with *Leptospirillum*-like bacteria. In Rossi G. and Torma A. E. (Eds). *Recent Progress in Biohydrometallurgy*. Cagliari, Italy. pp. 83-96.
- Norris P. R., Barr D. W., Hinson D. (1987) Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria : affinities for iron and attachment to pyrite. In: Norris P.R. and Kelly D. P. (Eds) *Biohydrometallurgy proceedings of the International Symposium* (pp. 43-49) Warwick, UK.
- Oremland R.S., Kulp T.R., Switzer Blum J., Hoefl S.E., Baesman S., Miller L. G., Stoltz J. F. (2005) A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. *Science* 308 : 1305-1308.
- Praharaj T., Fortin D. (2004) Indicators of microbial sulphate reduction in acidic sulphide-rich mine tailings. *Geomicrobiol. J.* 21 : 457-467.
- Pizzaro J., Jedlicki E., Orellana O., Romero J., Espejo R. T. (1996) Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1323-1328.
- Pollard A. J. (2008) Metal hyperaccumulation: a model system for coevolutionary studies. *New Phytol.* 146 : 179-181.
- Quéméneur M., Heinrich-Salmeron A., Muller D., Lièvreumont D., Jauzein M., Bertin P. N., Garrido F., Jouliau C. (2008) Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* Genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 : 4567–4573.
- Rosen B. P. (1999) families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* 7 : 207-212
- Rowley M. V., Warkentin D. D., Sicotte V. (1997) Demonstration of the biosulphide process at the former Britannia Mine. In « Fourth Int. Conf. on acid rock drainage », Vancouver, B. C., vol. IV, pp. 1533-1547
- Rawlings D. E., Coram N. J., Gardner M. N., Deane S. M. (1999a) *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continuous flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal containing ores and concentrates. In: Amils R., Ballester A. (eds) *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century*. Elsevier, Amsterdam, pp 777-786.
- Rawlings D. E., Tribush H., Hansford G. S. (1999b) Reasons why “*Leptospirillum*”-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in

many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* 145 : 5-13.

Saltikov C. W., Newman D. K. (2003) Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc. Nat. Acad. Science* 100 : 10983-10988.

Sand W., Rhode K., Sobotke B., Zenneck C. (1992) Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 85-92.

Santini, J.M., Sly, L.I, Schnagl, R.D., Macy, J.M. (2000) A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 92-97.

Santini J.M., Wen L.I.S. A., Comrie D., de Wulf-Durand P., Macy J.M. (2002) New arsenite-oxidizing bacteria isolated from Australian gold mining environments – phylogenetic relationships. *Geomicrobiol. J.* 19 : 67-76.

Shock E., Mc Collom T, Schulte M. D. (1998) The emergence of metabolism from within hydrothermal systems. Pp. 59-74. In “Thermophiles – The keys to molecular evolution and the origin of life?”, Eds J. Wiegel and A. Michael W.W., Taylor and Francis.

Sinha S.N., Barnerjee R.D. (1997) Ecological role of thiosulphate and sulphide utilizing purple nonsulphur bacteria of a riverine ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24 : 211-220.

Smiedja J. A., Wilkin R. (2003) Preservation of sulfidic waters containing dissolved As(III). *J. Environ. Monit.* 5 : 913-916.

Stewart D. I., Burke I. T., Mortimer R. J. G. (2007) Stimulation of microbially mediated chromate reduction in alkaline soil-water systems. *Geomicrobiol. J.* 24 : 655-669.

Swartz C. H., Blute N. K., Badruzzman B., Ali A., Brabander D., Jay J., Besancon J., Islam S. Hemond H. F., Harvey C. (2004) Mobility of arsenic in a Bangladesh aquifer: inferences from geochemical profiles, leaching data, and mineralogical characterization. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68 : 4539-4557.

Tebo, B.M. and Obraztsova, A.Y. (1998) Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 162 : 193-198.

Temple K. L. and Colmer A. R. (1951) The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 62 : 605-611.

Tuffin I. M., de Groot P., Deane S. M., Rawlings D. E. (2005) An unusual Tn21-like transposon containing an ars operon is present in highly arsenic-resistant strains of the biomining bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *Microbiology* 151 : 3027-3039.

Tuffin I. M., Hector S. B., deane S. M., Rawlings D. E. (2006) Resistance determinants of a highly arsenic-resistant strain of *Leptospirillum ferriphilum* isolated from a commercial biooxidation tank. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 : 2247-2253.

Walcott R.R., Langston D. B. Jr., Sanders F. H. Jr., Gitaitis R. D. (2000) Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. *Phytopathol.* 90 :191-196.

Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., Trüper H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37 : 463-464.

Weeger W.D., Lievreumont D., Perret M., Lagarde F., Hubert J.C., Leroy M., Lett M.C. (1999) Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometals* 12 : 141-149.

Wilkin R., Wallschlager D., Ford R.G. (2003) Speciation of arsenic in sulfidic waters, *Geochem. Trans.* 4 : 1-7.

Zakaria A. A., Zakaria Z., Surif S., Wan A. A. (2007) Biological detoxification of Cr(VI) using wood-husk immobilized *Acinetobacter haemolyticus*. *J. Hazard. Mat.* 148 : 164-171.

Zettler L. A., Messerli M. A., Laatsch A. D., Smith P. J. S., Sogin M. L. (2003) From genes to genomes: beyond biodiversity in Spain's Rio Tinto. *Biol. Bull.* 204 : 205-209.

Zilles J.L., Peccia J., Kim M.W., Hung C.H., Noguera D.R. (2002) Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 2763-2769.

Zimmerley S. R., Wilson D. G., Prater J. D. (1958) Cyclic leaching process employing iron oxidizing bacteria. U.S. Patent No. 2,829,964

6. Curriculum Vitae

6.1 Etat Civil

Fabienne BATTAGLIA-BRUNET
Née le 2 janvier 1968 à Salon de Provence (13)
Nationalité française
Mariée, deux enfants (4 et 11 ans)

Adresse personnelle :

138, rue de la Haletière, 45060 Marcilly-en-Villette
Téléphone : 02 38 76 04 01

Adresse professionnelle :

BRGM
Service Environnement et Procédés
Unité Ecotechnologies
3, av. Claude Guillemin

45060 Orléans cedex 02
Téléphone : 02 38 64 39 30 Télécopie : 02 38 64 36 80
Adresse électronique : f.battaglia@brgm.fr

Poste actuel : Ingénieur de Recherche et Chef de Projet au BRGM

6.2 Titres Universitaires

Doctorat de l'Université de Provence (Aix-Marseille I), option Biologie Cellulaire et Microbiologie, soutenu le 15 avril 1994 : « *Optimisation de la lixiviation bactérienne d'un concentré de pyrite cobaltifère* ». Directeur de thèse : Jean-Louis Garcia

Diplôme d'Ingénieur d'Université en Microbiologie Industrielle et Appliquée de l'Université de Provence (Aix-Marseille I), avec équivalence du diplôme d'Etude Approfondies, 1990

Maîtrise de Sciences et Techniques en Microbiologie Industrielle et Appliquée (Université de Provence, Aix-Marseille I), 1989

DEUG « Sciences de la nature et de la vie », option Biochimie (Université de Provence, Aix-Marseille I), 1987

6.3 Parcours professionnel

1990 - 1994 : Ingénieur et Doctorat. Laboratoire de Traitement Chimique des Matières Minérales au BRGM. Etude de la lixiviation bactérienne d'un concentré de pyrite cobaltifère. Projet de traitement des déchets pyriteux de la mine de Kasese en Ouganda pour la récupération du cobalt, qui a débouché sur la construction d'une unité industrielle de production du cobalt par biolixiviation qui fonctionne depuis 1999.

1994 - 1996 : Ingénieur d'étude au BRGM, laboratoire Géomatériaux et GéoProcédés, Traitement biologique de sols contaminés et de déchets industriels (hydrocarbures, effluents cyanurés, chlorophénols, sables de fonderies). Lixiviation bactérienne de minerais d'or réfractaires. Etude du blanchiment des sables et kaolins par des procédés biologiques (acides organiques produits par *Aspergillus niger*, utilisation de bactéries ferri-réductrices).

1996 : Chef de projet de Recherche BRGM "Biotraitements appliqués à l'environnement"

1997 – 1999 : Service Minier National, Département Procédés, Service Traitements Biologiques et Hydrométallurgiques. Animation de l'Action de Recherche Concertée « Mise en œuvre des bactéries sulfato-réductrices pour le traitement des sols et des effluents pollués par des métaux » qui rassemblait des équipes du laboratoire de Bio-énergétique et Bio-ingénierie des Protéines du CNRS (Marseille), de l'IRD, laboratoire de Microbiologie (Marseille), et du BRGM. Cette action était inscrite dans le programme ECODEV du CNRS.

2000 – 2004 : Service Environnements et Procédés, Unité Biotechnologies. Contribution au montage et à l'animation du projet Européen (5eme PCRD) Metalbioreduction : "Development of technologies using the activity of sulphate- and metal-reducing bacteria"

(SMRB) to remove heavy metals and metalloids from ground waters and soils” Contract number: EVK1-CT-1999-00033. Etude de la bioréduction du Cr(VI) par les BSR. Etude du cycle microbiologique de l’arsenic sur l’ancien site minier de CHENI (Saint-Yriex-la-Perche, 87). Chef de projets co-financés par l’ADEME : « Réduction des déchets de traitement de surface et récupération sélective de métaux en utilisant les bactéries sulfato-réductrices et l’hydrométallurgie - contrat BRGM-ADEME N° 0002016 » et « Utilisation de microorganismes spécialisés dans les barrières perméables réactives (BPR) –convention 0372 C 0010 ». Participation au montage et à la réalisation du projet labellisé RITEAU « Décontamination d’arsenic dans l’eau par oxydation biologique à l’aide de *Thiomonas*, As-Thiox »

2005 – 2008 : Chef de projet de Recherche BRGM « Phymic ». Collaboration sur le thème de l’oxydation de l’As(III) par diverses souches bactériennes appartenant au genre *Thiomonas*, avec l’Université de Bangor (UK), et L’Université de Strasbourg, dans le cadre du GDR 2909 « Métabolisme de l’arsenic chez les procaryotes » coordonné par l’Université de Strasbourg. Participation au projet Européen Intégré (7eme PCRD) « BIOMINE » (contract NMP2-CT-2005-500329) : étude de la précipitation de sulfure d’arsenic par les BSR en milieu acide. Participation au montage et à la réalisation du projet ANR (PRECODD 2007) COBIAS : « Compréhension du rôle du Biofilm bactérien et maîtrise de son développement lors du traitement d’eaux ArSéniées en bioréacteurs à lit-fixe ».

2009 : Coordinatrice du projet ANR (CES 2008) ASEDMAR : Arsenic dans les sédiments marins : Modélisation couplée Biogéochimie – Biodisponibilité – Ecotoxicologie. Chef de projet de Recherche BRGM « Bacpolmin » portant sur les mécanismes de mobilité de l’arsenic dans les aquifères. Montage d’une action du projet AXELERA sur la biodégradation des PCBs.

6.4 Montage de projets (projets acceptés et financés)

1999 – 5ème PCRD, montage du projet **Metalbioreduction** (contribution 50%) : “Development of technologies using the activity of sulphate- and metal-reducing bacteria (SMRB) to remove heavy metals and metalloids from ground waters and soils” Contract number: EVK1-CT-1999-00033. Partenaires : BRGM (coordinateur), IRD (Marseille), BIP-CNRS (Marseille), UT2A (Grèce), Proplan (Chypre), VITO (Belgique), Munters-Euroform (Allemagne), GEOS (Allemagne).

2000 – Appel d’offre ADEME, montage du projet **BSR-TS** : Réduction des déchets de traitement de surface et récupération sélective de métaux en utilisant les bactéries sulfato-réductrices et l’hydrométallurgie (contribution 50%). Contrat BRGM-ADEME N° 0002016. Partenaires : BRGM (coordinateur), SETS.

2002 – Réseau Technologique RITEAU, montage du projet « **As-Thiox** » « Décontamination d’arsenic dans l’eau par oxydation biologique à l’aide de *Thiomonas* » (contribution 70%). Financé par le Ministère de la Jeunesse, de l’Education et de la Recherche. Partenaires : BRGM (coordinateur), GRESE (Université de Limoges), ACTREAD environnement S.A.S., INRA de Narbonne.

2007 – Appel d’offre ANR PRECODD, montage du projet COBIAS « Compréhension du rôle du Biofilm bactérien et maîtrise de son développement lors du traitement d’eaux

ArSéniées en bioréacteurs à lit-fixe » (contribution 50%). ANR-07-ECOT-001. Partenaires : BRGM (coordinateur), GRESE Université de Limoges, Eco-Solution, Université de Strasbourg, Soletanche-Bachy, SAUR.

2008 – Appel d’offre ANR-CES, montage du projet ASEDMAR « Arsenic dans les sédiments marins : Modélisation couplée Biogéochimie – Biodisponibilité – Ecotoxicologie » (contribution 80%). Partenaires : BRGM (coordinateur), Université de Nice Sophia-Antipolis, ECOMERS-INSERM, Université de Strasbourg, UT2A.

2008 – Appel d’offre AXELERA (Pôle de compétitivité à vocation mondiale Chimie-Environnement Lyon & Rhône-Alpes), Projet PCB-AXELERA. Participation au montage de l’action SEDICA « Traitement des sédiments pollués par les PCB et autres polluants par la mise en œuvre de charbon actif couplée à des techniques de tri granulométrique des matériaux » (contribution 20%). Partenaires : IRCELYON, Extract-Ecoterre, Soletanche-Bachy, BRGM.

6.5 Encadrement

Stagiaires (2 à 4 mois)

1999 – Cédrik Bétron. BTS Biotechnologies (2^{ème} année). Etude des bactéries participant au cycle de l’arsenic sur un site minier.

2000 - Catherine-Dorothee Loiseau. MST "Mesure et Traitement des Pollutions et Nuisances" Option Eau-Déchets. Université de Pau et des Pays de l’Adour. Décontamination des sols pollués par des métaux avec des bactéries sulfato-réductrices : application à la réduction bactérienne du fer(III) et de l’arsenic(V).

2001 – Sanae Abdouni. BTS Biotechnologies (2^{ème} année). Isolement d’une bactérie oxydant l’As(III) et apparentée à *Thiomonas* à partir d’une culture mixte issue d’un environnement minier.

2002 – Stéphanie Perrin. BTS Biotechnologies (2^{ème} année). Etude d’une souche bactérienne nommée CASO1 (Cheni Arsenic Oxydative n°1) capable d’oxyder l’arsenic en condition autotrophe et provenant de l’ancienne mine d’or de Cheni (limousin, Haute-vienne)

2003 – Jaouad El Kaabi. Maîtrise de Biochimie Moléculaire, Université d’Orléans. Evaluation de la production d’hydrogène à partir d’un produit commercialisé sous le nom de HRC.

2003 – Samantha Angot. Maîtrise de Biochimie Structurale, Université d’Orléans. Etude de populations bactériennes oxydant l’As(III) en As(V).

2004 – Stéphanie Champétinaud. BTS Biotechnologies (1ère année). Etude d’une nouvelle bactérie oxydant l’As(III) et de la croissance de *Variovorax paradoxus* à partir d’un exhaure du site minier de L. (Finistère).

2006 – Hafida El Achbouni. BTS Biotechnologies (1^{ère} année). Production biologique d’hydrogène via l’oxydation du sulfure par *Prosthecochloris vibriiformis*.

2006 – Hans Benaouda. BTS Biotechnologies (2^{ème} année). Caractérisation d'une nouvelle espèce bactérienne oxydant l'arsenic.

2006 – Eve Demange. Ecole de Biologie Industrielle (Cergy 95), stage de 2^{ème} année. Caractérisation de la souche S1.1 - Etude des activités enzymatiques de la souche S1.1 vis-à-vis de l'arsenic et du fer.

2007 - Hafida El Achbouni. BTS Biotechnologies (2^{ème} année). Traitement des effluents chargés en arsenic par une population bactérienne sulfato-réductrice.

2007 – Clément Mompied, IUT Génie Biologique, Université d'Auvergne, Clermont I. Traitement des effluents acides chargés en arsenic par une population bactérienne sulfato-réductrice.

2007 - Marie-Ludivine de Tauzia. BTS Biotechnologies (2^{ème} année). Etude du rendement cellulaire de souches de *Thiomonas* sur As (III)

2008 – Thomas Duval. BTS Biotechnologies (1^{ère} année). Influence du pH sur la croissance de 3 souches de *Thiomonas* ayant la capacité d'oxyder l'arsenic.

2008 – Marie-Ludivine de Tauzia. BTS Biotechnologies (2^{ème} année). Etude d'une population bactérienne As(III)-oxydante de Lopérec : Caractérisation de la souche S1.1.

2009 – Thomas Duval. BTS Biotechnologies (2^{ème} année). Etudes des activités microbiennes liées à l'arsenic dans les sédiments marins

2009 – Clément Charles-Moreau. BTS Biotechnologies (1^{ère} année). Etude biogéochimique de sédiments marins pollués par de l'arsenic sur le littoral sud de Marseille.

Etudiants en DEA, Master II ou Ecoles d'Ingénieurs (6 mois)

1995 - Sophie Tourette. Ingénieur de Microbiologie, Université de Provence. Biodégradation des résines phénoliques dans les sables de fonderie.

1996 - Carine Ablitzer. DEA de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, filière Génie des Procédés. Evaluation de l'efficacité d'un champignon ligninolytique pour la biodégradation de molécules organiques chlorées

2004 – Alice Houlliot. DEA Géosystèmes : Fonctionnement et Ressources. Université d'Orléans. Optimisation d'un procédé de traitement biologique de l'exhaure minier de L. (Finistère)

2005 – Malika Lachambre. Master Pro II « Evaluation des Risques Environnementaux – Risques Chimiques », Université du Havre. Evaluation technique et économique de bioréacteurs visant au développement de biobarrières pour le traitement in-situ d'eaux souterraines polluées par du Cr(VI) ou du cyanure.

2006 – Aurélie De Carvalho. Ecole Nationale Supérieure de Géologie (Nancy). Stage de fin d'Etude. Traitement des effluents chargés en arsenic par une population bactérienne sulfato-réductrice.

2008 – Salim Chalal. Master Pro II Techniques Bio-Industrielles, Université d'Orléans. Traitement biologique d'une eau de mine chargée en arsenic et manganèse : suivi du bioréacteur et étude de la population bactérienne par la méthode FISH

2009 – Aude Locatelli. Université de Dijon. Master II Pro Aliments, Microbiologie, Assurance Qualité. Spécialité Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire et à l'Agroenvironnement. Biogéochimie d'un aquifère artificiel contaminé à l'arsenic.

2009 – Nicolas Manlius. Université Paris 7 Diderot. Master II professionnel option Espace et Milieux. Pollution par l'arsenic et acceptabilité des procédés de biotraitement.

Etudiants en Thèse

Participation à l'encadrement des thèses de :

1998 – 2001 - Caroline Michel, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II. Mise en œuvre des bactéries sulfato-réductrices pour le traitement des sols et des effluents pollués par des métaux. Soutenue le 12 novembre 2001. (Elaboration du sujet et montage du dossier pour financement ADEME, responsable scientifique BRGM, orientation des travaux).

2000 – 2004 – Katia Duquesne, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II. Rôle des bactéries dans la bioremédiation de l'arsenic dans les eaux acides de drainage de la mine de Carnoulès. Soutenue le 28 mai 2004 (Elaboration du sujet et montage du dossier pour financement ADEME, responsable scientifique BRGM, orientation des travaux, membre du jury).

2004-2008 – Aurélie Lieutaud, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II. Etude pour la mise au point d'un biocapteur ampérométrique à arsénite utilisant l'arsénite oxydase. Soutenue le 11 janvier 2008 (Elaboration du sujet et montage du dossier pour financement ADEME, membre du jury).

2006-2009 – Angélique Bossy, Université de Limoges. Mobilisation de l'arsenic des phases solides altérées vers les eaux de surface dans un bassin versant impacté par des activités minières. Thèse en cours de réalisation. Encadrement pour les aspects biogéochimie (10% environ de l'ensemble du travail)

2008-2011 - Naresh Kumar, Université d'Anvers. Metallic particles for the remediation of groundwater contaminated with arsenic oxyanions: interaction between microbiology and (geo) chemistry. PhD thesis funded by Aquatrain European project (7eme PCRD). En collaboration avec le VITO (Belgique) et le CEREGE (France). Conseil pour l'élaboration des plans expériences, encadrement prévu des expériences qui seront réalisées au BRGM en 2010.

2008-2011 – Frédéric Garnier, Université d'Orléans. Evaluation Biologique de l'exploitation Thermique d'un aquifère : Expérimentation en laboratoire. Encadrement pour les aspects faisant appel à la microbiologie.

Activités de formation et d'enseignement

Septembre 2003 : Exposé aux élèves de l'Ecole Normale Supérieure de Paris en visite au BRGM : *De la bio-géochimie aux bio-procédés de traitement des sols et des eaux.*

Octobre 2006 : Présentation au Congrès de l'Union des professeurs de Physiologie Biochimie Microbiologie, au Lycée Jacques Monod, Saint-Jean de Braye (Octobre 2006). *Les Biotechnologies au BRGM*

2004 – 2007 : Présentation des activités de biotechnologie du BRGM aux élèves de 2^{ème} année du BTS de Biotechnologie (Lycée Jacques Monod, Saint-Jean de Braye), exposé et visite des laboratoires et de la halle pilote.

2007 et 2008 : participation au jury de Validation des Acquis par l'Expérience, pour l'obtention du diplôme de BTS Biotechnologies (Lycée Jacques Monod, Saint-Jean de Braye).

2008 et 2009 : Université de Tours, Master II Géo-Hydrosystèmes et Environnement. 4 h de cours en 2008 et 6 heures en 2009 : « *Bioremédiation des sites miniers* ».

2009 : participation au jury de BTS Biotechnologies. Participation à l'élaboration du programme de cours pour la nouvelle école « Ecole Nationale d'Applications des Géosciences » en cours de création au BRGM (première promotion en 2009).

7. Annexes

Isolation and study of two strains of *Leptospirillum*-like bacteria from a natural mixed population cultured on a cobaltiferous pyrite substrate

Fabienne Battaglia¹, Dominique Morin¹, Jean-Louis Garcia² & Pierre Ollivier¹

¹ BRGM avenue de Concyr, BP 6009, 45060 Orléans Cédex 2, France; ² ORSTOM laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cédex 3, France

Received 16 November 1993; accepted in revised form 31 January 1994

Key words: *Leptospirillum*, pyrite, cobalt, iron, leaching

Abstract

Two strains of *Leptospirillum*-like bacteria, L6 and L8, have been isolated from a mixed inoculum, also containing *Thiobacillus ferrooxidans* and *T. thiooxidans*, cultured for one year with a cobaltiferous pyrite as energy substrate in a 100 l continuous bioleaching laboratory unit. Several physiological properties of the strains are described. The vibrio-shaped microorganisms grew at pH values lower than 1.3. Their growth rate was maximum between 2.5 and 8.0 g l⁻¹ ferrous iron. The optimal growth temperature was 37.5° C. Ferric iron had a stimulative effect on bacterial development up to 8 g l⁻¹, and growth was as rapid at 14 g l⁻¹ ferric iron as at 8 g l⁻¹. The negative influence of cobalt on the final cell concentration was observed at 0.5 g l⁻¹, but the growth rate was not affected up to 2 g l⁻¹. The G + C content of strains L8 is 55.6 mol%.

Introduction

The mesophilic bacteria principally involved in the oxidation of sulfides are *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. The rod-shaped bacteria of the genus *Thiobacillus* has already been extensively studied when *L. ferrooxidans* was described by Markosyan in 1972. Since this first observation, similar vibrio or coiled microorganisms have been detected in several mining environments. Such *Leptospirillum*-like bacteria were isolated in samples from uranium mines, coal spoil heaps, and copper acid drainages (Norris 1983; Harrison & Norris 1985; Sand et al. 1992). Some properties of those vibrio-shaped strains have been defined. Pure cultures of the iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum* cannot oxidize elemental sulfur or inorganic sulfur compounds such as thiosulfate or tetrathionate. On the other hand, pyrite can be used as energy substrate (Merretig et al. 1989; Sand et al. 1992). Furthermore, pyrite materials seem to favour the growth of *Leptospirillum*: enrichment cultures of *Leptospirillum*-like bacteria have been obtained with pyrite (Norris 1983). Helle & Onken (1988) noted that *Leptospirillum*-like bacteria over-

grew *T. ferrooxidans* during the continuous bioleaching of a pyrite by a mixed culture.

The present paper describes the main characteristics of two *Leptospirillum*-like bacterial strains that belong to a mixed population originally sampled in a sulfide ore mine. Strains of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* were isolated from this inoculum, which had been used for one year to bioleach an arsenopyrite concentrate (Collinet & Morin 1990). When the culture was transferred to cobaltiferous pyrite substrate, *Leptospirillum*-like bacteria were observed. After several months of continuous biological oxidation of pyrite, the vibrio-shaped microorganisms were the dominant component of the population. The medium from which the two *Leptospirillum*-like bacterial strains were isolated possessed certain specific properties: in addition to the high ferric iron concentrations and low pH values, which are typically obtained during the growth on pyrite, some cobalt had been solubilized. The behaviour of the *Leptospirillum*-like bacteria towards ferric iron, pH, ferrous iron, cobalt, and temperature were determined so as to explain why *Leptospirillum* is favoured as compared with *T. ferrooxidans* when pyrite is the energy sub-

strate. We compared the characteristics of those strains with other *Leptospirillum*-like bacteria that originated from environments where natural oxidation of sulfides occurs.

Materials and methods

Origin of microorganisms

The indigenous inoculum was initially sampled by BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières) in sulfide ore mines. It has been successively cultured on arsenopyrite, then on cobaltiferous pyrite, in a continuous bioleaching unit composed of four agitated and aerated reactors in cascade. Collinet & Morin (1990) isolated strains of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* from this mixed population when arsenopyrite was used as energy substrate.

Isolation of Leptospirillum-like bacteria

The indigenous mixed culture was sampled from the continuous bioleaching reactors loaded with cobaltiferous pyrite. This bacterial population was subcultured ten times in the liquid medium of Silverman and Lundgren (1959) containing 9 g l⁻¹ ferrous iron as energy substrate (9K medium), to which 8 g l⁻¹ ferric iron were added to make it selective. The pH of the cultures was adjusted to 1.7 with H₂SO₄. *Leptospirillum*-like bacteria were isolated by spreading 50 µl of culture, appropriately diluted in 2 g l⁻¹ H₂SO₄, on plates containing the *Thiobacillus* Solid Medium 1 (TSM1). This medium, developed by Visca et al. (1989) in order to obtain quantitative yields of *T. ferrooxidans* colonies, contains 4 g l⁻¹ ferrous iron as energy substrate. It was prepared with agarose Sigma low BEO. The plates were incubated at 30° C for 10 days.

Characterization of Leptospirillum-like strains

Several energy substrates were tested for their ability to support growth. The following chemicals were added to 50 ml of basal salt medium, i.e. the medium of Silverman and Lundgren (1959) but without ferrous iron, in 100 ml Erlenmeyer flasks: 10 g l⁻¹ pyrite, 5 g l⁻¹ elemental sulfur, 5 g l⁻¹ sodium sulfite, or 5 g l⁻¹ sodium thiosulfate. Flasks were placed at 35° C on a 100 rpm reciprocal agitating table.

The influence of pH, ferric iron, ferrous iron, and cobalt were tested at 35° C in 250 ml Erlenmeyer flasks

containing 50 ml of medium and placed on a 100 rpm reciprocal agitating table. The standard liquid medium was 9K medium containing 9 g l⁻¹ ferrous iron as energy substrate, and 8 g l⁻¹ ferric iron. Culture pH was adjusted to 1.7 with H₂SO₄. The concentration of ferric iron was varied from 0 to 24 g l⁻¹ when the influence of this ion was studied. For the experiments concerning the influence of pH, ferric iron, and cobalt, the medium contained 9 g l⁻¹ ferrous iron. In order to study the influence of ferrous iron, the concentration of this ion was varied from 2 to 14 g l⁻¹. The tolerance to cobalt was tested at 0.5, 1.0, 2.0, and 5.0 g l⁻¹. Ferrous, ferric iron, and cobalt were introduced into the medium as sulfates. Influence of pH was tested between 0.9 and 2.0. The influence of temperature was tested in air-lift tubes containing 200 ml of standard liquid medium. Air was provided through a glass pipe, immersed in the culture, which delivered the gas at the bottom of the tubes. Experiments at 20, 30, 35, 37.5, 40, and 45° C were performed simultaneously in six different thermostated baths.

Liquid media were sterilized by filtration at 0.22 µm and elemental sulfur by heating at 100° C for one hour for three days. Pyrite was autoclaved in the basal salt medium, at 110° C for 30 min.

Analytical methods

Bacteria were enumerated using a Thoma counting cell under an optical microscope (× 400). Ferrous iron and total iron were analyzed by (1) a colorimetric method using orthophenantroline, and (2) a volumetric method with potassium dichromate (Charlot 1966). Cobalt was determined by atomic absorption spectrophotometry (Varian, SpectrAA-300).

DNA base composition

DNA was extracted by the technique of Visuvanathan et al. (1989) for strain L8. The mol % G+C of the DNA was determined at the DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig, Germany, using the methods described by Mesbah et al. (1989) and Tamaoka & Komagata (1984).

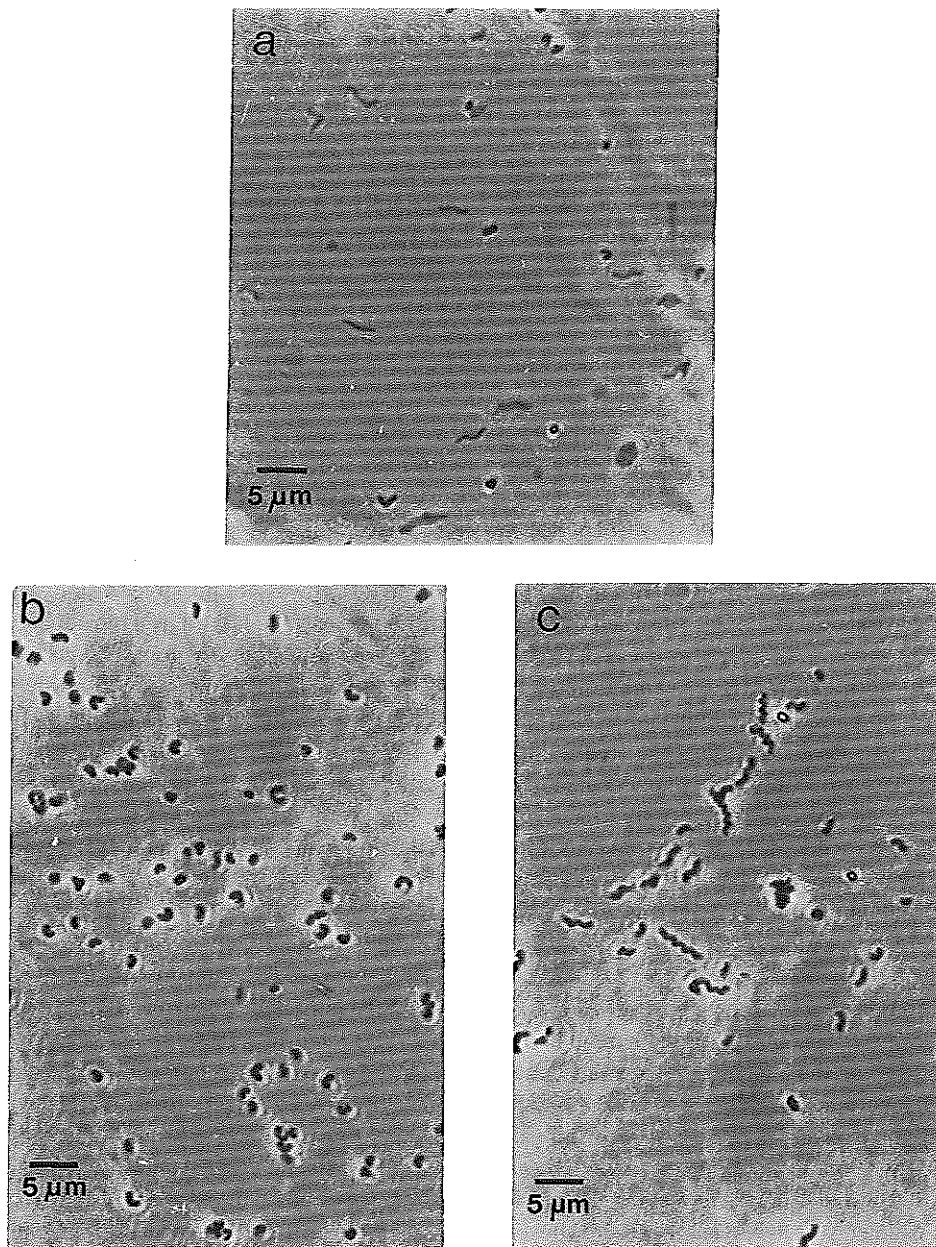


Fig. 1. Observations of the cultures by optical microscopy. (a) mixed population provided by BRGM: both rod-shaped and vibrio-shaped bacteria can be seen in this picture; (b) strain L8 of *Leptospirillum*-like bacterium isolated from the mixed culture provided by BRGM incubated at 35° C; (c) strain L8 incubated at 25° C.

Results and discussion

Isolation of Leptospirillum-like bacteria

The indigenous mixed inoculum provided by BRGM had been cultured for one year in a continuous bioleaching unit loaded with a cobaltiferous pyrite sub-

strate. The pulp contained small bacilli, 1.5 µm in length and 1.0 µm in diameter, vibrio-shaped bacteria, 1.0 to 1.5 µm in diameter, and some long stretched spirals, 3.0 µm in length and 0.5 µm in diameter (Fig. 1a). The rod-shaped bacteria were less numerous than vibrio and helicoïdal microorganisms, which presented some similitude with the mesophilic, acidophilic,

autotrophic, and iron-oxidizing bacterium *L. ferrooxidans*.

Samples of pulp were used to inoculate liquid media. When the medium did not contain ferric iron, the proportion of bacilli in the mixed population increased. The vibrio forms were entirely eliminated after a few subcultures. In order specifically to inhibit the development of *T. ferrooxidans*, which is the main iron-oxidizing rod-shaped bacterium, 8 g l⁻¹ ferric iron were added to the 9K medium, which also contained 9 g l⁻¹ ferrous iron as sole energy substrate. Collinet & Morin (1990) showed that the growth of a *T. ferrooxidans* strain isolated from the same inoculum was markedly reduced by 10 g l⁻¹ ferric iron. *Leptospirillum ferrooxidans* is known to be less affected by ferric iron than *Thiobacillus* species (Norris et al. 1987; Johnson 1991). The *Leptospirillum*-like bacteria became the major morphological type after several successive passages in 9K medium containing 8 g l⁻¹ ferric iron. Afterwards, this medium was used as standard liquid medium.

The culture resulting from this enrichment step was used for the isolation on solid medium TSM1 containing ferrous iron as sole energy substrate. Some red-brown colonies, 0.5 to 1.0 mm in diameter, surrounded by a large red halo of oxidized ferrous iron, were obtained. Several colonies were sampled and used to inoculate the standard liquid medium. Nevertheless, the results of spreading the bacterial suspension on solid medium TSM1, which is normally used for the iron-oxidizer *T. ferrooxidans*, were not reproducible in terms of counts and growth of *Leptospirillum*-like bacteria, and seemed to be closely dependent upon the physiological state of the inoculum. The same phenomenon was mentioned by Johnson et al. (1987) who developed the Iron and Tryptone Soya Broth solid medium (FeTSB) for the simultaneous isolation and enumeration of iron-oxidizing bacteria and acidophilic bacteria. Two isolated strains, L6 and L8, were chosen for the study.

Morphology

Strains L6 and L8 stained Gram negative. They exhibited some polymorphism: cells were vibrio-shaped under optimal conditions (Fig. 1b); spiral forms appeared at sub-optimal temperature (Fig. 1c); small coccoid cells, which tended to aggregate, were also occasionally observed. At the beginning of the exponential growth phase, bacteria were very motile. All those characteristics correspond to the descriptions of

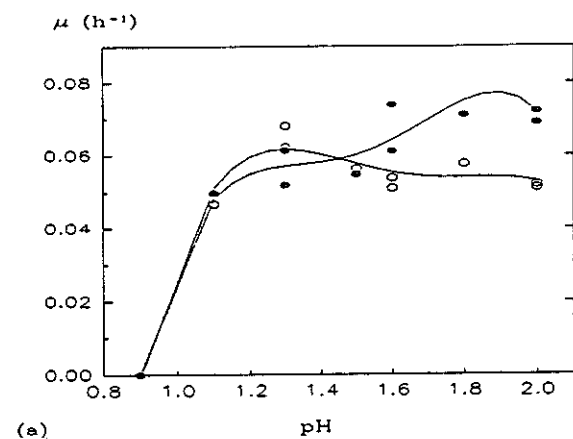
L. ferrooxidans (Balashova et al. 1975; Pivovarova et al. 1981; Harrison & Norris 1985).

Physiology

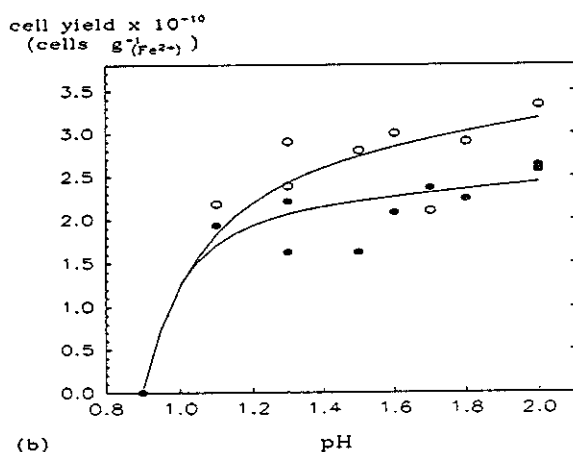
Several energy substrates which are likely to support the growth of sulfur- and iron-oxidizing bacteria were inoculated with strains L6 and L8. The two strains showed the same characteristics. They were able to grow when ferrous iron or pyrite was added to the basal salt medium. With elemental sulfur, the inoculum did not multiply, however, the bacteria remained observable for 10 days at 35° C. In the presence of thio-sulfate or sulfite, no growth occurred and the bacteria disappeared. The results of these tests are in agreement with the substrate specificity of *L. ferrooxidans* (Sand et al. 1992).

The influence of pH was studied in the range from 0.9 to 2.0. It was not possible to study higher pH conditions because the ferric iron introduced into the standard liquid medium precipitated between pH 2.3 and pH 2.6. The logarithmic growth rate was not greatly affected when the initial pH reached values as low as 1.1 (Fig. 2a). The growth rate of strain L8 increased with initial pH up to 1.8, whereas the maximum growth rate of strain L6 was obtained at pH 1.3. On the other hand, the final cell yield on ferrous iron increased with the initial pH for the two strains (Fig. 2b). Regardless of pH values, the final cell concentration was slightly higher with L6 than with L8. Collinet & Morin (1990) observed that the growth of *T. ferrooxidans* was strongly inhibited when the pH was lower than 1.4. The present results, in accordance with previously published data (Merretig et al. 1989; Sand et al. 1992) suggest that *Leptospirillum*-like bacteria are more resistant to very low pH than *Thiobacillus* species.

The influence of ferrous iron as sole energy substrate was studied in the range from 2 to 14 g l⁻¹. Figure 3a shows that the growth rate was optimal between 2.5 and 8.0 g l⁻¹. At higher concentrations, ferrous iron produced a progressive inhibitory effect with affected both growth rate and cell yield. The final cell density reached its maximum value at 2.5 g l⁻¹ for L8 and at 3.2 g l⁻¹ for L6 (Fig. 3b). A few data were published about the influence of ferrous iron concentration on *Leptospirillum*-like bacteria. Four strains of *L. ferrooxidans* exhibited their exponential growth rates between 0.0124 and 0.0289 h⁻¹ in the presence of 2.8 g l⁻¹ ferrous iron, at 30° C (Harrison & Norris 1985). The optimal ferrous iron concentrations were 8 g l⁻¹ and



(a)

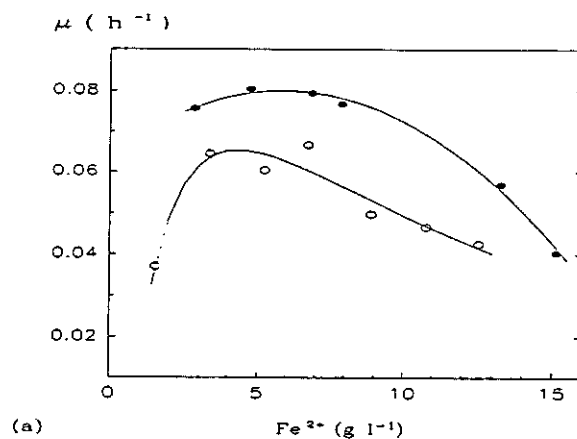


(b)

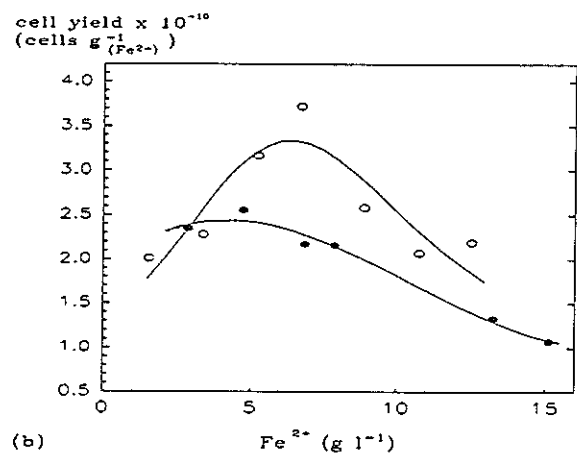
Fig. 2. Influence of pH on the growth of strains L6 and L8. (a) growth rate; (b) cell yield. Symbols: (o) strain L6; (●) strain L8.

6 g l⁻¹ for two *Leptospirillum*-like bacterial strains (Sand et al. 1992).

The effect of temperature was studied between 20 and 45° C. The maximum exponential growth rate was observed at 37.5° C (Fig. 4). A higher growth rate was observed at 40° C compared to 30° C. Growth rate decreased at higher temperature. The optimal growth temperature of *L. ferrooxidans* was 30° C (Markosyan 1972). Other experiments with *L. ferrooxidans* and *Leptospirillum*-like bacteria have given optimal growth temperatures ranging from 28 to 35° C (Harrison & Norris 1985; Sand et al. 1992). At 35° C, *L. ferrooxidans* and *Thiobacillus* showed equivalent growth rates, but at 20° C, the growth rate of *L. ferrooxidans* was much lower than that of *Thiobacillus*. Thus, *L. ferrooxidans* cannot grow in mixed culture with *Thiobacillus*



(a)



(b)

Fig. 3. Influence of ferrous iron concentration on the growth of strains L6 and L8. (a) growth rate; (b) cell yield. Symbols: (o) strain L6; (●) strain L8.

unless the temperature is sufficiently high (Sand et al. 1992). The optimal temperature for the oxidation of sulfides by the strains of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* which composed the mixed population used by BRGM was 32° C (Collinet-Latil 1989). Above 35° C, the development of the mixed culture was affected. The metabolism of strains L6 and L8 reached its maximum activity when the medium was maintained at 37.5° C, that is slightly higher than the optimum growth temperature of thiobacilli and *L. ferrooxidans*. Recently, a moderately thermophilic strain of *Leptospirillum* was isolated (Barrett et al. 1993). This new species, *Leptospirillum thermoferrooxidans*, grows optimally between 45 and 50° C, which is higher than the optimum temperature range for L6 and L8.

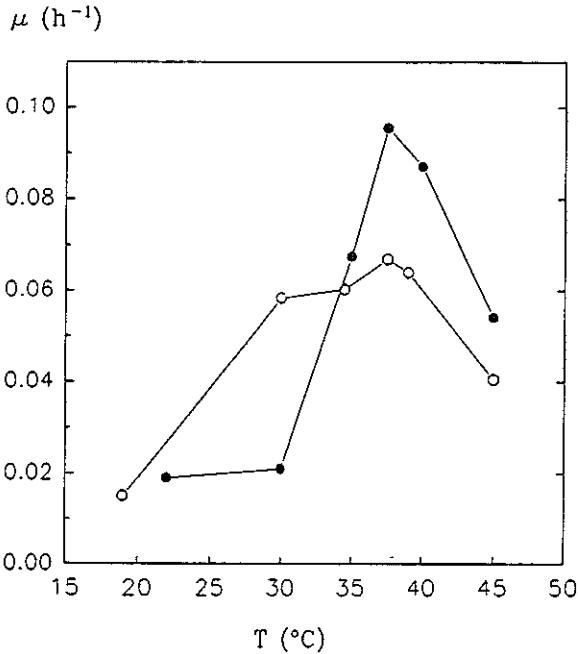
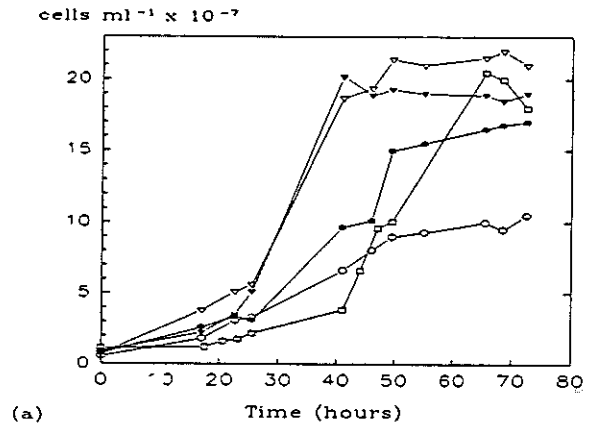


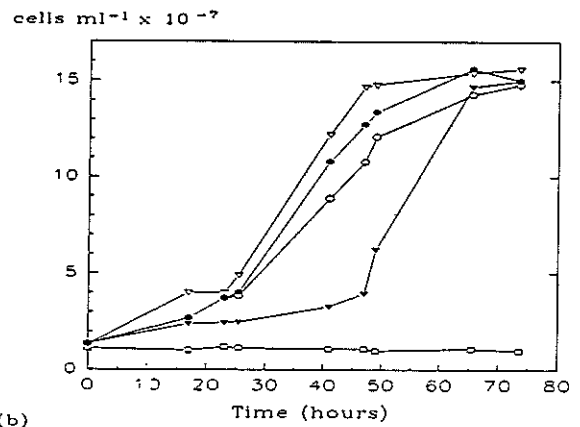
Fig. 4. Influence of temperature on the growth rate of strains L6 and L8. Symbols: (o) strain L6; (●) strain L8.

Influence of ferric iron

Strains L6 and L8 were cultured at several initial ferric iron concentrations. Bacterial growth was improved by ferric iron up to 8 g l^{-1} (Fig. 5). This positive effect was observed with the two strains, but was more marked with L6. For the highest ferric iron concentration, i.e. 24 g l^{-1} , the lag time of L6 was extended (Fig. 5a). The same phenomenon was observed for L8 at 14 g l^{-1} , and this strain was fully inhibited at 24 g l^{-1} (Fig. 5b). However, for L6 and L8, the growth at 14 g l^{-1} was as rapid as the growth at 8 g l^{-1} . Collinet & Morin (1990) showed that ferric iron had a negative effect on the growth of thiobacilli starting at 5 g l^{-1} , and the oxidation of pyrite by the mixed population was slowed down at 9 g l^{-1} (Morin et al. 1993). Although *L. ferrooxidans* is known to be less affected by ferric iron than thiobacilli, a competitive inhibition of *Leptospirillum* by ferric iron has been mentioned (Norris et al. 1987). Strains L6 and L8 were usually cultured in presence of 8 g l^{-1} ferric iron. This could explain why their growth was only affected at higher concentrations. However, ferric iron seems to have a stimulating effect on the growth up to 8 g l^{-1} .



(a)



(b)

Fig. 5. Influence of ferric iron concentration on the growth of strains L6 and L8. (a) strain L6; (b) strain L8. Symbols for ferric iron concentrations: (o) 0 g l^{-1} ; (●) 4 g l^{-1} ; (▽) 8 g l^{-1} ; (▼) 14 g l^{-1} ; (□) 24 g l^{-1} .

Influence of cobalt (Co^{2+})

Cobalt concentrations between 0.5 and 5.0 g l^{-1} were inhibitory (Fig. 6). Final cell density was more affected than growth rate. A decrease of the bacterial yield on ferrous iron was observed at 0.5 g l^{-1} (Fig. 6b). However, growth rate remained maximum up to 1.0 g l^{-1} for L8 and 2.0 g l^{-1} for L6 (Fig. 6a). When growing in a continuous way of bioleaching of a cobaltiferous ore, both bacteria could withstand 5.0 g l^{-1} cobalt (Morin et al. 1993). The mixed population was not inhibited by cobalt up to 15 g l^{-1} . Strains L6 and L8 were more affected by cobalt than the mixed population growing on cobaltiferous pyrite. A similar phenomenon was observed by Harrison & Norris (1985), who noted

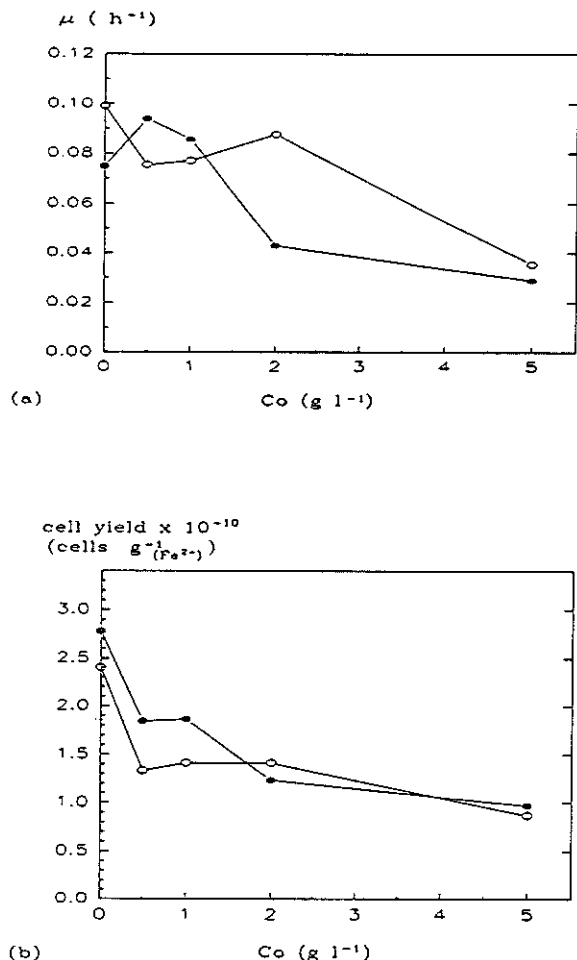


Fig. 6. Influence of cobalt on the growth of strains L6 and L8. (a) growth rate; (b) cell yield. Symbols: (o) strain L6; (●) strain L8.

that *L. ferrooxidans* was relatively sensitive to sudden exposure to copper while the *Leptospirillum*-like bacteria could withstand high copper concentrations during growth on minerals. They may have lost a major part of their cobalt resistance during the repeated passages in standard liquid medium, which did not contain cobalt.

DNA base composition

The guanine-plus-cytosine content of DNA from strain L8 determined in duplicate by HPLC was 55.6 mol %. Values of 51.7 mol % by the buoyant density method and 54 mol % by chromatography of hydrolysed DNA were obtained for *L. ferrooxidans* (Harrison & Norris 1985). The DNA base composition of various *Leptospirillum*-like bacteria have yielded guanine-

plus-cytosine contents between 51 and 57 mol % (Harrison & Norris 1985; Sand et al. 1992). The result for strain L8 is situated within this range.

Conclusion

The mixed culture, originally sampled in a sulfide ore mine, was studied for the first time by Collinet-Latil (1989). Some strains of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* were isolated when the population was adapted to arsenopyrite, but no form of *Leptospirillum* was observed (Collinet & Morin 1990). The vibrio-shaped bacteria appeared during the bioleaching of pyrite. Such a phenomenon has already been described (Helle & Onken 1988). The present study shows that the *Leptospirillum*-like strains L6 and L8 could grow at pH values lower than 1.3, and were not affected by 14 g l⁻¹ ferric iron. Thus the development of *Leptospirillum*-like bacteria could be favoured during the bioleaching of pyrite because large quantities of ferric iron and sulfuric acid are released by this sulfide.

The comparison of strains L6 and L8 with *L. ferrooxidans* strains described in the literature shows several common characteristics: morphology, substrate specificity, optimal ferrous iron concentration, and resistance to low pH. Nevertheless, the positive effect of ferric iron on the growth had never been mentioned. The relation between the behaviour of the strains towards ferric iron and their adaptation by subculturing in a ferric iron-containing medium remains to be studied. The optimum growth temperature, 37.5° C, is slightly higher than that of *L. ferrooxidans* and *Leptospirillum*-like bacteria described in the literature. Some *Leptospirillum*-like bacteria were present in the mixed population cultured on cobaltiferous pyrite when the bioleaching medium, whose pH was lower than 1.7, contained 5 g l⁻¹ cobalt. Strains L6 and L8 were isolated and maintained in standard liquid medium without cobalt, at pH 1.7. The behaviour of strains L6 and L8 in the presence of cobalt shows that these strains are not always resistant to this element. On the other hand, the same bacteria can grow optimally at pH lower than 1.7 after several passages in standard liquid medium at pH 1.7. Unlike their resistance to cobalt, their ability to withstand low pH is independent of the bioleaching conditions.

Acknowledgements

Thanks are due to B. Ollivier for his help with the photographic work on bacterial strains and to P. Roger for revising the manuscript. This research was supported by BRGM (contribution n° 93066) and by a grant from ADEME.

References

- Balashova VV, Vedenina IYa, Markosyan GE & Zavarzin GA (1975) The auxotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Mikrobiologiya Engl. Tr.* 43: 491–494
- Barrett J, Hughes MN, Karavaiko GI & Spencer PA (1993) Metal extraction by bacterial oxidation of minerals. Hellis Horwood Ltd Publishers, Chichester, England
- Charlot G (1966) Les méthodes de la chimie analytique, analyse quantitative minérale. 5th ed. Masson et Cie (Eds) Paris, France
- Collinet-Latil MN (1989) Lixiviation bactérienne par *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans* d'un concentré de flottation arsénopyriteux aurifère (réfractaire à la cyanuration directe). Thèse de Doctorat d'Université. Marseille
- Collinet MN & Morin D (1990) Characterization of arsenopyrite oxidizing *Thiobacillus*. Tolerance to arsenite, arsenate, ferrous and ferric iron. *Antonie van Leeuwenhoek* 57: 237–244
- Harrison Jr AP & Norris PR (1985) *Leptospirillum ferrooxidans* and similar bacteria: some characteristic and genomic diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 30: 99–102
- Helle U & Onken U (1988) Continuous bacterial leaching of a pyritic concentrate by *Leptospirillum*-like bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 553–558
- Johnson DB, Macvicar JMH & Rolfe S (1987) A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 7: 9–18
- Johnson DB (1991) Biological desulfurization of coal using mixed populations of mesophilic and moderately acidophilic bacteria. In: Dugan PR, Quigley DR & Attia YA (Eds) *Processing and Utilization of High-Sulfur Coals IV* (pp. 567–576) Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam
- Markosyan GE (1972) A new iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* gen. and sp. nov. *Biol. Zh. Arm.* 25: 26
- Merretig U, Wlotzka P & Onken U (1989) Removal of pyritic sulfur from coal by *Leptospirillum*-like bacteria. In: Salley J, McCready RGL & Wichlacz PL (Eds) *Biohydrometallurgy Proceedings of the International Symposium* (pp. 761–771) Jackson Hole, Wyoming
- Mesbah M, Premachandran U & Whitman W (1989) Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bact.* 39: 159–167
- Morin D, Battaglia F & Ollivier P (1993) Study of the bioleaching of a cobaltiferous pyritic concentrate. In: Torma AE, Wey JE, Lakshmanan VI (Eds) *Biohydrometallurgical Technologies: I. Bioleaching Processes. Proceedings of the International Symposium* (pp. 147–156) Jackson Hole, Wyoming
- Norris PR (1983) Iron and mineral oxidation with *Leptospirillum*-like bacteria. In: Rossi G & Torma AE (Eds) *Recent Progress in Biohydrometallurgy* (pp. 83–96) Cagliari, Italy
- Norris PR, Barr DW & Hinson D (1987) Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria: affinities for iron and attachment to pyrite. In: Norris PR & Kelly DP (Eds) *Biohydrometallurgy Proceedings of the International Symposium* (pp. 43–39) Warwick, UK
- Pivovarova TA, Markosyan GE & Karavaiko GI (1981) Morphogenesis and fine structure of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Mikrobiologiya Eng. Tr.* 50: 339–343
- Sand W, Rohde K, Sobotke B & Zenneck C (1992) Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 85–92
- Silverman MP & Lundgren DC (1959) Studies on the chemoautotrophic iron-bacteria *Ferrobacillus ferrooxidans*: I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.* 77: 642–647
- Tamaoka J & Komagata K (1984) Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 125–128
- Visca P, Bianchi E, Polidoro M, Buonfiglio V, Valenti P & Orsi N (1989) A new solid medium for isolating and enumerating *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 35: 71–81
- Visuvanathan S, Moss MT, Stanford JL, Hermon-Taylor J & McFadden J Jo (1989) Simple enzymatic method for isolation of DNA from diverse bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 10: 59–64

A Simple Biogeochemical Process Removing Arsenic from a Mine Drainage Water

Fabienne Battaglia-Brunet

Biotechnology Unit, Environment & Process Division, BRGM, Orléans, France

Yann Itard

Mineral Resources Division, BRGM, Orléans, France

Francis Garrido

Biotechnology Unit, Environment & Process Division, BRGM, Orléans, France

Fabian Delorme and Catherine Crouzet

Analyses and Mineral Characterization Division, BRGM, Orléans, France

Catherine Greffié

Mineral Resources Division, BRGM, Orléans, France

Catherine Joulian

Biotechnology Unit, Environment & Process Division, BRGM, Orléans, France

Arsenic is a toxic element commonly found in mining environments. The present study aimed to determine the influence of the indigenous bacterial population on the biogeochemical evolution of arsenic concentration in a mine drainage water. Biological As(III)-oxidizing activity was detected in diverse micro-environments along the water stream, from the source to the discharge point. Laboratory experiments showed that the bacterial population promoted As(III) and Fe(II) oxidation in conditions close to those of the site, i.e., temperature, water composition and oxygen availability. Immobilization of bacteria on pozzolana in a column bioreactor increased oxidation rates compared to on-site natural conditions: As concentration in the bioreactor outlet was less than 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, whereas on-site total As concentration at the discharge point is close to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. The highest As(III) removal rate in the inoculated column reached 1900 $\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ and As(III) removal rate in the non-inoculated blank column was 42 $\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Two strains of As(III)-oxidizing bacteria, related to *Variovorax paradoxus* and *Leptothrix cholodnii*, were respectively isolated from a laboratory reactor and directly from site sludge. A diverse population of bacteria affiliated to nine phylogenetic groups belonging to the *Proteobacteria* and to the *Bacteroidetes* was identified in a laboratory reactor by molecular analyses of 16S rRNA genes. Amongst these, microorganisms already known

to be potentially responsible for As(III) or Fe(II) oxidation, as well as for As(V) reduction co-existed: they included members of the genera *Gallionella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium* and *Methylophilus*. On-site experiments confirmed the laboratory results, i.e. the removal of As from the contaminated effluent, and a passive on site treatment is currently developed for improving the quality of the discharged water.

Keywords mine drainage, arsenic, oxidation, bacterial population, 16S rRNA genes, iron oxyhydroxides

INTRODUCTION

Arsenic is a common trace-level constituent of gold-quartz vein deposits in mining regions. Mine drainage water can contain high concentrations of this metalloid, which is mobilized from the source and spread in the environment. The resulting contamination of surface waters and sediments is a matter of great public concern and most international drinking water standards are lowering acceptable As concentrations from 40–50 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 10–20 $\mu\text{g L}^{-1}$, following the recommendations of the World Health Organization (Smith et al. 1999). In France, the threshold discharge is set at 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ As. Whereas arsenic has deleterious effects on human health and recent studies suggest it is a more serious carcinogen than previously thought, many bacteria are able to withstand high arsenic concentrations (Cervantes et al. 1994). Some organisms can use this element as an energy source or electron acceptor. The active microbial transformation

Received 5 December 2005; accepted 15 March 2006.

This is the BRGM contribution No. 03464.

Address correspondence to Fabienne Battaglia-Brunet, BRGM, Environment & Process Division, Biotechnology Unit, 3 av. Claude Guillemin, 45060 Orléans Cedex 2, France. E-mail: f.battaglia@brgm.fr

of arsenic, associated with bacterial growth, seems to drive the arsenic cycle in many ecosystems (Oremland and Stolz 2003; Oremland et al. 2004). Arsenic is commonly found in trivalent arsenite (As(III)) and pentavalent arsenate (As(V)) ionic forms, both forms being toxic to living organisms. Conversely, As(III) is more mobile because of its neutral form (HAsO_2) being the dominant form at neutral pH and thus considered as more toxic than As(V). Despite its toxicity, As(III) can be biologically oxidized to the less toxic As(V), thus providing potential applications for bioremediation.

Several As(III)-oxidizing bacteria have been isolated (Simeonova et al. 2004), and some of them, selected from mining environments, have been growing as chemolithoautotrophs with arsenic as the only energy source (Santini et al. 2000, 2002; Battaglia-Brunet et al. 2002). However, all these bacteria were isolated in the presence of 100 to 500 mg L^{-1} of As(III). At low in situ As(III) concentration, the role of bacteria in the oxidation or removal of As(III) from the liquid phase is more difficult to demonstrate, as other processes such as adsorption or chemical oxidation may occur. In acid thermal springs, biological As(III) oxidation at 2–3 mg L^{-1} As(III) concentration has been demonstrated, and the resulting filamentous microbial mat contained As(V) coprecipitated with Fe(III) amorphous oxyhydroxide (Langner et al. 2001). At lower As(III) concentration, i.e., 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, the oxidation of arsenic in a groundwater was found to be catalyzed by indigenous bacteria being simultaneously involved in iron oxidation (Katsoyiannis and Zouboulis 2004).

The objective of the present study was to evaluate the influence of bacteria on the geochemical evolution of an arsenic-containing mine drainage water submitted to a shift from

anaerobic to aerobic conditions. In 1987, a mining prospecting campaign detected a gold-arsenopyrite mineralization (cherts and quartz veins) in Loperec site (Finistere department, Brittany, France). In 1992, the digging of an exploration gallery induced the outflow of 10 $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ drainage water, which was then discharged into the environment after partial refining in a settling pond. At the gallery outlet, the anoxic near-neutral water (pH 6.0–7.0) contains 5 to 12 mg L^{-1} of iron and 0.2 to 2.0 mg L^{-1} of arsenic. In this context, the oxidation of iron and arsenic should promote the co-precipitation of these two elements. The current investigation aimed to identify the biogeochemical phenomena involved in natural removal of arsenic from the drainage, and to propose a passive remediation strategy derived from these biological mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of the Site and Mine Drainage Water

At the gallery outlet, now filled up, the water flows through a pipe into a settling pond (1 m 50 wide \times 2 m high \times 1 m deep), then runs through a buried pipe down to the road-side ditch before joining the natural drainage 480 m downstream. A schematic representation of the site is given in Figure 1. The composition of the water at the gallery outlet analyzed on samples taken in January 2001 is given in Table 1. Other characteristics of the water have been monitored since 1991, 5 to 12 measurements each year: pH 6.0 to 7.0; redox potential, –50 to –30 mV (ref. Ag/AgCl); temperature 11 to 13°C; Fe(II), 5 to 12 mg L^{-1} ; As, 0.2 to 2.0 mg L^{-1} , with 70–90% As(III) and 10–30% As(V), total As concentration at the discharge point close to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

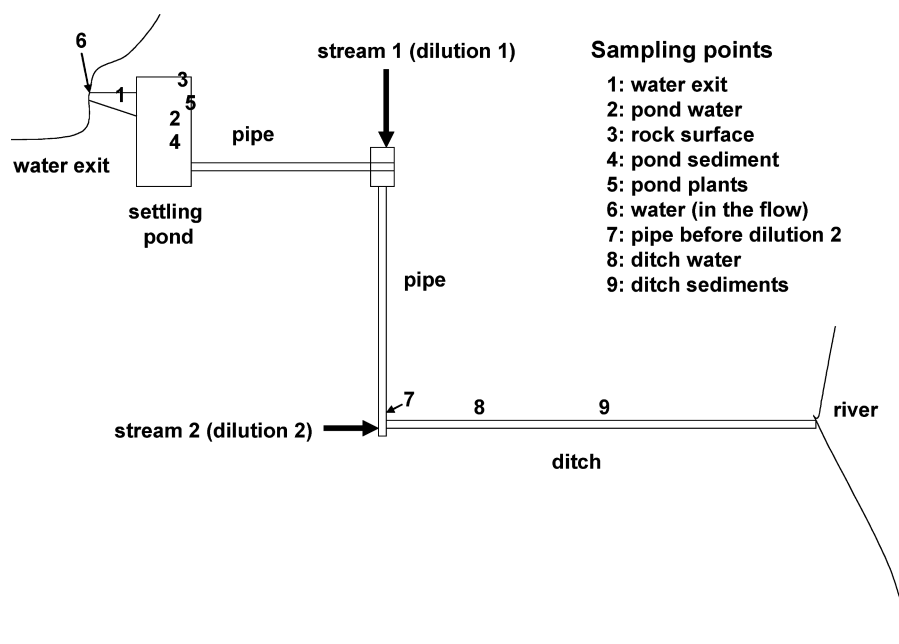


FIG. 1. Schematic representation of the site and localization of sampling points.

TABLE 1

Composition of the real mine water (January 2001) and the synthetic mine water basal solution used for both enrichments and column experiments

Chemical products	Synthetic mine water, mg L ⁻¹	Chemical species	Synthetic mine water, mg L ⁻¹	Real mine water, mg L ⁻¹
CaCO ₃	92.90	Ca	37.2	37.2
NaHCO ₃	17.90	CO ₃ + HCO ₃	68.48	102
MgSO ₄ ·7H ₂ O	116.60	Mg	11.5	11.5
NaCl	30.00	Na	16.82	16.7
KCl	2.09	K	2.10	2.1
KNO ₃	2.12	Cl	19.22	19.0
K ₂ HPO ₄	0.18	NO ₃	1.3	1.3
KNO ₂	0.22	SO ₄	54.72	53.0
NaF	0.22	PO ₄	0.1	0.1
MnSO ₄ ·1H ₂ O	3.11	NO ₂	0.12	0.12
		F	0.1	0.1
		Mn	1.011	1.011

Evaluation of As(III)-Oxidizing Activities

The evaluation of As(III)-oxidizing bacterial activities in different micro-environments of the site was performed by inoculating 100 mL of CSM culture medium, a selective medium containing As(III) as sole energy source (Battaglia-Brunet et al. 2002), with 1 mL of water or sludge sampled on-site (sampling points localized in Figure 1). The cultures were prepared in sterile Erlenmeyer flasks, and incubated at 25°C under aerobic and reciprocal agitated (120 rpm) conditions. This experiment was repeated three times.

Enrichments in Stirred Reactors

The objective of these experiments was to obtain enrichments of As(III)-oxidizing micro-organisms, in conditions close to the site conditions. Three 1.5 L glass reactors equipped with water jackets (R1, R2 and R3), agitated with a magnetic stirrer, were filled with 1 L of synthetic mine water prepared as follows. Solution A—in 1 L of demineralized water: KCl, 180 mg; KNO₃, 190 mg; K₂HPO₄, 16 mg; KNO₂, 20 mg; NaF, 20 mg; MnSO₄·H₂O, 280 mg. Solution B—in 100 mL demineralized and N₂-flushed water: CaCO₃, 84 mg; NaHCO₃, 16 mg. Solution C—FeSO₄·7H₂O, 20 mg in 10 mL of N₂-flushed demineralized water acidified at pH 2.5 with H₂SO₄. Solutions B and C were sterilized by autoclaving for 20 min at 120°C. In each reactor, 9 mL of solution A, 105 mg MgSO₄·7 H₂O and 27 mg NaCl were added to 790 mL of demineralized water. Reactors were sterilized by autoclaving for 20 min at 120°C. Then, 100 mL of solution B were added and the reactors were flushed with N₂ for 1 h and the temperature was adjusted to 12°C using a cryothermostat. Solution C (10 mL) was added to this synthetic mine water basal solution, and the pH was adjusted to 6 with sterile H₂SO₄ 0.5 M or NaOH 1 M. The final composition of the synthetic mine water basal solu-

tion is compared to the composition of the real mine water in Table 1. As(III) and As(V) were added as 10 g L⁻¹ sterile solutions (As₂O₃, 13 g L⁻¹ and Na₂HAsO₄·7H₂O, 41.6 g L⁻¹): 0.1 mL of each in reactor R₁, 0.1 mL As(V) solution and 1 mL As(III) solution in reactor R₂, 0.1 mL As(V) solution and 10 mL As(III) solution in reactor R₃. Each reactor was inoculated with 100 mL of mine water sampled in the settling pond. Aeration was performed by passive diffusion of air through sterile cotton tops. In reactor R1, additions of As(III) were performed during the incubation (50 µL of the 10 g L⁻¹ solution for each addition).

Experiments in Column Reactors

Column experiments were performed in 2 L PVC columns equipped with water jackets, inner diameter 7.2 cm. They were filled with 1400 g of 2–5 mm pozzolana pieces, (Carrière de la Denise, Le Puy, France), specific surface 2730 m² L⁻¹. Both the column and the feed reactor were maintained at 12°C using a cryothermostat. The synthetic mine water basal solution was prepared by directly dissolving the chemical substances listed in Table 1 in demineralized water. The pH was adjusted to 6 with H₂SO₄. The sulphate concentration was not significantly modified by the pH adjustment.

Column C1 was inoculated with 2 L of mine water from the site, up-flow pumped through the column. The column was continuously down-flow fed with fresh synthetic mine water basal solution supplemented with 218 mg FeSO₄·7H₂O, 0.5 mL As(III) 10 g L⁻¹ and 0.5 mL As(V) 10 g L⁻¹ and prepared in a 10 L glass reactor equipped with a water jacket, and air was injected at the bottom (0, 1 or 10 L h⁻¹). The water surface was 5–10 cm above the pozzolana. Dissolved oxygen (O₂ 4100 transmitter with a Inpro 6400 sensor, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA), pH and redox potential (pH 197-S, WTW, Weilheim,

Germany) were measured at the top and bottom of the column. The feed reactor was permanently flushed with O₂-free N₂ gas to avoid Fe(II) and As(III) oxidation, and was regularly washed with concentrated HCl, then abundantly rinsed with demineralized water, in order to avoid bacterial development. During this experiment, the residence time was decreased from 24 h to 4 h.

Column C2 was prepared and inoculated in conditions identical to those of Column C1, in order to test residence times lower than 4 h. The column was continuously down-flow fed with fresh synthetic mine water. The synthetic mine water basal solution was prepared in a 100 L tank, and a concentrated solution (pH adjusted to 6 with H₂SO₄) containing 2 g L⁻¹ FeSO₄·7H₂O and 10 mg L⁻¹ As(III) was separately pumped and injected into the feed pipe before entry of the reconstituted mine water at the top of the column. In this experiment, the feed was supplemented only with As(III), at higher concentration than during the C1 column experiment, in order to determine if the remediation system would be able to withstand a potential increase in As(III) concentration (the As concentration in the real mine water is variable). The synthetic mine water basal solution flow rate was 10 times higher than the Fe/As solution flow rate. During this experiment, the residence time was decreased from 10 h to 0.5 h. After 40 days of laboratory experiment, Column C2 was carried on-site and continuously fed with mine water from the site at 1 h residence time. A blank column filled with fresh pozzolana was fed in the same conditions. These two on-site columns were aerated by injecting 5 L h⁻¹ air.

Blank experiments were performed in the same type of column, washed with NaHClO, then abundantly rinsed with demineralized water. The feed reactor and the pozzolana were sterilized by autoclaving at 120°C for 20 min. The pipes were washed with ethanol. These experiments included 2 phases: (1) a phase aimed to evaluate adsorption of As and Fe on the pozzolana, performed by feeding the column with synthetic effluent at 0.5 h residence time and by injecting 10 L h⁻¹ Argon into the column, and (2) a phase performed in aerated conditions in order to evaluate abiotic oxidation of As(III) and Fe(II), at 0.5 and 4 h residence times and by injecting 10 L h⁻¹ air into the column. During all columns experiments, the feed samples were taken from the feed pipe just before the feed entry into the reactors.

Isolation of As(III)-Oxidizing Microorganisms

Sludge from the site and samples from the enrichment reactors were inoculated in solid CSM medium (CSM medium supplemented with 15 g L⁻¹ agar, 0.2 g L⁻¹ yeast extract and 0.136 g L⁻¹ Na₂S₂O₃). The plates were inoculated with 0.1 mL of sample, pure or diluted in sterile water, and incubated at 12°C. Colonies were picked and inoculated in 20 mL sterile liquid media: medium 1 was synthetic mine water with 10 mg L⁻¹ As(III), medium 2 was CSM medium, medium 3 was CSM medium supplemented with 0.2 g L⁻¹ yeast extract and 0.136 g L⁻¹ Na₂S₂O₃. Strains that were able to oxidize

As(III) were purified by 5 successive cultures on solid then liquid media.

Analyses

For arsenic concentrations higher than 10 mg L⁻¹, As(III) and total As were analyzed with a flame atomic absorption spectrophotometer (AAS, Varian SpectrAA 300). As(III) was extracted in methyl isobutyl ketone with pyrrolidine dithiocarbamate as extractant, according to Battaglia-Brunet et al. (2002). For arsenic concentrations lower than 10 mg L⁻¹, As(III) and As(V) were separated using an ion exchange method (Kim 2001). Separation was performed on anionic resin (AG 1-X8, Biorad, Hercules, CA, USA). Arsenic was quantified with an oven atomic absorption spectrophotometer (AAS, Varian, Palo Alto, CA, USA, T = 2050°C, λ = 193.7 nm).

Fe(II) was quantified by the colorimetric method using 5-ortho-phenantroline, using an UV-visible spectrophotometer (Agilent 8453, Palo Alto, CA, USA). Total Fe was obtained by reducing Fe(III) with a 1% hydroquinone solution (in pH 4.5 0.05 M acetate buffer). The freshly precipitated iron phases were sampled from the pozzolana pieces in Column C2, after 40 days feeding in the laboratory with synthetic mine water, and 15 days on-site with mine water from the site. X-ray diffraction was carried out on freeze dried material with a Siemens D-5000 diffractometer using Co-K radiation. Total arsenic content was analysed by Inductively Coupled Plasma—Atomic Emission Spectrometry. Pieces of pozzolana sampled at the top of Column C1 were carbon coated using an EDWARDS Auto 306 apparatus (EMS, Hatfield, PA, USA), then observed using a JSM 6100 Scanning Electron Microscope (JEOL, Tokyo, Japan) coupled to a X-ray Energy Dispersive Spectrometer KEVEX Quantum (Thermo Electron Corp., Dreieich, Germany).

Molecular Identification of Micro-Organisms

Pieces of pozzolana covered with red sludge deposit were sampled at the top of Column C1. They were vigorously agitated in sterile water in order to separate sludge from pozzolana, and the recovered sludge was stored in glycerol at -80°C until used. Samples (4.5 mL) were centrifuged (14,000 rpm, 30 min) and genomic DNA was extracted from pellets by bead beating using the Bio101 FastPrep Instrument and the FastDNA Spin Kit for Soil (Bio101, Vista, CA, USA). DNA extracts were stored at -20°C. A 35-cycle PCR amplification was performed using bacterial primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGAC-3') targeting 16S rRNA genes (ca. 1.5 kb) and a temperature of 55°C for primer hybridization. PCR products were purified (GeneClean Turbo kit, Qbiogen, Montreal, Canada) and ligated into pCR-TA-TOPO plasmids, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, San Diego, CA, USA). The clone library was screened for inserts of the right length by direct PCR amplification from a colony with primers T3 (5' AATTAACCTCACTAAAGGG 3') and T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') targeting the plasmid. Correct-length clones were screened

by restriction analyses using *Hae*III and *Rsa*I endonucleases (Promega, San Luis, CA, USA). Selected plasmids were isolated using the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega). Sequencing of the insert was performed by Genome Express (Grenoble, France) with primers T3 and T7.

The 16S rRNA gene sequences of As(III)-oxidizing isolates were obtained using the FastDNA MH Kit (Bio 101), 30 PCR cycles with primers 8F and 1492R, pGEMT-Easy Cloning Kit (Promega), and sequencing primers T7 and REV (5'CAGGAAACAGCTATGACC 3') targeting the plasmid.

Nucleotidic sequences were manually aligned with reference sequences obtained from the Ribosomal Database Project (Cole et al. 2003) and from Genbank database (Benson et al. 1999) using the sequence alignment editor BioEdit (Hall 1999). Pairwise evolutionary distances of 1160 unambiguous nucleotides were computed by the method of Jukes and Cantor (1969). Phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987). Confidence in the tree topology was determined by bootstrap analysis using 100 resamplings of the sequences (Felsenstein 1985). All phylogenetic programs were implemented in the software package Treecon 1.3b (Van de Peer and De Wachter 1994). 16S rRNA gene sequences have been deposited in Genbank under accession numbers DQ241387 to DQ241397.

RESULTS

The evaluation of As(III)-oxidizing bacterial activities was performed using the CSM medium (Battaglia-Brunet et al. 2002) that proved to be efficient for the detection of biological As(III) oxidation. All the materials sampled in situ contained microorganisms able to oxidize 100 mg L⁻¹ As(III) when cultured at 25°C (Figure 2). The oxidation started rapidly with samples of

settling pond sediments and of red sludge removed from the rock surface watered by the mine effluent. The activity was delayed but intense when the medium was inoculated with mine water from the site. This experiment showed that As(III)-oxidizing bacteria were widespread in different micro-environments of the site. This experiment was repeated three times and similar results were obtained, with only slight differences in lapse duration.

Enrichment reactor experiments were performed in order to obtain bacterial cultures in the site conditions, in terms of temperature and nutrients availability. Different arsenic concentrations were tested (Figure 3). In Reactor R1, the initial As concentration was 3 mg L⁻¹, and additions of As(III) were performed during the experiment (Figure 3A). As(III) oxidation started on day 7, and was complete on day 12. In Reactor R2, the initial As(III) concentration was 10 mg L⁻¹, and As(III) oxidation started on day 2 and was complete on day 12 (Figure 3B). In Reactor R3 containing initially 100 mg L⁻¹ As(III), the oxidation rate noticeably increased on day 9, and 25 mg L⁻¹ were oxidized on day 16 (Figure 3C). Final total As concentrations were 7, 9 and 100 mg L⁻¹ in R1, R2 and R3 respectively. These results showed that indigenous bacteria were able to oxidize As(III) at 12°C without added nutrients. However, in the presence of 100 mg L⁻¹ As(III), the oxidation was slower under in situ conditions than in the CSM medium incubated at 25°C. Many different types of colonies were obtained on solid CSM medium (minimal salts medium supplemented with As(III), yeast extract and thiosulphate) inoculated with samples from the enrichment reactors, and 16 different colonies were tested for As(III) oxidation. Only one strain, isolated from reactor 2 and named L4.2, was able to oxidize As(III).

Column experiments were then started in order to develop a treatment process based on natural biogeochemical reactions. Laboratory experiments were performed in two continuously

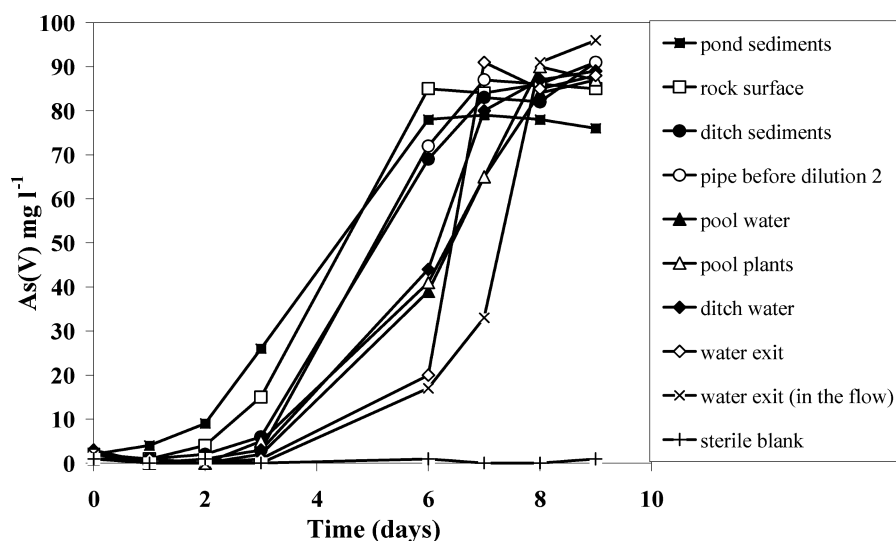


FIG. 2. As(III)-oxidizing activities in samples from diverse micro-environments of the mining site.

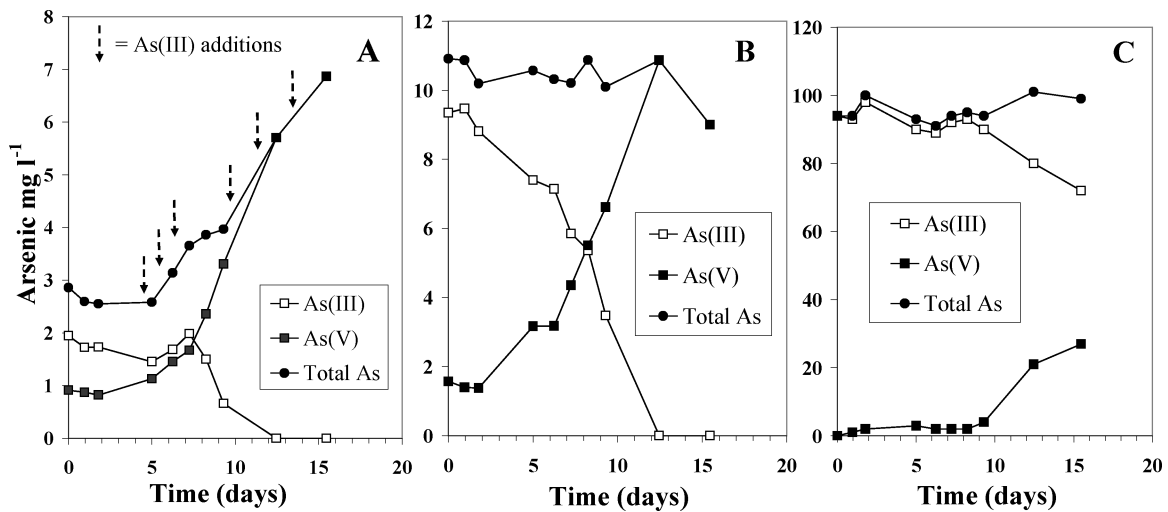


FIG. 3. Oxidation of As(III) at 12°C in reactors containing synthetic mine water and inoculated with mine water from the site. (A) Reactor R1, 2 mg L⁻¹ initial As(III) concentration, arrows indicate As(III) additions. (B) Reactor R2, 10 mg L⁻¹ initial As(III) concentration. (C) Reactor R3, 100 mg L⁻¹ initial As(III) concentration.

fed fixed-bed columns inoculated with water from the settling pond and operated at different residence times and arsenic concentrations in the feed. The As(III) and As(V) concentrations in the feed fluctuated, probably because it was impossible to maintain the feed pipe sterile and oxygen diffused into this pipe. However, the As concentration in the feed always remained in the range of fluctuation observed in the real mine water. On days 19 and 20 (Figure 4A) we observed an increase in As(V) concentration correlated to a decrease in As(III) concentration in the feed. This phenomenon was probably linked to a bacterial development in the feed device. The problem was rapidly solved because the feed device was regularly drained and washed with concentrated HCl.

A few days after inoculation, the As(III) concentration in the outlet was always lower than 50 μg L⁻¹, and often lower than 10 μg L⁻¹ (Figure 4). As(V) concentration in the outlet was higher than As(III) concentration. Oxidation of Fe(II) was nearly complete, between 24 and 0.5 h residence time. When the air flow-rate was decreased, O₂ concentration dropped from 10 to 2 mg L⁻¹ (data not shown). This parameter did not influence Fe(II) and As(III) concentration in the outlet water. Total iron concentration was always very close to ferrous iron concentration. Thus, the oxidized iron was nearly entirely precipitated into the column. The development of a red sludge, starting from the top of the column and slowly progressing down towards the bottom, was observed.

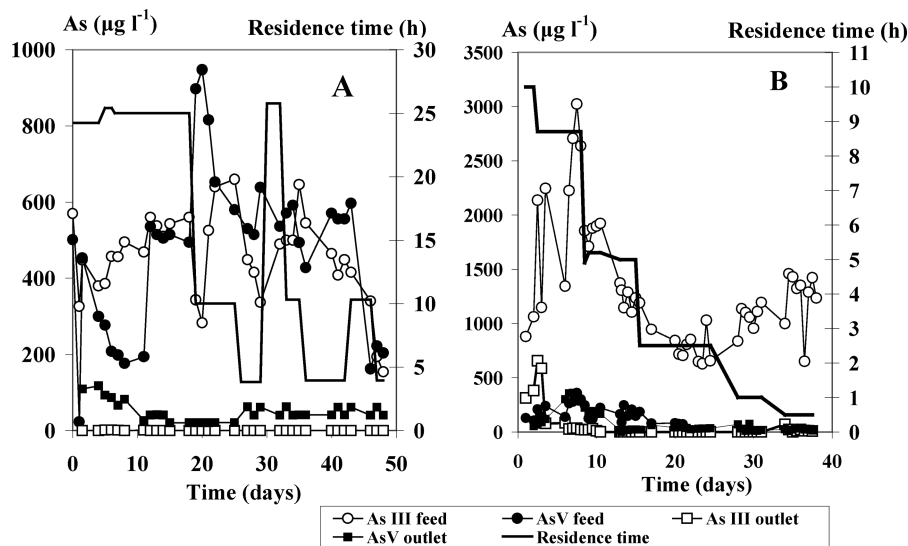


FIG. 4. Evolution of arsenic concentration and residence time in the laboratory columns inoculated with mine water from the site and continuously fed with synthetic mine water. (A) Column C1, residence time decreased from 24 to 4 h; (B) Column C2, residence time decreased from 10 to 0.5 h.

TABLE 2

Decrease in As and Fe concentrations through sterile (blank experiment performed in triplicate) or inoculated columns—after a working time of at least 6 residence times in the given operating conditions

	Blank experiments Argon 10 L h ⁻¹ Res. time 0.5 h	Blank experiments Air 10 L h ⁻¹ Res. time 4 h	Inoculated columns Air 10 L h ⁻¹ Res. time 4 h
Percentage decrease in As(III) concentration	2.5% ± 2.5%	42% ± 12%	99% ± 1%
Percentage decrease in As(V) concentration	14% ± 4%	46% ± 2%	91% ± 1%
Percentage decrease in Fe(II) concentration	26% ± 4%	49% ± 12%	99% ± 1%

Blank experiments were performed in order to evaluate the non-biological removal of arsenic by adsorption or chemical oxidation. In a first phase, 10 L h⁻¹ argon was injected into a sterile column fed with synthetic mine water at 0.5 h residence time, to detect the adsorption phenomena. In these conditions, As(III) concentrations in the feed and outlet waters were nearly the same (Table 2), and As(V) retention was limited to 14%. In a second phase, 10 L h⁻¹ air was injected in the blank columns, thus creating oxidizing conditions. In the presence of oxygen, less than 50% of As(III), As(V), and Fe(II) were eliminated through the column. When the pozzolana was inoculated, the percentages of As and Fe removal were in the range 90 to 100% (Table 2). The highest As(III) removal rate in the inoculated column reached 1900 μg L⁻¹ h⁻¹ whereas the As(III) removal rate in the blank column was 42 μg L⁻¹ h⁻¹.

The developed process was tested on-site. The inoculated Column C2 was fed with mine water at 1 h residence time. Simultaneously, a blank column containing non-inoculated pozzolana was fed on-site in the same conditions. The removal of As(III) and Fe(II) from the mine water from the site was complete as soon as the laboratory-inoculated Column C2 was operational on-site (Figures 5A and 5B). In the non-inoculated blank column, As(III) and Fe(II) removal was incomplete (between 40 and 60%) during the first 12 days of experiment. As(III), Fe(II) and As(V) were then efficiently removed from the mine effluent. These results suggest that an active population of As(III)- and Fe(II)-oxidizing bacteria indigenous to the mine water settled on the pozzolana. The As(III) removal was efficient as soon as day 5, before Fe(II) removal, suggesting that As(III)-oxidizing bacteria were active before Fe(II)-oxidizing bacteria. The As(V) concentration in the outlet of the non-inoculated column was very variable during the first 12 days of experiment. The peak on day 6 may reflect the fact that As(III) was bacterially oxidized while Fe(II) oxidation was not established, thus adsorption of As(V) was not efficient. From day 12, As(V) concentration was always lower than 20 μg L⁻¹.

Pieces of red sludge-covered pozzolana, sampled at the top of the laboratory-inoculated Column C1, were observed using a Scanning Electron Microscope coupled to a X-ray Energy Dispersive Spectrometer. Rod shaped (not shown) and vibrio-shaped bacteria probably embedded in extracellular polymeric substances (Figure 6) were observed. The X-ray energy dispersive spectrum of the inoculated pozzolana revealed the presence of arsenic peaks that were absent in the spectrum of fresh pozzolana (data not shown). X-ray diffraction analyses were also performed on pozzolana pieces and red sludge sampled in Column C2 that had worked for 40 days in the laboratory with

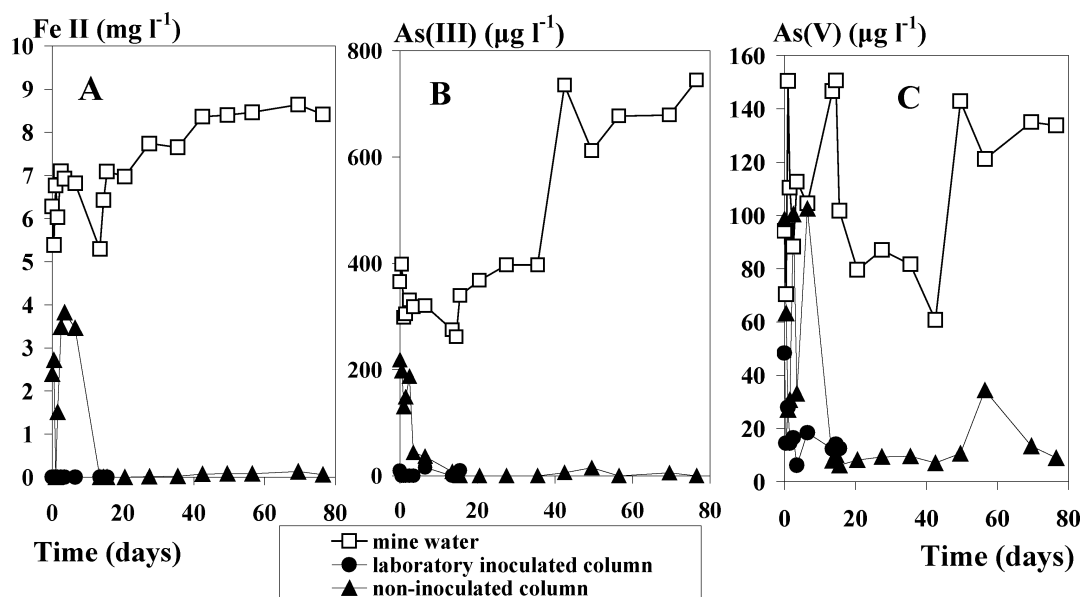


FIG. 5. On-site experiments in columns continuously fed with mine water from the site at L h residence time, 5 L h⁻¹ air injected at the bottom of each column. (A) Fe(II) concentrations; (B) As(III) concentrations; (C) As(V) concentrations.

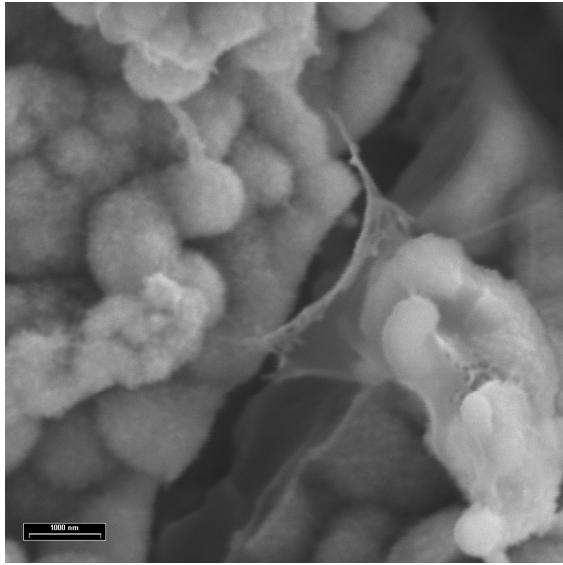


FIG. 6. Scanning electron micrograph of red sludge-covered pozzolana grains of the laboratory-inoculated column C1: vibrio-shaped bacteria embedded in extracellular polymeric substances (secondary electrons, 10 kV, bar represents 1 μ m).

the synthetic mine water, then 15 days on-site with the mine water from the site. The X-ray diffractogram (Figure 7) was composed of two diffusion bands at around 2.5 and 1.5 \AA that are typical of 2 line ferrihydrites (Cornell and Schwertmann 2003). Few diffraction peaks indicated the presence of crystallized Fe(III) products, mainly hematite and goethite. Few other peaks were characteristic of the minerals constituting pozzolana (augite and sanidine). Ferrihydrites were the dominant phases. The iron sludge contained up to 2.12% of total arsenic.

The bacterial population colonizing the red sludge-covered pozzolana from Column C1 was identified by comparative analyses of 16S rRNA gene sequences. A 16S rRNA gene library was successfully constructed, and 41 randomly selected clones exhibiting a correct-length insert (ca. 1.5 kb) were grouped into 12 phylotypes according to unique enzymatic restriction patterns. Among them, sequences with less than 2% identity were considered as the same Operating Taxon Unit (OTU). The phylogenetic analysis, thus performed on 9 selected OTU, showed that a diverse population of microorganisms affiliated to eight phylogenetic clades within the Gram-negative phylum of *Proteobacteria* and to one clade within the *Bacteroidetes* colonized the pozzolana (Figure 8). The clone library was

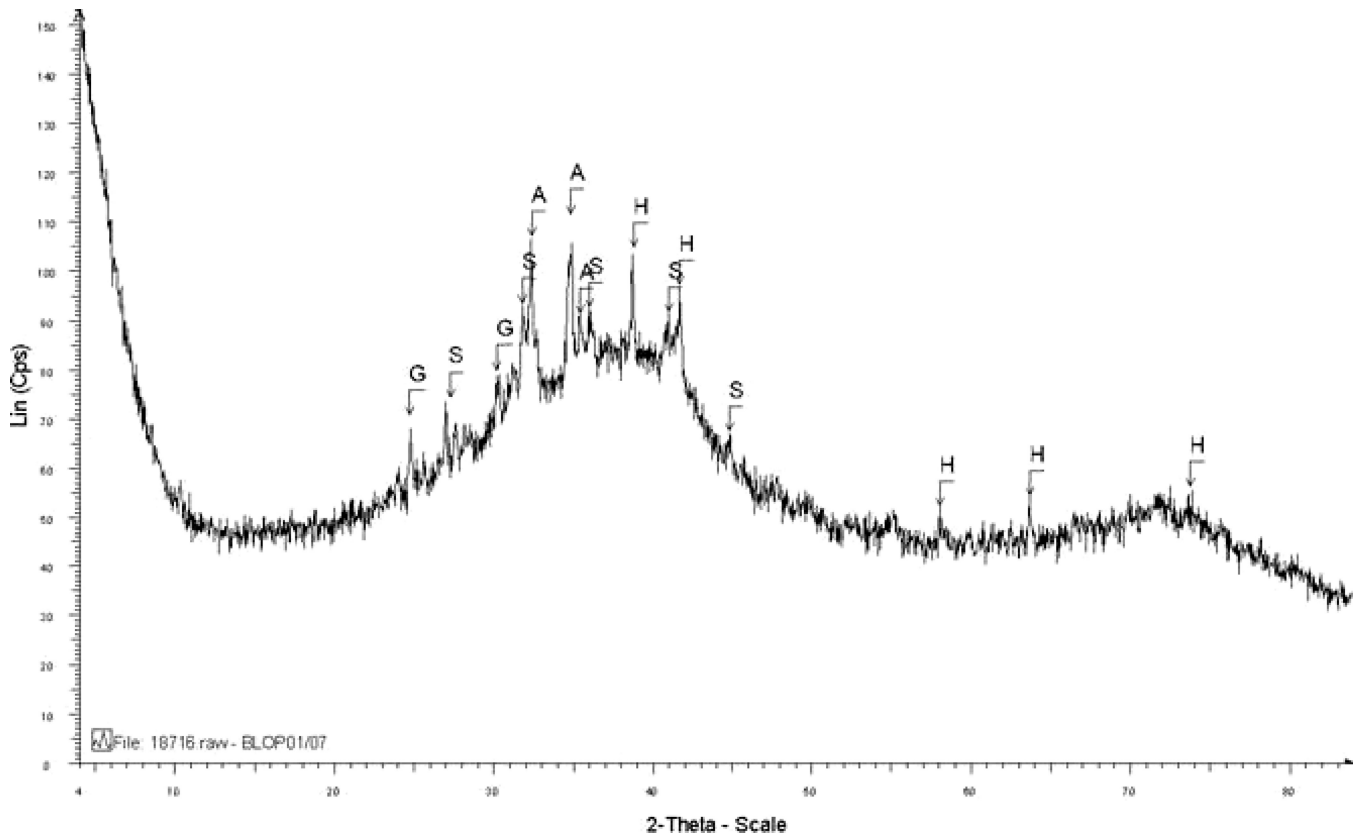


FIG. 7. X-ray diffraction diagram of red sludge composed of poorly ordered ferrihydrite showing 2 (hk) diffusion bands with some hematite (H) and goethite (G) as well as constituents of the pozzolana support (A: augite, S: Sanidine).

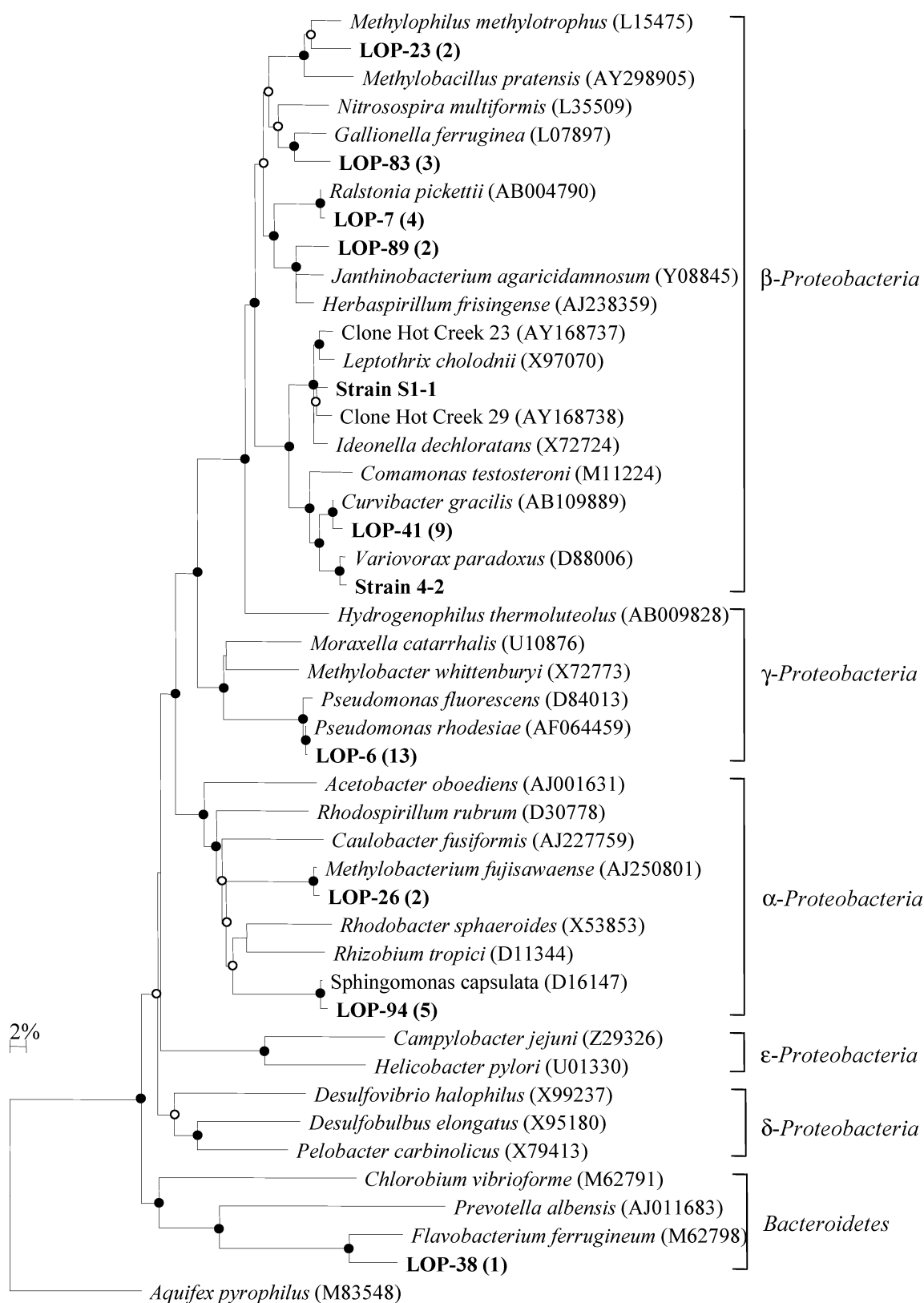


FIG. 8. Distance tree showing the phylogeny of the two isolated strains and of 16S rRNA gene sequences retrieved from Column C1 (in bold). Each sequence represents a restriction profile cluster, and numbers in brackets indicate how many clones fell into the cluster. Scale bar represents 2% of changes. Solid circles: bootstrap >80%; open circles: 50% < bootstrap <80%. Accession numbers of reference sequences are in brackets.

dominated by phylotypes closely related to the species *Pseudomonas rhodesiae* (31.7% of the clones, >99% identity on 16S rRNA gene sequences) and *Curvibacter gracilis* (22.0% of the clones, >99% identity). The bacterial consortium comprised also microorganisms closely related to *Ralstonia* sp. (9.8% of the clones, >99% identity with the type species *R. pickettii*), *Sphingomonas capsulata* (12.2% of the clones, >99% identities), *Methylobacterium fujisawaense* (4.9% of the clones, >99% identity). Furthermore, two phylotypes were more distantly affiliated to *Gallionella ferruginea* (7.3% of the clones, 95% identity) and *Methylophilus methylotrophus* (4.9% of the clones, 95% identity), and a phylotype formed a sister branch to the *Herbaspirillum-Janthinobacterium* group (4.9% of the clones, 96% identity). Finally, the only phylotype not belonging to the *Proteobacteria* but to the *Bacteroidetes* phylum was somewhat related to *Flavobacterium* spp. (2.4% of the clones, 93% identity).

Bacterial strains able to oxidize As(III) were isolated during these experiments. Strain L4.2, isolated from the enrichment stirred reactor R2 oxidizes 100 mg L⁻¹ As(III) at 12°C in 48 h in either synthetic mine water, CSM medium or CSM medium supplemented with 0.2 g L⁻¹ yeast extract and 0.136 g L⁻¹ Na₂S₂O₃. 16S rRNA gene analysis showed that strain L4.2 is affiliated to the species *Variovorax paradoxus* (>99.5% identity; Figure 8). Strain S1.1 was isolated from the settling pond sediments sampled on-site. This strain is related to the environmental clones Hot Creek 29 and Hot Creek 23 (98% identity), originating from an As(III)-oxidizing biofilm and published only in Genbank (Figure 8). Its closest described relatives are *Lep-tothrix cholodnii* and *Ideonella dechloratans* (97.8% identity). Strain S1.1 is able to oxidize 100 mg L⁻¹ As(III) in 1 week at 12°C, in CSM medium supplemented with 0.2 g L⁻¹ yeast extract and 0.136 g L⁻¹ Na₂S₂O₃.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The present study showed that the bacterial community naturally present in the mine water was able to promote As(III) and Fe(II) removal from the liquid phase. Biological As(III)-oxidizing activities were found in diverse water and sediment micro-environments. In another mining site where acidic conditions prevailed, the co-precipitation of As(III) with biologically produced Fe(III) in a poorly ordered schwertmannite was shown to contribute to As removal from a mine drainage (Duchesne et al. 2003). This mechanism occurred at high As and Fe concentrations (more than 100 mg L⁻¹), and only a few mg L⁻¹ As(III) remained in solution at the end of this precipitation process. Here, the most probable mechanism involved in As removal was As(III) oxidation followed by adsorption on freshly formed hydroxides. It is well established that As(V) tends to be adsorbed on iron oxides (Wilkie and Hering 1996). In fact, As(V) concentration in the outlet of our inoculated columns was higher than As(III) concentration, even when As(III) concentration in the feed was significantly higher than As(V) concentration. Con-

sidering that As(V) is more likely to adsorb on solid phases than As(III), As(III) concentration should have been higher than As(V) concentration if oxidation had not occurred. Furthermore, the naturally inoculated on-site column was more rapidly efficient for As(III) removal than for Fe(II) and As(V) removal. Some authors have shown that As(III) is chemically oxidized in parallel with the oxidation of Fe(II) by dissolved oxygen, most likely by reactive intermediates such as Fe(IV), reactive oxygen species and/or carbonate radicals (Leupin and Hug 2005). Here, the blank experiment showed that chemical oxidation was less efficient than bacterial oxidation. Moreover, As(III) and Fe(II) oxidation phenomena were efficient even at low oxygen concentration, and As(III) oxidation preceded Fe(II) oxidation in the on-site inoculated column. Three distinct phenomena participate in overall arsenic removal: As(III) oxidation, Fe(II) oxidation, and As(V) adsorption on Fe(III) precipitates. In natural conditions, these reactions do not allow the complete elimination of As before the discharge point, the remaining total As concentration is close to 100 µg L⁻¹. The residence time in the settling pond is close to 0.5 h. In column experiments, As and Fe removal could be efficient in 0.5 h because the experimental device optimized contact between immobilized bacterial population, water and air, thus certainly increasing the reaction rates.

Molecular ecology of 16S rRNA genes showed that a diverse population of bacteria originating from the mine water and affiliated to nine phylogenetic groups within the Gram-negative phyla of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* colonized Column C1. The detection of only Gram-negative bacteria suggests that they were dominating over Gram-positive bacteria in the studied column. This result is in accordance with the study of Tūrpeinen et al. (2004) reporting that a population shift occurred with a predominance of Gram-negative bacteria at sites contaminated with arsenic. The population included microorganisms related to the genera *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Methylophilus*, *Gallionella*, *Curvibacter*, *Herbaspirillum*, as well as *Flavobacterium*. Most of them have already been reported to have a role in the arsenic cycle. *Pseudomonas* sp. were reported to be amongst the dominant cultivable organisms in As-contaminated soils (Tūrpeinen et al. 2004), and a strain of *Pseudomonas fluorescens* oxidizing As(III) was isolated from a soil column treated with As(III) (Macur et al. 2004). Furthermore, the first described organism able to use As(III) as energy source belonged to this genus (Ilyaletdinov and Abdrashitova 1981). The presence of *Ralstonia*-related bacteria in an As(III)-oxidizing population was also reported, although its direct role in arsenic oxidation has not been investigated (Battaglia-Brunet et al. 2002). *Sphingomonas* strains have been shown to reduce As(V) in aerobic conditions (Macur et al. 2001). Several strains belonging to the genera *Methylobacterium* and *Methylophilus* have been reported to be resistant to a wide range of organic and inorganic pollutants including As(V) (De Marco et al. 2004). An arsenic resistant bacterium belonging to the *Flavobacterium-Cytophaga* group was isolated from As-contaminated soil (Honschopp et al. 1996)

and an As(III)-oxidizing *Variovorax paradoxus* strain was isolated from an As(III)-treated soil column (Macur et al. 2004). In our study, we isolated from an enrichment reactor inoculated with the mine water a strain of the species *V. paradoxus* able to oxidize As(III).

Katsoyiannis and Zouboulis (2004) hypothesized that Fe(II)-oxidizing organisms related to *Gallionella ferruginea* and *Leptothrix ochracea* promoted the removal of arsenic from groundwater, the iron being mainly precipitated as amorphous iron hydroxides. The occurrence of *Gallionella* sp. in our system was suggested by analyses of 16S rRNA gene sequences. The isolation from site sediments of the As(III)-oxidizing strain S1.1, phylogenetically related to the genus *Leptothrix*, is of particular interest as *Leptothrix*-like bacteria are commonly found in iron oxidizing microbial mats, and are suspected to be involved in As(III) oxidation (Spring et al. 1996; Katsoyiannis and Zouboulis 2004). Environmental sequences phylogenetically related to that of strain S1.1 and *Leptothrix* sp. have also been retrieved in an As contaminated environment where As(III) oxidation occurred (published only in Genbank). All these findings suggest that this group of microbes plays an important role in biological As(III) oxidation.

The indigenous microbial population was able to participate in arsenic removal from the mine water during the shift from anaerobic to aerobic conditions. At low oxygen concentration, the reaction rates of As(III) and Fe(II) oxidation were increased by the biological processes compared to simple chemical reactions. The present study allowed a better understanding of the biogeochemical evolution of the water stream. These results are exploited for the development of a passive treatment process that will treat on site the As-containing water and improve the quality of the discharged effluent.

REFERENCES

- Battaglia-Brunet F, Dictor MC, Garrido F, Crouzet C, Morin D, Dekeyser K, Clarens M, Baranger P. 2002. An As(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J Appl Microbiol* 93:656–667.
- Benson D, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BF, Rapp BA, Wheeler DL. 1999. GenBank. *Nucl Ac Res* 27:12–17.
- Cervantes C, Ji G, Ramirez JL, Silver S. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 15:355–367.
- Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM, Tiedje JM. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31:442–443.
- Cornell RM, Schwertmann U. 2003. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses. 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 664 p.
- De Marco P, Pacheco CC, Figueiredo AR, Moradas-Ferreira P. 2004. Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiol Lett* 234:75–80.
- Duquesne K, Lebrun S, Casiot C, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M, Elbatz-Poulichet F, Morin G, Bonnefoy V. 2003. Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol* 69:6165–6173.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol* 39:783–791.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc Ac Symp Ser* 41:95–98.
- Honschopp S, Brunken N, Nehrhorn A, Breunig HJ. 1996. Isolation and characterization of a new arsenic methylating bacterium from soil. *Microbiol Res* 151:37–41.
- Ilyaldin AN, Abdrashitova SA. 1981. Autotrophic oxidation of arsenic by *Pseudomonas arsenitoxidans*. *Mikrobiologia* 50:197–204.
- Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro H. N. (ed) *Mammalian Protein Metabolism* pp. 211–232. New York: Academic Press.
- Katsoyiannis IA, Zouboulis AI. 2004. Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters. *Wat Res* 38:17–26.
- Kim MJ. 2001. Separation of inorganic arsenic species in groundwater using ion exchange method. *Bull Environ Contam Toxicol* 67:46–51.
- Kimura M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120.
- Langner HW, Jackson CR, McDermott TR, Inskeep WP. 2001. Rapid oxidation of arsenite in a hot spring ecosystem, Yellowstone National Park. *Environ Sci Technol* 35:3302–3309.
- Leupin OX, Hug SJ. 2005. Oxidation and removal of arsenic (III) from aerated groundwater by filtration through sand and zero-valent iron. *Wat Res* 39:1729–1740.
- Macur RE, Wheeler JT, McDermott TR, Inskeep WP. 2001. Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environ Sci Technol* 35:3676–3682.
- Macur RE, Jackson CR, Botero LM, McDermott TR, Inskeep WP. 2004. Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environ Sci Technol* 38:104–111.
- Oremland RS, Stolz JF. 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300:939–944.
- Oremland RS, Stolz JF, Hollibaugh JT. 2004. The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California. *FEMS Microbiol Ecol* 48:15–27.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:405–425.
- Santini JM, Sly LI, Schnagl RD, Macy JM. 2000. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microbiol* 66:92–97.
- Santini JM, Wen L, Comrie D, de Wulf-Durand P, Macy JM. 2002. New arsenite-oxidizing bacteria isolated from Australian gold mining environments—phylogenetic relationships. *Geomicrobiol J* 19:67–76.
- Simeonova DD, Lièvremond D, Lagarde F, Muller DAE, Groudeva VI, Lett MC. 2004. Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 237:249–253.
- Smith AH, Biggs ML, Moore L, Haque R, Steinmaus C, Chung J, Hernandez A, Lopipero P. 1999. Cancer risks from arsenic in drinking water: implications for drinking water standards. In: Abernathy C. and Calderon R. L. (eds) *Arsenic Exposure and Health Effect*. pp. 191–206. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Spring S, Kampfer P, Ludwig W, Schleifer KH. 1996. Polyphasic Characterization of the genus *Leptothrix*: new descriptions of *Leptothrix mobilis* sp. Nov. and *Leptothrix discophora* sp. Nov. nom. Rev. and emended description of *Leptothrix cholodnii* emend. *System Appl Microbiol* 19:634–643.
- Türpeinen R, Kairesalo T, Häggblom MM. 2004. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiol Ecol* 47:39–50.
- Van de Peer Y, De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comp Appl Biosci* 10:569–570.
- Wilkie JA, Hering JG. 1996. Adsorption of arsenic onto hydrous ferric oxides: effects of adsorbate/adsorbent ratios and co-occurring solutes. *Colloid Surf A* 107:97–110.

Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov.

Fabienne Battaglia-Brunet^{1,*}, Catherine Joulian¹, Francis Garrido¹, Marie-Christine Dictor¹, Dominique Morin¹, Kris Coupland², D. Barrie Johnson², Kevin B. Hallberg² and Philippe Baranger¹

¹BRGM, Environment and Process Division, Biotechnology Unit, 2 av. Claude Guillemin, 45060, Orléans cedex 02, France; ²School of Biological Sciences, University of Wales, Bangor, Gwynedd, LL57 2UW, United Kingdom; *Author for correspondence (e-mail: f.battaglia@brgm.fr; phone: +33-0-2-3864-3930; fax: +33-0-2-3864-3680)

Received 4 August 2005; accepted in revised form 12 September 2005

Key words: Arsenic, Chemolithoautotrophy, Oxidation, *Thiomonas arsenivorans* sp. nov.

Abstract

A novel bacterium, strain b6^T (T=type strain), was isolated from a disused mine site by growth using arsenite [As(III)] as energy source in a simple mineral medium. Cells of strain b6^T were rod-shaped, Gram-negative, non-sporulating and motile. Optimum growth occurred at temperatures between 20 and 30 °C, and at pH between 4.0 and 7.5. Strain b6^T grew chemoautotrophically on As(III), sulphur and thiosulphate, and also heterotrophically on yeast extract and a variety of defined organic compounds. Several other *Thiomonas* strains, including the type species *Thiomonas (Tm.) intermedia*, were able to oxidize As(III), though only strain b6^T and strain NO115 could grow using As(III) as sole energy source in the absence of any organic compound. The G+C content of the DNA of strain b6^T was 65.1 mol %. Comparative small subunit (SSU) ribosomal RNA (rRNA) analysis indicated that strain b6^T belongs to the genus *Thiomonas* in the β -subdivision of the *Proteobacteria*. It was closely related to an unnamed *Thiomonas* strain (NO115) isolated from a Norwegian mining site, though sequence identities between strain b6^T and characterized *Thiomonas* species were less than 95%. DNA–DNA hybridization between strain b6^T and the type species of the genus *Tm. intermedia* showed less than 50% homology. On the basis of phylogenetic and phenotypic characteristics, strain b6^T (DSM 16361^T, LMG 22795^T) is proposed as the type strain of the new species *Thiomonas arsenivorans*, sp. nov.

Abbreviations: MCSM – Modified Cheni As-oxidizing population Selective Medium

Introduction

Bacteria belonging to the genus *Thiomonas* are facultative chemolithoautotrophs growing optimally in mixotrophic media containing both a reduced sulphur compound (or elemental sulphur) and organic substrates such as yeast

extract, peptone, sugars and amino-acids (Moreira and Amils 1997). In the absence of an organic compound, these bacteria can grow autotrophically using elemental sulphur or reduced inorganic sulphur compounds, such as thiosulphate or tetrathionate (London 1963; Shooner et al. 1996). The first *Thiomonas* species

were isolated from soils (London 1963; London and Rittenberg 1967), and more recently strains have been found in mining sites, where soluble metals and metalloids are often present in relatively high concentrations (Dennison et al. 2001; Coupland et al. 2004; Johnson and Hallberg 2005). A number of studies have shown that *Thiomonas* spp. are involved in metal-mobilization and the oxidation of minerals that are commonly found in sulphide-containing geological formations. The species *Tm. cuprina*, formerly known as '*Thiobacillus cuprinus*' and isolated from an uranium mine (Huber and Stetter 1990), can grow using a variety of sulphide ores such as chalcopyrite, sphalerite, arsenopyrite, and galena as energy sources. The ability of some *Thiomonas* strains to oxidise Fe(II) was demonstrated with isolates obtained from different mine sites including copper, coal, tin and gold mines (Coupland et al. 2004; Johnson and Hallberg 2005). As(III) oxidation was recently demonstrated in several *Thiomonas* isolates (Battaglia-Brunet et al. 2003; Bruneel et al. 2004; Coupland et al. 2004; Duquesne 2004). However, most of these strains were not able to grow lithoautotrophically with As(III), but required small amounts of yeast extract. The discovery of several chemolithotrophic As(III)-oxidizing bacteria, isolated from gold mines in Australia, demonstrated that energy for growth can be conserved during oxidation of As(III) (Santini et al. 2000, 2002). The Australian isolates are distinct from *Thiomonas* spp., and are more closely related to the genera *Rhizobium*, *Agrobacterium*, and *Sinorhizobium*. Even in bacteria that depend on organic carbon sources, As(III) may be used as supplemental energy source (Anderson et al. 2003). A novel As(III)-oxidizing bacterium was isolated from a mixed population obtained from a disused gold mining site, and selected by its ability to grow by oxidizing As(III) in a mineral salts medium (Battaglia-Brunet et al. 2002). The present paper describes this isolate (strain b6^T) as a new species of the genus *Thiomonas*, which is characterized by its ability to use As(III) as sole energy source for chemolithoautotrophic growth. The name *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. is proposed for this microorganism. In addition, we show that the ability to oxidize As(III) is common to many *Thiomonas* strains, including the type species of the genus, *Tm. intermedia*.

Materials and methods

Bacteria

Strain b6^T was isolated from an As(III)-oxidizing mixed population (coded CAsO1) obtained from Cheni, a disused gold mine site in France (Battaglia-Brunet et al. 2002). Two other strains (NO115 and WJ68) were isolated from mining sites in Norway and Wales (U.K.), respectively (Coupland et al. 2004; Johnson and Hallberg 2005). *Tm. intermedia* ATCC 15466^T was obtained from the American Type Culture Collection. The type strain of *Tm. perometabolis* (ATCC 23370^T) was obtained from the Pasteur Institute Collection (CIP 104403^T). Strain b6^T has been deposited in the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen as DSM 16361 and in the Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, Bacteria Collection (BCCM/LMG), as LMG 22795.

Media and cultivation

Modified CSM medium (MCSM), containing 100 mg l⁻¹ As(III) (Battaglia-Brunet et al. 2002) and with vitamins omitted, was used throughout the work. Isolates were also grown on an equivalent solid medium (gelled with 1.5% bacteriological agar: MERCK) amended with 1 g l⁻¹ sodium lactate. *Tm. perometabolis* was cultured in medium 126 (Pasteur Institute) at pH 6.0. Media were inoculated with 10% (v/v) of active bacterial culture throughout. To determine the pH range for growth of b6^T, sulphuric acid or dilute sodium hydroxide were used to adjust the pH of the MCSM in shake flasks that were incubated at 25 °C under reciprocal agitation (120 rpm). For the determination of temperature range for growth, glass reactors filled with 1 l MCSM, equipped with water jackets and agitated with a magnetic impeller were used. To compare mixotrophic and chemolithotrophic growth, 10 ml of the following media were distributed in 25 ml glass tubes previously ignited (2 h at 500 °C) in order to eliminate traces of organic carbon, and incubated at 25 °C in static conditions: (i) MCSM prepared with HPLC-grade water with (100 mg l⁻¹) and (ii) without As(III), (iii) MCSM prepared with demineralized water with 100 mg l⁻¹ As(III), (iv) MCSM prepared with demineralized water with

100 mg l⁻¹ As(III) and further amended with 0.02 and (v) 0.2 g l⁻¹ yeast extract. Four successive cultures in each media were performed.

The ability of *Thiomonas* strains to oxidize As(III) was tested in 20 ml glass flasks containing (i) MCSM, (ii) medium 126 supplemented with 100 mg l⁻¹ As(III), and (iii) MCSM supplemented with 1 mM sodium thiosulphate and 0.2 g l⁻¹ yeast extract; incubation was performed at 25 °C in static conditions. For kinetics of As(III) oxidation, shake flasks were filled with 100 ml of MCSM and incubated at 25 °C under reciprocal agitation (115 rpm).

All growth experiments were done on at least two separate occasions.

Anaerobic growth with NO₃⁻ as electron acceptor was tested in sealed flasks containing 100 ml of MCSM supplemented with 0.1 g l⁻¹ NO₃⁻ as NaNO₃. The head space gas was N₂. Nitrification was tested in 100 ml aerobic cultures with MCSM supplemented with 0.1 g l⁻¹ NH₄ as (NH₄)₂SO₄. Growth experiments with organic compounds were performed at 20 °C by using MCSM medium lacking As(III), and which was supplemented with

the organic compounds given in Table 1. Growth was monitored as described below. Additional substrates were tested using API strips (Biotype 100) inoculated with the bacterial culture and incubated during 2 and 4 days at 25 °C; when turbidity developed or colour changed after 2 or 4 days, growth was considered as positive.

Oxidation of ferrous iron by strain b6^T was studied by following changes in ferrous iron concentrations in triplicate cultures growing in ferrous iron/thiosulphate medium (Hallberg and Johnson 2003) in shake flasks. These were inoculated with a culture grown previously on the same medium, and were incubated at 30 °C with shaking (at 150 rpm). The pH of the medium was 4.5 at the start, and the iron concentration was 5 mM and thiosulfate 10 mM. An uninoculated flask served as control to measure abiotic oxidation of iron.

Analytical methods

Growth was determined by enumerating cells using a Thoma bacterial counting chamber, with

Table 1. Characteristics of strain b6^T and its closest characterized relatives among the *Thiomonas* genus.

	Strain b6 ^{Ta}	<i>Tm. perometabolis</i> ^{b, c, d}	<i>Tm. intermedia</i> ^{a, d, e}	<i>Tm. thermosulfata</i> ^{d, f}	<i>Tm. cuprinda</i> ^{d, g}
Heterotrophic growth with:					
Acetate	-(20 mM)	ND	ND	-	-
Aspartate	+(20 mM)	+	-	-	ND
Formate	-(40 mM)	-	ND	-	-
Glutamate	+(10 mM)	+	-	+	-
Pyruvate	+(20 mM)	ND	ND	-	+
Succinate	+(10 mM)	+	ND	+	-
Glucose	+(10 mM)	-	-	-	-
Raffinose	+10 mM)	ND	ND	-	-
Sucrose	+(10 mM)	ND	-	-	-
Sorbitol	+(10 mM)	ND	ND	-	ND
Yeast extract	+(0.05%)	+	+	+	+
Autotrophic growth with:					
Sulphur	+(0.5%)	+	+	+	+
Thiosulphate	+(20 mM)	+	+	+	-
Tetrathionate	+(10 mM)	+	+	+	-
As(III) oxidation	+	-	+	ND	ND
Fe(II) oxidation	+	+	+	ND	-
Motility	+	+	+	+	+
Temperature (°C) (optimum)	20–30	30–37	30–37	50	30–36
pH range (optimum)	4.0–7.5	5.0–7.0	5.0–7.0	5.0–6.0	3.0–4.0
G + C content of DNA (mol %)	65%	65–66%	65–67%	61%	66–69%

ND: not determined; growth for a given compound is indicated by + while lack of growth is indicated by -. ^aThis study. ^bKatamaya-Fujimura and Kuraishi (1983). ^cLondon and Rittenberg (1967). ^dMoreira and Amils (1997). ^eLondon (1963). ^fShoener et al. (1996). ^gHuber and Stetter (1990).

an optical microscope (Nikon Optiphot), at 400× magnification. Arseniate [As(V)] and As(III) were separated by extracting As(III) in methyl isobutyl ketone with pyrrolidine dithiocarbamate (Battaglia-Brunet et al. 2002). As(V) remaining in the aqueous phase was analysed by Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS, Varian SpectrAA 300), using As(V) standards prepared following the same extraction method. Total arsenic was analysed by AAS with standards prepared in 1% HCl (v/v). Ferrous iron was measured colorimetrically using the ferrozine reagent as described previously (Lovley and Phillips 1987). Nitrate and nitrite were analysed using a high performance ion chromatography system (Dionex DX600[®], Sunnyvale, CA, USA) equipped with an AS50[®] autosampler, an EG40[®] eluent generator, a CD25[®] conductivity detector, and used with an IonPack[®] AS17 column.

SSU rRNA gene sequence determination and phylogenetic analysis

Two ml of strain b6^T culture were centrifuged (14,000 rpm, 30 min) and genomic DNA was extracted from the cell pellet by bead beating using the Bio101 FastPrep Instrument and the FastPrep MH Kit (Bio 101, Vista, Ca). The SSU rRNA gene was amplified by PCR using the eubacterial-specific primers 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCT CAG-3') and 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTT ACGAC-3') and the following reaction conditions: an initial denaturation of 1 min at 95 °C, 30 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 55 °C, 2 min at 72 °C, and a final extension of 5 min at 72 °C. PCR products were purified with the GeneClean Turbo kit (Qbiogen, Illkirch, France) and ligated into pGEMT-easy plasmids (Promega, Charbonnière, France). The clone library was screened by direct PCR amplification from a colony using the vector specific primers T7 (5'-TAATACGAC TCACTA-TAGGG-3') and SP6 (5'-ATTTAGGT GACACT ATAGAA-3'). A plasmid containing an insert of the correct length was purified with the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega). Sequencing was performed by Genome Express (Grenoble, France) with primers T7 and SP6.

The SSU rRNA gene sequence of strain b6^T was aligned with reference sequences obtained from the

Ribosomal Database Project II (Maidak et al. 2001) and from GenBank database (Benson et al. 1999), using the sequence alignment editor BioEdit (Hall 1999). Positions of sequence and alignment uncertainties were omitted from the analyses. Pairwise evolutionary distances of 1279 unambiguous nucleotides of the SSU rRNA gene were computed by the Jukes and Cantor (1969) method. A phylogenetic tree was constructed by the neighbor joining method (Saito and Nei 1987). Confidence in the tree topology was determined by bootstrap analysis using 100 resamplings of the sequences (Felsenstein 1985). All phylogenetic programs were implemented in the software package Treecon 1.3b (Van de Peer and De Wachter 1994).

DNA–DNA hybridization and G + C content

A fermentor with a working volume of 15 l (SGI, set 20 CM) was used to produce strain b6^T biomass in MCSM supplemented with 0.2 g l⁻¹ yeast extract. Approximately 3 g dry weight of biomass was sent to the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) for DNA–DNA hybridization and G + C content determination. Genomic DNA was isolated by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion et al. (1977). DNA–DNA hybridization was carried out as described by De Ley et al. (1970), with the modifications described by Huss et al. (1983) and Escara and Hutton (1980), using a spectrophotometer. Renaturation rates were computed with the TRANSFER.BAS program of Jahnke (1992). G + C content was determined by enzymatic digestion of genomic DNA and HPLC as described by Mesbah et al. (1989). Calibration was performed with non-methylated Lambda-DNA (Sigma), GC-content 49.9 mol %.

Results

Isolation and morphology of strain b6^T

Strain b6^T was isolated from a mixed bacterial population (Battaglia-Brunet et al. 2002), originating from the disused Cheni gold mine site (Limousin, France), where 600,000 tonnes of a

fine arsenic-containing silt were dumped. The population was able to grow autotrophically using As(III) as the only energy source. Colonies of strain b6^T on lactate-containing solid medium were disc shaped, 0.5 mm in diameter, smooth, beige and translucent. Cells were straight small rods, 1–2 µm long (Figure 1), motile or non-motile depending on the growth phase and growth conditions. Gram-staining was negative. Spores were not observed.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses of the almost complete sequence (1279 base pairs) of the SSU rRNA gene of strain b6^T affiliated the new isolate to the genus *Thiomonas* in the β -subclass of the *Proteobacteria* (Figure 2). Strain b6^T was most closely related (98.3% identity) to the unnamed isolate NO115 from a Norwegian mining site. The SSU rRNA genes of the closest related described species, *Tm. intermedia*, *Tm. perometabolis*, and *Tm. thermosulfata* showed less than 95% sequence identity with that of b6^T. The phylogenetic tree shows the position of the main other known As(III)-oxidizing *Proteobacteria*.

Genomic DNA characteristics

The genomic DNA G + C content of strain b6^T was 65.1 mol % as determined by HPLC. DNA–DNA hybridization (in 2 × SSC + 5% [v/v] formamide at

70 °C) of strain b6^T against *Tm. intermedia* ATCC 15466^T gave 48.8% homology.

Growth properties and substrate utilization

The temperature range for optimum growth of strain b6^T was 20–30 °C. Growth was weak at 4 °C and not observed at 45 °C. The pH range for growth was 2.5–8.0, with optimal growth occurring between pH 4.0–7.5 (Figure 3). Growth was not observed at an initial pH of 1.9 or 9.0.

Strain b6^T was able to use elemental sulphur, thiosulphate, tetrathionate and a wide range of organic compounds as electron donors (Table 1). In addition, API tests were recorded as positive for the following carbon sources: phosphoramidothioic acid, hydroxykinoline- β -glucuronide, 4-aminobutyrate, 2-ketogluconate, tyrosine, histamine, gentisate and esculin. Strain b6^T did not grow anaerobically in presence of nitrate. In presence of oxygen, strain b6^T oxidized about 20% of ammonium to nitrite but no nitrate was produced.

Oxidation of As(III)

Strain b6^T was able to grow in MCSM, containing 100 mg l⁻¹ As(III), by oxidizing As(III) (Figure 4). The maximal growth rate, obtained in this medium with an initial pH of 5.5 (Figure 3), was 0.147 (± 0.031) h⁻¹. The corresponding growth yield and arsenite oxidation rates were 3.4 × 10¹¹

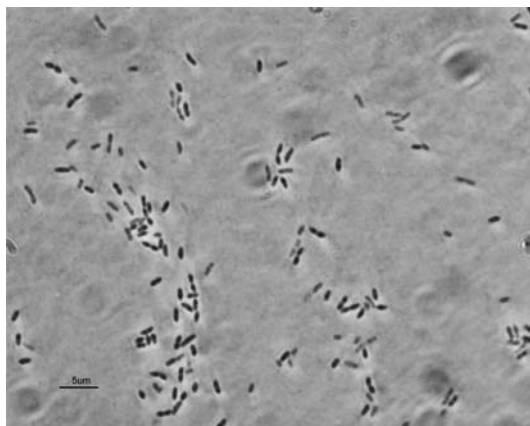


Figure 1. Phase-contrast photomicrograph of strain b6^T grown in MCSM with 0.2 g l⁻¹ yeast extract. Bar, 5 µm.

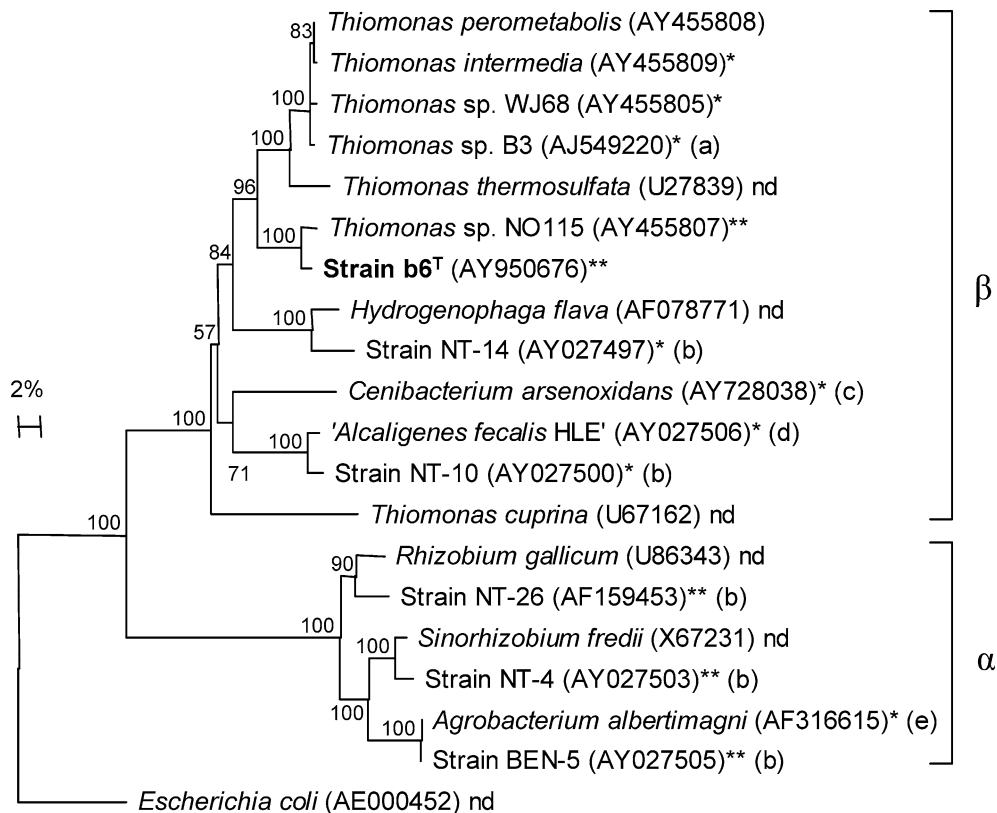


Figure 2. SSU rRNA gene distance tree showing the phylogenetic position of strain b6^T in the *Thiomonas* genus and the other main As(III)-oxidizing micro-organisms within the β and α subclass of the *Proteobacteria*. Symbols: (*): As(III)-oxidizing bacteria; (**): bacteria able to grow chemoautotrophically during As(III) oxidation. (nd): As(III) oxidation not determined. Bar: 2 nucleotide substitution per 100 nucleotides. ^a Bruneel et al. (2004); ^b Santini et al. (2002); ^c Weeger et al. (1999); ^d Anderson et al. (2003); ^e Salmassi et al. (2002).

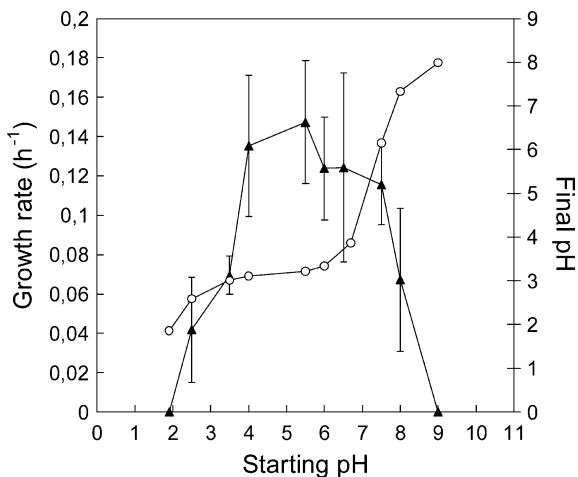


Figure 3. Influence of pH on b6^T growth rate. (▲), growth rate; (○) final pH. Error bars represent the standard error of the mean (triplicates).

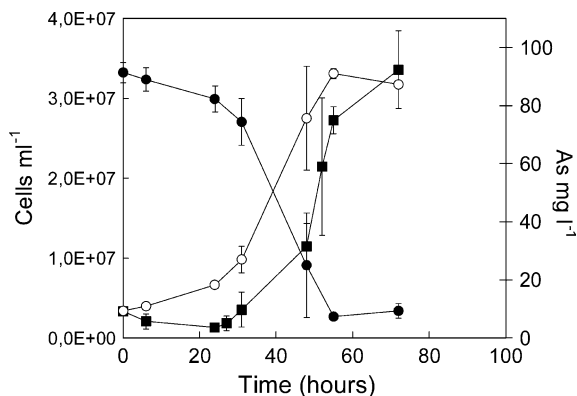


Figure 4. Growth of strain $b6^T$ and oxidation of As(III) in MCSM and shake flasks. (■), cells ml^{-1} ; (○), As(V); (●) As(III). Error bars represent the standard error of the mean (triplicates).

($\pm 3 \times 10^{10}$) cells per g of As(III) and $4 (\pm 0.44) mg [As(III)] l^{-1} h^{-1}$, respectively. In order to verify that the strain did not use traces of organic carbon present in the demineralized water or on the vessel, four subcultures were performed in MSCM prepared with HPLC-grade water and using oven-treated tubes. Growth was identical in basal media prepared with HPLC-grade or demineralized water (Figure 5). No growth was obtained in the absence of As(III). Final cell concentrations were higher in the presence of yeast extract, however growth in chemolithoautotrophic conditions was sustained in successive sub-cultures. Final analyses showed that As(III) had been entirely oxidized to As(V) in all As-containing media.

The ability of other *Thiomonas* strains to oxidize As(III) was tested. Table 2 shows that several strains were able to grow in the presence of As(III), including the type species *Tm. intermedia*

ATCC 15466^T, and were able to oxidize As(III). The growth of *Tm. perometabolis* was inhibited by As(III). Only strains $b6^T$ and NO115 were capable of sustained growth in MCSM, with As(III) as the sole energy source. *Tm. intermedia* and WJ68 required yeast extract for growth while oxidizing As(III).

Oxidation of Fe(II)

Strain $b6^T$ was able to oxidize ferrous iron when grown in shake flasks, as indicated by the disappearance of ferrous iron over 6 days and the accumulation of ferric iron. During this same time frame, there was a concomitant increase in $b6^T$ cell numbers (data not shown). There was no oxidation of iron in the abiotic controls over the 6 days period.

Discussion

Strain $b6^T$ was isolated from an arsenic-contaminated mining site (Battaglia-Brunet et al. 2002), selected for its ability to oxidize As(III). Phylogenetic analysis of SSU rRNA genes clearly showed its affiliation to the genus *Thiomonas* within the β -subclass of the *Proteobacteria*. Strain $b6^T$ and the unnamed As(III)-oxidizing isolate NO115 are a group of related bacteria that share SSU rRNA gene identities of more than 98%. Sequence identities between strain $b6^T$ and described *Thiomonas* species, including *Tm. intermedia* ATCC 15466^T (type species of the genus), *Tm. perometabolis* and *Tm. thermosulfata* were less than 95%; unfortunately *Tm. thermosulfata* is no longer available from

Table 2. Capacity of strain $b6^T$ and other *Thiomonas* strains to oxidize As(III) at a starting concentration of $100 mg l^{-1}$.

Strains	Medium	Growth	As(III)-oxidation
Strain $b6^T$	MCSM	+	+
NO 115	MCSM	+	+
WJ 68	MCSM	-	-
WJ 68	MCSM + $0.2 g l^{-1}$ YE + 1 mM thiosulphate	+	+
<i>Tm. intermedia</i> ATCC 15466 ^T	MCSM	-	-
<i>Tm. intermedia</i> ATCC 15466 ^T	MCSM + $0.2 g l^{-1}$ YE + 1 mM thiosulphate	+	+
<i>Tm. perometabolis</i> CIP 104403	MCSM	-	-
<i>Tm. perometabolis</i> CIP 104403	MCSM + $0.2 g l^{-1}$ YE + 1 mM thiosulphate	-	-
<i>Tm. perometabolis</i> CIP 104403	Medium 126 + $100 mg l^{-1}$ As(III)	-	-

YE = yeast extract.

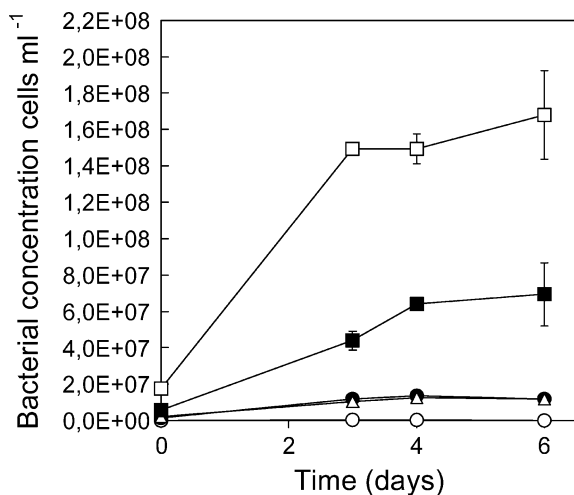


Figure 5. Growth of the fourth sub-culture of strain $b6^T$ in static 10 ml tubes. (○), MCSM without As(III) made with HPLC-grade water; (●), MCSM made with HPLC-grade water; (▲), MCSM; (■), MCSM with 0.02 g l^{-1} yeast extract; (□), MCSM with 0.2 g l^{-1} yeast extract. Error bars represent the standard error of the mean (triplicates).

any culture collection so we were unable to assess whether this microbe could also oxidize As(III) or ferrous iron. The DNA–DNA homology of strain $b6^T$ against *Tm. intermedia* was less than 50%, in accordance with the phylogenetic distance between strain $b6^T$ and the group of described species including *Tm. intermedia*. Based upon this level of DNA–DNA homology, strain $b6^T$ belongs to a distinct species as defined by Wayne et al. (1987).

Strain $b6^T$ shares with other *Thiomonas* isolates important phenotypic features, such as lithoautotrophic growth on reduced sulphur compounds, mixotrophic growth, optimum pH range, and DNA G+C content (Moreira and Amils 1997). As an original feature, strain $b6^T$ can grow heterotrophically with numerous simple organic substrates, while most *Thiomonas* species need complex substrates (Moreira and Amils 1997), or use a limited range of simple compounds (Katayama-Fujimura and Kuraiishi 1983; Huber and Stetter 1990; Shoener et al. 1996). Its closest described relative, *Tm. thermosulfata*, was able to grow on sulphur, thiosulphate, yeast extract, glutamate and succinate, but not on glucose, aspartate, pyruvate, raffinose, sucrose and sorbitol (Shoener et al. 1996). According to their original descriptions, *Tm. intermedia* and *Tm. perometabolis* were not able to use simple organic substrates

for growth (London 1963; London and Rittenberg 1967). However, Katayama-Fujimura and Kuraiishi (1983) found that *Tm. perometabolis* could grow slowly on alaline, malate, citrate, aspartate, glutamate and succinate after a long lag phase.

We showed here that oxidation of As(III) is a common phenotypic feature of several *Thiomonas* strains isolated from diverse environments, such as As(III)-contaminated mining sites (strains $b6^T$, NO115 and WJ68) and soil (*Tm. intermedia*). Furthermore, oxidation of As(III) by *Thiomonas* strains isolated from a heavily As-polluted mine drainage was reported by Bruneel et al. (2004) and Duquesne (2004). One original feature that distinguish strain $b6^T$ and its closest phylogenetic relative strain NO115 from other As(III)-oxidizing *Thiomonas* isolates is that these two organisms can grow chemolithoautotrophically using As(III) as the energy source. To date, chemolithoautotrophy in the genus *Thiomonas* was exclusively reported with sulphur compounds. Several strains also isolated from mining sites, namely NT-26, BEN-5 and NT-4, have been reported to grow autotrophically with As(III) as the sole energy source (Santini et al. 2002). However, they all belong to the α -subclass of *Proteobacteria* and are thus phylogenetically distant from the genus *Thiomonas*. Except from the *Thiomonas*-related isolates $b6^T$ and NO115, only heterotrophic As(III) oxidation has been reported to date amongst members of the β -*Proteobacteria*.

In mining environments, sulphur, iron and arsenic are commonly associated with minerals. Recent theories suggest an ancient bioenergetic origin for arsenite oxidase (Lebrun et al. 2003). Microorganisms are able to grow with As(III) when the concentrations of reduced sulphur and iron compounds become limiting (Jackson et al. 2001). The dilution of acidic mine waters in neutral streams often creates transition zones slightly acidic to neutral, where the energetic use of As(III) may be favoured as this chemical species can remain soluble whereas most of the iron is removed from the water phase. The large pH range for growth of strain $b6^T$ and other *Thiomonas* isolates are characteristics of these transition zones.

Conclusions

Oxidation of As(III) is a common phenotypic feature of *Thiomonas* strains, including the type

species *Tm. intermedia* ATCC 15466^T. To date, strain b6^T is the first characterized β -proteobacterium able to grow autotrophically during oxidation of As(III). On the basis of phenotypic and phylogenetic distinctiveness, we propose strain b6^T as a novel species of the genus *Thiomonas*, *Thiomonas arsenivorans* sp. nov.

Description of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov.

Thiomonas arsenivorans (N. L. adj. ar.se.ni'vo.rans. element arsenic from Gr.n. *arsén*, male; L. n. *vorans*, masc. substantive from L. part. adj. *vorans*, devouring, organism that uses arsenic as a growth substrate).

Cells are rod shaped, approximately 0.3–0.5 μ m wide and 1 μ m long, gram-negative, non-spore-forming and motile. The optimum temperature for growth is between 20 and 30 °C. The optimum pH for growth is between 4.0 and 7.5. Facultative chemolithoautotroph, capable of aerobic growth with As(III), sulphur, thiosulphate, tetrathionate. Organotrophic growth occurs aerobically on yeast extract, glucose, sucrose, succinate, aspartate, glutamate, pyruvate, raffinose, sorbitol, tyrosine, 2-ketogluconate, phosphoramidothioic acid, hydroxykinoline- β -glucuronide, 4-aminobutyrate, histamine, gentisate and esculin. Capable of ferrous iron oxidation. Denitrification was not observed. G+C content of the DNA is 65.1%. The type strain is strain b6^T (DSM 16361^T, LMG 22795^T). The 16S rRNA gene sequence of b6^T has been deposited in GenBank under the accession number AY950676.

Acknowledgements

This is the BRGM contribution no. 03922. We are grateful to Dr Peter Schumann (DSMZ) for his kind participation with the chemotaxonomic analyses. We also thank Karin Dekeyser (GRAM S.A), Manuel Clarens and Arnaud Denamur for their clear-sighted help in selecting, isolating and identifying the strain.

References

Anderson G.L., Love M. and Zeider B.K. 2003. Metabolic energy from arsenite oxidation in *Alcaligenes faecalis*. J. Phys. IV France 107: 49–52.

- Battaglia-Brunet F., Dictor M.-C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Clarens M. and Baranger P. 2002. An As(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. J. Appl. Microbiol. 93: 656–667.
- Battaglia-Brunet F., Duquesne K., Dictor M.-C., Garrido F., Bonnefoy V., Baranger P. and Morin D. 2003. Arsenite oxidizing *Thiomonas* strains isolated from different mining sites. Geophys. Res. Abst. 5: 11069.
- Bruneel O., Personné J.-C., Casiot C., Leblanc M., Elbaz-Poulichet F., Mahler B.J., Le Flèche A. and Grimont P.A.D. 2004. Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoules, France). J. Appl. Microbiol. 95: 492–499.
- Benson D., Bogusk M.S., Lipman D.J., Ostell J., Ouellette B.F., Rapp B.A. and Wheeler D.L. 1999. GenBank. Nucleic Acids Res. 27: 12–17.
- Cashion P., Holder-Franklin M.A., McCully J. and Franklin M. 1977. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. Anal. Biochem. 81: 461–466.
- Coupland K., Battaglia-Brunet F., Hallberg K.B., Dictor M.-C., Garrido F. and Johnson D.B. 2004. Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes: an important role for novel *Thiomonas* spp. In: Tsezos M., Hatzikioseyan A. and Remoudaki E. (eds), Biohydrometallurgy; A Sustainable Technology in Evolution, National Technical University of Athens, Zografou, Greece, pp. 639–646.
- De Ley J., Cattoir H. and Reynaerts A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. Eur. J. Biochem. 12: 133–142.
- Dennison F., Sen A.M., Hallberg K.B. and Johnson D.B. 2001. Biological versus abiotic oxidation of iron in acid mine drainage waters: an important role for moderately acidophilic, iron-oxidizing bacteria. In: Ciminelli V.S.T. and Garcia O. Jr. (eds), Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development, Part B, Elsevier, Amsterdam, pp. 493–501.
- Duquesne K. 2004. Rôle des bactéries dans la bioremédiation de l'arsenic dans les eaux acides de drainage de la mine de Carnoules. Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II.
- Escara J.F. and Hutton J.R. 1980. Thermal stability and renaturation of DNA in dimethylsulphoxide solutions: acceleration of renaturation rate. Biopolymers 19: 1315–1327.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids. Symp. Ser. 41: 95–98.
- Hallberg K.B. and Johnson D.B. 2003. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. Hydrometallurgy 71: 139–148.
- Huber H. and Stetter K.O. 1990. *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 56: 315–322.
- Huss V.A.R., Festl H. and Schleifer K.H. 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. Syst. Appl. Microbiol. 4: 184–192.

- Jahnke K.-D. 1992. Basic computer program for evaluation of spectroscopic DNA renaturation data from GILFORD System 2600 spectrometer on a PC/XP/AT type personal computer. *J. Microbiol. Methods* 15: 61–73.
- Jackson C.R., Langner H.W., Doahoe-Christiansen J., Inskip W.P. and McDermott T.R. 2001. Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. *Environ. Microbiol.* 3: 532–542.
- Johnson D.B. and Hallberg K.B. 2005. Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Sci. Total Environ.* 338: 81–93.
- Jukes T.H. and Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro H.N. (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, pp. 211–232.
- Katayama-Fujimura Y. and Kuraishi H. 1983. Emendation of *Thiobacillus perometabolis* London and Rittenberg 1967. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 650–651.
- Lebrun L., Brugna M., Baymann F., Muller D., Lièvremon D., Lett M.-C. and Nitschke W. 2003. Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol. Biol. Evol.* 20: 686–693.
- London J. 1963. *Thiobacillus intermedius* nov. sp., a novel type of facultative autotroph. *Arch. Microbiol.* 46: 329–337.
- London J. and Rittenberg S.C. 1967. *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic *Thiobacillus*. *Arch. Microbiol.* 59: 218–225.
- Lovley D.R. and Phillips E.J.P. 1987. Rapid assay for microbially reduced ferric iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1536–1540.
- Maidak B.L., Cole J.R., Lilburn T.G., Parker C.T., Saxman P.R., Farris R.J., Garrity G.M., Olsen G.J., Schmidt T.M. and Tiedje J.M. 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 29: 173–174.
- Mesbah M., Premachandran U. and Withman W. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bact.* 39: 159–167.
- Moreira D. and Amils R. 1997. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic Thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 522–528.
- Saito N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 405–425.
- Salmassi T.M., Venkateswaren K., Satomi M., Neelson K.H., Newman D.K. and Hering J.G. 2002. Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiol. J.* 19: 53–66.
- Santini J.M., Sly L.I., Schnagl R.D. and Macy J.M. 2000. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 92–97.
- Santini J.M., Wen L.I.S.A., Comrie D., de Wulf-Durand P. and Macy J.M. 2002. New arsenite-oxidizing bacteria isolated from Australian gold mining environments – phylogenetic relationships. *Geomicrobiol. J.* 19: 67–76.
- Shooner F., Bousquet J. and Tyagi R.D. 1996. Isolation, phenotypic characterization, and phylogenetic position of a novel, facultatively autotrophic, moderately thermophilic bacterium, *Thiobacillus thermosulfatus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 409–415.
- Van de Peer Y. and De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comp. Appl. Biosci.* 10: 569–570.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. and Trüper H.G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463–464.
- Weeger W.D., Lièvremon D., Perret M., Lagarde F., Hubert J.C., Leroy M. and Lett M.C. 1999. Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometals* 12: 141–149.

Relationship Between Sulphate Starvation and Chromate Reduction in a H₂-fed Fixed-film Bioreactor

F. Battaglia-Brunet · C. Michel · C. Jouliau ·
B. Ollivier · I. Ignatiadis

Received: 3 November 2006 / Accepted: 3 March 2007 / Published online: 4 April 2007
© Springer Science + Business Media B.V. 2007

Abstract While developing a low-sulphate system combining indirect chromate-reduction by biologically-produced hydrogen sulphide and direct biological chromate-reduction to treat chromate-bearing waters, the aim of the present work was to evaluate the influence of sulphate and H₂ starvation on chromate reduction. Chromate-reduction was performed under continuous-feed conditions in a fixed-film column bioreactor originally inoculated with a bacterial consortium containing *Desulfomicrobium norvegicum*, and fed with H₂. With 500 mg l⁻¹ of sulphate in the feed solution, total chromate-reduction was observed in the effluent whereas sulphate-reduction was strongly decreased, as also confirmed by measurements of isotopic ratios for sulphur. In the absence of sulphate, a chromate-reduction activity was still observed but was lower than in the presence of sulphate, and chromate-reduction was H₂-dependent. Molecular biology techniques revealed the composition of the bacterial population in the effluent.

D. norvegicum together with other micro-organisms of the *Bacteria* domain were detected. They include members related to the genera *Acinetobacter*, *Acetobacterium* and *Rhodocyclus*. Even when sulphate-reduction was strongly decreased, the presence of sulphate enhances the efficiency of the H₂-dependent chromate-reduction. A H₂- and CO₂-consuming bacterial population may be used in a globally autotrophic process to reduce chromate at low sulphate concentration, thus avoiding excess sulphide production.

Keywords Bioreactor · Chromate-reduction · *Desulfomicrobium norvegicum* · Fixed-film · Hydrogen · Molecular ecology · Sulphate-reduction · 16S rRNA gene · *dsrAB* gene

1 Introduction

Chromium has been designated a worldwide priority pollutant by all developed countries. The extensive use of chromium in industry (leather tanning, electroplating, metallurgy, etc.) is responsible for large amounts of chromium being discharged into the environment in two main valence states: Cr(VI) and Cr(III). In its Cr(VI) state, hexavalent chromium, or chromate, a chromium oxyanion (HCrO₄⁻ or CrO₄²⁻), is a well-known human carcinogen (Gruber and Jennette 1978; Blasiak and Kowalik 2000). Chromate

F. Battaglia-Brunet · C. Michel · C. Jouliau ·
I. Ignatiadis (✉)
BRGM, Environment and Process Division,
3 av. Claude Guillemin, BP 36009,
45060 Orleans, Cedex 2, France
e-mail: i.ignatiadis@brgm.fr

C. Jouliau · B. Ollivier
IRD, UR 101, Laboratoire de Microbiologie, CESB-ESIL,
13288 Marseille Cedex 9, France

is characterized by a high solubility in water that explains its frequent occurrence in natural aquatic and soil systems. In contrast, Cr(III) is much less toxic and precipitates in very stable solid forms (like $\text{Cr}(\text{OH})_3$ and CrPO_4), in a wide range of environmental conditions (Rai et al. 1987, 2004). The total Cr(III) solubility in water (like Cr^{3+} , CrOH^{2+} , $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, $\text{Cr}(\text{OH})_3(\text{aq})$, $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$, etc...) in the pH range from 6.5 to 10.5 is less than $10^{-6.5}$ mol l^{-1} (Rai et al. 1987, 2004), that corresponds to less than 0.01 mg l^{-1} of total dissolved Cr(III).

As many microorganisms exhibit the ability to reduce Cr(VI) to Cr(III) (Lovley 1994; Bhide et al. 1996; Turick and Apel 1997; Vainshtein et al. 2003), bioprocesses can be developed for treatment of water contaminated with this metal. During their growth, hydrogenotrophic bacteria generate only minor organic wastes, thus they are of considerable interest to treat heavy metals contaminations (Kim et al. 2001; Wang 2000). Among these micro-organisms, sulphate-reducing bacteria (SRB) are known to readily use hydrogen and indirectly reduce Cr(VI) by hydrogen sulphide (H_2S or HS^- or S^{2-} ; the three pH-dependent forms) resulting from sulphate-reduction (Kim et al. 2001). The ability of some SRB to use Cr(VI) as a terminal electron acceptor has also been reported (Tebo and Obraztsova 1998; Fauque and Ollivier 2003). In addition, SRB possess redox proteins, such as cytochromes c_3 and hydrogenases, which are involved in the reduction of metals (Lovley and Phillips 1994; Lojou et al. 1998; Michel et al. 2001). Chemical reduction of Cr(VI) by H_2S produced by SRB has already been proposed as an alternative to the classical processes of Cr(VI) bioremediation (Lupton et al. 1991). Moreover, chemical reduction of chromate by H_2S combined with biological reduction has also been considered, as it could optimize Cr(VI) bioremediation and minimize costs and organic waste products (Smith and Gadd 2000; Battaglia-Brunet et al. 2004a).

It has been previously reported (Battaglia-Brunet et al. 2004a) that fixed-bed column bioreactors inoculated with the sulphate reducer *Desulfomicrobium norvegicum* and fed with H_2 could reduce 100 mg l^{-1} of Cr(VI) in the presence of 250 mg l^{-1} of sulphate (SO_4^{2-}), thus indicating its high ability to reduce this metal. It has been subsequently shown (Battaglia-Brunet et al. 2002; 2004a,b; 2006) that this bioprocess was effective for removing chromate from

different matrices (synthetic solutions, actual ground waters and actual waste waters), by using different supports (mainly pozzolana, ceramics and PVC cross-filler material), under continuous feed conditions, between 10 and 35°C, for several months, and in scaled up bioreactors (volume capacity of 2, 20 and 200 l). During the process development steps, whose main purpose was the efficient chromate immobilisation as Cr(III), certain aspects were not sufficiently detailed and we try to describe more precisely the process through some complementary experiments and investigations.

With the background of up to ten similar bioreactors implemented, we have here conducted further experiments in a fixed-bed column bioreactor inoculated with a consortium containing *D. norvegicum* (i. e. the outflow of one of the above mentioned reactors of a volume capacity of 2-l capacity), under non-aseptic continuous-feed conditions. This work aimed to examine the relationship between sulphate starvation and chromate reduction into a H_2 -fed fixed-film bioreactor, inoculated with a microbial consortium containing *D. norvegicum*, constructed to combine indirect (H_2S) and direct (enzymatic) chromate-reduction.

2 Materials and Methods

2.1 Feed Solution and Inoculum

The feed solution used in this study is an Industrial Medium containing Urea (IMU) made up with tap water at pH 6.8. It contained 0.21 g l^{-1} urea (nitrogen >46.2% w/w; Brenntag, St Cyr en Val, France), 0.23 g l^{-1} Di-Amino-Phosphate fertilizer (DAP: NH_3 25.5% w/w, PO_4^{3-} 72.5% w/w; Brenntag, St Cyr en Val, France), 0.4 g l^{-1} $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g l^{-1} KOH, 0.5 g l^{-1} Na_2CO_3 , 7.1 g l^{-1} Na_2SO_4 , 0.5 g l^{-1} CH_3COONa , and 1 ml l^{-1} trace-metals solution. The composition of the trace-metals solution was 3 g l^{-1} EDTA, 1.1 g l^{-1} $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 65 mg l^{-1} MnSO_4 , 89 mg l^{-1} ZnSO_4 , 24 mg l^{-1} NiCl_2 , 18 mg l^{-1} $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g l^{-1} H_3BO_3 , 2 mg l^{-1} CuCl_2 and 130 mg l^{-1} $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The outflow from a fixed-film column bioreactor inoculated with *D. norvegicum* strain Norway 4 (NCBI 8320) and run continuously using the IMU medium in non-aseptic conditions for 5 months (Battaglia-Brunet et al. 2004a), was used as inoculum in the present experiment.

Chromate (CrO_4^{2-}) solutions were obtained by dissolution in water of adequate quantities of sodium chromate ($\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, from Merck, Darmstadt, Germany).

2.2 Experimental Device

Experiments were performed in a PVC column bioreactor (7.2 cm inner diameter, 62 cm height). The free empty inner volume without the cross filter material was 2 l. The column was filled with PVC cross-filler material (Munters Euroform GmbH, Aachen, Germany) with a specific surface of $0.55 \text{ m}^2 \text{ l}^{-1}$.

The temperature in the column was maintained at 30°C with a water jacket. The reactor was fed with H_2 as energy source (20 l h^{-1}) and with CO_2 to maintain pH between 7.0 and 8.3 (1–10% of the total gas phase).

2.3 Phases of the Experiment

2.3.1 Phase 1: Biofilm Development (day 1 to day 20)

The column was fed continuously over 3 days with the inoculum. The column was then fed with $5,000 \text{ mg l}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ -IMU feed solution at low flow-rate (8 ml h^{-1}) for 1 week in order to allow biofilm development, before decreasing the sulphate concentration in the feed to 600 mg l^{-1} by modification of the Na_2SO_4 quantity introduced in the IMU solution. Thereafter, the flow rate was increased to 70 ml h^{-1} so as to decrease residence time to 30 h.

2.3.2 Phase 2: Chromate Addition in the Presence of Sulphate (day 21 to day 48)

The Cr(VI) concentration in the feed solution was progressively increased from 0 to 40 mg l^{-1} , while the SO_4^{2-} concentration was maintained at 600 mg l^{-1} . The flow-rate was maintained between 48 and 70 ml h^{-1} .

2.3.3 Phase 3: Chromate-reduction in the Absence of Sulphate (day 49 to day 71)

A 0-sulphate/ 40 mg l^{-1} Cr(VI) feed solution with nutrients was prepared using demineralised water and by adjusting the pH to 6.8 with HCl. The SO_4^{2-} concentration in this medium was less than the detection limit of the analytical method (5 mg l^{-1}).

This feed solution was injected into the column for 22 days. One week after the beginning of the 0-sulphate phase (or (+)Cr(VI)(-)SO₄²⁻ period), the Cr(VI) concentration in the feed solution had to be decreased from 40 to 20 mg l^{-1} . During the last week of the (+)Cr(VI)(-)SO₄²⁻ period, the H_2 injection was stopped three times during 4 h.

2.3.4 Phase 4: Sulphate Reintroduction (day 72 to the end)

The bioreactor was fed with IMU containing $500 \text{ mg l}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ and 50 mg l^{-1} Cr(VI). The flow rate was increased to 300 ml h^{-1} and the Cr(VI) concentration was increased to 70 mg l^{-1} during the last 3 days of the experiment.

2.4 Chemical Analyses

All liquid samples were filtered at $0.45 \mu\text{m}$ before analyses. Cr(VI) was quantified (as Cr, not as CrO_4^{2-} using the Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) Spectroquant® kit 1.14758.0001 (detection limit 0.025 mg l^{-1}), based on the oxidation of diphenylcarbazide to the purple-coloured Cr(III)-diphenylcarbazone complex. This kit is also used for the analysis of the total dissolved chromium (TDC) after previous (acid attack and thermal treatment at 110°C) oxidation of the sample. Difference in Chromium content between TDC and Cr(VI) (without oxidation of the sample) would have given the dissolved Cr(III) content, but the last one always was under the limit of detection (0.025 mg l^{-1}).

Total dissolved sulphide was determined (detection limit 1 mg l^{-1}) by potentiometric titration, using Tacussel TIM 900 Titralab (Radiometer Analytical, Villeurbanne, France) with a titrating solution of $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ($5.10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), using a specific sulphide electrode ($\text{Ag}-\text{Ag}_2\text{S}$) coupled to a $\text{Ag}-\text{AgCl}$ reference electrode. Sulphate was quantified using the Merck Spectroquant® kit 1.14548.001 (detection limit 5 mg l^{-1}). This kit is based on nephelometric measurements performed with an UV-visible spectrophotometer at 526 nm when using BaCl_2 to precipitate SO_4^{2-} as BaSO_4 .

2.5 Isotopic Determinations

All isotope analyses were reported in δ which are defined as ‰ deviations of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ from

an international standard: the sea mean Ocean water (SMOW) for oxygen, and the Cañon Diablo Troilite (CDT) for sulphur.

^{18}O values (‰ vs. SMOW) were determined using the gas–water equilibration method described by Epstein and Mayeda (1953), and isotopic ratios were measured on a Finnigan MAT 252 mass spectrometer (Finnigan MAT, Orsay, France) equipped with an automatic equilibration unit similar to the device used by Horita et al. (1989).

Solutions were filtered at 0.45 μm , acidified with HCl 12N, and then filtered again till 0.025 μm . Sulphate was precipitated as BaSO_4 with a BaCl_2 solution. One aliquot of the dried BaSO_4 precipitate was reduced to H_2S by a boiling mixture HI-HCl- H_3PO_2 (Thode et al. 1961). The H_2S , swept out with a stream of nitrogen, was precipitated as CdS by reaction with a $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd}$ solution. Then, the dried CdS reacted under vacuum with O_2 to produce SO_2 , on which the sulphur isotopic composition was determined, using a Delta S mass spectrometer (Thermo Finnigan, Orsay, France). Another aliquot of BaSO_4 was mixed with pure graphite (in excess) and heated at 1,050°C under vacuum (Sakai and Krouse 1971; Caron et al. 1986). CO and CO_2 were both produced during the reaction. While CO_2 was trapped in liquid N_2 , CO was converted to CO_2 by a high voltage electrical discharge. Isotope measurements were made on the total CO_2 using a Delta S mass spectrometer (Thermo Finnigan).

2.6 Microbial Composition of the Consortium in the Reactor by Molecular Biology

In order to investigate the bacterial diversity in the system without dismantling the structure of the bioreactor and make vulnerable the initial aims of the study, the effluent was sampled in aseptic conditions only two times: before (day 43) and during (day 57) the (+)Cr(VI)(-)SO $_4^{2-}$ period. Samples were immediately stored at -80°C until used. Samples (4.5 ml) were centrifuged (14,000 rpm, 30 min) and genomic DNA was extracted from pellets by bead beating using the Bio101 FastPrep Instrument and the FastDNA Spin Kit for Soil (Bio101, Vista, Ca. USA). DNA extracts were stored at -20°C.

A 35-cycles PCR amplification was performed using bacterial primers 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGT

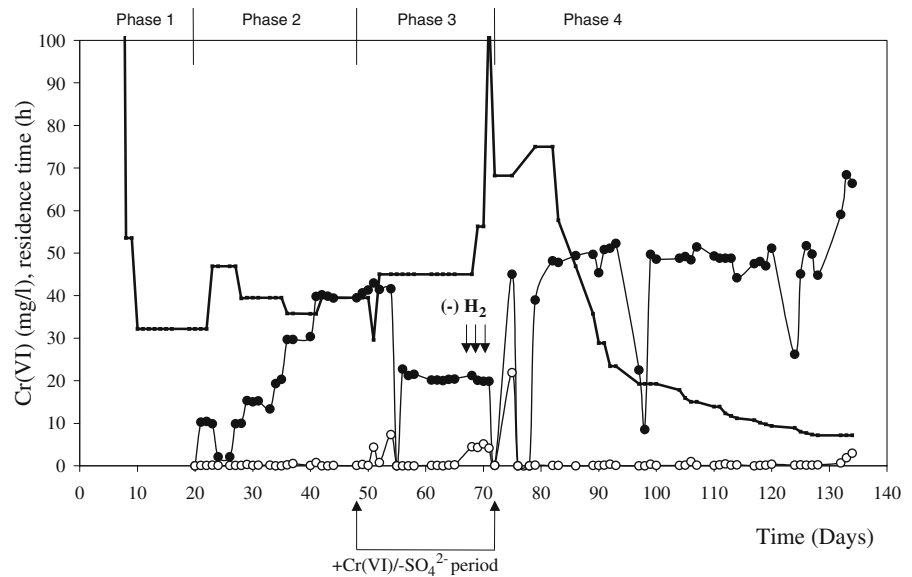
TACCTTGTTACGAC-3') targeting the small-subunit (SSU) ribosomal RNA (rRNA) genes (ca. 1.5 kb) and a temperature of 55°C for primer hybridization. SRB diversity was specifically investigated using primers DSR1F (5'-ACSCACTGGAAGCACG-3') and DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') targeting partial α - and β -subunits of the dissimilatory sulphite reductase (*dsrAB*) genes (ca. 1.9 kb). Initial 40-cycles PCR amplification was performed using a temperature of 54°C for primer hybridization. The band of interest (1.9 kb) was gel purified and re-amplified using the same PCR conditions.

PCR products were purified (Geneclean Turbo kit, Qbiogen, Montreal, Canada) and ligated into pCR-XL-TOPO plasmids (*dsrAB* gene) or into pGEMT-easy plasmids (SSU rRNA gene), according to the manufacturers protocols (Invitrogen, San Diego, Calif.; Promega, Madison, Wi. USA). Clone libraries were screened for inserts of the right length by direct PCR amplification from a colony with primers specific to the plasmids. Right-length inserts of the SSU rRNA gene clones were screened by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) using *HaeIII* and *RsaI* endonucleases (Promega).

Selected plasmids were isolated using the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega). Sequencing was performed by Genome Express (Grenoble, France) with primers targeting the plasmids.

Nucleotidic (SSU rRNA genes) or amino-acid (deduced from nucleotidic sequences of *dsrAB* genes) sequences were manually aligned with reference sequences obtained from the Ribosomal Database Project (Cole et al. 2003) and/or from Genbank database (Benson et al. 1999) using the sequence alignment editor BioEdit (Hall 1999). Positions of sequence and alignment uncertainties were omitted from the analyses. Pairwise evolutionary distances of 1,186 unambiguous nucleotides of the SSU rRNA gene and 518 unambiguous amino acids of the DsrAB were computed respectively by the method of Jukes and Cantor (1969) and the method of Kimura (1980). Phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method (Saitou and Nei 1987). Confidence in the tree topology was determined by bootstrap analysis using 1000 resamplings of the sequences (Felsenstein 1985). The phylogenetic programs were implemented in the software package Treecon 1.3b (Van de Peer and De Wachter 1994).

Fig. 1 Evolution of residence time (*thick line*), of Cr(VI) in the feed medium (\bullet), and of Cr(VI) in the outflow (\circ)



SSU-rRNA gene sequences have been deposited in Genbank under accession numbers AY913831 to AY913841.

3 Results

3.1 Chromate-reduction

Chromate reduction was first performed in the presence of 600 mg l^{-1} sulphate. Residence time during this period fluctuated between 30 and 50 h (Fig. 1, phases 1 and 2). Chromate concentration in the feed solution was increased to 40 mg l^{-1} , and Cr(VI) was entirely reduced in the column. At the end of phase 2, Cr(VI) reduction rate reached $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 2). When the sulphate-containing influent was replaced by a 0-sulphate influent (day 48), Cr(VI)-reduction still took place, but some Cr(VI) was detected in the outflow solution (Fig. 1, phase 3). In order to avoid inhibition of the biofilm activity, Cr(VI) concentration in the feed solution was decreased to 20 mg l^{-1} from day 53. In these conditions, a complete Cr(VI) reduction was maintained for period equal to six residence times, from day 53 to day 67 (Fig. 1, phase 3), while the sulphate concentration was below the detection limit in both the inflow and outflow (Fig. 3, phase 3); the Cr(VI)-reduction rate was $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ during this period (Fig. 2, phase 3). The dependence of Cr(VI)-reduction on H_2 was then tested by stopping H_2 injection three times for

4 h (days 67, 68 and 69). In the absence of H_2 Cr(VI) reduction was affected and some Cr(VI) was detected in the effluent (Fig. 1, phase 3).

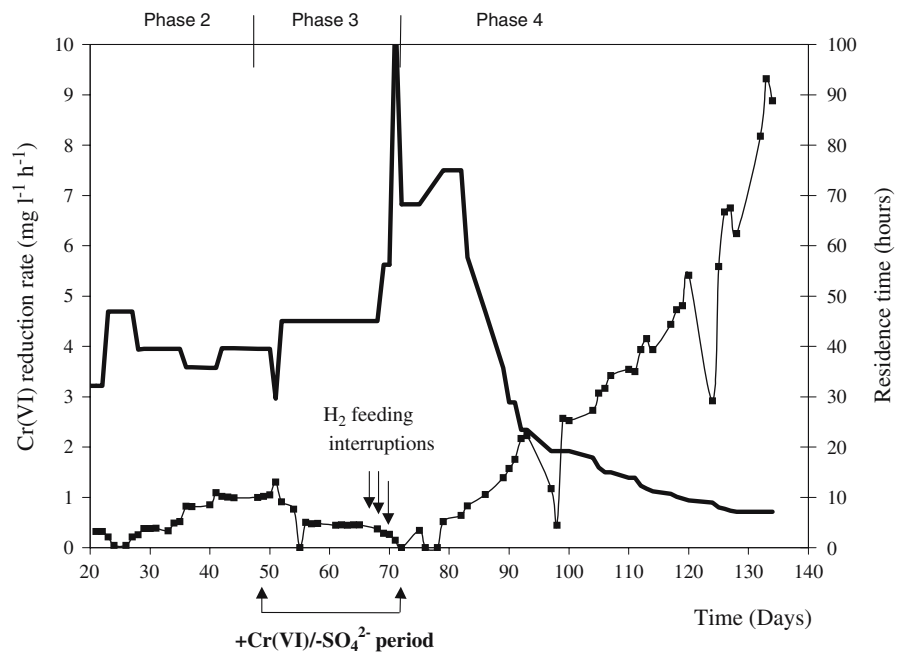
The 0-sulphate influent was then replaced by a feed solution containing 500 mg l^{-1} sulphate and 40 mg l^{-1} Cr(VI) on day 72. A short batch period was applied in order to restore the Cr(VI)-reduction activity, following which the residence time was progressively decreased to 7 h. Cr(VI)-reduction was complete during this phase (Fig. 1, phase 4), with the reduction rate reaching $9 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at the end of the experiment (Fig. 2, phase 4), when the Cr(VI) concentration in the feed solution was increased to 70 mg l^{-1} (Fig. 1, phase 4).

3.2 Sulphate Reduction

At the beginning of the experiment, when the influent did not contain Cr(VI), the sulphate reduction rate reached $30 \text{ mg (sulphate) l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with 600 mg l^{-1} sulphate in the feed solution (Fig. 3, phase 1). With the introduction of Cr(VI) in the feed solution (day 21), the sulphate concentration immediately increased in the outflow. Cr(VI) seemed to inhibit sulphate-reduction, because sulphate outflow fluxes clearly increased when Cr(VI) concentration in the effluent increased.

Between day 24 and day 48 (phase 2), the average sulphate reduction rate was $1.2 \text{ mg (sulphate) l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 3), and the dissolved hydrogen sulphide concentration was below the detection limit (1 mg l^{-1}).

Fig. 2 Evolution of Cr(VI)-reduction rate (■) and of residence time (thick line)



After the (+)Cr(VI)(-) SO_4^{2-} period (phase 4), from day 72 to the end of the experiment, the average sulphate reduction rate was $3.7 \text{ mg (sulphate) l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, significantly higher than before the (+)Cr(VI)(-) SO_4^{2-} period (Fig. 3). The redox potential in the bioreactor remained lower than -500 mV and till -750 mV (versus the ref. electrode Ag–AgCl) during the phases 1, 2, and 3 (Fig. 4). It increased up to 300 mV because the feed solution contained dissolved oxygen,

reaching the value of -350 mV /Ag–AgCl at the end of phase 4, when the residence time was decreased. The increase in redox potential when the residence time was decreased is directly proportional to the presence of dissolved O_2 in the feed. Dissolved O_2 was decreased by reaction with sulphide and stripped with H_2/CO_2 mixture. However, both, the reaction period with sulphide and the H_2 -stripping period were decreased with the residence time.

Fig. 3 Evolution of sulphate concentration in the feed medium (■) and in the outlet (□), and of sulphate-reduction rate (▲)

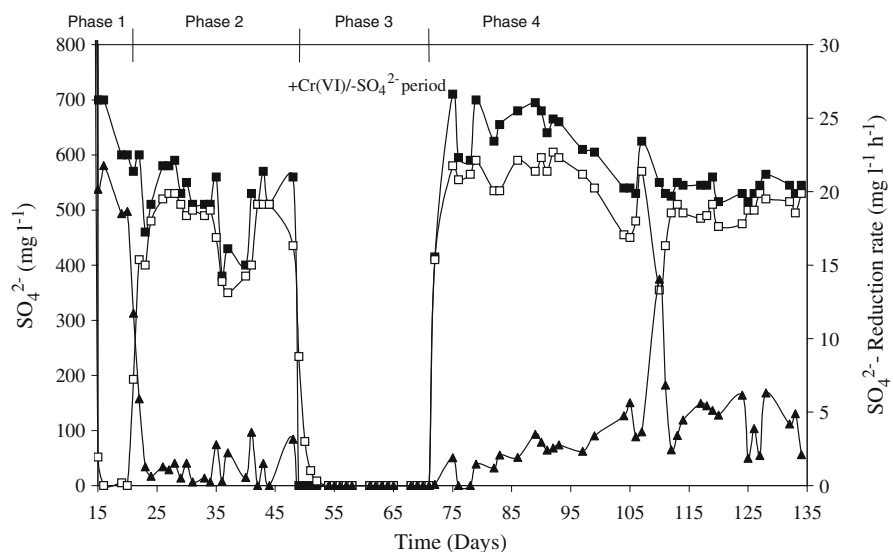
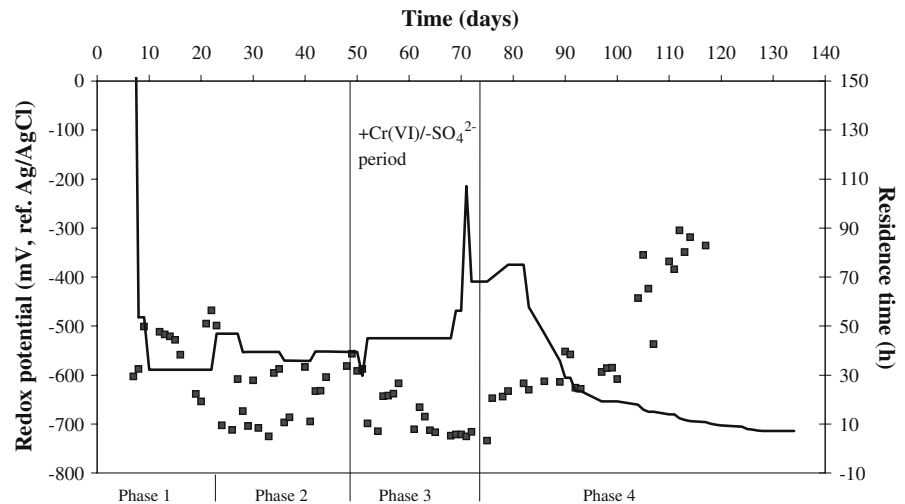


Fig. 4 Evolution of redox potential at the outflow (reference Ag/AgCl) (■) and residence time (*thick line*)



3.3 Isotopic Determinations

The introduction of Cr(VI) in the feed solution (Figs. 1 and 3, phase 2) seemed to inhibit sulphate reduction, and sulphate concentration was nearly the same (510 mg l^{-1}) in the effluent as in the influent (Table 1). However, with only these chemical analyses it was not possible to know whether no sulphate was reduced by the bacteria, or whether some hydrogen sulphide produced by sulphate-reduction was chemically re-oxidized to SO_4^{2-} by Cr(VI). One way of detecting bacterial sulphate-reduction is to analyze the isotopic $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ratio in the sulphate of the feed and the outlet flows of the bioreactor. The pertinence of this analysis is based on the fact that during a bacterial sulphate-reduction the stable sulphur isotope ^{32}S is preferentially reduced than the ^{34}S isotope, so that this isotopic fractionation is reflected in the $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ratio in the remaining sulphate. If some sulphate-reduction occurred in the bioreactor during

the phase 2, the $\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4^{2-})$ vs CDT of the effluent would be larger than that of the feed solution. If chemical oxidation of hydrogen sulphide by Cr(VI) has preferences for one of the two isotopes (this is very improbable), it is clear that this would not necessarily create an equal fractionation to that of the sulphate-reduction, so that after one reduction-oxidation cycle we obtain the same $\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4^{2-})$ vs CDT values.

The feed and the outlet flows of the bioreactor were therefore sampled for isotopic determinations on day 47 (end of phase 2). The results are given in Table 1. The isotopic $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ratios in dissolved sulphate, expressed as δ , were identical (5.4 ‰ vs. CDT) in the feed and outlet of the bioreactor, at identical sulphate concentrations ($510 \text{ mg sulphate l}^{-1}$).

The isotopic $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios in dissolved sulphate in the two flows differ from 9.9 to 9.1 ‰ vs. SMOW.

3.4 Description of the Bacterial Population

Consortium in the Effluent of the Bioreactor

Diversity results presented below are obtained from liquids in contact with the reactor biofilm. Unfortunately, biofilm diversity could not be investigated without dismantle the structure of the bioreactor. Even if this population may not be quantitatively representative of that inhabiting the bioreactor, it probably contains the main organisms that are active in the biofilter.

The bacterial diversity in the bioreactor effluent was investigated before (day 43) and during (day 57) the (+)Cr(VI)(-)SO₄²⁻ period. SSU rRNA gene libraries were successfully constructed from the two samples.

Table 1 Dissolved sulphate concentration and isotopic ratios $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ in the dissolved sulphate in the inflow and outflow waters of the bioreactor on day 47 (end of Phase 2)

Samples	Inflow	Outflow
[SO ₄ ²⁻] mg l ⁻¹	$\delta^{18}\text{O}(\text{SO}_4^{2-})$	$\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4^{2-})$
510	+9.9 (±0.3)	+5.4 (±0.3)
510	+9.1 (±0.3)	+5.4 (±0.3)

δ are ‰ deviations of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ from an international standard: the sea mean Ocean water (SMOW) for oxygen, and the Cañon Diablo Troilite (CDT) for sulphur. Standard deviations represent the internal variability of the assay on one sample.

Sixty-four randomly selected clones exhibiting a right-length insert were grouped into 25 phylotypes according to unique ARDRA patterns. After sequencing the SSU rRNA gene of each phylotype and exclusion of chimeric sequences, phylotypes with less than 1% differences on SSU rRNA gene sequence were considered as related groups. Finally, 12 phylotypes, including 31 (day 43) and 28 (day 57) clones, were included in phylogenetic analyses were (Table 2).

A phylogenetic tree built from comparative analyses of 1,186 nucleotides of SSU rRNA genes revealed that a diverse population of bacteria affiliated to nine phylogenetic clades colonized the bioreactor (Fig. 5). Phylotypes closely related to the anaerobic genus *Acetobacterium* represented the majority of clones prior (25.8%) and after (28.6%) the (+)Cr(VI)(-)SO₄²⁻ period. A phylotype affiliated to the genus *Rhodocyclus* was also retrieved in both libraries (respectively 9.7 and 21.4%), as well as one clone only distantly affiliated to *Prevotella* and *Bacteroides* genera. A phylotype related to members of the genera *Sedimentibacter* and poorly represented (3.2%), was retrieved only prior to the (+)Cr(VI)(-)SO₄²⁻ period. Members of these latter genera are anaerobic microorganisms. Aerobes or microaerophiles were also present in the bioreactor outlet. They include (1) phylotypes closely related to the genera *Delftia* and

Acinetobacter, well represented prior (respectively 25.8 and 16.1%) and after (14.3%) sulfate starvation, (2) phylotypes related to the genera *Aquaspirillum* (6.4% prior and 7.1% after sulfate starvation) and *Stenotrophomonas* (3.2% prior and 10.7% after sulfate starvation), and (3) a phylotype related to the genera *Cryseobacterium* (3.2%) and retrieved only prior the (+)Cr(VI)(-)SO₄²⁻ period.

It is noteworthy that the number of clones matching a certain species is not a precise indicator of population density.

Neither *D. norvegicum*, which was initially inoculated in the former bioreactor (Battaglia-Brunet et al. 2004a), which outflow served as inoculum in the present study, or any other SRB was detected in the SSU rRNA gene libraries.

In order to specifically target SRB, we further investigated the diversity of this metabolic group using as molecular marker the *dsrAB* gene. These genes encode the dissimilatory sulphite reductase (Dsr), a key enzyme of the sulphate respiration (Wagner et al. 1998; Joulain et al. 2001).

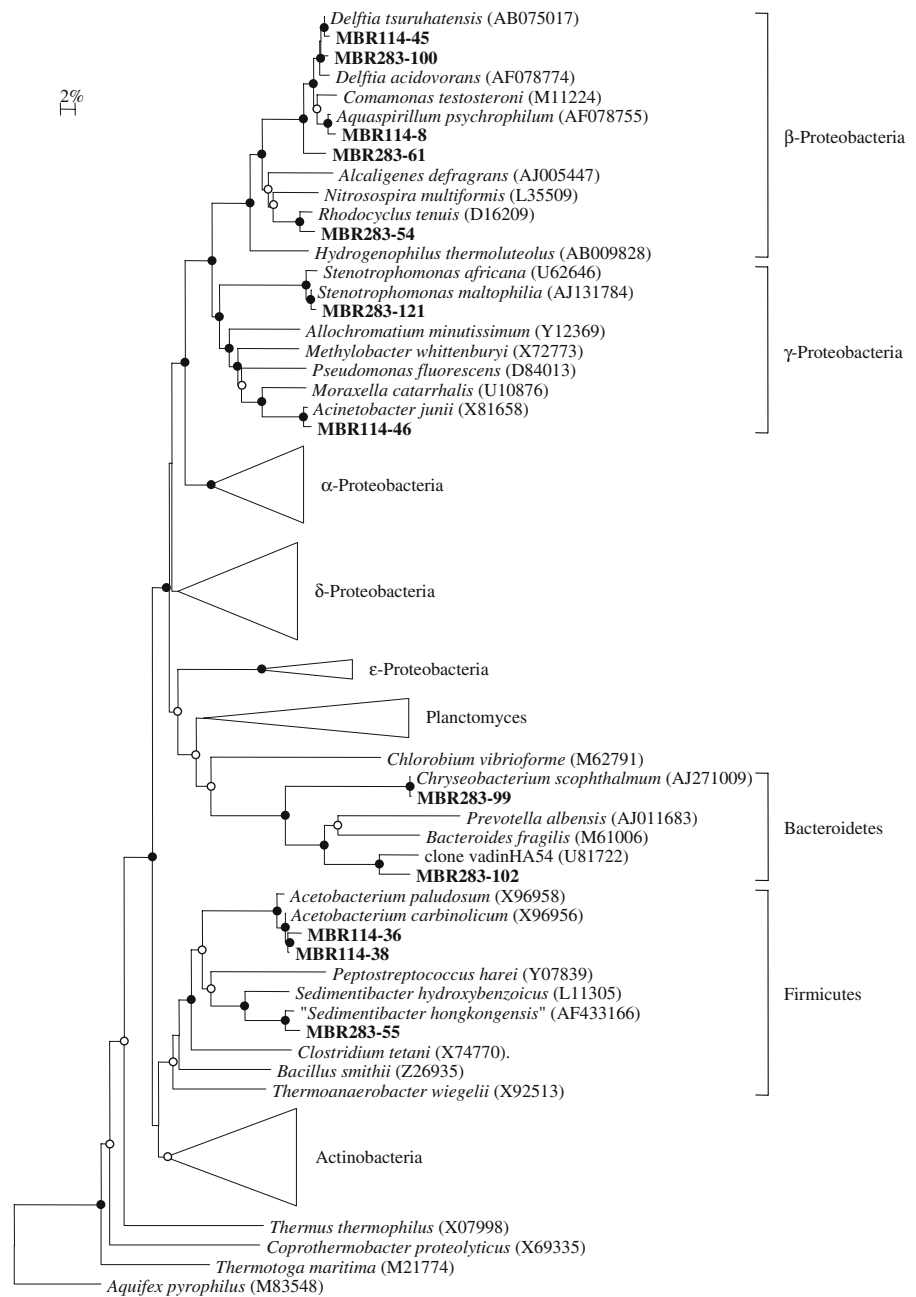
Thirteen clones from day 43 and 15 clones from day 57 samples, all containing a 1.9 kb insert, were sequenced. However, only nine and three retrieved sequences for day 43 and day 57 samples, respectively, were found to be *dsrAB* gene sequences. The phylogeny of amino-acid sequences of the DsrAB

Table 2 Affiliation and distribution of SSU rRNA gene clones retrieved in the bioreactor effluent prior and after sulphate starvation

	Phylotypes	Before the 0-sulphate period (day 43) Number of clones	During the 0-sulphate period (day 57) Number of clones
Organisms generally found in anaerobic environments			
<i>Acetobacterium</i> (strictly anaerobic)	MBR114-36 MBR114-38	8 (25.8%)*	8 (28.6%)
<i>Rhodocyclus</i>	MBR283-54	3 (9.7%)	6 (21.4%)
<i>Sedimentibacter</i> (strictly anaerobic)	MBR283-55	1 (3.2%)	0
<i>Prevotella</i> (strictly anaerobic)	MBR283-102	1 (3.2%)	1 (3.6%)
Organisms generally found in aerobic or micro-aerophilic environments			
<i>Delftia</i>	MBR114-45 MBR283-100	8 (25.8%)	4 (14.3%)
<i>Acinetobacter</i>	MBR114-46	5 (16.1%)	4 (14.3%)
<i>Aquaspirillum</i>	MBR114-8	2 (6.4%)	2 (7.1%)
<i>Delftia-Aquaspirillum</i> Group	MBR283-61	1 (3.2%)	0
<i>Stenotrophomonas</i>	MBR283-121	1 (3.2%)	3 (10.7%)
<i>Chryseobacterium</i>	MBR283-99	1 (3.2%)	0

*Phylotype percentage in each clone library is in bracket

Fig. 5 Distance tree showing the phylogeny of SSU rRNA gene sequences retrieved from day 43 and day 57 samples (*in bold*). *Solid circles* show nodes with a bootstrap value higher than 80%; *open circles* show nodes with a bootstrap value comprised between 50% and 80%. Sequence accession numbers are indicated *in brackets*. MBR sequences have been deposited in Genbank under accession numbers AY913831 to AY913841. Sequence accession numbers of the *Actinobacteria* cluster were Z36934, X80750, AB018092, X89513, U75647, X87135. Sequence accession numbers of the *Planctomyces* cluster were U73110, L27666, X62911. Sequence accession numbers of the *ε-Proteobacteria* cluster were U01330, Z29326. Sequence accession numbers of the *δ-Proteobacteria* cluster were X99237, AJ233947, X79413, X95180, X85131, U12254. Sequence accession numbers of the *α-Proteobacteria* cluster were AJ001631, D30778, D11344, AJ227759, X53853



estimated by distance analysis showed that all retrieved sequences were affiliated to the DsrAB sequence of *D. norvegicum* (data not shown).

4 Discussion

The investigated bioreactor in the present experiment was inoculated with the outflow liquid from a fixed-

film column bioreactor inoculated with *D. norvegicum* strain Norway 4 (NCBI 8320) and run continuously using the IMU medium in non-aseptic conditions for 5 months (Battaglia-Brunet et al. 2004a). This strain, *D. norvegicum*, was previously selected for its high Cr(VI)-reducing activity (Michel et al. 2001; Chardin et al. 2003). In the presence of sulphate, *D. norvegicum* may produce H₂S, that can chemically reduce Cr(VI).

In our experiments, when the bioreactor was fed with Cr(VI) in the presence of sulphate (day 21), the sulphate-reduction process severely decreased (the sulphate concentration immediately increased in the outflow). As a result, the sulphate concentration was nearly the same in the feed and outflow solutions. Cr(VI) seemed to inhibit sulphate-reduction, because sulphate outflow fluxes clearly increased when Cr(VI) concentration in the feed increased. The sulphate reduction is completely inhibited at Cr(VI) ratios as low as 0.04–0.6 g Cr(VI)/g SO_4^{2-} .

Despite the evidence that sulphate-reduction has been ruled out as can be suspected by the rapid and progressive increase of sulphate content in the outflow and by the equality of the sulphate concentrations in feed and effluent solutions, we formulated the following hypothesis: a significant sulphate-reduction activity may have persisted, and H_2S produced by this process may have been chemically oxidized back into sulphate by Cr(VI) (Pettine et al. 1994; Chulsung et al. 2001). In order to test this hypothesis, we undertook isotopic determinations for sulphur and oxygen and found that the isotopic $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ratio in dissolved sulphate was exactly the same in the feed solution as in the outflow. An increase in the proportion of ^{34}S in the remaining sulphate (effluent) is considered commonly as a fingerprint of bacterial sulphate-reduction (Böttcher et al. 1998a,b), therefore a sulphate-reduction activity should have modified the ^{34}S ratio, because one would presume ^{32}S -sulphate would be preferentially reduced to H_2S .

In this respect, these results suggest that the sulphate-reduction process was really very poor during this period, and that the hypothesis of a reduction-oxidation cycle between Cr(VI) and sulphide may be ruled out. Obviously, the last assertion would be false if H_2S was reoxidised back to sulphate by chromate with exactly the same isotopic fractionation. This suggests that the chromate-reduction process at least at this timepoint was entirely direct and was not partially due to chemical reduction of chromate by H_2S resulting from sulphate reduction.

The $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratio in the dissolved sulphate in the outflow water was also close to that of the influent. The observed differences would have been induced by exchanges with water oxygen.

When studying microbial consortia enriched from metal-contaminated sediments, Arias and Tebo (2003)

showed that SRB were particularly sensitive to Cr(VI) toxicity. Smith and Gadd (2000) also observed the inhibition of sulphate-reduction in the presence of CrO_4^{2-} in batch conditions. One possible explanation of the chromate toxicity is that CrO_4^{2-} can act as an analogue of SO_4^{2-} by virtue of its chemical and structural similarities. As an example, Cr(VI) is a competitive inhibitor of sulphate transport in *Pseudomonas* (Cervantes 1991). In our experiments, even though sulphate reduction was strongly inhibited, the Cr(VI)-reduction rate was less efficient when sulphate was removed from the feed solution, decreasing from $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ just before the (+)Cr(VI)(-) SO_4^{2-} period, to $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ during this period. This result suggests that sulphate may have a protective or stimulating effect on the bacterial activity. It could be hypothesized that, as CrO_4^{2-} and SO_4^{2-} enter the cells by the same transport system, sulphate might limit the accumulation of chromate in the cells, thus lowering its toxicity. *D. norvegicum* was maintained and detected as the only sulphate reducer in the outflow of the reactor and sulphate-reduction was higher after the (+)Cr(VI)(-) SO_4^{2-} period than before. A high Cr(VI) reduction rate of $9 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ was obtained in the last phase of the experiment, rate twice higher than that obtained in a previous experiment (Battaglia-Brunet et al. 2004a). Our results suggest that the resistance of the microbial consortium (including *D. norvegicum*) to Cr(VI) was increased by the (+)Cr(VI)(-) SO_4^{2-} period. As chromate was more toxic in the absence of sulphate during the (+)Cr(VI)(-) SO_4^{2-} period, the bacterial population submitted to this stressing conditions might have developed an increased tolerance to chromate.

Using molecular tools, *D. norvegicum* and other bacteria related to anaerobic genera were detected in the outlet of the bioreactor. These organisms are adapted to the physical and chemical conditions prevailing in the reactor. Organisms related to the genus *Acinetobacter* and commonly found at metal-contaminated sites (Turpeinen et al. 2004) were present in the bacterial population of the bioreactor outlet. *Acinetobacter*-related organisms were also detected in Cr(VI)-contaminated sludges (Dilek and Gökçay 1996; Francisco et al. 2002) from which Cr(VI)-reducing *Acinetobacter* strains were isolated. Microorganisms phylogenetically related to the genera *Acetobacterium*, *Rhodocyclus*, and *Sedimentibacter* were also present on the bioreactor outlet. From a subsurface sandstone

ecosystem, two bacterial species belonging to the genera *Desulfomicrobium* and *Acetobacterium* were found to compete for H₂ consumption (Krumholz et al. 1999). *Acetobacterium* spp. were detected in Cr(VI)-reducing bacterial consortia enriched from a contaminated sediment and was present during Cr(VI) reduction (Arias and Tebo 2003). *Acetobacterium* spp. are known to produce acetate while consuming H₂ + CO₂, the two gases injected in the bioreactor in our study. Biological synthesis of acetate in our system was previously suspected (Battaglia-Brunet et al. 2004a) and confirmed (Battaglia-Brunet et al. 2006). Thus, the addition of acetate in the feed is probably useless as carbon and energy sources may be delivered to the overall bacterial population only from H₂ and CO₂. Concerning *Rhodocyclus* spp., they can grow anaerobically using hydrogen sulphide as energy source (Sinha and Banerjee 1997), and metabolize acetate (Zilles et al. 2002). Thus, growth of *Rhodocyclus*-related organisms in the bioreactor was probably favoured together by acetate and sulphide available *in situ*.

Bacteria related to the genera *Delftia*, *Aquaspirillum*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, and *Chryseobacterium* were also detected. Members of these genera are commonly found in soils or water, and grow under aerobic or micro-aerophilic conditions. Because of their physiological features, such microorganisms could hardly find favourable conditions for their growth in the reactive part of the reactor, where very reducing conditions prevail. However, they may have colonized the outlet pipe from which samples were taken.

Our experiments also showed that the Cr(VI)-reducing activity was mainly based on hydrogen metabolism as it was immediately inhibited when H₂ feeding was stopped. This suggests that among the bacteria present in the bioreactor, those that were directly or indirectly involved in Cr(VI) reduction consumed H₂ (such as *D. norvegicum* or *Acetobacterium* spp.). To date, only *D. norvegicum*- and *Acinetobacter*-related bacteria were shown to be involved in Cr(VI) reduction in axenic conditions. After the (+)Cr(VI)(-)SO₄²⁻ period, both SO₄²⁻ reduction and CrO₄²⁻ reduction were more efficient than before. This result suggests that *D. norvegicum*, the only SRB detected in the bioreactor, contributes to CrO₄²⁻ reduction, even if it may not be the only CrO₄²⁻ reducer involved in the process.

The bacterial population colonizing the bioreactor showed a quite efficient ability to decontaminate Cr

(VI)-polluted effluents. The two main advantages of this process were (1) the use of hydrogen as a cheap and clean electron source, and (2) the low production of excess of toxic sulphide.

Moreover, the bioprocess and the consortium developed here proved to be operational for Cr(VI)-reduction at high sulphate concentrations. Since they often co-occur in contaminated environments, one issue to decontaminate Cr(VI)- and sulphate-containing waters could thus be to select a sulphate-reducing population able to simultaneously efficiently reduce these two compounds.

Acknowledgements This is the BRGM contribution n° 02811. This work was carried out in the framework of the Commission of European Union contract no EVK1-CT-1999-00033 (METALBIOREDUCTION project) and received financial support from a BRGM research project (BIOPROC project). We thank M. Marggraff from Munters-Euroform for providing filling materials and C. Flehoc from Metrology, Monitoring and Analysis Division, BRGM/MMA, for the isotopic determinations.

References

- Arias, Y. M., & Tebo, B. M. (2003). Cr(VI) reduction by sulphidogenic and non-sulphidogenic microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 1847–1853.
- Battaglia-Brunet, F., Touze, S., Michel, C., & Ignatiadis, I. (2006). Treatment of a chromate-polluted groundwater in a 200-dm³ pilot bio-reactor fed with hydrogen. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *81*, 1506–1513.
- Battaglia-Brunet, F., Foucher, S., Denamur, A., Marggraff, M., Morin, D., & Ignatiadis, I. (2004a). Chromate reduction at low sulphate concentration in hydrogen-fed bioreactors. *Environmental Technology*, *25*(1), 101–109.
- Battaglia-Brunet, F., Foucher, S., Morin, D., & Ignatiadis, I. (2004b). Chromate (CrO₄²⁻) reduction in ground waters by using reductive bacteria in fixed-bed bioreactors. *Water, Air & Soil Pollution, Focus*, *4*(4–5), 127–135.
- Battaglia-Brunet, F., Foucher, S., Ignatiadis, I., Michel, C., & Morin, D. (2002). Reduction of chromate by fixed films of sulphate-reducing bacteria using hydrogen as electron source. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *28*, 154–159.
- Benson, D., Boguski, M. S., Lipman, D. J., Ostell, J., Ouellette, B. F., Rapp, B. A., et al. (1999). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *27*, 12–17.
- Bhide, J. V., Dhakephalkar, P. K., & Paknikar, K. M. (1996). Microbiological process for the removal of Cr(VI) from chromate-bearing cooling tower effluent. *Biotechnology Letters*, *18*, 667–672.
- Blasiak, J., & Kowalik, J. (2000). A comparison of the *in vitro* genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutation Research*, *469*, 135–145.

- Böttcher, M. E., Brumsack, H. J., & De Lange, G. J. (1998a). Sulphate reduction and related stable isotope (^{34}S , ^{18}O) variations in interstitial waters from the Eastern Mediterranean. *Proceedings of Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 160, 365–373.
- Böttcher, M. E., Oelshläger, B., Höpner, T., Brumsack, H. J., & Rullkötter, J. (1998b). Sulphate reduction related to the early diagenetic degradation of organic matter and “black spot” formation in tidal sandflats of the German Wadden Sea (Southern North Sea): Stable isotope (^{13}C , ^{34}S , ^{18}O) and other geochemical results. *Organic Geochemistry*, 29, 1517–1560.
- Caron, F., Tessier, A., Kramer, J. R., Schwarcz, H. P., & Rees, C. E. (1986). Sulphur and oxygen isotopes of sulphate in precipitation and lakewater, Quebec, Canada. *Applied Geochemistry*, 1, 601–606.
- Cervantes, C. (1991). Bacterial interaction with chromate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59, 229–233.
- Chardin, B., Giudici-Orticoni, M. T., De Luca, G., Guigliarelli, B., & Bruschi, M. (2003). Hydrogenases in sulphate-reducing bacteria function as chromium reductase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 315–321.
- Cheung, K. H., & Gu, J. D. (2003). Reduction of chromate (CrO_4^{2-}) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulphate-reducing bacteria. *Chemosphere*, 52, 1523–1529.
- Chulsung, K., Gunhui, Z., Baolin, D., Thornton, E. C., & Huifang, X. (2001). Chromium(VI) reduction by hydrogen sulphide in aqueous media: Stoichiometry and kinetics. *Environmental Science and Technology*, 35, 2219–2225.
- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., et al. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): Previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 31, 442–443.
- Dilek, F. B., & Gökçay, C. F. (1996). Microbiology of activated sludge treating wastewater containing Ni(II) and Cr(VI). *Water Science and Technology*, 34, 183–191.
- Epstein, S., & Mayeda, T. (1953). Variation of ^{18}O content of waters from natural sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 4, 213–224.
- Fauque, G., & Ollivier, O. (2003). Anaerobes: The sulphate-reducing bacteria as an example of metabolic diversity. In A. T. Bull (Ed.) *Microbial Diversity and Bioprospecting* (vol. 17, pp. 169–176). Washington: ASM.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Francisco, R., Alpoim, M. C., & Morais, P. V. (2002). Diversity of chromium-resistant and -reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 837–843.
- Gruber, J. E., & Jennette, K. W. (1978). Metabolism of the carcinogen chromate by rat liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 82, 700–706.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Horita, J., Ueda, A., Mizukami, K., & Takatori, I. (1989). Automatic δD and $\delta^{18}\text{O}$ analyses of multi-water samples using H_2 - and CO_2 -water equilibration methods with a common equilibration set-up. *Applied Radiation and Isotopes*, 40, 801–805.
- Joulian, C., Ramsing, N. B., & Ingvorsen, K. (2001). Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulphite reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3314–3318.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In H. N. Munro (Ed.) *Mammalian Protein Metabolism* (pp. 211–232). New York: Academic.
- Kim, C., Zhou, Q., Deng, B., Thornton, E., & Xu, H. (2001). Chromium reduction by hydrogen sulphide in aqueous media: Stoichiometry and kinetics. *Environmental Science and Technology*, 35, 2219–2225.
- Kimura, M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Krumholz, L. R., Harris, S. H., Tay, S. T., & Sulfitia, J. M. (1999). Characterization of two subsurface H_2 -utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogaeum* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov. and their ecological roles. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2300–2306.
- Lojou, E., Bianco, P., & Bruschi, M. (1998). Kinetic studies on the electron transfer between bacterial c-type cytochromes and metal oxides. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 452, 167–177.
- Lomans, B. P., Leijdekkers, P., Wesselink, J.-J., Bakkes, P., Pol, A., van der Drift, C., et al. (1991). Obligate sulphide-dependent degradation of methoxylated aromatic compounds and formation of methanethiol and dimethyl sulphide by a freshwater sediment isolate, *Parasporobacterium paucivorans* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4017–4023.
- Lovley, D. R. (1994). Microbial reduction of iron, manganese and other metals. *Advances in Agronomy*, 54, 175–229.
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. P. (1994). Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c_3 cytochrome. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 726–728.
- Lupton, F. S., DeFilippi, L. J., & Goodman, J.R. (1991). Bioremediation of chromium (VI) contaminated aqueous systems by sulphate reducing bacteria. US patent n° 5,062,956.
- Michel, C., Brugna, M., Aubert, C., Bernadac, A., & Bruschi, M. (2001). Enzymatic reduction of chromate: Comparative studies using sulphate-reducing bacteria. Key role of polyheme cytochromes c and hydrogenases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 95–100.
- Pettine, M., Millero, F. J., & Passiro, R. (1994). Reduction of chromium (VI) with hydrogen sulphide in NaCl media. *Marine Chemistry*, 46, 335–344.
- Rai, D., Moore, D. A., Hess, N. J., Rao, L., & Clark, S. B. (2004). Chromium(III) hydroxide solubility in the aqueous $\text{Na}^+ - \text{OH}^- - \text{H}_2\text{PO}_4^- - \text{HPO}_4^{2-} - \text{PO}_4^{3-} - \text{H}_2\text{O}$ system. A thermodynamic model. *Journal of Solution Chemistry*, 33, 1213–1242.
- Rai, D., Sass, B. M., & Moore, D. A. (1987). Chromium (III) hydrolysis constants and solubility of chromium (III) hydroxide. *Inorganic Chemistry*, 26, 345–349.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 405–425.

- Sakai, H., & Krouse, H. R. (1971). Elimination of memory effects in ^{18}O – ^{16}O determination in sulphates. *Earth and Planetary Science Letters*, *11*, 361–373.
- Smith, W., & Gadd, G. (2000). Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, *88*, 983–991.
- Sinha, S. N., & Barmerjee, R. D. (1997). Ecological role of thiosulphate and sulphide utilizing purple nonsulphur bacteria of a riverine ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, *24*, 211–220.
- Tebo, B. M., & Obraztsova, A. Y. (1998). Sulphate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*, *162*, 193–198.
- Thode, H. G., Monster, J., & Dunford, H. B. (1961). Sulphur isotope geochemistry. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, *25*, 50–174.
- Thomsen, T. R., Finster, K., & Ramsing, N. B. (2001). Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 1646–1656.
- Turick, C. E., & Appel, W. A. (1997). Method for *in situ* or *ex situ* bioremediation of hexavalent chromium contaminated soils and/or groundwater. US Patent n° 5,681,739.
- Turpeinen, R., Kairesalo, T., & Häggblom, M. M. (2004). Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper- contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology*, *47*, 39–50.
- Vainshtein, M., Kuschik, P., Mattusch, J., Vatsourina, A., & Wiessner, A. (2003). Model experiments on the microbial removal of chromium from contaminated groundwater. *Water Research*, *37*, 1401–1405.
- Van de Peer, Y., & De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, *10*, 569–570.
- Wagner, M., Roger, A., Flax, J., Brusseau, G. & Stahl, D. (1998). Phylogeny of dissimilatory sulphite reductases supports an early origin of sulphate respiration. *Journal of Bacteriology*, *180*, 2975–2982.
- Wang, Y. T. (2000). Microbial reduction of chromate. In D. R. Lovley (Ed.), *Environmental microbe-metal interactions*, chap. 10 (pp. 225–235). Washington D.C.: ASM.
- Zilles, J. L., Peccia, J., Kim, M. W., Hung, C. H., & Noguera, D. R. (2002). Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 2763–2769.

Microflore bactérienne des milieux riches en métaux et métalloïdes

Résumé

De nombreux métaux et métalloïdes sont indispensables au développement des sociétés humaines, qui ont exploité les gisements de divers éléments stratégiques depuis des siècles, voire des millénaires. Cependant, les êtres vivants dits « supérieurs » sont sensibles à la toxicité des métaux et métalloïdes : ces derniers peuvent causer des dommages importants à la santé des populations exposées, ainsi qu'à l'ensemble des écosystèmes contaminés. Les milieux riches en métaux et métalloïdes offrent cependant des niches écologiques favorables au développement de certains micro-organismes. La microflore de ces environnements est capable de résister à de fortes concentrations en métaux, et de nombreuses bactéries peuvent utiliser des métaux et des métalloïdes en tant que donneurs ou accepteurs d'électrons. Elles participent ainsi activement aux cycles biogéochimiques de ces éléments.

Le présent mémoire est une synthèse des travaux réalisés par l'auteur entre 1990 et 2010 dans le domaine des biotechnologies et de la biogéochimie. Ces études ont été focalisées sur des processus bactériens de solubilisation ou d'immobilisation des métaux et/ou métalloïdes, en milieu neutre, modérément acide ou très acide. Les principaux sujets de recherche abordés ont été les suivants :

- la biolixiviation acidophile des minerais sulfurés, et les interactions entre bactéries et fer dissous,
- l'oxydation biologique de l'arsenic dans les environnements miniers, et l'application de ce phénomène dans le domaine du traitement des eaux,
- l'utilisation de l'As(III) comme source d'énergie par des bactéries isolées,
- les phénomènes de bio-réduction et bio-précipitation de métaux et métalloïdes, en particulier du chrome et de l'arsenic, en conditions de sulfato-réduction.

Les différents travaux évoqués dans le présent mémoire ont porté soit sur la biogéochimie d'environnements pollués, soit sur la mise au point de procédés de bioremédiation. Le projet de recherche proposé pour les années à venir conservera cette dualité processus/procédés. Il sera focalisé sur les réactions qui modifient les formes des métaux et métalloïdes en présence de catalyseurs microbiens, et s'efforcera de quantifier le bénéfice potentiel tiré de ces réactions par les micro-organismes, en fonction des conditions physico-chimiques. Cette démarche permettra de cibler la recherche de niches écologiques où des métabolismes bactériens originaux, potentiellement exploitables en termes de procédés, pourraient être mis en évidence.