



HAL
open science

Acteurs et mécanismes des bio-transformations de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium pour la mise en place d'éco-technologies appliquées à la gestion d'anciens sites miniers

Elia Laroche

► To cite this version:

Elia Laroche. Acteurs et mécanismes des bio-transformations de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium pour la mise en place d'éco-technologies appliquées à la gestion d'anciens sites miniers. Sciences de la Terre. Université Montpellier, 2019. Français. NNT: 2019MONTG048 . tel-02611018

HAL Id: tel-02611018

<https://theses.hal.science/tel-02611018v1>

Submitted on 18 May 2020

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences de l'Eau

École doctorale GAIA

Unité de recherche Hydrosiences Montpellier UMR 5569

Unité de recherche GME (Géomicrobiologie et Monitoring Environnemental) du BRGM, Orléans

Acteurs et mécanismes des bio-transformations de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium pour la mise en place d'éco-technologies appliquées à la gestion d'anciens sites miniers

Présentée par Elia LAROCHE

Le 29 Novembre 2019

Sous la direction de Corinne CASIOT
et Fabienne BATTAGLIA-BRUNET

Devant le jury composé de

Pascale Bauda, Professeur, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux,
Université de Lorraine, Metz

Jean Martins, Directeur de recherches, Institut des Géosciences de l'Environnement, Université
de Grenoble

Eric van Hullebusch, Professeur, Institut de Physique du Globe de Paris

Patrick Seyler, Directeur de Recherches, HydroSciences Montpellier

Corinne Casiot, Chargée de Recherches CNRS, HydroSciences Montpellier

Fabienne Battaglia-Brunet, Chercheur, BRGM, Orléans

Marina Héry, Maître de Conférences, HydroSciences Montpellier

Catherine Joulian, Chercheur, BRGM, Orléans

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice

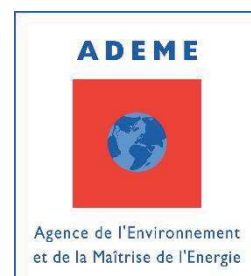
Co-directrice

Co-encadrante

Co-encadrante



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



Dédié à ma grand-mère et à mon père,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directrices de thèses, ainsi que mes co-encadrantes, d'avoir dirigé l'ensemble de ces travaux. J'aimerais remercier Marina Héry et Corine Casiot qui m'encadrent depuis maintenant cinq ans et qui ont été les premières à m'offrir l'opportunité de réaliser cette thèse. Je n'oublie pas Fabienne Battaglia-Brunet et Catherine Joulian sans qui cette expérience de thèse n'aurait pu être complète. Un grand merci à toutes les quatre pour votre confiance, vos conseils et votre investissement (même les week-ends !).

Je souhaite également remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ces travaux. Je remercie Pascale Bauda et à Jean Martins d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Eric Van Hullebusch et Patrick Seyler d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je suis reconnaissante à l'Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (Ademe) et au Bureau de Recherche Géologique et Minière (BRGM), qui ont co-financés ces travaux de thèse. Ces derniers ont été menés à la fois au sein du laboratoire HydroSciences Montpellier (HSM) et du BRGM. Je remercie donc Patrick Seyler, directeur du laboratoire HSM, ainsi que Francis Garrido et Christopher Bryan, responsables de l'unité Bio-géochimie environnementale et qualité de l'eau du BRGM, de m'avoir accueilli au sein de ces structures. J'ai ainsi pu y mener de nombreuses expériences avec l'aide précieuse d'Angélique, Mickaël, Cindy, Sophie, Léa, Dominique, Elise et Aurore. Merci à Vincent qui m'a aidé à démêler les méandres des logiciels Mothur et R, avec l'appuie également d'Odile et Jennifer. Ma reconnaissance à Fabienne, Berengère et Marie-Christine qui m'ont guidé à travers les labyrinthes administratifs de la thèse. J'ai rencontré tant de personnes qui m'ont aidée et soutenue dans ces deux laboratoires que je ne peux toutes les citer, alors merci à : tous les membres de l'administration, mes collègues scientifiques, de pause-café et de clopes, à tous les ingénieurs et techniciens de laboratoire, aux autres doctorants et non permanents.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la joie de pouvoir enseigner. Je tenais donc à remercier l'ensemble des équipes pédagogiques qui m'ont permis de vivre cette superbe expérience professionnelle.

Un doctorat c'est trois ans d'investissement professionnel mais aussi personnel. Nombreux sont ceux qui ont partagés mes joies et mes peines, des amis Orléanais (Cindy, Anne, Juju, Alison, Quentin), Montpelliérains (Lidia, Olga, Stéphane, Arnold et Benoit) et n'oublions pas les anciens (Cécile, Manon, Alizée, Carole, Héloïse, Boubou, Benjamin, Thibault, Pierre, Claire, Clément, Walid). Une pensée particulière pour Pablo qui m'a supportée au laboratoire et quotidiennement (de toute façon c'est la faute de Pablo). Je tiens à remercier mon père, Florence, ma sœur, Monique et toute ma famille pour avoir toujours cru en moi.

Enfin un grand merci à toutes les personnes qui directement ou indirectement m'ont aidé au cours de ces trois années.

Sommaire

Remerciements	i
Sommaire	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	ix
Introduction	1
Chapitre I : De la formation des DMA à leur bioremédiation.....	3
1. Drainages miniers acides (DMA) : origine et impacts.....	5
1.1. Formation des drainages miniers acides.....	5
1.2. Conséquences des drainages miniers acides	10
2. Métaux et métalloïdes au sein des drainages miniers acides : cas de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium	13
2.1. Présence et toxicité.....	13
2.2. Spéciation et comportement	17
2.3. Biotransformations	21
3. Processus microbiens qui contribuent à l'atténuation naturelle des polluants métalliques dans les drainages miniers acides	28
3.1. Précipitation des sulfures métalliques	28
3.2. Formation des (oxy)hydroxydes métalliques	30
3.3. Influence des facteurs biotiques et abiotiques	33
4. Développement d'éco-technologies de bioremédiation microbienne des drainages miniers.....	40
4.1. Traitements actifs ou passifs	40
4.2. Traitements biologiques passifs des DMA.....	48
5. Questions scientifiques et objectifs de la thèse	64
Chapitre II : Bio-oxydation de l'antimoine et croissance microbienne en conditions acides ..	67
1. Introduction, objectifs et démarche	69
2. Article: Microbially mediated Sb(III)-oxidation under acidic conditions.....	71
2.1. Introduction	71
2.2. Materials and methods.....	72
2.3. Results	77
2.4. Discussion	84

2.5. Conclusion.....	87
2.6. Supplementary material.....	88
Chapitre III : Elimination simultanée de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium dans un drainage minier acide par sulfato-réduction au sein d'un bioréacteur en colonne.....	91
1. Introduction, objectifs et démarche	93
2. Article: Bio-precipitation of arsenic and antimony from acid mine water in a sulfate-reducing bioreactor.....	95
2.1. Introduction	95
2.2. Materials and methods.....	97
2.3. Results	100
2.4. Discussion	108
2.5. Conclusion.....	111
2.6. Supplementary table	112
Chapitre IV : Etude de la dynamique des communautés bactériennes au sein d'un pilote de terrain traitant un drainage minier acide riche en arsenic	113
1. Introduction, objectifs et démarche	115
2. Article: Dynamics of bacterial communities mediating the treatment of an As-rich acid mine drainage in a field pilot.....	117
2.1. Introduction	118
2.2. Material and methods	119
2.3. Results	123
2.4. Discussion	127
2.5. Conclusion.....	132
2.6. Supplementary material.....	133
Conclusion générale	139
Perspectives	143
Références	147
Annexes	173
1. Publications	173
2. Communications orales	174

Liste des figures

- Figure 1** : Localisation et caractéristiques physico-chimiques de quelques drainages miniers acides à travers le monde. Certaines caractéristiques physico-chimiques n'ont pu être renseignées faute de données (Méndez-Garcia et al., 2015). 6
- Figure 2** : Photographies montrant les différents faciès des précipités de fer : formation de concrétions laminées (a) et déshydratées (b); une vue en microscopie électronique à balayage des bactéries et des diatomées dans les concrétions laminées (c); croûte ferrugineuse à la surface d'eau stagnante (d) (Egal et al., 2008). 7
- Figure 3** : Les principaux impacts des DMA sur un système lotique (Gray, 1997). 11
- Figure 4** : Carte des mines ayant extrait des minerais arséniés, représentées par des triangles noirs, en France métropolitaine d'après le site sigminesfrance.brgm.fr 14
- Figure 5** : Carte des mines ayant extrait des minerais d'antimoine, représentées par des points noirs, en France métropolitaine d'après le site sigminesfrance.brgm.fr 16
- Figure 6** : Diagramme Eh-pH de l'arsenic dans le système Fe-As-S-H₂O à 25°C et 1 bar, modifié d'après Suratman, 2016. La zone bleue représente les conditions de pH du DMA. .. 18
- Figure 7** : Diagramme Eh-pH de l'antimoine dans le système Sb-S-H₂O, pour des concentrations en antimoine et en sulfure dissous de 10⁻⁸ mol/L et 10⁻³ mol/L respectivement, modifié d'après Filella et al. (2002). La zone bleue représente les conditions de pH du DMA. 18
- Figure 8** : Diagramme Eh-pH du thallium dans le système Tl-Cl-H₂O, pour des concentrations en Cl de 1,7.10⁻⁴ mol/L, modifié à partir de Casiot et al., 2011. La zone bleue représente les conditions de pH du DMA. 18
- Figure 9** : Transformations bactériennes de l'arsenic (A) et de l'antimoine (B) adaptée de Kruger et al. (2013) et Li et al. (2016). L'As(III), Sb(III) et As(V) entrent dans la cellule via les transporteurs de glycérol ou phosphate et sont excrétés par des pompes à efflux via le système Ars (1). Le transport du Sb(V) reste encore méconnu (5). Ces métalloïdes peuvent être transformés par des processus de réduction (2), de méthylation (3) et d'oxydation (4). 22
- Figure 10** : Les différentes étapes de la réduction dissimilatrice des sulfates par les bactéries sulfato-réductrices. Les enzymes et les gènes sont respectivement représentés par des cercles et des flèches bleues. 29
- Figure 11** : Organisation de l'opéron *dsr* au sein de différentes bactéries sulfato-réductrices et chez *Bilophila wadsworthia* (D'après Zverlov et al., 2005 et Giloteaux, 2010). 30
- Figure 12** : Oxydation du Fe(II) chez *Acidithiobacillus ferroxidans*. Les électrons issus de cette oxydation sont transportés jusqu'à O₂ ou le NAD⁺. Le flux des électrons et des protons sont respectivement indiqués par des flèches en pointillés ou pleines. Tous les cytochromes c sont représentés en vert clair, la rusticyanine en violet, l'oxydase terminale aa₃ en rouge, l'ATP synthase en jaune, le complexe bc₁ en bleu foncé et le complexe NADH1 en vert foncé. (Modifié à partir de Bird et al., 2011). 32
- Figure 13** : Schéma d'une lagune anaérobie plantée (Zipper et al., 2014). 49
- Figure 14** : Schéma d'une lagune aérobie plantée (Zipper et al., 2014) 49
- Figure 15**: Evolution of Sb(III) concentration (light grey) and Sb(V) concentration (dark grey) in batch experiment at pH 5.5 inoculated with unsterilized (biotic) or sterilized (abiotic) Auzon

soil, and in control batch experiment without soil. Arrow denotes the timing of subculture. Error bars indicate standard deviations of the mean for triplicates. 77

Figure 16: Taxonomic composition of bacterial communities at the class level (A) and at the genus level (B) in batch inoculated with microbial consortium and incubated at pH 3.5 and 0.1 mM of Sb(III) during 7 days. When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset. 78

Figure 17: Evolution of bacterial biomass in the microbial consortium according to the pH at 0.1 mM of Sb(III) (A) and according to Sb(III) initial concentration at pH 3.5 (B). 79

Figure 18: Comparison of the bacterial community structure (CE-SSCP profiles) obtained from Sb-oxidizing microbial consortium cultured at different pH : 5.5 (A), 3.5 (B) and 3.25 (C). Sb(III) concentration was 0.1 mM in all batch. Replicates are represented by different colors (blue, green and black). 80

Figure 19: Comparison of the bacterial community structure (CE-SSCP profiles) obtained from microbial Sb-oxidizing consortium cultured at pH 3.5 and at different Sb(III) initial concentrations : 0.1 (A), 1 (B), 5 (C), 10 (D), 50 (E) and 100 mM (F). Replicates are represented by different colors (blue, green and black). 81

Figure 20: Evolution of (A) dissolved Sb(III) (solid black lines) and Sb(V) concentrations (dashed black lines) during growth of microbial consortium (solid grey lines) in biotic batch (circle), (B) in abiotic batch (square), control batch (triangle) and (C) pH. Error bars indicate standard deviations of the mean for biotic triplicates and analytical error (5%) for abiotic and control conditions. Experiments were conducted at pH 3.5 and 0.1 mM initial Sb concentration. 83

Figure 21: Comparison of the bacterial community structure (CE-SSCP profiles) obtained from microbial consortium at the beginning (A) and the end (B) of the experiment assessing the ability to oxidize 0.1 mM of Sb(III) at acid pH (3.5). Replicates are represented by different colors (blue, green and black). 84

Supplementary figure S22: Sb(III) (light grey) and Sb(V) concentrations (black grey) in fresh and frozen samples collected at day 8 during Sb(III) oxydation kinetic performed at pH 3.5 and 0.1 mM Sb(III). Error bars indicate standard deviations of the mean for biotic triplicates and analytical error (5%) for abiotic and control conditions. 88

Supplementary figure S23: Evolution of eukaryotic biomass from microbial consortium according to the pH at 0.1 mM of Sb(III) (A). Evolution of eukaryotic biomass from microbial consortium according to Sb(III) initial concentration at pH 3.5 (B). 89

Figure 24: Schematic representation of the upflow anaerobic fixed-bed bioreactor (A). Picture of the column with filling material and yellow biogenic precipitates (B). 97

Figure 25: pH variations of inlet and outlet waters represented by white and black circles respectively (A). Histogram of pH vertical-profiles at the end of each phase in the column bioreactor (B); the white circles represent the average pH of inlet and outlet waters along each phase, and the error bars indicate standard deviations of the mean for three measurements for each feed condition. 101

Figure 26: Vertical profiles of dissolved arsenic (A) and antimony (B) concentrations in the column bioreactor at the end of each phase (data missing for the Sb concentration in the inlet water in phase 1), the error bars indicate analytical error (2%). The white circles represent the average As and Sb concentrations of inlet and outlet waters for each phase, and the error bars

indicate standard deviations of the mean for three measurements for each feed condition. The figure 3C represent a close up view of the figure 3B. 102

Figure 27: Vertical profiles of dissolved iron (A) and sulfur (B) concentrations in the column bioreactor at the end of each phase, with error bars that indicate analytical error (2%). The white circles represent the average Fe and S concentrations of inlet and outlet waters for these phases, and the error bars indicate standard deviations of the mean for three measurements for each feed condition. 103

Figure 28: SEM image in backscattering electron mode showing different spots on the bioprecipitate collected at the surface of filled material (bottom zone of the column bioreactor) at the end of experiment. The EDS spectra of each spot shows the main occurrence of As and S signals. 103

Figure 29: SEM image in backscattering electron mode showing a bacterial cell embedded in the bioprecipitate collected at the end of the experiment in the surface of filled material (middle zone of the column bioreactor) (A). EDS spectra of the Sb-As-S bearing phase (B). 104

Figure 30: Elemental map showing the distribution of chemical compounds on bioprecipitate collected at the end of the experiment (middle zone of the column bioreactor). 104

Figure 31: Spatial and temporal evolution of bacterial biomass, expressed in log₁₀ 16S rRNA gene copy numbers by ml of water collected inside the column bioreactor at the end of each phase (A). Spatial evolution of bacterial biomass associated to the solids at the end of the experiment, expressed in log₁₀ 16S rRNA gene copy numbers by g of solid (B). 105

Figure 32: Bacterial species richness in number of OTUs observed (A) and Shannon diversity index (B) in the water samples (solid lines) and solid samples (dashed lines) collected inside the reactor. 106

Figure 33: Bray-Curtis based non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination plot of samples collected at the bottom (circle), middle (triangle) and upper (square) level of the reactor during the phase 1 (light grey), 2 (dark grey) and 3 (black). Filled and dashed symbols represent respectively water and solid samples collected inside the reactor. Stress values for ordination plot were < 0.2 which indicates that these data were well-represented by the two-dimensional representation 106

Figure 34: Taxonomic composition of bacterial communities (at the genus level) in the inoculum, the water and the solid samples collected along the reactor at the end of each phases (analyses performed in triplicates except for the inoculum). When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset. 108

Figure 35: Schematic representation of the field-bioreactor composed of five trays (T = tray) adapted from Fernandez-Rojo et al. (2019) (A). Arsenic removal rates calculated from inlet and outlet dissolved As concentration and estimated hydraulic retention time and maximum Fe(II) oxidation rates estimated from analytical uncertainty on dissolved Fe(II) determination, according to Fernandez-Rojo et al. (2019) (B). 120

Figure 36: Bacterial species richness in number of OTUs observed (A) and Shannon diversity index (B) in the biogenic precipitates collected in the tray 1 (light gray) and tray 5 (black). Error bars represent standard deviation of the mean value (analyses performed in triplicates). 123

Figure 37: Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination plot of the weighted pairwise Unifrac distances of the bacterial community in the biogenic precipitates collected on the seven campaigns (the numbers indicate the days of sampling) in the tray 1 (gray) and the

tray 5 (black) of the bioreactor (analyses performed in triplicates) and in the riverbed sediment (SED) collected on day 171. Stress values for ordination plot were < 0.2 which indicates that these data were well-represented by the two-dimensional representation. 124

Figure 38: Taxonomic composition of bacterial communities (at the genus level) in the biogenic precipitates collected on the seven campaigns in the tray 1 (T1) and the tray 5 (T5) of the bioreactor (analyses performed in triplicates) and in the riverbed sediment (SED) collected on day 171. When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*), the order level (**) or the class level (***). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset. 125

Figure 39: Redundancy analysis (RDA) illustrating the relationships between the environmental variables (DO, dissolved oxygen; SO_4^{2-} , dissolved sulfate concentration; T, temperature; pH, As, dissolved arsenic concentration; Fe(II), dissolved ferrous iron concentration and the redox potential Eh) and the distribution of the major bacterial taxa in the bioprecipitates collected on the seven campaigns in the tray 1 (gray) and the tray 5 (black) of the bioreactor (only the taxa with a relative abundance $\geq 1\%$ in at least one bioprecipitate sample are included in this analysis). The analyses were performed in triplicates. The inset represents a close-up view of the center part of the RDA plot. 127

Supplementary figure S40: Rarefaction curves comparing the number of detected OTUs with the number of bacterial 16S rRNA gene sequences from the inlet waters (A) and the biogenic precipitates collected in the trays of the bioreactor (B) during the whole monitoring period. Analyses were performed in triplicates. 136

Supplementary figure S41: Taxonomic composition of bacterial communities (at the genus level) in the inlet waters during the whole monitoring period (except D115). When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*) or the class level (***). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset. Analyses were performed in triplicates. 137

Supplementary figure S42: Taxonomic composition of bacterial communities (at the genus level) in the biogenic precipitates collected on day 48 and on day 171 in all the trays (T1-T5). Analyses were performed on triplicates. When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*), the order level (**) or the class level (***). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset. 138

Supplementary figure S43: CARD-FISH photomicrographs of bacterial cells from biogenic precipitates collected at D171 (November 2016). (A) DAPI-stained cells, in blue. (B): CARD-FISH staining of *Thiomonas* Group II cells with TM1G0138 probe, in green. (C): Merged images. Scale bar = 10 μm 138

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux procaryotes ferro- et sulfo-oxydants observés dans les DMA, adapté de Johnson et Hallberg (2003, 2008) ; Hallberg, (2010) ; Volant (2012) ; Javerliat (2014) ; Johnson et al. (2014) et Chen et al. (2016).....	9
Tableau 2 : Concentrations typiques en arsenic dans les minéraux sulfurés. Modifié d'après Smedley et Kinniburgh (2002) et Fernandez (2017).....	14
Tableau 3 : Principaux minerais contenant de l'antimoine (Webmineral Mineralogy database website, 2019, http://www.webmineral.com).	16
Tableau 4 : Concentrations en thallium dans les principaux minéraux sulfurés (Karbowska, 2016).....	17
Tableau 5 : Principales caractéristiques métaboliques de souches appartenant au genre <i>Thiomonas</i> isolées à partir d'environnements miniers	37
Tableau 6 : Principales caractéristiques métaboliques de bactéries sulfato-réductrices détectées au sein de drainages miniers acides.....	38
Tableau 7 : Principales caractéristiques métaboliques de bactéries ferro-oxydantes détectées au sein de drainages miniers acides.....	39
Tableau 8 : Principes, avantages et limites des traitements actifs (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a ; Bru, 2006 ; ITRC, 2010 ; US EPA, 2015 ; Rakotonimaro, 2017 ; Moodley et al., 2018)	42
Tableau 9 : Principes, avantages et limites des traitements passifs (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a ; Bru, 2006 ; ITRC, 2010 ; US EPA, 2015 ; Rakotonimaro, 2017 ; Moodley et al., 2018)	46
Tableau 10 : Exemples de traitement de l'As en bioréacteurs en mode batch ou continu (modifié à partir de Alam et McPhedran, 2019)	53
Tableau 11 : Traitement de l'antimoine en bioréacteurs en mode batch ou continu	56
Tableau 12 : Traitement du thallium en bioréacteurs en mode batch ou continu.	58
Tableau 13 : Avantages et inconvénients de plusieurs substrats organiques utilisés pour la sulfato-réduction biologique (modifié à partir de Kaksonen et Puhakka, 2007).....	61
Table 14 : Duration of enrichment batch experiments and final pH for the different experimental conditions. The experiments were stopped when Sb(III) was not detected anymore in solution by colorimetric method.	79
Table 15 : Average values of physico-chemical parameters of feeding water for each experimental condition.....	98
Supplementary Table S16 : Average removal and concentrations of minor toxic elements from inlet and outlet waters during each phase.....	112
Table 17 : Quantification by CARD-FISH of <i>Thiomonas</i> belonging to Group I (bacteria hybridized with the oligonucleotide probe TM2G0138) and of <i>Thiomonas</i> belonging to Group II (bacteria hybridized with the oligonucleotide probe TM1G0138).	126
Supplementary Table S18 : Physico-chemical characteristics of inlet (W_{in}) and outlet (W_{out}) waters tested as environmental variables in RDA analysis (T=temperature, Eh = redox potential, DO= dissolved oxygen concentration, EC = electrical conductivity, TDS = total dissolved solid,	

SO_4^{2-} = dissolved sulfate concentration, Fe(II) = dissolved ferrous iron concentration, Fe = dissolved iron concentration, As(III) = dissolved arsenite concentration, As(V) = dissolved arsenate concentration, As = dissolved arsenic concentration) (Fernandez-Rojo et al, 2019). 135

Introduction

L'exploitation minière fait partie intégrante de l'histoire de l'humanité. Il y a déjà 450 000 ans, *Homo sapiens* recherchait des matériaux naturels, tel que le silex, nécessaires à la confection d'outils, d'armes et d'ornements (Weisgerber et Pernicka, 1995 ; Ghose, 2009). L'homme a ainsi pris conscience très tôt de l'intérêt d'exploiter les ressources minérales présentes dans le sous-sol pour améliorer sa qualité de vie.

L'exploitation à grande échelle d'un site minier finit inévitablement par cesser suite au tarissement d'un gisement ou pour des raisons économiques. L'abandon de nombreux sites miniers au cours de l'histoire, sans réhabilitation, a donc eu d'importantes conséquences environnementales. L'une de ces conséquences est la formation de drainages miniers acides (DMA), suite à l'oxydation des minéraux sulfurés contenus dans les déchets miniers stockés de manière non-adéquate. Le DMA est considéré comme l'une des pollutions aquatiques les plus graves des zones industrielles et post-industrielles dans le monde. Sans intervention, un DMA peut s'auto-entretenir pendant des siècles, aboutissant à l'acidification des cours d'eaux et la dissémination de métaux et métalloïdes toxiques dans l'environnement.

Historiquement, le traitement des drainages miniers acides le plus employé est la neutralisation via l'application de produits chimiques, tel que la chaux. Ce traitement est cependant non viable à long-terme, en raison de son coût et de ses impacts néfastes considérables au niveau climatique, économique, sanitaire et environnemental. La gestion des anciens sites miniers doit donc privilégier l'utilisation de dispositifs applicables à long terme et à moindre frais, dans une optique de développement durable.

Une alternative au traitement chimique est l'exploitation de processus microbiens naturellement impliqués dans l'atténuation des polluants présents dans les DMA. En effet, certains microorganismes, capables de se développer dans ces environnements extrêmes, modulent la toxicité et la mobilité des polluants via leur métabolisme. L'utilisation de ces processus biologiques au sein de systèmes de traitement dit passifs, c'est-à-dire sans apport de matière et d'énergie, s'avère donc une voie prometteuse pour traiter les DMA. Les traitements passifs, nécessitent moins de maintenance et produisent des boues plus stables que les procédés actifs. L'efficacité des systèmes de traitements biologiques passifs dépend de processus biotiques et abiotiques complexes en perpétuelle interaction. L'étendue de nos connaissances actuelles sur ces processus et leurs facteurs de contrôle varie en fonction des polluants.

L'arsenic (As), l'antimoine (Sb) et le thallium (Tl) sont trois éléments toxiques potentiellement présents dans les DMA. L'arsenic (As) est de loin le plus abondant dans les effluents miniers. Aussi, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre son comportement dans ces milieux et ses interactions avec les microorganismes. Des procédés biologiques de traitement utilisant des communautés microbiennes ou des souches bactériennes ont été développés afin de piéger l'arsenic présent dans les DMA. Cependant, les liens qui existent entre la dynamique des communautés, leur potentiel fonctionnel, la physico-chimie des eaux et l'efficacité des traitements demeurent mal compris. Ceci constitue à l'heure actuelle un verrou pour l'amélioration et le contrôle des performances de ces systèmes. L'antimoine et le thallium représentent des problématiques émergentes sur les sites miniers. Ces deux éléments ont été peu étudiés dans le contexte du traitement des drainages miniers acides. Les processus

biogéochimiques et les communautés microbiennes impliquées dans l'atténuation de ces polluants doivent donc être mieux caractérisés afin de proposer des traitements biologiques adaptés.

Cette thèse a pour objectif de contribuer au développement de systèmes de traitement biologique passif des drainages miniers acides contenant de l'arsenic, de l'antimoine et/ou du thallium. Deux objectifs scientifiques distincts ont été poursuivis en fonction du niveau de développement inégal de ces systèmes selon le polluant visé :

Pour l'antimoine et le thallium, l'objectif était d'améliorer nos connaissances sur les transformations directes ou indirectes du Sb et du Tl par les microorganismes dans les DMA, afin d'évaluer la possibilité de traiter ces polluants par des procédés passifs basés sur des processus microbiens.

Pour l'arsenic, l'objectif était de mieux caractériser l'effet de facteurs physico-chimiques sur la diversité et la structure des communautés bactériennes impliquées dans la remédiation de l'As, pour qu'à terme, ces travaux contribuent à améliorer les performances des traitements passifs des drainages miniers acides arséniés.

A cet effet, une synthèse des connaissances concernant le comportement de l'As, du Sb et du Tl dans les drainages miniers acides et leurs interactions avec les microorganismes a été réalisée. Elle fait l'objet du **chapitre I** de ce manuscrit. Cet état de l'art a permis de concevoir une approche expérimentale permettant d'aborder certains des verrous associés au développement de méthodes de bioremédiation adaptées à ces éléments.

Les résultats de ce travail expérimental sont présentés dans les chapitres II, III et IV sous la forme d'articles scientifiques.

Le **chapitre II** présente les résultats d'expérimentations en laboratoire visant à évaluer la capacité d'un consortium microbien à tolérer et oxyder l'antimoine en condition acide typique de DMA.

Le **chapitre III** porte sur l'élimination simultanée de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium au sein d'un bioréacteur à flux continu de laboratoire traitant un DMA par sulfato-réduction.

Le dernier volet expérimental de cette thèse, objet du **chapitre IV**, présente les résultats d'une expérimentation utilisant un pilote de traitement à flux continu implanté sur le terrain et alimenté par un DMA réel, riche en arsenic. L'objectif est d'étudier la dynamique spatio-temporelle des communautés bactériennes qui se développent au sein du pilote, en lien avec les variations de la physico-chimie des eaux et des précipités.

La synthèse des avancées obtenues suite à ces expérimentations conclue finalement ce manuscrit, avec une ouverture sur leurs applications pour le développement de nouvelles stratégies de bioremédiation des sites miniers et de nouvelles perspectives de recherches.

Chapitre I :

De la formation des DMA à leur bioremédiation

1. Drainages miniers acides (DMA) : origine et impacts

1.1. Formation des drainages miniers acides

1.1.1. Définition et caractéristiques d'un drainage minier acide

L'exploitation minière a été et représente toujours une activité indissociable du développement industriel et technologique humain. Cependant, à chaque étape d'un projet minier, de la prospection minérale jusqu'à l'après-mine, sont associés un ou plusieurs impacts écologiques. Les séquelles environnementales majeures sont dues à la gestion et au stockage des déchets miniers (ELAW, 2010). Lottermoser (2010) estime une production annuelle mondiale des déchets miniers solides de 20 à 25 milliards de tonnes. Ces résidus miniers sont riches en minéraux sulfurés, métaux et métalloïdes parfois toxiques. Lors d'un stockage inadapté, l'air et le sol peuvent être contaminés par la dispersion de poussières, tandis que les eaux souterraines ou de surface peuvent être polluées par le lessivage de ces déchets (Hudson-Edwards et al., 2011). La dispersion de métaux et métalloïdes, due aux activités minières, dans les écosystèmes terrestres, aquatiques et atmosphériques a été estimée à plusieurs millions de kilogrammes par an (Nriagu et Pacyna, 1988). Il est possible de limiter cette dispersion en améliorant les conditions de stockage des déchets miniers. Cependant, dans le cas d'anciens sites miniers ayant généré des déchets riches en sulfures, les conditions de stockage inadaptées conduisent à la formation de drainages miniers acides (DMA) capables de s'auto-entretenir pendant des siècles (Modis et al., 1998).

Le drainage minier acide est un type de pollution des cours d'eau superficiels produit lors du contact des minerais sulfurés présents dans les roches mises à nue par l'exploitation minière ou dans les déchets miniers riches en sulfures avec l'air et l'eau. Le DMA est caractérisé par un pH faible (~3) et une forte teneur en sulfates (jusqu'à 4,9 g/L), fer (jusqu'à 1,7 g/L) et autres métaux et métalloïdes (Casiot et al., 2004) (Fig.1). Il produit des effets délétères sur les êtres vivants dans les milieux aquatiques exposés à ces pollutions (Hogsden et Harding, 2012). C'est pourquoi les DMA sont considérés comme une des pollutions aquatiques les plus graves des zones industrielles et post-industrielles dans le monde (Johnson, 1995). En 2005, Johnson et Halberg ont estimé que 19 300 km de rivières, 72 000 hectares de lacs et réservoirs d'eau douce étaient sévèrement impactés par les effluents miniers à l'échelle mondiale.

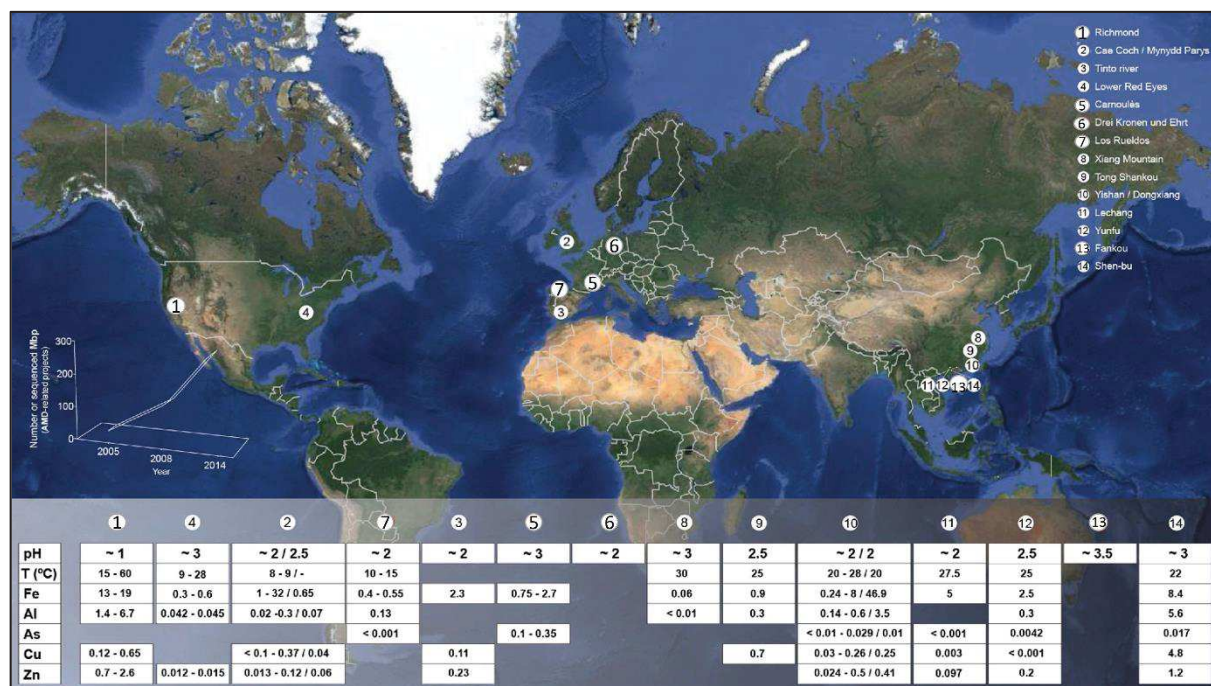
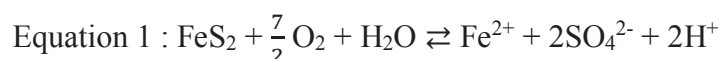


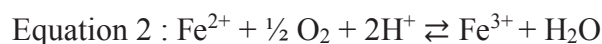
Figure 1 : Localisation et caractéristiques physico-chimiques de quelques drainages miniers acides à travers le monde. Certaines caractéristiques physico-chimiques n’ont pu être renseignées faute de données (Méndez-García et al., 2015).

1.1.2 Processus géochimiques à l’origine des drainages miniers acides

L’oxydation des minerais sulfurés produit de l’acide sulfurique et mobilise les métaux, aboutissant à la formation des DMA. La pyrite (FeS₂) est le minéral sulfuré le plus abondant. Les réactions de son oxydation directe et indirecte ont été largement décrites (Evangelou, 1995 ; Lawson, 1982 ; Singer et Stumm, 1970 ; Moses et al., 1987 ; Baker et Banfield, 2003 ; Akcil et Koldas, 2006). A pH proche de la neutralité, la pyrite subit une oxydation directe et lente par l’oxygène selon l’équation suivante :



Cette première oxydation aboutit à la libération de fer ferreux [Fe(II)] et d’acide sulfurique (H₂SO₄) diminuant le pH. En condition oxydante, le fer ferreux est oxydé en fer ferrique [Fe(III)] selon l’équation 2 :



Le Fe(III) produit oxydera à son tour la pyrite lorsque le pH est inférieur à 4 (Nordstrom et Alpers, 1999) :



Cette oxydation indirecte de la pyrite est 10 à 100 fois plus rapide que l’oxydation directe (équation [1]) (Ritchie, 1994). Elle génère du Fe(II) qui sera lui-même oxydé selon l’équation 2, en particulier à travers les processus biologiques décrits dans la partie suivante. Un procédé cyclique s’établit alors entre les équations 2 et 3 aboutissant à l’auto-entretien des DMA. Pour arrêter ce cycle, il faudrait isoler les réactifs de l’oxygène ou bien augmenter le pH. En effet, le Fe(III) précipite par exemple sous forme d’hydroxyde (Fe(OH)₃) et d’oxyhydroxyde (FeOOH) de fer lorsque le pH du milieu est supérieur à 5 :



Ces précipités brun-jaune sont à l'origine de la couleur et des concrétions laminées caractéristiques des DMA, illustrées par la figure 2. Cependant, la précipitation du fer reste provisoire, car la libération de protons (H^+) lors de ces hydrolyses diminue le pH et rétablit ainsi le procédé cyclique.

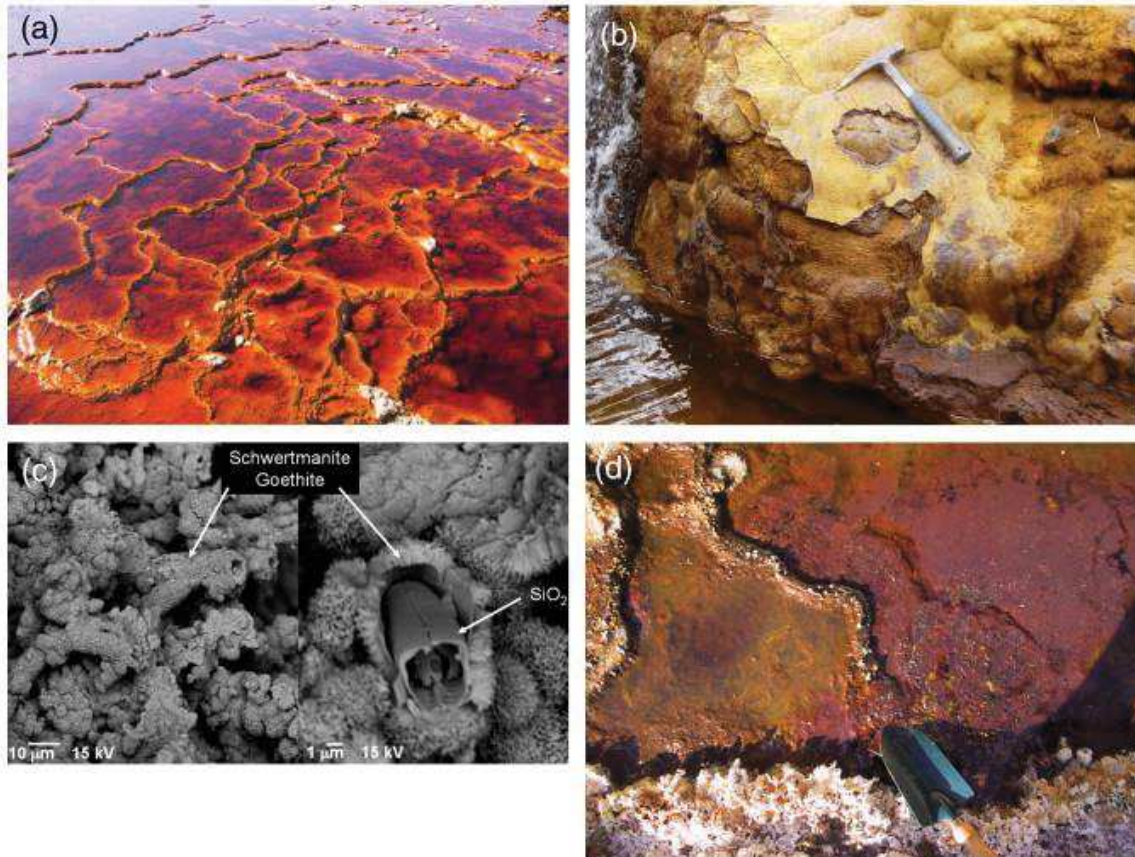


Figure 2 : Photographies montrant les différents faciès des précipités de fer : formation de concrétions laminées (a) et déshydratées (b); une vue en microscopie électronique à balayage des bactéries et des diatomées dans les concrétions laminées (c); croûte ferrugineuse à la surface d'eau stagnante (d) (Egal et al., 2008).

1.1.3. Biolixiviation

Des processus biologiques, nommés biolessivage ou biolixiviation, contribuent à la formation et au maintien des DMA. Les déchets miniers représentent une niche écologique pour une diversité de microorganismes acclimatés aux conditions extrêmes des DMA. La plupart de ces microorganismes sont impliqués dans le cycle du fer et du soufre (Schippers et al., 2010). Ils agissent comme des catalyseurs des réactions chimiques ayant lieu à la surface des minéraux et en solution (cf. chapitre précédent).

Les microorganismes capables d'oxyder le fer sont généralement favorisés par les concentrations en fer élevées dans les DMA. C'est pourquoi ces milieux contiennent de nombreux microorganismes qui tirent leur énergie de l'oxydation du Fe(II) en Fe(III). La première bactérie capable d'oxyder le fer ayant été isolée de DMA est *Acidithiobacillus*

ferrooxidans. D'autres bactéries ainsi que des archées ferro-oxydantes ont par la suite été recensées (Tableau 1). Leur activité accélère la formation des DMA. En effet, elle permet la régénération du fer ferrique à pH acide (équation 2), nécessaire à l'oxydation indirecte de la pyrite. Cette régénération est thermodynamiquement favorable, mais elle est très lente voire négligeable à un pH inférieur à 4 (Stumm et Morgan 1981 ; Baker et Banfield, 2003 ; Johnson et Hallberg, 2005a). A un tel pH, l'oxydation microbienne du fer est jusqu'à 10^5 fois plus rapide que son oxydation abiotique (Singer et Stumm, 1970). La dissolution de la pyrite suite à l'oxydation microbienne du fer ferreux en fer ferrique correspondrait à un mécanisme indirect. Cependant d'autres études supposent une catalyse directe. Cette hypothèse s'appuie sur la nécessité d'une proximité entre les microorganismes et la surface de la pyrite pour favoriser sa dissolution (Larsson et al., 1993 ; Edwards et al., 1998 et 1999 ; Fowler et al., 1999 ; Edwards et al., 2000 et 2001). Ces résultats suggèrent donc une attaque enzymatique de la pyrite par les bactéries liées à sa surface via la présence de substances polymériques extracellulaires (EPS). Cette hypothèse ne fait cependant pas consensus. Le débat reste donc ouvert concernant les détails du mécanisme (ou des mécanismes) de la biolixiviation (Baker et Banfield, 2003 ; Srichandan et al. 2019).

Certains procaryotes, tels qu'*Acidithiobacillus ferrooxidans*, sont aussi capables d'oxyder des produits soufrés intermédiaires de l'oxydation de la pyrite. L'ensemble de ces procaryotes sulfo-oxydants, présentés dans le tableau 1, facilite l'acidification et donc la génération du DMA (Lindsay et al., 2015).

Tableau 1 : Principaux procaryotes ferro- et sulfo-oxydants observés dans les DMA, adapté de Johnson et Hallberg (2003, 2008) ; Hallberg, (2010) ; Volant (2012) ; Javerliat (2014) ; Johnson et al. (2014) et Chen et al. (2016)

Phylum/Classe	Genre/Espèce	Oxydation	
		Fe	S
<i>Proteobacteria</i>			
<i>α-proteobacteria</i>	<i>Acidiphilium acidophilum</i>		+
	<i>Acidiphilium angustum</i>		+
	<i>Acidiphilium cryptum</i>		+
	<i>Acidiphilium multivorum</i>		+
	<i>Acidocaldus organivorans</i>		+
<i>β-proteobacteria</i>	<i>Ferrovum myxofaciens</i>	+	
	<i>Gallionella ferruginea</i>	+	
	<i>Thiomonas</i> spp.	+	+
<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Acidithiobacillus caldus</i>		+
	<i>Acidithiobacillus ferridurans</i>	+	+
	<i>Acidithiobacillus ferriphilus</i>	+	+
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	+	+
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	+	+
	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		+
	<i>Halothiobacillus</i> spp.		+
<i>Actinobacteria</i>			
	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	+	
	<i>Acidithrix ferrooxidans</i>	+	
	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	+	
	<i>Ferrithrix thermotolerans</i>	+	
<i>Nitrospirae</i>			
	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	+	
	<i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i>	+	
	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	+	
<i>Firmicutes</i>			
	<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>		+
	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	+	+
	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	+	+
	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	+	+
<i>Aquificae</i>			
	<i>Hydrogenobaculum acidophilum</i>		+
<i>Crenarchaeota</i>			
	<i>Acidanus brierleyi</i>	+	+
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>		+
	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	+	+
	<i>Sulfolobus metallicus</i>	+	+
	<i>Metallosphaera sedula</i>	+	+
<i>Euryarchaeota</i>			
	<i>Acidiplasma aeolicum</i>	+	
	<i>Acidiplasma cupricumulans</i>	+	
	<i>Ferroplasma acidamanus</i>	+	
	<i>Ferroplasma acidphilum</i>	+	

1.2. Conséquences des drainages miniers acides

Au total, 4303 articles scientifiques traitant des DMA ont été recensés sur la base de données Scopus entre 1980 et 2016. Or, seulement 8 % de ces derniers ont été publiés avant 1994. Cette analyse effectuée par Kefeni et al. en 2017 illustre une prise de conscience tardive des conséquences de la formation d'un DMA. L'acidification et la libération d'éléments toxiques dans l'environnement, lors de la formation des DMA, sont à l'origine de la pollution des écosystèmes. Les conséquences sont à la fois écologiques, sanitaires et socio-économiques. De plus, un DMA peut s'auto-entretenir pendant des siècles si aucune stratégie de remédiation n'est appliquée (Modis et al., 1998).

1.2.1. Impact écologique

La biodiversité réduite observée dans les DMA est due à la fois à l'acidité et à la présence de polluants dans ces milieux extrêmes. Au niveau cellulaire, l'acidification des systèmes aquatiques provoque une altération des membranes et des composants internes pouvant mener à la lyse cellulaire (Carlson-Gunnoe et al., 1983 ; Wortman et al., 1986). Plusieurs métaux et métalloïdes présents dans les DMA sont hautement toxiques. Leur similarité structurale avec des nutriments essentiels au métabolisme, comme l'arsenic avec le phosphate et le glycérol, leur permet de pénétrer dans les cellules et d'interagir avec certaines fonctions métaboliques (Kelly, 1988 ; Tessier et al., 1982 ; Tyler et al., 1989). Plusieurs études signalent l'accumulation des métaux et métalloïdes par les plantes aquatiques et terrestres, par les organismes benthiques et par les animaux suite à une pollution par des effluents miniers acides (Kelly, 1988 ; Tessier et al., 1982 ; Tyler et al., 1989 ; Cain et al., 2000 ; Besser et al., 2001 ; Greig et al., 2010). La figure 3, issue de Gray, 1997, liste plusieurs des impacts métaboliques et physiologiques des DMA sur les organismes. Cette étude note aussi une dégradation physique, chimique et écologique des habitats incompatibles avec la vie. Par exemple, la coloration et les colloïdes des drainages miniers acides augmentent la turbidité qui impacte la photosynthèse et obstrue les branchies des poissons. Les précipités d'oxydes de fer recouvrent le lit des cours d'eau altérant l'habitat des êtres vivants (substrat instable, perte de niche écologique, toxicité des sédiments, augmentation du débit et réduction de la turbulence) (Hoehn et Sizemore, 1977 ; Gray, 1997).

Les DMA induisent une perturbation de la structure des communautés et des réseaux trophiques (Gray, 1997). La structure des communautés microbiennes est réduite à un nombre limité d'espèces dont les capacités métaboliques sont adaptées aux conditions extrêmes de ces environnements (Baker et Banfield, 2003 ; Lear et al., 2009). Les producteurs primaires sont impactés par la destruction des ions carbonates et bicarbonates à pH acide, car ils les utilisent comme source de carbone inorganique (Kelly, 1988). Ainsi, les conditions extrêmes des DMA entraînent une baisse de la productivité primaire (plantes aquatiques) et une réduction de la diversité et des concentrations de phytoplancton, de zooplancton et du benthos (Niyogi et al., 1999 ; Cherry et al., 2001 ; Battaglia et al., 2005 ; Bray et al., 2008 ; Hogsden et Harding, 2012). Plusieurs études ont montré un impact significatif des DMA sur la vie piscicole amenant à une réduction ou suppression totale des populations de poissons (Sullivan et Gray, 1992 ; Rutherford et Mellow, 1994 ; Besser et al., 2001 ; Greig et al., 2010). C'est pourquoi, ces études

suggèrent l'utilisation des poissons et des macroinvertébrés comme bioindicateurs de la pollution induite par les DMA (Gray, 1997 ; Gray et Delaney, 2008 ; He et al., 2015).

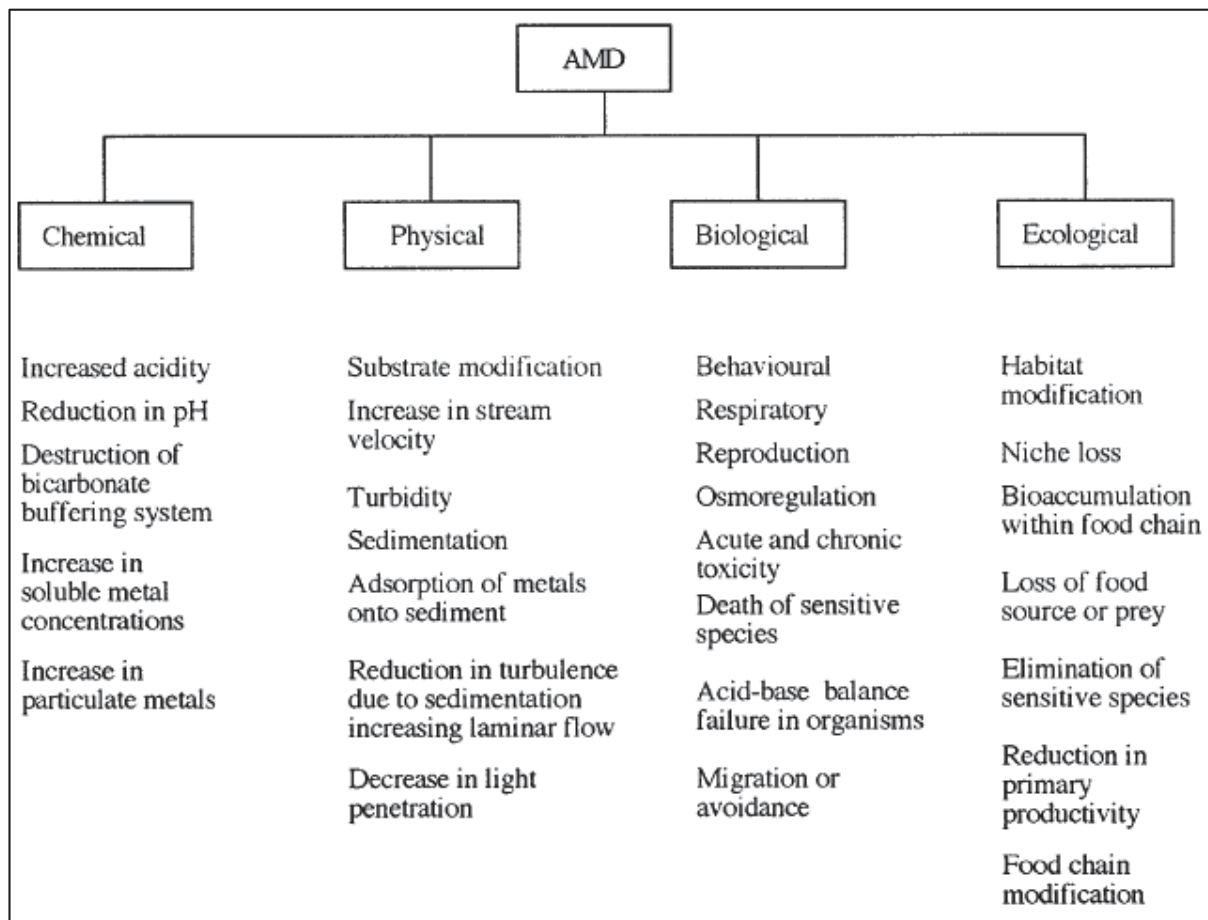


Figure 3 : Les principaux impacts des DMA sur un système lotique (Gray, 1997)

1.2.2. Impact sur la santé humaine

Les DMA peuvent dégrader la qualité des eaux souterraines (Lottermoser, 2003) et de celles destinées à la consommation humaine (Rojas et Vandecasteele, 2007 ; Chen et al., 2007 ; McCarthy et Humphries, 2013). Un autre risque sanitaire concerne la contamination via la chaîne alimentaire quand les cultures sont situées à proximité ou irriguées avec un DMA (Lin et al., 2005 ; Garrido et al., 2009 ; Choudhury et al., 2017).

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la santé est un état de complet bien-être physique, mental et social, et ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité. C'est pourquoi l'impact des DMA sur la santé des populations ne peut être évalué seulement par rapport à un état physiologique. Des enquêtes sociales menées sur les populations vivant à proximité des DMA mettent en évidence une inquiétude et un mal-être vis-à-vis du danger que représentent les rejets miniers (Dogaru et al., 2009 ; Obiri et al., 2016 ; Moeng, 2018). Dans certains cas, l'existence de DMA peut causer un déplacement des populations (Hobbs et al., 2008).

1.1.1. Impact économique

Les DMA limitent aussi d'autres usages des cours d'eau comme les activités récréatives, de pêche, d'agriculture et industrielles. Down et Stocks estimaient déjà en 1977 un impact sur les zones de pêches et de récréation sur plus de 21 000 km de lacs et rivières. En conséquence, l'économie liée au tourisme peut en être affectée. Les terres proches des DMA peuvent aussi devenir inaptes à l'agriculture, soit via l'irrigation, soit par une baisse de productivité ou encore une accumulation de polluants dans les cultures (Lin et al., 2005 ; Garrido et al., 2009 ; Choudhury et al., 2017). Au niveau financier, la gestion des anciens sites miniers et de leurs résidus représente un coût significatif. Le montant des dépenses liées aux DMA en Australie est estimé approximativement à 80 millions de dollars annuel, voir plus de 1 000 millions de dollars sur 15 ans. Des montants similaires sont rapportés pour le Canada, les Etats-Unis et d'autres pays (Hobbs et al., 2008). En France, la gestion opérationnelle de sécurité après mine est assurée depuis 2006 par le Département Prévention et Sécurité Minière (DPSM) du Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM). Un budget de l'ordre de trente millions d'euros lui est accordé par le Ministère de l'Environnement pour mener cette mission. Le DPSM réalise chaque année entre 20 et 30 projets de travaux au titre de maître d'ouvrage délégué et assure la gestion de plus de 1850 ouvrages, implantés sur des sites miniers abandonnés à travers tout le territoire national (Charles et al., 2017).

2. Métaux et métalloïdes au sein des drainages miniers acides : cas de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium

2.1. Présence et toxicité

De nombreux métaux et métalloïdes sont présents dans les drainages miniers acides, tels que le Pb, Sb, As, Bi, Cu, Co, Ni, Zn, Au, Ag, Se, et le Te (Deditius et al., 2011). Les présents travaux de thèse s'intéressent plus particulièrement à trois polluants d'intérêt prioritaire selon le conseil de l'union européenne et l'agence américaine de protection de l'environnement (Council of the European Communities, 1976 ; US EPA, 1982): l'arsenic (As), l'antimoine (Sb) et le thallium (Tl).

2.1.1. Arsenic

L'arsenic (As) est le 20^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre. Sa concentration y varie entre 2 et 5 mg/kg (Taylor et McLennan, 1985). Sa présence dans les autres compartiments environnementaux provient à la fois de sources naturelles (altération des roches, éruptions volcaniques, sources thermales et feux de forêt) et anthropiques. Au cours du siècle dernier, les composés arséniés ont été utilisés dans de nombreux produits et procédés industriels (*e.g.* pesticides, préservation du bois, tannerie, fabrication du verre et de produits électroniques). Ces activités agricoles, industrielles et minières ont largement contribué à la libération de l'arsenic dans l'environnement (Bissen et Frimmel, 2003).

La toxicité de cet élément est reconnue. De façon générale, l'arsenic inorganique présente une toxicité aigüe plus importante que les espèces organiques, et l'arsénite [As(III)] est plus toxique que l'arséniate [As(V)] (Baker et al., 2018). Cette toxicité s'explique par la similarité structurale de l'arséniate avec le phosphate et de l'arsénite avec le glycérol qui leur permet de rentrer dans les cellules respectivement via les transporteurs du phosphate et les aquaglycéroporines (Rosen et Liu, 2009). A l'intérieur des cellules, l'arsenic interagit avec des protéines et inhibe des réactions métaboliques essentielles à la vie (Goyer et Clarkson, 2001). L'exposition chronique à l'arsenic via l'eau de boisson est à l'origine d'une variété de pathologies incluant des cancers, comme l'illustre la crise sanitaire survenue au Bangladesh suite à la pollution arsénifiée des eaux d'alimentation (Hossain, 2006). C'est pourquoi la norme de qualité des eaux destinées à la consommation humaine a été fixées à 10 µg/L et la norme de qualité environnementale à 4,2 µg/L au-dessus du bruit de fond géochimique (Décret n° 2001-1220 ; Directive 98/83/CE ; valeur guide OMS ; Directive 2000/60/CE).

Les DMA représentent une menace pour les ressources en eau car ils peuvent contenir des dizaines voire des centaines de mg/L d'arsenic dissous (Williams, 2001 ; Casiot et al., 2003). La libération de l'arsenic dans les DMA dépend de l'altération et de la teneur initiale en As des minéraux (mécanisme décrit dans la section 1.1.2 via l'exemple de la pyrite) (Tableau 2). A cause d'une affinité géochimique entre l'arsenic et le soufre (élément chalcophile), il existe plus de 156 minéraux sulfurés associés à l'arsenic ; ceux-ci sont recensés dans la base de données Mindat (Paikaray, 2015). Les sulfures d'arsenic les plus fréquents au niveau des sites miniers sont la pyrite arsénifère (FeS₂-As), l'arsénopyrite (FeAsS), le réalgar (As₂S₂), l'orpiment

(As₂S₃), la cobaltite (CoAsS), l'énargite (Cu₃AsS₄), et la tennantite [(Cu,Ag;Zn,Fe)₁₂(As,Sb)₄S₁₃] (Paikaray, 2015).

Tableau 2 : Concentrations typiques en arsenic dans les minéraux sulfurés. Modifié d'après Smedley et Kinniburgh (2002) et Fernandez (2017).

Minéral	Formule chimique	Concentration As (mg/kg)
Réalgar	As ₄ S ₄	701 000
Orpiment	As ₂ S ₃	610 000
Arsénopyrite	FeAsS	460 000
Gersdorffite	NiAsS	453 000
Cobaltite	CoAsS	452 000
Tennantite	(Cu, Fe) ₁₂ As ₄ S ₁₃	203 000-216 000
Enargite	Cu ₃ AsS ₄	191 000
Marcasite	FeS ₂	20-126 000
Pyrite	FeS ₂	100-77 000
Sphalérite	ZnS	5-17 000
Galène	PbS	5-10 000
Chalcopyrite	CuFeS ₂	10-5 000
Pyrrhotite	Fe _(1-x) S	5-100

L'arsenic rejeté dans les eaux de surface par les activités minières est actuellement quantifié au niveau national pour 8 sites miniers sur 55 répertoriés sur le SIG Mines du BRGM (Manlius et al., 2009). Cependant, d'après l'inventaire minéralogique et géochimique mené sur 330 sites miniers (Greffié et al., 2004), jusqu'à 65 gisements sont susceptibles d'induire une pollution arsénisée sur le territoire métropolitain (Fig. 4).

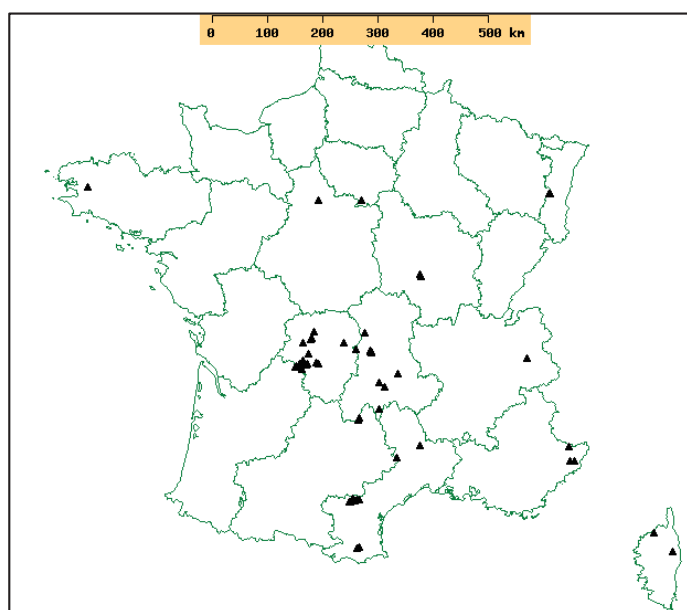


Figure 4 : Carte des mines ayant extrait des minerais arséniés, représentées par des triangles noirs, en France métropolitaine d'après le site sigminesfrance.brgm.fr

2.1.2. Antimoine

L'antimoine et l'arsenic sont deux analogues structuraux. Naturellement, la concentration en antimoine dans les eaux douces est inférieure au $\mu\text{g/L}$ et de quelques $\mu\text{g/g}$ pour les sédiments (Filella et al., 2002a). Cependant, des analyses de carottes de glace et de tourbes ont montré une importante augmentation des rejets d'antimoine dans l'environnement durant les deux derniers siècles (Shotyk et al., 2005 ; Krachler et al., 2005). Cette augmentation est due à un important usage industriel de ce composé, dont la consommation est répartie de la façon suivante : 52 % comme retardateur de flamme, 38 % comme alliage du plomb et comme composé des batteries au plomb, 6 % comme catalyseur dans la production du polyéthylène téréphtalate (PET), et moins de 3 % pour la chimie et la céramique. La demande importante en antimoine en fait un métalloïde critique dont les réserves pourraient être épuisées d'ici une décennie (Dupont et al., 2016). Cette situation fait de l'antimoine à la fois un problème économique et environnemental émergent.

L'antimoine présente une toxicité aiguë dont le tableau clinique ressemble très fortement à celui d'une intoxication arsenicale (Lauwers et al., 1990). Tout comme l'arsenic, les formes trivalentes de l'antimoine sont plus toxiques que celles pentavalentes avec une toxicité moindre des espèces organiques par rapport aux inorganiques (Filella et al., 2007 ; Herath et al., 2017). Cette toxicité semble être due à des interactions avec les groupements thiols du glutathion et des protéines (Sun et al., 2000). Cependant, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires d'adsorption et de toxicité chez l'Homme doivent encore être approfondis. De même, le nombre limité d'études réalisées à ce jour ne permet pas de statuer quant à sa toxicité chronique. Même si plusieurs de ces études suggèrent la génotoxicité et la cancérogénicité de l'antimoine et de ses dérivés (Cooper et al., 1968 ; Potkonjak et Pavlovich, 1983 ; El Shanawany et al., 2017), seul le trioxide d'antimoine est actuellement considéré comme un cancérogène potentiel par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer). La concentration en Sb dans l'eau potable a donc été limitée à $5 \mu\text{g/L}$ (Décret n° 2001-1220 ; Directive 98/83/CE).

Les activités minières ont constitué la principale source anthropique de rejet d'antimoine dans les sols et les eaux au cours du dernier siècle (Guo et al., 2014a). Sur les sites miniers, la quantité d'antimoine libérée dépend du type de gisements présents. Comme l'arsenic, l'antimoine est un élément chalcophile. Le plus commun des minerais sulfurés d'antimoine est la stibnite, aussi appelée stibine et plus rarement antimoonite (Sb_2S_3). Il est fréquemment associé à des minéraux secondaires dont les plus fréquents sont, dans l'ordre : la bindheimite ($\text{Pb}_2\text{Sb}_2\text{O}_7$), la stibiconite ($\text{Sb}_3\text{O}_6\text{OH}$), la valentinite (Sb_2O_3), la cervantite (Sb_2O_4), la kermesite ($\text{Sb}_2\text{S}_2\text{O}$) et la sénarmontite (Sb_2O_3) (Roper et al., 2012 ; Multani et al., 2016). Le tableau 3 présente le pourcentage d'antimoine dans la composition chimique de ces principaux minerais.

Tableau 3 : Principaux minerais contenant de l'antimoine (Webmineral Mineralogy database website, 2019, <http://www.webmineral.com>).

Minéral	Formule chimique	Sb (mg/kg)
Sénarmontite	Sb_2O_3	884 000
Valentinite	Sb_2O_3	835 000
Cervantite	Sb_2O_4	792 000
Stibiconite	Sb_3O_6OH	764 000
Kermesite	Sb_2S_2O	752 000
Stibnite/Stibine/Antimonite	Sb_2S_3	716 800
Bindheimite	$Pb_2Sb_2O_7$	316 000

Les gisements susceptibles d'induire une pollution de l'environnement à l'antimoine représentent 100 sites sur l'ensemble du territoire métropolitain, soit 1/3 des exploitations inventoriées (Greffié et al., 2004) (Fig. 5).

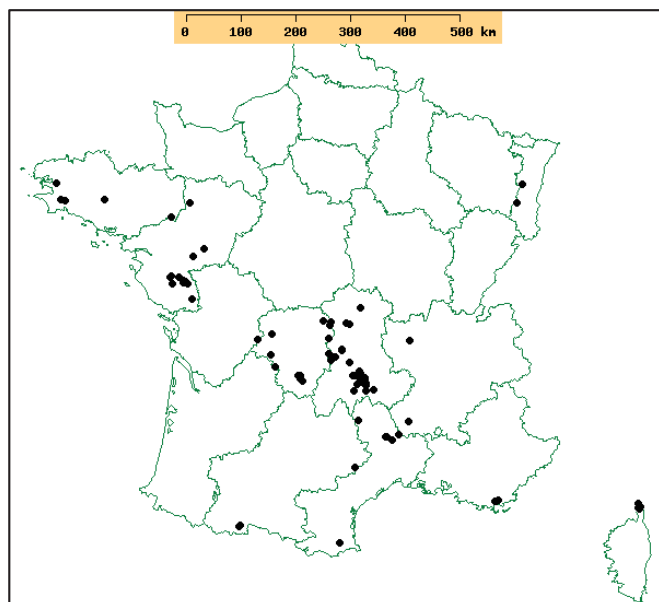


Figure 5 : Carte des mines ayant extrait des minerais d'antimoine, représentées par des points noirs, en France métropolitaine d'après le site sigminesfrance.brgm.fr

2.1.3. Thallium

Le thallium est un élément naturellement peu abondant dans l'environnement. Sa concentration dans les roches, la croûte continentale ou océanique est généralement inférieure à 1 $\mu\text{g/g}$ (Belzile et Chen, 2017). Cependant, l'utilisation anthropique du thallium a augmenté depuis sa découverte en 1861 par William Crookes. Son utilisation dans de nombreux produits de consommation (*e.g.* crèmes dépilatoires, pesticides et traitements médicaux) au début du XX^{ème} siècle a été rapidement interdite à cause de sa toxicité (Nriagu, 1998). Aujourd'hui, il est encore largement utilisé dans des domaines comme les hautes technologies (*e.g.* cellules photoélectriques) ou la médecine (Belzile et Chen, 2017). Cette utilisation entraîne une émission industrielle de Tl dans l'environnement estimée entre 2000 à 5000 tonnes par an (Kazantzis, 2000). Or des problèmes de santé publique liés à une exposition au Tl ont été détectés dans les régions minières en Chine et en Italie (Zhou et al., 2008 ; Campanella et al.,

2016). Même si ces contaminations restent locales, le thallium est considéré par principe de précaution comme un polluant émergent au vu de sa consommation croissante et de sa haute toxicité.

Cette toxicité est équivalente voire supérieure à celles de l'arsenic, du mercure, du cadmium, du plomb et du cuivre (Peter et Viraraghavan, 2005 ; Rodríguez-Mercado et Altamirano-Lozano, 2013). Elle s'explique notamment par sa capacité à remplacer le potassium dans les systèmes biologiques, mais les mécanismes liés à cette toxicité ne sont pas encore pleinement élucidés (Karbowska et Zembrzuski, 2016 ; Cvjetko et al., 2010). Le Tl(I) serait plus toxique que le Tl(III) pour les humains et les mammifères selon des tests toxicologiques, alors que le Tl(III) serait plus toxique pour certaines espèces d'algues et d'invertébrés aquatiques (Rodríguez-Mercado et Altamirano-Lozano, 2013). Malgré sa toxicité, aucune norme de qualité environnementale, limite ou référence de qualité dans les eaux de consommation n'est actuellement fixée en France. En effet, l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, l'environnement et du travail) et l'EPA (Environmental Protection Agency) s'accordent sur le fait que les données existantes sur la toxicité chronique du thallium ne permettent pas de conclure quant à son caractère cancérigène, génotoxique et reprotoxique (US EPA, 2009 ; ANSES, 2012).

Dans les résidus miniers, le thallium est souvent associé aux gisements de sulfure de métaux de base (Zn, Pb, Cu), tels que la pyrite (FeS_2), la marcasite (FeS_2), ou encore la sphalérite (ZnS), dont les concentrations peuvent dépasser la centaine de mg/kg de solide (Tableau 4) (Karbowska, 2016). Parmi ces gisements de sulfures, 11 présentent des quantités notables de thallium à l'échelle nationale (Greffié et al., 2004).

Tableau 4 : Concentrations en thallium dans les principaux minéraux sulfurés (Karbowska, 2016)

Minéral	Formule chimique	Concentration Tl (mg/kg)
Pyrite	FeS_2	800–1200
Marcasite	FeS_2	> 1000
Sphalérite	ZnS	36-500

2.2. Spéciation et comportement

2.2.1. Spéciation de l'As, du Sb et du Tl en solution

La toxicité de l'As, du Sb et du Tl et leur mobilité dans le milieu aquatique dépendent de leur spéciation chimique. Un point commun à ces trois éléments est que leur spéciation est gouvernée par des processus rédox dont les facteurs clés sont le pH et le potentiel rédox (Eh). Les diagrammes Eh-pH de chacun de ces éléments sont représentés dans les figures 6, 7 et 8. Ils permettent de visualiser les domaines de prédominance des différentes formes rédox et les espèces ioniques correspondantes en fonction du Eh et du pH. Ces diagrammes supposent toutefois des conditions d'équilibre thermodynamique. Dans la nature, cet équilibre n'est pas toujours atteint ; aussi la spéciation rédox mesurée pour ces éléments dans l'environnement peut se distinguer notablement de ces prévisions théoriques.

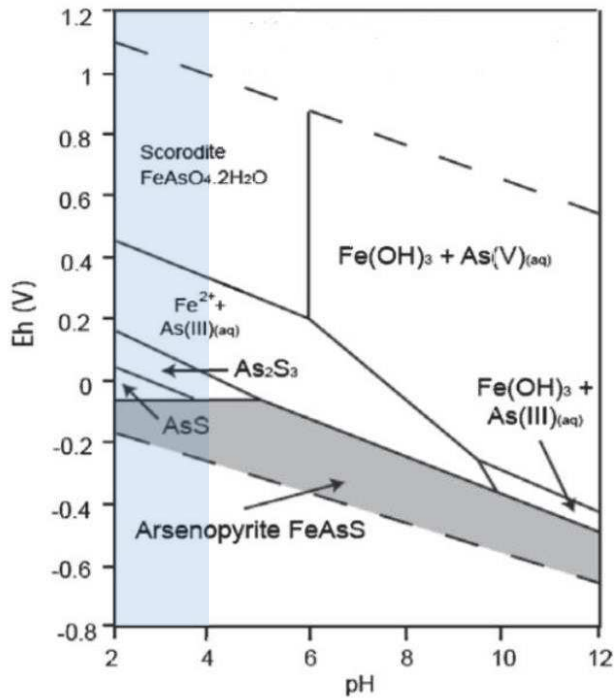


Figure 6 : Diagramme Eh-pH de l'arsenic dans le système Fe-As-S-H₂O à 25°C et 1 bar, modifié d'après Suratman, 2016. La zone bleue représente les conditions de pH du DMA.

Figure 7 : Diagramme Eh-pH de l'antimoine dans le système Sb-S-H₂O, pour des concentrations en antimoine et en sulfure dissous de 10⁻⁸ mol/L et 10⁻³ mol/L respectivement, modifié d'après Filella et al. (2002). La zone bleue représente les conditions de pH du DMA.

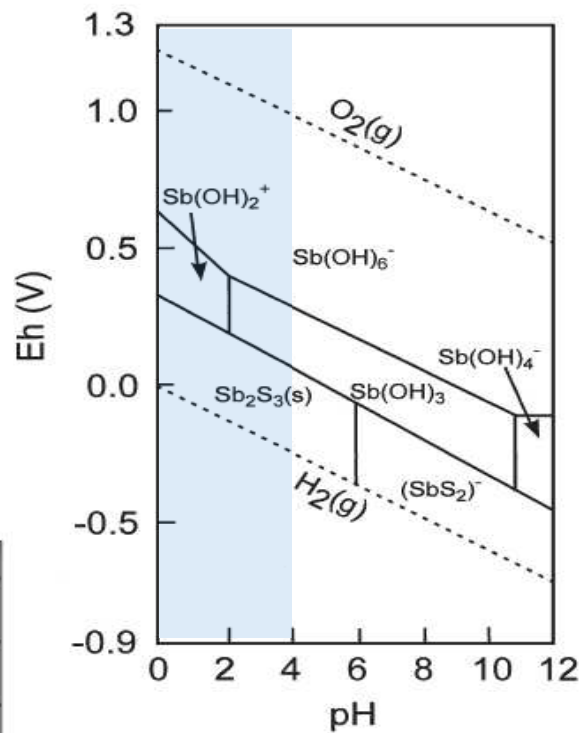
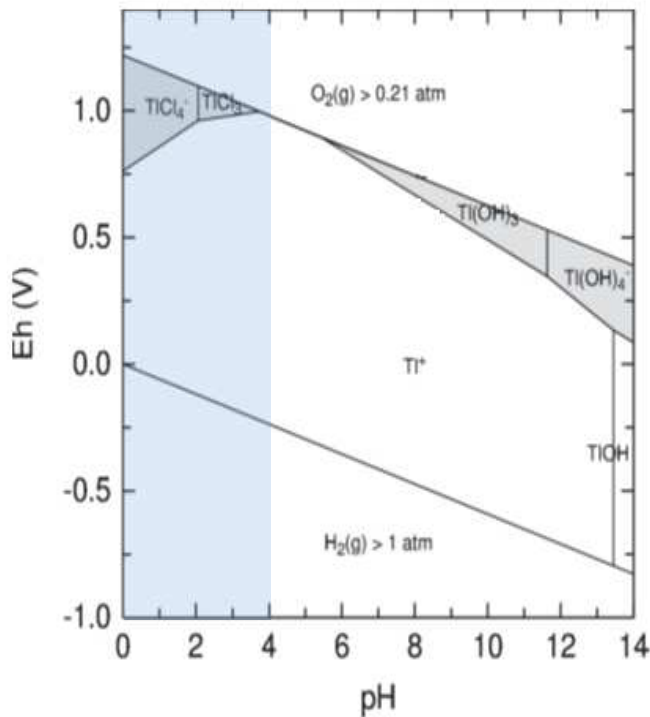


Figure 8 : Diagramme Eh-pH du thallium dans le système Tl-Cl-H₂O, pour des concentrations en Cl de 1,7.10⁻⁴ mol/L, modifié à partir de Casiot et al., 2011. La zone bleue représente les conditions de pH du DMA.



L'arsenic et l'antimoine se présentent respectivement sous quatre états d'oxydation (-3, 0, +3, +5), sous formes inorganiques ou organiques. Ils peuvent évoluer réversiblement d'une forme solide, liquide à gazeuse. Toutefois, les formes inorganiques trivalente ou pentavalente prédominent dans l'environnement (Baes et Mesmer, 1976). Les espèces aqueuses majoritaires dans les DMA sont l'arséniate [As(V)] et l'antimoniite [Sb(V)] en condition oxydante, alors que l'arsénite [As(III)] et l'antimonite [Sb(III)] sont majoritaires en condition réductrice. Cependant, les cinétiques d'oxydo-réduction sont très lentes (Johnson et Pilson, 1975 ; Masscheleyn et al., 1991 ; Smedley et Kinniburgh, 2002 ; Baeyens et al., 2007). C'est pourquoi des formes trivalentes peuvent persister dans des conditions oxydantes.

Le thallium est présent dans l'environnement sous deux états d'oxydation : le Tl(I) monovalent et le Tl(III) trivalent (Vink, 1993 ; Kaplan et Mattigod, 1998). Le Tl(III) aqueux est peu présent naturellement car les conditions environnementales doivent être très oxydantes. De plus Tl(III) précipite sous forme d'hydroxyde thallique, $Tl(OH)_3$, dont la solubilité est faible (Lin et Nriagu, 1998 ; Xiong, 2009). Des exceptions ont toutefois été identifiées dans divers environnements (Lin et Nriagu, 1999 ; Peacock et Moon, 2012 ; Voegelin et al., 2015 ; Campanella et al., 2017). La présence du Tl(III) dans l'eau de mer (80 % du thallium) s'explique par la formation d'un complexe anionique stable avec le Cl^- ou OH^- (Batley et Florence, 1975). Dans les Grands Lacs d'Amérique du Nord, la présence de Tl(III) résulterait d'une oxydation microbienne du Tl(I) en Tl(III), ce dernier étant complexé avec des substances organiques, inorganiques ou encore méthylé pour former le dimethylthallium. En dépit de ces quelques exceptions, il semble que le Tl(I) soit la forme soluble la plus abondante dans les systèmes aquatiques (Vink, 1993 ; Kaplan et Mattigod, 1998 ; Xiong, 2007 ; Casiot et al., 2011). Cette espèce se complexe rarement avec des anions, tels que les sulfates, carbonates et phosphates, excepté avec les ions chlorures (Kaplan et Mattigod, 1998 ; Casiot et al., 2011). C'est pourquoi, le Tl(I) reste généralement mobile et biodisponible sous sa forme ionique en solution (Vink, 1993 ; Jacobson et al., 2005 ; Casiot et al., 2011 ; Voegelin et al., 2015).

2.2.2. Mécanismes abiotiques qui influencent la mobilité de l'As, du Sb et du Tl

La mobilité de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium dans les DMA est contrôlée par des processus de sorption et de précipitation. Ces processus dépendent des caractéristiques des phases solides (surface spécifique, charge de surface, changements structuraux), de la chimie de la phase aqueuse (pH, potentiel rédox, présence d'anions compétiteurs) et de la spéciation des trois éléments. La spéciation rédox conditionne fortement la sorption de l'As, du Sb et du Tl sur les phases solides car les espèces oxydées et réduites présentent des charges différentes (cf. Fig. 6 à 8).

L'arsenic peut être adsorbé sur de nombreux colloïdes, tels que les argiles, les carbonates de calcium, la matière organique, les hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse. En général, les hydroxydes de fer sont les minéraux les plus impliqués dans l'absorption de l'As (Cheng et al., 2009). Dans les DMA, les principales phases solides susceptibles d'adsorber l'arsenic sont la schwertmannite, puis minoritairement la jarosite et la goethite (Bigham et al., 1996). L'absorption de l'As(V) sur ces solides est plus favorable que celle de l'As(III) à pH acide (Dixit et Hering, 2003). En effet, l'arséniate est chargé négativement tandis que l'arsénite est une espèce neutre dans la gamme de pH caractéristique des DMA (pH 2-5). En conséquence,

la réduction de l'arsenic adsorbé sur ces solides contribue à sa mobilisation vers le milieu aquatique.

La spéciation et le comportement du Sb dans les différents compartiments environnementaux ne sont pas toujours clairement établis (Filella et al., 2002ab ; Asta et al., 2012 ; Herath et al., 2017). Il est admis que Sb(III) est moins mobile que Sb(V) et peut s'adsorber sur les hydroxydes métalliques selon l'ordre suivant : $MnOOH > Al(OH)_3 > FeOOH$ (Thanabalasingam et Pickering, 1990). L'oxydation chimique du Sb(III) en Sb(V) augmente la mobilité du Sb. Cependant, l'immobilisation du Sb(V) sur les oxydes de fer est favorisée en condition acide, et devient équivalente à celle du Sb(III) (Leuz et al., 2006a ; Guo et al., 2014b).

De plus en plus d'études montrent que le thallium peut être immobilisé sur des phases minérales (Liu et al., 2011 ; Peacock et Moon, 2012 ; Voegelin et al., 2015 ; Coup et Swedlund, 2015 ; Martin et al., 2018). Selon Martin et al. (2018), le Tl(I) peut s'adsorber sur des phases minérales selon l'ordre suivant : $MnO_2 > \text{illite} > \text{smectite} \sim \text{ferrihydrite} \sim Al_2O_3 \sim \text{goethite} > SiO_2$. Toutefois, il semble que les oxydes de fer n'aient qu'une relative, voire faible affinité pour le thallium (Liu et al., 2011 ; Casiot et al., 2011 ; Coup et Swedlund, 2015).

Compte-tenu des réactivités distinctes des différentes formes rédox vis-à-vis des phases solides, les agents oxydants ou réducteurs naturellement présents dans l'environnement contribuent à modifier la mobilité de l'As, du Sb et du Tl. Il s'agit de l'oxygène, des espèces réactives de l'oxygène (*e.g.* le peroxyde d'hydrogène H_2O_2) et de certaines phases solides minérales ou organiques. L'oxydation de l'As et du Sb par l'oxygène est très lente dans les solutions homogènes (Leuz et Johnson, 2005 ; Cheng et al., 2009). De même, H_2O_2 oxyde très lentement l'As dans des gammes de pH acides à neutres en absence de Fe(II) (Pettine et al., 1999). Il peut contribuer à oxyder Sb(III) dans des environnements proches de la neutralité ou alcalins, mais pas dans des conditions acides équivalentes aux DMA. Parmi les phases minérales ayant des propriétés oxydantes, les hydroxydes de fer et de manganèse sont les plus fréquemment cités comme oxydants de l'As(III) (Cheng et al., 2009), du Sb(III) (Herath et al., 2017 ; He et al., 2019) et du Tl(I) (Peacock et Moon, 2012 ; Voegelin et al., 2015). Toutefois, à pH acide, les hydroxydes de manganèse ne sont pas stables (Cheng et al., 2009). C'est pourquoi les hydroxydes de fer sont les agents oxydants les plus importants dans de telles conditions. En conditions réductrices, les composés sulfurés réduits peuvent induire la réduction de l'As et du Sb (Rochette et al., 2000 ; Polack et al., 2009).

La précipitation de minéraux secondaires d'As, Sb ou Tl dans les DMA contribue également à limiter leur dissémination dans l'environnement. En conditions oxydantes, l'arsenic peut précipiter sous forme de scorodite (Drahota et Filippi, 2009) et de tooeleite (Morin et al., 2003). L'antimoine précipite sous forme de valentinite, senarmonite et de différents sulfates (coquandite, klebelsbergite, peretaite) (Filella et al., 2009a). Le Tl(III) précipite sous forme d'hydroxyde thallique, $Tl(OH)_3$ (Lin et Nriagu, 1998). Le Tl(I) précipite sous forme de lanmauchangite ($TlAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) dans les DMA enrichis avec de l'aluminium et du sulfate (Xiong, 2009). En condition réductrice, la sulfato-réduction joue un rôle important car les sulfures peuvent précipiter avec l'As, le Sb et le Tl sous la forme de stibnite (Sb_2S_3), d'orpiment (As_2S_3) ou de sulfure de thallium (Tl_4S_3) (Cullen et Reimer, 1989 ; Filella et al., 2002b ; Weiner, 2010).

2.3. Biotransformations

Divers microorganismes eucaryotes (levure, champignon et protozoaire) et procaryotes (bactérie et archée) sont capables de se développer dans des environnements concentrés en polluants métalliques. Ces microorganismes emploient différentes stratégies pour limiter l'accumulation de ces polluants dans leur cytosol : (i) l'inhibition de leur entrée ; (ii) leur excrétion via des pompes à efflux ; (iii) leur séquestration intracellulaire ou extracellulaire (Sun et al., 2015 ; Li et al., 2016 ; Bruneel et al., 2017). L'efflux d'As et du Sb est le mécanisme de résistance le plus répandu à la fois chez les procaryotes (système Ars) et les eucaryotes (système ACR ou ARR), selon des voies métaboliques très similaires (Bruneel et al., 2017).

D'autres microorganismes sont capables de modifier la forme chimique de l'As, du Sb et du Tl, via des réactions rédox, de méthylation ou de déméthylation. Ces biotransformations modifient la spéciation de ces éléments, leur mobilité et leur toxicité. En effet, l'As est moins mobile et toxique sous sa forme oxydée que réduite (Baker et al., 2018). Le Sb réduit et oxydé précipite de façon équivalente avec les oxydes de fer, mais la forme oxydée est moins toxique (Leuz et al., 2006a ; Guo et al., 2014b). Le Tl oxydé précipite plus facilement sous forme d'hydroxyde thallique, $Tl(OH)_3$ (Lin et Nriagu, 1998). La méthylation convertit les formes inorganiques en composés organiques méthylés (Cullen et Reimer, 1989 ; Schedlbauer et Heumann, 2000 ; Li et al., 2016). Cette biométhylation peut aboutir à la volatilisation de l'As et du Sb, donc au transfert de ces éléments du DMA vers l'atmosphère.

Les biotransformations de l'arsenic ont fait l'objet de nombreuses études synthétisées dans plusieurs revues (*e.g.* Oremland et Stolz, 2003 ; Paéz-Espino et al., 2009 ; Tsai et al., 2009 ; Lloyd et al., 2011 ; Yamamura et Amachi, 2014 ; Bruneel et al., 2017). Deux revues récentes font un bilan des connaissances acquises sur les transformations bactériennes du Sb (Li et al., 2016 ; He et al., 2019). La figure 9 résume les transformations bactériennes pour l'As et Sb. En revanche, les transformations bactériennes du Tl font actuellement l'objet de peu d'études abordées par la revue de Belzile et Chen (2017). Ces dernières seront succinctement évoquées en premier. Puis les transformations bactériennes de l'As et du Sb seront traitées simultanément du fait de leurs relatives similitudes.

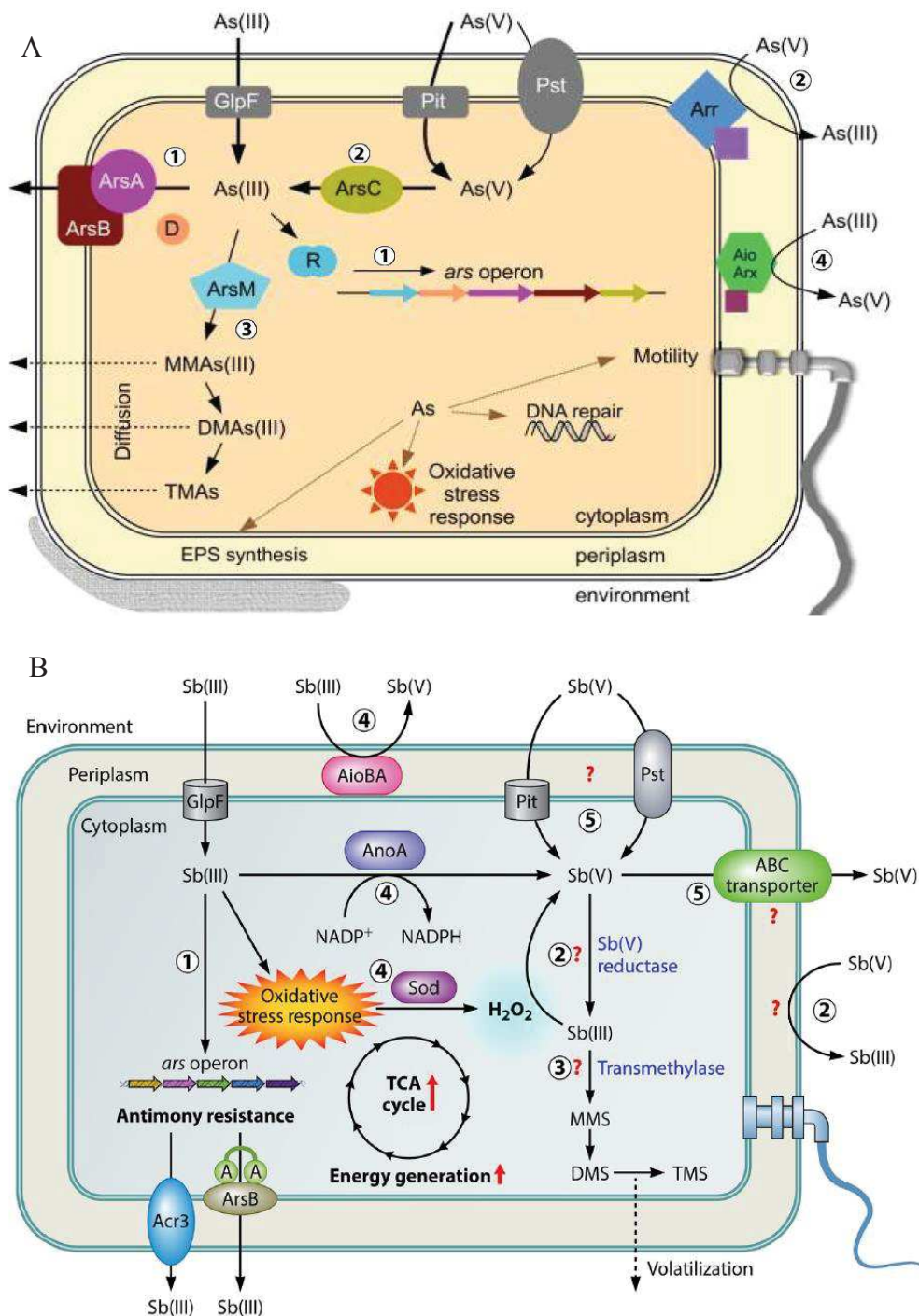


Figure 9 : Transformations bactériennes de l'arsenic (A) et de l'antimoine (B) adaptée de Kruger et al. (2013) et Li et al. (2016). L'As(III), Sb(III) et As(V) entrent dans la cellule via les transporteurs de glycérol ou phosphate et sont excrétés par des pompes à efflux via le système Ars (1). Le transport du Sb(V) reste encore méconnu (5). Ces métalloïdes peuvent être transformés par des processus de réduction (2), de méthylation (3) et d'oxydation (4).

2.3.1. Transformations bactériennes du thallium

Malgré la haute toxicité du thallium, de nombreuses bactéries sont capables de croître dans des environnements pollués par cet élément (Twining et al., 2003 ; Sun et al. 2012 ; Bao et al., 2014 ; Rasool et Xiao, 2018 ; Liu et al., 2019). Liu et son équipe (2019) montrent notamment une corrélation positive entre plusieurs genres bactériens ferro- et sulfo- oxydant (*e.g. Ferroplasma, Leptospirillum, Ferrovum, Metallibacterium, Acidithiobacillus, et Sulfuriferula*) et le thallium dans un DMA, suggérant une haute résistance de ces bactéries. Certaines bactéries se sont aussi avérées capables de transformer le thallium (Huber et Kirchman, 1978 ; Schedlbauer et Heumann, 2000 ; Twining et al., 2003). Huber et Kirchman (1978) ont suggéré que la biométhylation du Tl, réalisée *in vitro* par des bactéries anaérobies, correspondrait à un mécanisme de détoxification. La production de dimethylthallium dans l'océan suite à une activité bactérienne a été ultérieurement confirmée par Schedlbauer et Heumann (1999, 2000). Dans les grands lacs canadiens, les bactéries planctoniques seraient responsables de l'oxydation du Tl(I) en Tl(III) (Twining et al., 2003). A ce jour, l'identité de ces bactéries et leurs processus biologiques restent méconnus.

2.3.2. Transformations bactériennes de l'arsenic et de l'antimoine

2.3.2.1. Réduction bactérienne de l'arsenic et de l'antimoine

- *Réduction via l'arséniate réductase C (ArsC)*

La réduction bactérienne de l'As, et possiblement du Sb, peut être catalysée par ArsC, une arséniate réductase. Cette protéine fait partie du système Ars présent chez de nombreuses bactéries Gram positives et négatives. Ce système a d'abord été identifié comme un mécanisme de résistance à l'arsenic, puis à l'antimoine en condition aérobie et anaérobie (Li et al., 2016). Sa présence dans des procaryotes phylogénétiquement très variés, et dans des environnements divers avec ou sans As et/ou Sb, tend à prouver que c'est un mécanisme de résistance très ancien présent très tôt dans les cellules (Mukhopadhyay et al., 2002 ; Silver et Phung, 2005).

Ce mécanisme de résistance est codé par l'opéron *ars*, localisé sur des plasmides ou des chromosomes. Cet opéron peut contenir plusieurs gènes avec des configurations différentes selon les procaryotes (Fekih et al., 2018). Deux gènes doivent cependant être présents, en plus de celui de l'arséniate réductase (*arsC*), afin de coder : un régulateur transcriptionnel (*arsR*) et une pompe à efflux (*arsB*). Suite à la transcription de l'opéron, l'As(III) et le Sb(III) sont directement éliminés du cytoplasme bactérien par une pompe à efflux, ArsB ou Acr3p (Li et al., 2016). En revanche, l'excrétion de l'As(V) par ces pompes requiert au préalable une réduction en As(III) par ArsC (Mukhopadhyay et al., 2002). Bien qu'aucune preuve ne démontre une réduction intracellulaire du Sb(V) via ArsC, cette arséniate réductase est probablement aussi impliquée dans la résistance au Sb (Li et al., 2016).

- *Réduction dissimilatrice (respiration anaérobie)*

Indépendamment du processus de résistance, la réduction de l'As(V) et Sb(V) peut être couplée à la respiration. En condition anaérobie, certains procaryotes utilisent l'As(V) ou le

Sb(V) comme accepteur final d'électron pour générer de l'énergie (Oremland et Stolz, 2003 ; Li et al., 2016).

La réduction dissimilatrice de l'arséniate est couplée à l'oxydation de substrats organiques (e.g. acetate, lactate ou composés aromatiques) ou inorganiques (e.g. H₂ or S₂⁻) (Stolz et al., 2006). Cette réduction a d'abord été mise en évidence chez *Sulfurospirillum arsenophilum* et *S. barnesii*, puis dans les groupes phylogénétiques bactériens incluant les γ -, δ -, ϵ -*Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Chrysiogenes* (Oremland et Stolz, 2003). Comme pour le système *ars*, la large distribution de ce processus chez les procaryotes suggère une origine ancienne de la respiration dissimilatrice de l'arséniate (Stolz et Oremland, 1999). A ce jour, seule la souche MLMS-1 a été identifiée comme une As(V)-réductrice obligatoire (Hoeft et al., 2004). Hormis cette dernière, les bactéries As(V)-réductrices peuvent utiliser une variété d'accepteur d'électrons, tel que l'O₂, le séléniate, le NO₃⁻, le NO₂⁻, le fumarate, le Fe(III), le thiosulfate, le soufre élémentaire, le dimethylsulfoxyde et le triméthylamine oxide (Héry et al., 2008).

La réduction respiratoire de l'As(V) en As(III) est catalysée par une As(V) réductase membranaire, caractérisée chez *Chrysiogenes arsenatis*, *Bacillus selenitireducens* et *Shewanella* sp. ANA-3 (Krafft et Macy, 1998 ; Afkar et al., 2003 ; Malasarn et al., 2008). Cette enzyme appartient à la famille des diméthyl sulfoxyde réductases (DMSO) des molybdoenzymes. Elle est constituée de deux sous-unités :

- La grande sous-unité catalytique ArrA (87 kDa) qui contient un cofacteur à molybdène et un centre [4Fe-S],

- La petite sous-unité ArrB (29 kDa) qui peut contenir jusqu'à 4 centres et qui permet le transfert des électrons.

Les gènes *arrA* et *arrB*, localisés sur l'opéron *arr*, codent ces deux sous-unités. Chez *Shewanella* sp. ANA-3, la présence de ces deux gènes suffit à la réalisation de la réduction respiratoire de l'As(V) (Saltikov et Newman, 2003). D'autres gènes peuvent être associés au sein de l'opéron *arr* selon les procaryotes avec des fonctions différentes (e.g. *arrT*, *arrR*, *arrS*) (Saltikov, 2011).

La réduction dissimilatrice du Sb(V) a également été rapportée (Li et al, 2016 ; He et al., 2019). Seulement quelques bactéries responsables de cette réduction ont été identifiées : *Sinorhizobium* sp. JUK-1 (Nguyen et Lee, 2014), *Desulfuribacillus stibiiarsenatis* sp. (Abin et Hollibaugh., 2014 et 2017), *Shewanella* sp. CNZ-1 (Zhang et Hu, 2019). Des enrichissements en microorganismes réduisant Sb ont été obtenus à partir de sédiments miniers (Lai et al., 2016 ; Wang et al., 2018). Lai et al. (2016) ont ainsi obtenu un enrichissement autotrophe, dominé par le genre *Rhizobium* ; le second contient majoritairement les genres *Alkaliphilus* (18–36 %), *Clostridiaceae* (17–18 %), *Tissierella* (24–27 %), et *Lysinibacillus* (16–37 %) (Wang et al., 2018). Toutes les bactéries Sb-réductrices, isolées ou enrichies à ce jour, nécessitent un substrat organique comme donneur d'électrons, excepté celles enrichies par Lai et al. (2016). Dans cette expérience, la réduction de l'antimoine est aussi rapide que le donneur d'électron soit du H₂ ou du lactate. A contrario, Nguyen et al. (2018) ont trouvé que la réduction du Sb était plus rapide en utilisant des donneurs d'électrons organiques. La morphologie et la nature cristallisée ou

amorphe des phases solides obtenues suite à la réduction de Sb semblent aussi varier selon les donneurs d'électron utilisés.

Contrairement à l'As(V), la réduction respiratoire du Sb(V) n'a pas encore été élucidée d'un point de vue moléculaire. Récemment, Abin et Holligauth (2019) ont cependant découvert un gène, BHU72_07145 nommé *anrA*, qui coderait une sous-unité catalytique d'une Sb(V) réductase respiratoire chez *Desulfuribacillus stibiiarsenatis* MLFW-2T.

2.3.2.2. Oxydation bactérienne de l'arsenic et de l'antimoine

En 1918, Green isolait *Bacillus arsenoxydans*, la première bactérie capable d'oxyder As(III) en As(V). Depuis, de nombreuses bactéries As(III)-oxydantes ont été identifiées à partir d'environnements variés (e.g. sols, sédiments miniers, lacs hypersalins ...) (Quéménéur et al., 2008). Elles appartiennent à différents phyla, tels que les *Proteobacteria*, les *Firmicutes*, les *Actinobacteria*, les *Deinococcus-Thermus*, les *Chloroflexi*, et les *Aquificae* (Green, 1918 ; Mokashi et Paknikar, 2002 ; Quéménéur et al., 2008).

La première bactérie capable d'oxyder Sb(III), *Stibiobacter senarmontii*, a été isolée en 1974 à partir d'un gisement de minerai (Lialikova, 1974). En 2016, plus d'une soixantaine de bactéries Sb(III)-oxydantes étaient répertoriées et classifiées dans les α -, β -, γ -*Proteobacteria* et les *Actinobacteria*. Toutes ces bactéries ont été isolées à partir d'environnements présentant des pH proches de la neutralité, comprenant soit des sols miniers soit des sédiments contaminés (Li et al., 2016).

Les bactéries As(III)- et Sb(III)- oxydantes sont généralement divisées en deux groupes métaboliques : les hétérotrophes et les chimiolithotrophes. Certaines chimiolithotrophes utilisent l'As(III) et Sb(III) en tant que donneur d'électron pour générer de l'énergie (Lialikova, 1974 ; Oremland et Stolz, 2003 ; Kulp et al., 2008 ; Terry et al., 2015). Les autres bactéries As et Sb oxydantes utilisent l'oxydation comme un mécanisme de détoxification (Oremland et Stolz, 2003 ; Li et al., 2016). Cette oxydation s'effectue à la fois en condition aérobie et anaérobie. En condition anaérobie, c'est le nitrate qui est utilisé comme accepteur d'électron (Oremland et al., 2002 ; Rhine et al., 2006 ; Terry et al., 2015 ; Nguyen et al., 2017). Contrairement à l'As(III), l'utilisation du Sb(III) comme source d'électron pour la photosynthèse bactérienne anoxygénique n'a pas encore été démontrée (Kulp et al., 2008 ; Li et al., 2016).

L'oxydation bactérienne de l'As(III) et Sb(III) peut être catalysée par trois types d'oxydases: Aio, Arx et Ano. Les deux premières appartiennent à la famille des diméthyl sulfoxyde réductases (DMSO) des molybdoenzymes.

Arx a été découvert plus récemment que Aio, chez *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 et *Ectothiorhodospira* PHS-1 (Zargar et al., 2010 et 2012). Sa particularité est qu'elle peut soit oxyder soit réduire l'arsenic sous condition aérobie ou anaérobie respectivement. L'abréviation Arx, the arsenate reductase arsenite oxidase (*arxA*) en anglais, réfère à cette double fonctionnalité découverte *in vitro*. Cependant les gènes *arxA* et *arxB* présentent une plus grande similarité avec *arrAB* que *aioAB* (Zargar et al., 2012).

L'arsénite oxydase AioA est impliquée à la fois dans l'oxydation de l'As(III) et du Sb(III). C'est une protéine membranaire (*Alcaligenes faecalis*) ou périplasmique (*Rhizobium*

sp. NT-26 et *Hydrogenophaga* sp. NT-24) qui a été entièrement caractérisée chez *A. faecalis* NCIB 8667 (Ellis et al., 2001 ; Santini et vanden Hoven, 2004 ; vanden Hoven et Santini, 2004). Comme pour l'arséniate réductase, elle est composée d'une large sous-unité catalytique à molybdoptérine et centre [3Fe-4S], AioA, et d'une petite sous-unité à centre [2Fe-2S] de type Rieske, AioB, qui transfère les électrons. Les gènes *aioA* et *aioB*, qui codent cette oxydase, ont été référencés au préalable sous différents noms (*aoxAB* chez *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 et *Agrobacterium tumefaciens* 5A ; *asoAB* chez *A. faecalis* NCIB 8667 ; *aroAB* chez *Rhizobium* sp. NT-26) (Anderson et al., 1992 ; Muller et al., 2003 ; Santini et vanden Hoven, 2004 ; Silver et Phung, 2005 ; Kashyap et al., 2006). Ces gènes sont localisés sur l'opéron *aio* qui peut facultativement en contenir d'autres selon les souches bactériennes. Bien que l'oxydase AioAB soit capable d'oxyder Sb(III) *in vitro* et *in vivo*, l'expression de l'opéron *aio* n'est induit que par la présence d'As(III). De même, la délétion du gène *aioA* élimine l'oxydation de l'As(III) chez *Agrobacterium tumefaciens* 5A, mais réduit seulement d'environ 25 % celle du Sb(III) (Wang et al., 2015). Ces résultats suggèrent donc l'implication d'autres voies biochimiques dans l'oxydation du Sb(III).

Li et al. ont d'ailleurs découvert en 2015 une nouvelle Sb(III) oxydase cytoplasmique appartenant à la famille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte. Selon une analyse génomique de ces mêmes auteurs, cette enzyme serait largement distribuée parmi le domaine des *Bacteria*. La délétion du gène *anoA* chez *A. tumefaciens* GW4 diminue l'oxydation du Sb(III) d'environ 27 % ; alors que sa surexpression l'augmente d'approximativement 34 % (Li et al., 2015). *AnoA* et *AioA* oxydent respectivement le Sb(III) au niveau du cytoplasme et du périplasme. Sans *AioA*, une quantité plus importante du Sb(III) entre dans les cellules, régule l'expression d'*AnoA* et finalement augmente le taux d'oxydation du Sb(III) (Li et al., 2017b). Comme *AioA*, *AnoA* peut oxyder As(III) *in vitro*, mais moins efficacement que Sb(III) (Li et al., 2016). Cette enzyme serait donc plus impliquée dans l'oxydation du Sb(III) que dans celle de l'As(III), alors que *AioA* favoriserait l'oxydation de l'As(III). Cependant la délétion de *anoA* et *aioA* ne supprime pas l'oxydation du Sb(III) chez *A. tumefaciens* GW4 et 5A, suggérant une fois encore l'implication d'autres mécanismes d'oxydation (Li et al., 2015 ; Wang et al., 2015).

Deux études récentes ont proposé un troisième mécanisme d'oxydation bactérienne indirecte du Sb(III) en Sb(V), basé sur l'oxydant H₂O₂ (Wang et al., 2016 ; Li et al., 2017a). La présence intracellulaire du Sb(III) chez *A. tumefaciens* GW4 induit un stress oxydatif. Ce stress génère des espèces réactives de l'oxygène, comme H₂O₂ qui s'avère être capable d'oxyder Sb(III) en Sb(V). Ce processus permet donc à la fois d'atténuer la toxicité du Sb mais aussi de consommer le H₂O₂ toxique lors de l'oxydation (Li et al., 2017a).

2.3.2.3. Méthylation bactérienne de l'arsenic et de l'antimoine

Les formes inorganiques de l'As et du Sb peuvent être converties en composés organiques méthylés dans différents environnements (Cullen et Reimer, 1989 ; Li et al., 2016). La volatilisation des espèces méthylées peut permettre de diminuer la concentration cellulaire en As et Sb. Cependant, Filella (2010) suggère que la biométhylation du Sb serait plutôt un processus fortuit qu'un mécanisme de détoxification. Différentes bactéries capables de réaliser cette méthylation, en condition aérobie et anaérobie, ont été identifiées (Bentley et Chasteen, 2002 ; Li et al., 2016). Quelques bactéries sont même capables de déméthyliser le mono- et

diméthylarsenic (*e.g. Alcaligenes, Pseudomonas* et *Mycobacterium* spp.), mais ce mécanisme reste encore mal compris (Bentley et Chasteen, 2002 ; Maki et al., 2004). La S-adenosylméthionine (SAM) est le donneur de groupe méthyl chez la majorité des bactéries méthylant l'As, mais la méthylcobalamine peut aussi être utilisée par des bactéries anaérobies. Les bactéries méthylant Sb utilisent certainement les mêmes donneurs d'électrons (Bentley et Chasteen, 2002 ; Grob et al., 2018).

La méthylation bactérienne emploie la voie moléculaire proposée par F. Challenger en 1945 (Wehmeier et Feldmann, 2005 ; Stolz, et al., 2006 ; Paéz-Espino et al., 2009). Ainsi les formes pentavalentes inorganiques sont d'abord réduites en formes trivalentes puis des méthylation successives aboutissent finalement à la formation d'espèces méthylées volatiles (monométhyl MMA/MMS ; diméthyl DMA/DMS ; triméthyl TMA/AMX). Le gène *arsM*, code une S-adenosylméthionine méthyltransférase qui catalyse le transfert du groupe méthyl lors de la biométhylation de l'As. Ce gène, localisé au niveau ou à proximité de l'opéron *ars*, a été identifié dans le génome de 125 bactéries (Qin et al., 2006). Cette méthyltransférase est sûrement impliquée, ou au moins en partie, dans la biométhylation du Sb (Challenger, 1945 ; Andrewes et al., 2000 ; Wehmeier et Feldmann, 2005). De même, l'implication d'une méthylarséniate/méthylantimoniate réductase a été suggérée, mais reste encore à confirmer (Qin et al., 2006).

3. Processus microbiens qui contribuent à l'atténuation naturelle des polluants métalliques dans les drainages miniers acides

Les risques liés aux drainages miniers acides sont dus à leur acidité et à la présence de polluants métalliques extrêmement toxiques, tels que l'As, le Sb et le Tl. Contrairement aux polluants organiques, ces éléments ne sont pas dégradables. C'est pourquoi ils peuvent être disséminés sur de très grandes distances sous leurs formes dissoutes. Cependant, une immobilisation de ces polluants au sein de la phase solide a été observée dans de nombreux DMA (e.g. Casiot et al., 2003 ; Fukushi et al., 2003 ; Manaka et al., 2007 ; Asta et al., 2010 ; Favas et al., 2016). Cette atténuation naturelle de la pollution métallique est due à la réduction et l'oxydation biologiques des sulfates et du fer, respectivement. En effet, l'As et le Sb sont alors éliminés de la phase aqueuse par formation 1) d'(oxy)hydroxydes métalliques suite à la ferro-oxydation microbienne en condition aérobie et 2) de stibnite (Sb_2S_3), d'orpiment (As_2S_3) ou de sulfure de thallium (Tl_4S_3) suite à la sulfato-réduction microbienne en condition anaérobie. D'autres réactions d'oxydation et de réduction biologiques interagissent directement avec l'As, le Sb et le Tl et peuvent favoriser la co-précipitation de ces polluants avec les phases solides en modulant leurs spéciations rédox. Ces dernières ont déjà été abordées dans la partie 2.3. Cette troisième partie abordera donc l'atténuation naturelle des polluants métalliques au sein des DMA en décrivant plus amplement les processus bactériens de réduction des sulfates et d'oxydation respective du fer. Les facteurs de contrôle qui peuvent limiter cette atténuation, en modulant la croissance et l'activité des bactéries impliquées dans ces processus au sein des DMA, seront abordés dans un dernier temps.

3.1. Précipitation des sulfures métalliques

En conditions anoxiques, les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont impliquées dans des processus de bio-précipitation de métaux et métalloïdes présents dans les drainages miniers acides (Jong et Parry, 2003 ; Amils et al., 2007 ; Qiu et al., 2009). Ces bactéries appartiennent à quatre taxa différents, les *Deltaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospira* et *Thermodesulfobacteria*. Cependant, leur présence dans les DMA semble restreinte aux *Deltaproteobacteria* et aux *Firmicutes* (Méndez-García et al., 2015).

Le nom et le rôle clé de ces bactéries provient de leur capacité à réduire les sulfates (SO_4^{2-}) dans le cadre de leur métabolisme respiratoire. Certaines BSR sont aussi capables d'utiliser d'autres formes oxydées du soufre, tels que le sulfite (SO_3^{2-}), le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) et le soufre élémentaire (S_0) (Bak et Pfennig, 1987 ; Jackson et McInerney, 2000).

Cette réduction dite dissimilatrice doit être couplée à l'oxydation d'une source de carbone organique, bien que certaines chimiolithotrophes utilisent le CO_2 et H_2 comme source de carbone et d'électrons (Lens et Kuenen, 2001). Le catabolisme de ces composés génère de l'ATP et des électrons. Le transport de ces électrons dans la chaîne respiratoire de la membrane cytoplasmique fournit l'ATP nécessaire à la réduction des sulfates en sulfures. L'ATP est donc entièrement consommée par cette dernière réduction. Le gain énergétique provient finalement

des phosphorylations oxydatives lors du transport des électrons dans la membrane cytoplasmique et des réactions de phosphorylation au niveau du substrat.

La respiration anaérobie des sulfates, ou d'autres composés soufrés, est composée principalement de trois étapes (Widdel, 1988), schématisées sur la figure 10:

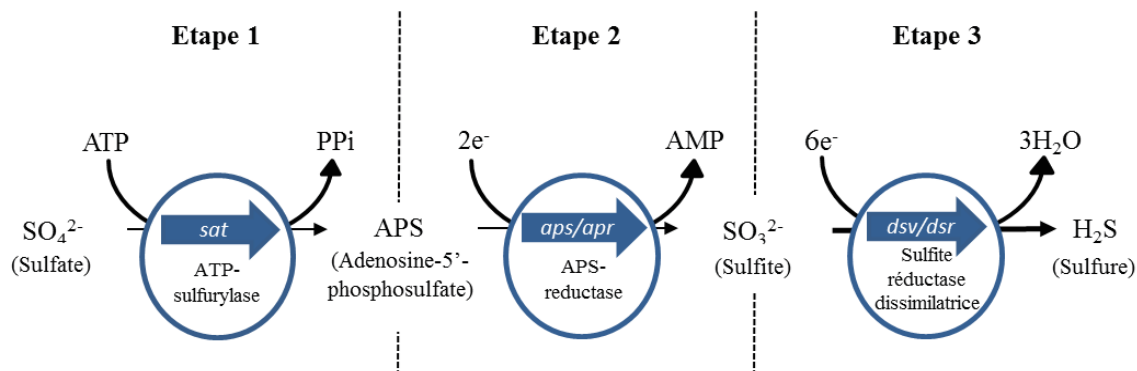


Figure 10 : Les différentes étapes de la réduction dissimilatrice des sulfates par les bactéries sulfato-réductrices. Les enzymes et les gènes sont respectivement représentés par des cercles et des flèches bleues.

- Etape 1 : le sulfate doit être activé en adénosine-5'-phosphosulfate (APS) par une ATP sulfurylase (ou ATP adénylyltransférase sulfate, CE 2.7.7.4) codé par le gène *sat* (Rabus et al., 2006).
- Etape 2 : la réduction de cette APS en sulfite est ensuite catalysée par une APS-réductase dissimilatrice, dont le gène codant est *apsAB* ou *aprAB* (Hipp et al., 1997 ; Fritz et al., 2000).
- Etape 3 : le sulfite produit est réduit en sulfure par la sulfite réductase dissimilatrice, codée par le gène *dsrAB* ou *dsvAB*.

Le gène *dsrAB* est majoritairement utilisé comme biomarqueur afin de détecter la présence de microorganismes sulfato-réducteurs (Müller et al., 2015). Le gène *dsrA* précède le gène *dsrB* sur l'opéron *dsr* (Fig. 11) (Dahl et al., 1993 ; Karkhoff-Schweizer et al., 1995 ; Wagner et al., 1998 ; Larsen et al., 1999 ; Pereira et al., 2011). Ces deux gènes seraient issus de la duplication d'un gène unique ancestral avant la séparation des domaines *Bacteria* et *Archaea* (Wagner et al., 1998 ; Dhillon et al., 2005 ; Loy et al., 2009). Les gènes *dsrA* et *dsrB* codent respectivement les deux sous-unités α et β de la sulfite réductase dissimilatrice. D'autres gènes peuvent être associés au sein de l'opéron *dsr* selon les procaryotes, avec des fonctions différentes (e.g. *dsrN*) ou encore à l'étude (e.g. *dsrC* et *dsrD*) (Fig. 11) (Rabus et al., 2015).

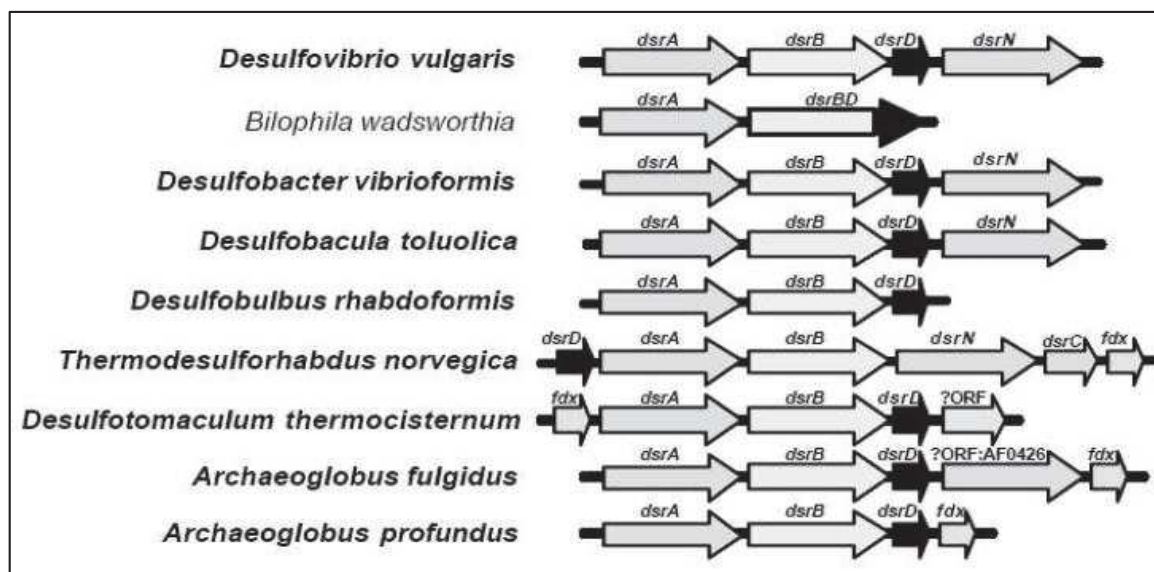
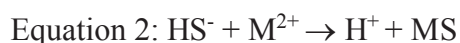


Figure 11 : Organisation de l'opéron *dsr* au sein de différentes bactéries sulfato-réductrices et chez *Bilophila wadsworthia* (D'après Zverlov et al., 2005 et Giloteaux, 2010)

Au final, les métabolites générés par la réduction dissimilatrice des sulfates (Equation 1) correspondent à des ions bicarbonates (HCO_3^-) et des sulfures ($\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ fonction du pH) :



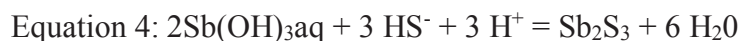
Par la suite, le sulfure d'hydrogène, très réactif, précipite avec les métaux et métalloïdes présents sous forme de sulfures métalliques insolubles (Neculita et al., 2007). L'augmentation du pH suite à la libération de bicarbonate favorisera d'autant plus la précipitation des cations métalliques (notés M^{2+} , équation 2) (Hallberg et Johnson, 2005) :



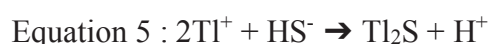
L'arsenic et l'antimoine sont des oxy-anions dont le comportement diffère de celui des cations métalliques. La précipitation de l'orpiment, sulfure d'arsenic, est favorisée en conditions acides et à de faibles concentrations en sulfure dissous (Eary 1992, équation 3) :



Le même phénomène a été mis en évidence pour l'antimoine, avec une solubilité fortement diminuée de la stibnite lorsque le pH diminue (Olsen et al., 2018, équation 4) :



La précipitation du sulfure de thallium, par contre, semblerait être optimale à pH élevé, d'après Mueller (2001) :



3.2. Formation des (oxy)hydroxydes métalliques

Les bactéries ferro-oxydantes (BFO) jouent un rôle majeur dans les environnements riches en fer. La première bactérie capable d'oxyder le fer ayant été isolée d'un DMA est *Acidithiobacillus ferrooxidans*. D'autres bactéries ont par la suite été recensées. Ces bactéries sont incluses dans de nombreux phyla bactériens, dont majoritairement les *Proteobacteria* (e.g. *Acidithiobacillus*, *Ferrovum*, *Gallionella*), les *Nitrospirae* (*Leptospirillum*), les *Firmicutes*

(*Sulfobacillus* et *Alicyclobacillus*) et les *Actinobacteria* (*Acidimicrobium*, *Ferrimicrobium* et *Ferrithrix*) (Méndez-García et al., 2015 ; Chen et al., 2016). Les BFO sont à l'origine du processus de biolixiviation qui contribue à la formation des DMA (cf partie 1.1.3). Mais ces bactéries sont aussi responsables de processus d'atténuation naturelle au sein même du DMA en condition aérobie.

En effet, l'oxydation abiotique du fer ferreux [Fe(II)] en fer ferrique [Fe(III)] à pH acide étant très lente (Stumm et Morgan, 1981), les BFO peuvent catalyser cette réaction. A pH 4-5, le fer ferrique résultant de cette oxydation biologique précipite alors sous forme d'(oxy)hydroxydes et (oxy)hydroxysulfate de fer. De plus, les parois cellulaires des microorganismes et/ou la production d'exopolysaccharides (EPS) pourraient jouer le rôle de sites de nucléation (formation des premiers germes cristallins) et favoriser la précipitation des oxydes de fer. Ce phénomène reste cependant encore mal compris (Clarke et al., 1997 ; Kawano et Tomita, 2001 ; Benzerara et al., 2008). Ainsi, les BFO participent directement à la formation de bioprécipités ou biominéraux riches en fer. Ces biominéraux peuvent piéger des polluants métalliques et métalloïdes (tels que l'arsenic) par des processus de sorption et/ou de co-précipitation. De plus, les oxydes de fer peuvent oxyder certains polluants, comme l'arsenic et l'antimoine, modulant ainsi leur toxicité et leur mobilité (Belzile et al., 2001 ; Leuz et al., 2006b ; Asta et al., 2012).

Pour certaines BFO, comme *Leptothrix discophora*, l'oxydation du fer est un mécanisme de résistance dans les environnements riches en cet élément (Corstjens et al. 1992). D'autres ont intégré cette réaction dans leur métabolisme énergétique, bien que l'énergie générée par cette oxydation soit faible (Johnson et Hallberg 2008). L'oxydation biologique du fer peut s'effectuer en condition aérobie et anaérobie. En condition aérobie, les bactéries acidophiles utilisent le fer comme donneur d'électron pour réduire l'oxygène au cours de leur respiration et régénérer du NAD⁺ en NADH. Cette voie métabolique est plus intéressante à pH acide (Johnson et Hallberg 2008). Les conditions acides et l'utilisation du Fe(II) posent cependant deux problèmes majeurs : le maintien de l'homéostasie et l'oxydation abiotique intracellulaire du Fe(II). Pour maintenir un pH cytoplasmique neutre, les bactéries acidophiles maintiennent un potentiel électrique membranaire inversé ($\Delta\Psi$ positif) afin d'empêcher l'entrée de protons dans la cellule (Baker-Austin et Dopson, 2007). Le Fe(II) est oxydé en Fe(III) à l'extérieur de la cellule, près de la membrane, car une oxydation intracellulaire pourrait endommager les cellules (radicaux libres, acidification et obstruction par les oxydes de fer) (Bird et al., 2011).

L'oxydation biologique du Fe(II) a été particulièrement bien étudiée et décrite d'un point de vue moléculaire chez *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Ingledew, 1982 ; Quatrini et al., 2009 ; Bird et al., 2011 ; Bonnefoy et Holmes, 2012 ; Hedrich et al., 2011a). *Acidithiobacillus ferrooxidans* est un chimiolithotrophe autotrophe. La fixation du CO₂ nécessite de l'énergie (ATP) et du pouvoir réducteur (NADH). Les électrons issus de l'oxydation du Fe(II) permettent la production d'ATP (voie descendante) et/ou la régénération des coenzymes réduits (NAD⁺) (voie ascendante) (Fig. 12). Le mécanisme de régulation des électrons entre ces deux voies est à ce jour encore non élucidé (Ferguson et Ingledew, 2008).

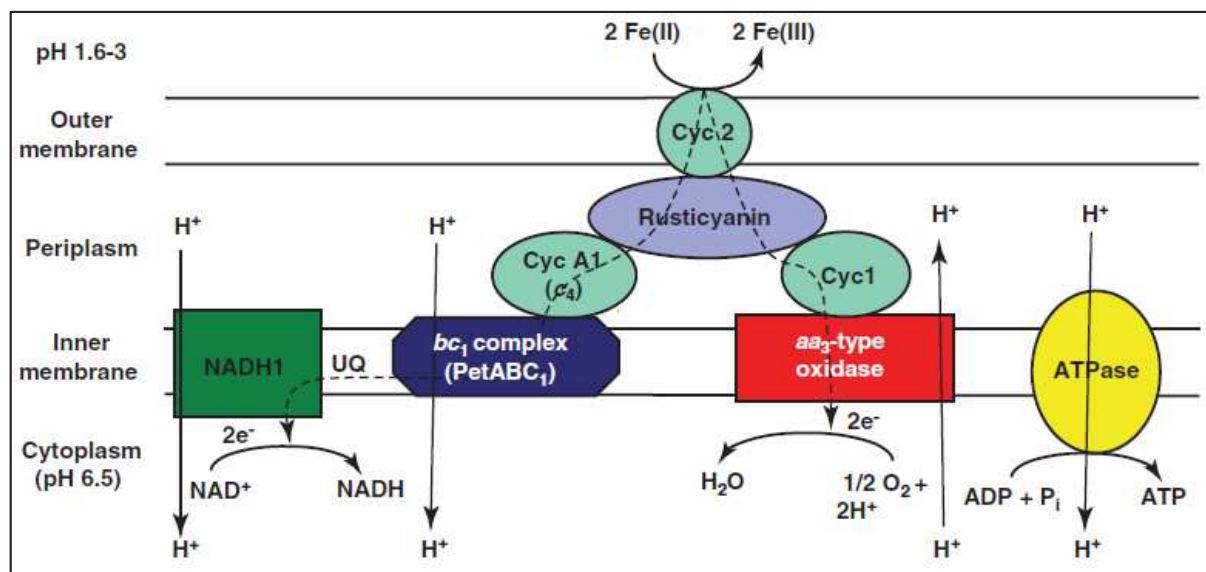


Figure 12 : Oxydation du Fe(II) chez *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Les électrons issus de cette oxydation sont transportés jusqu'à O_2 ou le NAD^+ . Le flux des électrons et des protons sont respectivement indiqués par des flèches en pointillés ou pleines. Tous les cytochromes c sont représentés en vert clair, la rusticyanine en violet, l'oxydase terminale aa_3 en rouge, l'ATP synthase en jaune, le complexe bc_1 en bleu foncé et le complexe NADH1 en vert foncé. (Modifié à partir de Bird et al., 2011).

Le cytochrome Cyc2, localisé dans la membrane externe, catalyse l'oxydation extracellulaire du Fe(II). Le transport des électrons issus de cette oxydation est ensuite assuré par la rusticyanine, une protéine à cuivre de type I du périplasm. La rusticyanine est liée à deux cytochromes dihémiqes c_4 , Cyc1 et CycA1 respectivement impliqués dans la voie descendante et la voie ascendante. C'est pourquoi il a été supposé que la régulation entre ces deux voies se fasse au niveau de la rusticyanine.

Le flux descendant des électrons va s'effectuer du cytochrome Cyc1 jusqu'à la cytochrome oxydase terminale de type aa_3 , où est réduit le O_2 en H_2O . Les protons intracellulaires sont ainsi à la fois consommés par la réduction de l' O_2 et expulsés par l'oxydase terminale vers le périplasm, ce qui contribue au maintien de l'homéostasie. Le gradient de protons entre le périplasm (pH ~ 2) et le cytoplasm (pH $\sim 6,5$) permet également la synthèse d'ATP via l'ATP synthase. L'opéron *rus* contient les gènes codant le cytochrome *cyc2* (*cyc2*), la rusticyanine (*rus*) et les protéines impliquées uniquement dans la voie descendante (respectivement *cyc1* et *coxBACD* pour le cytochrome Cyc1 et le complexe aa_3).

Les électrons de la voie ascendante sont transférés au cytochrome CycA1, puis à un complexe cytochromique bc_1 (complexe III, coenzyme Q – cytochrome c réductase), au pool de quinone puis à la NADH déshydrogénase (complexe I). Le complexe bc_1 est codé par l'opéron *petI*. L'énergie nécessaire au transport ascendant des électrons jusqu'au NAD^+ est fournie par la force proton-motrice générée entre le périplasm et le cytoplasm.

L'oxydation du fer a été étudiée chez d'autres bactéries acidophiles (*At. ferrivorans*, *Thiobacillus prosperus*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *L. rubarum* et *L. ferrodiazotrophum*). Ces organismes utilisent des protéines différentes au cours de cette oxydation. Cependant le mécanisme est présumé être similaire (au moins chez les bactéries à gram négative) : les électrons issus de l'oxydation du Fe(II) sont transférés d'un cytochrome c inclus dans la

membrane externe, à une protéine périplasmique, puis un cytochrome c localisé dans la membrane interne, jusqu'à la cytochrome oxydase terminale, en parallèle le complexe bc1 peut transférer les électrons jusqu'au NAD⁺ (Bird et al., 2011 ; Bonnefoy et Holmes, 2012).

3.3. Influence des facteurs biotiques et abiotiques

Dans les DMA, les bactéries jouent un rôle majeur dans l'atténuation naturelle de l'As, du Sb et du Tl. Ces éléments sont éliminés de la phase aqueuse sous forme d'(oxy)hydroxydes métalliques suite à la ferro-oxydation bactérienne en condition aérobie ; alors qu'en condition anaérobie la sulfato-réduction bactérienne aboutit à la formation et à la précipitation de sulfures métalliques. A pH acide, l'As s'adsorbe mieux sur les oxydes de fer sous sa forme oxydée. Sb(III) et Sb(V) précipitent de façon équivalente avec les oxydes de fer (Leuz et al., 2006a ; Guo et al., 2014b). Le Tl précipite plus facilement sous forme d'hydroxyde thallique, Tl(OH)₃ (Lin et Nriagu, 1998 ; Ralph et Twiss, 2002).

L'élimination de ces polluants métalliques va donc dépendre à la fois de la diversité et de l'activité des BFO, des BSR, des bactéries As(III)-oxydantes, et possiblement de bactéries Sb- et Tl-oxydantes non-identifiées. Or, leurs dynamiques spatio-temporelles sont contrôlées à la fois par les interactions biologiques et les conditions environnementales, en particuliers physico-chimiques (cf. paragraphe 3.3.2), au sein des DMA. Ces deux éléments vont favoriser les bactéries aux capacités physiologiques les plus adaptées au détriment des autres. Un aperçu de la diversité phylogénétique et physiologique de ces bactéries est donné dans les tableaux 5 à 7. Les bactéries As(III)-oxydantes les mieux décrites et étudiées au sein des DMA sont celles appartenant au genre *Thiomonas*, c'est pourquoi nous nous attarderons plus particulièrement sur ces dernières. En revanche, aucune bactérie capable d'oxyder le Sb et le Tl en condition acide n'a été isolée à ce jour.

3.3.1. Interactions biologiques

La communauté microbienne d'un DMA est composée d'eucaryotes et de procaryotes en interactions constantes. Les relations trophiques, la compétition et le commensalisme peuvent impacter positivement ou négativement la dynamique des communautés bactériennes responsables de l'atténuation des polluants métalliques au sein du DMA.

3.3.1.1. Relations trophiques

Les DMA étant généralement des environnements oligotrophes, les producteurs primaires y jouent un rôle important. Parmi eux, des eucaryotes photosynthétiques tels que *Euglena mutabilis*, jouent ainsi probablement un rôle indirect dans l'atténuation naturelle en fournissant de la matière organique aux bactéries hétérotrophes ou mixotrophes, présentées dans les tableaux 5 à 7 (Halter et al., 2012 ; Volant et al., 2016). Plusieurs bactéries autotrophes ferro-oxydantes sont aussi des producteurs primaires (e.g. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* et *Ferroplasma myxofaciens*) (Hallberg, 2010).

La prédation est un autre type de relation trophique qui peut aboutir à la diminution des populations bactériennes présentes dans un écosystème. La prédation d'*A. ferrooxidans* et *L.*

ferrooxidans par un flagellé proche des *Eutreptia* a été observée en co-culture, avec une préférence pour *A. ferrooxidans* (Mc Guinness et Johnson, 1992 ; Johnson et Rang, 1993).

3.3.1.2. Compétition

Les capacités physiologiques d'une bactérie peuvent lui conférer un avantage compétitif selon les conditions environnementales. Par exemple, *Ferrovum myxofaciens* produit des substances polymériques extracellulaires qui facilitent sa fixation aux surfaces, un avantage selon le débit du DMA (Rowe et Johnson, 2008). Des phénomènes de compétition apparaissent aussi pour l'utilisation d'une ressource partagée et limitée, particulièrement les substrats (source de carbone et d'électron) et l'habitat. Une inhibition compétitive a ainsi été observée lors d'une concentration excessive en bactéries ferro-oxydantes (> 0,6 mg de cellule/mL, poids sec). Le contact entre les cellules bactériennes limite la fixation du Fe(II), provoquant une inhibition de l'activité d'oxydation (Suzuki et al., 1989 ; Okereke et Stevens, 1991).

3.3.1.3. Commensalisme

Le commensalisme définit une relation bénéfique pour une espèce et sans préjudice pour l'autre, dans le cas d'un gain mutuel la relation devient mutualiste. Par exemple, l'association de *Desulfosporosinus* M1 et d'*Acidocella* PFBC apporte un bénéfice commun. La sulfato-réduction catalysée par *Desulfosporosinus* M1 génère de l'acétate qui est consommé par *Acidocella* PFBC. Cette consommation permet d'éliminer l'acétate qui est un composé inhibiteur pour l'activité de *Desulfosporosinus* M1 à faible pH (Kimura et al., 2006). Les auteurs font également l'hypothèse d'un transfert d'hydrogène entre PFBC et M1. Tout comme *Desulfosporosinus* M1 de nombreuses bactéries seraient impactées par leurs propres métabolites, s'ils n'étaient pas consommés par les hétérotrophes (Johnson, 1998 ; Johnson et Hallberg, 2008). Cet effet synergique explique pourquoi l'utilisation de cultures mixtes est souvent plus probante que celle de cultures pures pour reproduire ou optimiser un processus biologique en laboratoire (Norris, 1990 ; Johnson, 1998).

3.3.2. Paramètres environnementaux

Dans les DMA, les principales variables environnementales responsables de la dynamique des communautés bactériennes sont l'oxygène dissous, le pH, la température, le carbone organique total et les concentrations en éléments métalliques (Giloteaux et al., 2013 ; Méndez-García et al., 2015 ; Jones et al., 2015 ; Volant et al., 2014). La concentration en sulfate est aussi un facteur déterminant pour les BSR (Widdel, 1988).

3.3.2.1. Oxygène

La concentration en oxygène dissous peut conduire à la stratification des populations bactériennes entre zone oxique, suboxique et anoxique selon leur type respiratoire (aérobie strict, microaérophile/anaérobie facultatif, anaérobie strict) (Méndez-García et al., 2014). Comme précisé dans les paragraphes précédents, les réactions d'oxydation ou de réduction sont généralement favorisées en aérobie ou en anaérobie, respectivement. Ainsi, les BSR sont des bactéries anaérobies alors que les BFO ont plutôt une respiration aérobie (Tableau 6 et 7).

Des exceptions peuvent cependant être observées. Comme présenté dans la partie 2, certaines bactéries peuvent par exemple coupler l'oxydation de l'As(III) et du Sb(III) en condition anaérobie à la respiration des nitrates (Oremland et al., 2002 ; Rhine et al., 2006 ; Terry et al., 2015 ; Nguyen et al., 2017). De façon similaire, la réduction bactérienne de l'As(V) en aérobiose est possible via le système Ars (Mukhopadhyay et al., 2002). La concentration en oxygène dissous peut induire aussi une sélection plus fine selon la sensibilité de chaque bactérie à ce paramètre. Ainsi, *Gallionella* est une bactérie micro-aérophile, alors que *Ferrovum* est une aérobie stricte (Hanert, 2006 ; Johnson et al., 2014). Plusieurs études tendent d'ailleurs à montrer que l'abondance de *Ferrovum* serait corrélée à une augmentation des concentrations en oxygène (Jwair et al., 2016 ; Fabisch et al., 2016 ; Fernandez-Rojo et al., 2018 ; Laroche et al., 2018).

3.3.2.2. pH

Les conditions acides des drainages miniers semblaient à priori inappropriées au développement des BSR, au vu de l'énergie nécessaire pour le maintien de leur homéostasie et de la toxicité des métabolites de la sulfato-réduction (Martin, 1990 ; Lowe et al., 1993 ; Koschorreck, 2008). C'est pourquoi, la détection de BSR dans des environnements acides a d'abord été expliquée par la présence de microniches dont le pH serait plus élevé (Widdel, 1988 ; Hao et al., 1996). L'échec des isolements de BSR acidophiles ou actives à pH acide appuyait cette théorie. L'explication de cet échec réside en partie dans l'utilisation de sources de carbone toxiques à pH acide, comme le lactate (Norris et Ingledew, 1992). Par la suite, l'utilisation d'autres substrats, comme le glycérol ou le méthanol, s'est avérée plus efficace pour la culture de BSR en milieu acide (Johnson, 1998). Les bactéries qui se développent dans les DMA, sont toutes des acidophiles ou des acidotolérantes. Pour maintenir leur homéostasie, les acidophiles doivent maintenir un potentiel électrique membranaire inversé ($\Delta\Psi$ positif) afin d'empêcher l'entrée de protons dans la cellule (Baker-Austin et Dopson, 2007). Cependant, toutes les acidophiles n'ont pas la même sensibilité aux pH. Par exemple, *Gallionella* préfère des pH moins acides (>3) que *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus* et *Ferrovum*. Le développement de ces dernières s'effectue à des optimums de pH différents (respectivement pH <2, pH<3 et pH 3) (Coram et Rawlings, 2002 ; Grettenberger et al., 2017). Toutefois, pour des pH inférieurs à 1, l'activité des bactéries ferro-oxydantes peut-être inhibée (Johnson, 1998 ; Baker-Austin et Dopson, 2007). Le tableau 5 montre aussi que les différentes espèces de *Thiomonas* peuvent croître dans des gammes de pH différentes.

3.3.2.3. Température

La majorité des bactéries impliquées dans l'atténuation des polluants métalliques au sein des DMA sont mésophiles (Tableaux 5-7). Leur température optimale de croissance et d'activité est inférieure à 40 °C (Johnson et Hallberg, 2003). Certaines bactéries des DMA sont cependant des thermophiles modérées (e.g. *Ferrithrix thermotolerans* et *Sulfobacillus* spp.) (Dopson et Lindström, 2004 ; Johnson et al., 2009 ; Méndez-García et al., 2015). A contrario, *At. ferrooxidans* est capable de tolérer des températures descendant jusqu'à 5°C (Kupka et al., 2007). De même, certaines BSR peuvent tolérer une large gamme de température variant de -5 à 75°C (Neculita et al., 2007). Plusieurs études ont démontré une corrélation entre les variations

de température et la croissance ou l'activité de bactéries issues d'environnements pollués (Battaglia-Brunet et al., 2002 ; Dopson et al., 2007 ; Ito et al., 2012 ; Tardy et al., 2018). Ainsi Tardy et al. (2018) ont observé une oxydation de l'As plus importante lorsque la température augmente de 20 à 35°C. Cette augmentation résulterait d'une activité accrue des bactéries arsénite-oxydantes ou de la sélection de bactéries plus efficaces, vu qu'aucune augmentation de la biomasse n'est constatée entre les deux conditions.

3.3.2.4. Carbone organique total

Comme évoqué plus haut (partie 3.3.1.1.) la présence d'une source de carbone organique assimilable est un facteur crucial pour tous les hétérotrophes. C'est le cas pour la majorité des BSR qui couplent l'oxydation du carbone organique à la réduction des sulfates. L'oxydation des composés organiques par les BSR permet de les classer dans deux groupes : le groupe 1 dont l'oxydation des substrats carbonés est incomplète, et, le groupe 2 qui oxydera complètement les sources d'électrons carbonées en CO₂ (Muyzer et Stams, 2008). Une centaine de molécules ont été identifiées comme une source de carbone utilisable par des BSR, mais elles préfèrent généralement utiliser les composés organiques à faible poids moléculaire (Hussain et al., 2016). Les préférences pour les composés organiques varient cependant en fonction du genre et de l'espèce bactérienne, aussi bien chez les BSR que les BFO ou *Thiomonas* spp. (Johnson et Hallberg, 2008 ; Battaglia-Brunet et al., 2006a et 2011).

3.3.2.5. Concentrations en éléments métalliques et sulfates

Les BSR et les BFO dépendent respectivement des sulfates et du FeII pour leur métabolisme énergétique. Certaines *Thiomonas*, comme *Tm. delicata* DSM 1636, sont aussi capables de générer de l'énergie à partir de l'oxydation de l'As (Tableau 5). Cependant, à fortes concentrations, les éléments métalliques peuvent aussi être toxiques pour les bactéries. Le Fe(III) agit par exemple comme un inhibiteur pour les BFO (Rawlings et al., 1999 ; Meruane et al., 2002 ; Kuang et al., 2013). Le ratio Fe(III)/Fe(II) dissous peut donc moduler la distribution et l'activité des bactéries ferro-oxydantes dans un DMA, en fonction de leur affinité et sensibilité pour ces éléments. Un ratio important de Fe(III)/Fe(II) favorisera le développement de *Leptospirillum* spp. au détriment de *At. ferrooxidans* (Rawlings et al., 1999). Des résultats similaires ont été observés pour les BSR et le genre *Thiomonas* (Bryan et al., 2009 ; Giloteaux et al., 2013).

Tableau 5 : Principales caractéristiques métaboliques de souches appartenant au genre *Thiomonas* isolées à partir d'environnements miniers

Souches		<i>Tm. arsenitoxydans</i> 3As	<i>Tm. delicata</i> DSM 16361	<i>Thiomonas</i> sp. Ynys1	<i>Thiomonas</i> sp. WJ68	
Groupe		I	II	I	I	
Origine		DMA, ancienne mine de plomb argentifère (Carnoules, France)	DMA, mine d'or (Cheni, France)	Mine de charbon (Ynysarwed, UK)	DMA, système de bioremédiation (Wheal Jane, UK)	
As	Oxydation	+	+	-	+	
	Gain d'énergie	-	+	-	-	
	CMI (en mM)	As(III)	10	10	5	10
		As(V)	100	100	12.5	>100
gènes		<i>aoxAB</i> , <i>arsB1</i> et <i>arsB2</i>	<i>aoxAB</i> et <i>arsB2</i>	<i>arsB1</i>	<i>aoxAB</i> et <i>arsB1</i>	
Type trophique		Mixotrophe				
Type respiratoire		Aérobie	Anaérobie facultative	Aérobie		
Température (en °C)		Mésophile (optimum à 30)	Mésophile (optimum entre 20-30)	Mésophile (cultivée entre 20-30)		
pH		Acidophile modérée (optimum à 5)	Acidophile modérée (optimum entre 4,0-7,5)		Acidophile modérée (cultivée entre 3,8-6)	
Références		Duquesne et al., 2008 ; Bryan et al., 2009	Battaglia-Brunet et al., 2006a et 2011 ; Bryan et al., 2009	Halberg et Johnson, 2003 ; Bryan et al., 2009	Johnson et Hallberg, 2005b ; Bryan et al., 2009	

Tableau 6 : Principales caractéristiques métaboliques de bactéries sulfato-réductrices détectées au sein de drainages miniers acides

Phylum/Classe	Genre/Espèce	Type trophique	Type respiratoire	Classification thermique	pH	Références
<i>δ-proteobacteria</i>	<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	Hétérotrophe	Anaérobie	Mésophile	N.A	Rožanova et al., 1988
	<i>Desulfomonile tiedjei</i>	Mixotrophe	Anaérobie	Mésophile	Neutrophile	DeWeerd et al., 1990
	<i>Desulfosarcina</i> spp.	N.A	N.A	N.A	N.A	Bruneel et al., 2005
	<i>Desulfurella</i> spp.	N.A	N.A	N.A	N.A	Sánchez-Andrea et al., 2011
	<i>Desulfovibrio africanus</i>	Hétérotrophe	Anaérobie	Mésophile	N.A	Campbell et al., 1966
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Hétérotrophe	Anaérobie	Mésophile	Neutrophile	Gilmour et al., 2011
	<i>Desulfovibrio longus</i>	Hétérotrophe	Anaérobie	Mésophile	Neutrophile	Magot et al., 1992
	<i>Desulfovibrio magneticus</i>	Hétérotrophe	Anaérobie	Mésophile	Neutrophile	Sakaguchi et al., 2002
	<i>Syntrophobacter</i> spp.	N.A	N.A	N.A	N.A	Sánchez-Andrea et al., 2011
<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfosporosinus acididurans</i>	Mixotrophe	Anaérobie	Mésophile	Acidophile modéré	Sánchez-Andrea et al., 2015
	<i>Desulfosporosinus acidiphilus</i>	Mixotrophe	Anaérobie	Mésophile	Acidophile modéré	Alazard et al., 2010
	<i>Desulfosporosinus youngiae</i>	Hétérotrophe	Anaérobie	Mésophile	Neutrophile	Lee et al., 2009

Tableau 7 : Principales caractéristiques métaboliques de bactéries ferro-oxydantes détectées au sein de drainages miniers acides

Phylum/Classe	Genre/Espèce	Type trophique	Type respiratoire	Classification thermique	pH	Références
<i>Proteobacteria</i>						
<i>β-proteobacteria</i>	<i>Ferroplasma myxofaciens</i>	Autotrophe	Aérobie	Mésophile/ Psychrotolérant	Acidophile	Johnson et al., 2014
	<i>Gallionella ferruginea</i>	Mixotrophe	Micro-aérophilie	Mésophile	Neutrophile	Ehrlich et al., 2002
	<i>Thiomonas</i> spp.	Mixotrophe	Aérobie	Mésophile	Acidophile	Kelly et Wood, 2015
<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Acidithiobacillus ferridurans</i>	Autotrophe	Anaérobie facultative	Mésophile	Acidophile	Hedrich et Johnson, 2013
	<i>Acidithiobacillus ferriphilus</i>	Autotrophe	Anaérobie facultative	Mésophile /Psychrotolérant	Acidophile	Falagán et Johnson, 2016
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	Autotrophe	Anaérobie facultative	Mésophile /Psychrotolérant	Acidophile	Hallberg et al., 2010
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Autotrophe	Anaérobie facultative	Mésophile	Acidophile	Quatrini et Johnson, 2019
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Mixotrophe	Anaérobie facultative	Thermophile modéré	Acidophile	Donati et Sand, 2007
	<i>Acidithrix ferrooxidans</i>	Hétérotrophe	Anaérobie facultative	Mésophile	Acidophile	Jones et Johnson, 2015
	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	Hétérotrophe	Anaérobie facultative	Mésophile	Acidophile	Johnson et al., 2009
	<i>Ferrithrix thermotolerans</i>	Hétérotrophe	Anaérobie facultative	Thermophile modéré	Acidophile	
<i>Nitrospirae</i>	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Autotrophe	Aérobie	Mésophile /Thermotolérant	Acidophile	Donati et Sand, 2007
	<i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i>	Autotrophe	Aérobie	Mésophile	Acidophile	
	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Autotrophe	Aérobie	Mésophile	Acidophile	
<i>Firmicutes</i>	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	Mixotrophe	Anaérobie facultative	Mésophile /Thermotolérant	Acidophile	Donati et Sand, 2007
	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	Mixotrophe	Anaérobie facultative	Thermophile modéré	Acidophile	
	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Mixotrophe	Anaérobie facultative	Thermophile modéré	Acidophile	

4. Développement d'éco-technologies de bioremédiation microbienne des drainages miniers

4.1. Traitements actifs ou passifs

Une fois généré, un drainage minier acide peut s'auto-entretenir pendant des siècles (Modis et al., 1998). C'est pourquoi il est préférable d'agir en amont de sa formation en appliquant des techniques préventives au niveau des déchets miniers, telles qu'un stockage adapté, un confinement, un ajout d'inhibiteurs, une biolixiviation accélérée ou une maîtrise des écoulements (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a). Ces méthodes vont ainsi permettre d'inhiber ou de limiter l'acidification, mais restent complexes à mettre en place. Quand les DMA sont déjà formés, différentes techniques sont alors disponibles pour les traiter avant leur déversement dans le milieu naturel. Ces techniques reposent sur des mécanismes physiques, chimiques ou biologiques afin de neutraliser et éliminer les polluants métalliques des eaux minières. Elles sont classées dans deux catégories, les processus actifs et les systèmes passifs.

Les traitements actifs sont des technologies qui nécessitent un apport continu de ressource (Johnson et Hallberg, 2005a). Plus précisément, ces traitements nécessitent un apport de réactifs chimiques ou la mise en place d'équipements importants nécessitant à la fois de la maintenance et de l'énergie (Brunet et Coste, 2000). Les techniques employées, pour mener à bien ces traitements, sont basées sur des réactions de neutralisation, d'oxydation, d'adsorption, d'échange d'ions, d'extraction, des réactions électriques, de filtration et de sulfato-réduction biologique (Tableau 8) (Brown et al., 2002).

La neutralisation est le traitement actif le plus employé. Les effluents miniers à traiter doivent être préalablement collectés. Dans un premier temps, les ions H^+ vont être neutralisés par l'ajout de réactifs alcalins. La hausse du pH entraîne une précipitation des polluants métalliques sous forme d'(oxy)hydroxydes. Comme observé dans la partie 2, les (oxy)hydroxydes de fer jouent un rôle majeur dans l'immobilisation des polluants. La précipitation du fer ferrique nécessite un pH supérieur à 5. Différents agents neutralisants peuvent être utilisés comme le calcaire, la chaux hydratée ou vive, le carbonate de soude, la soude caustique, l'hydroxyde de magnésium, l'ammoniac, les laitiers d'aciérie et les cendres volantes (Chevalier, 1996 ; Akcil et Koldas, 2006). L'aération ou l'ajout d'oxydants chimiques, tel que le peroxyde d'hydrogène, accélère l'oxydation du fer et favorisent donc la précipitation. Cette précipitation est aussi favorisée par l'emploi de coagulants et de flocculants, qui en complément augmentent la densité des boues générées (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a). L'utilisation de ces réactifs chimiques permet au final de neutraliser un volume important de DMA à court terme et nécessite peu d'espace. Cependant, le coût financier à long terme lié à ces traitements chimiques est non négligeable. Il englobe à la fois le prix et le transport des réactifs, une maintenance et un suivi continu, mais aussi le traitement, la stabilisation et le stockage des boues générées en grande quantité par ces méthodes (Brunet et Coste, 2000 ; Brown et al., 2002). La neutralisation à la chaux est la méthode la plus fréquemment employée au vu de son efficacité, sa fiabilité et son coût moindre par rapport aux autres méthodes chimiques. Cependant une analyse du cycle de vie des traitements actifs à la chaux, par rapport à d'autres traitements, conclut à des impacts néfastes considérables au niveau

climatique, de la consommation d'énergie et des ressources, ainsi qu'au niveau sanitaire et environnemental (Hengen et al., 2014).

Des alternatives à l'utilisation des réactifs chimiques ont été développées parmi les traitements actifs. Les méthodes les plus attrayantes permettent de traiter l'effluent tout en récupérant les métaux et métalloïdes valorisables économiquement. Cette précipitation sélective nécessite des technologies basées sur la sulfato-réduction biologique, l'échange d'ions, l'extraction, des méthodes électriques ou la filtration (Tableau 8) (Bru, 2006). Les bioréacteurs de sulfato-réduction ont été développés ces dernières années et testés avec succès à l'échelle du pilote (Boonstra et al., 1999 ; Xingyu et al., 2013). Ces réacteurs contiennent des bactéries sulfato-réductrices, dont l'activité induit une augmentation du pH et la précipitation des polluants métalliques sous forme de sulfures. Le zinc et le cuivre sont notamment deux éléments qui peuvent être valorisés suite à cette précipitation. Cependant, ces biosystèmes actifs ont un coût de construction et de fonctionnement conséquents (Johnson et Hallberg, 2005a ; Panda et al., 2016). Les autres technologies disponibles sont aussi relativement coûteuses, ce qui peut limiter l'avantage économique de la valorisation des métaux. De plus, elles semblent actuellement assez complexes à mettre en place à l'échelle d'un DMA, et nécessiteraient souvent la combinaison de plusieurs types de traitements (prétraitement ou neutralisation supplémentaire). Leurs applications sur des sites miniers abandonnés ou géographiquement difficiles d'accès ne semblent pas, à ce stade de développement, envisageables.

Tableau 8 : Principes, avantages et limites des traitements actifs (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a ; Bru, 2006 ; ITRC, 2010 ; US EPA, 2015 ; Rakotonimaro, 2017 ; Moodley et al., 2018)

Type	Méthode	Principe	Technique	Avantages	Limites
PHYSICO-CHIMIE	Neutralisation	Augmenter le pH afin de précipiter les éléments métalliques sous forme d'(oxy)hydroxydes	Ajout de réactifs alcalins	-Rapide et simple -Peu ou pas d'infrastructures nécessaires -Applicable à des volumes importants de DMA - Applicable à une large gamme de DMA (physico-chimie)	- Coûteux - Mo, Cr, Hg et Ar ne sont pas précipité suite au changement de pH - Instabilité et quantité importante de boues - Pas de valorisation des éléments métalliques (non sélectif) - Impacts environnementaux
	Oxydation	Oxyder les éléments métalliques afin d'accélérer leur précipitation sous forme d'(oxy)hydroxydes	Aération ou ajout de réactifs oxydants	-Mêmes avantages que la neutralisation	-Pas de neutralisation du pH -A coupler avec la neutralisation
	Décantation	Séparer les (oxy)-hydroxydes de l'eau	Ajout de coagulants et floculants	-Mêmes avantages que la neutralisation -Réduction de la densité des boues	-Pas de neutralisation du pH -A coupler avec la neutralisation
	Adsorption	Accélérer la précipitation sous forme d'(oxy)hydroxydes	Ajout de matériaux adsorbants (biomasse morte, argiles et ses dérivés, adsorbants commerciaux)	-Rapide et simple -Peu ou pas d'infrastructures nécessaires -Faible volume de boue -Pas de réactifs chimiques	-Faible capacité d'adsorption et durée de vie limitée des matériaux conventionnels -Coût élevé de certains adsorbants commerciaux -Sensible aux matières en suspension (MES) -Régénération coûteuse des matériaux -Pas de neutralisation du pH
	Echange d'ions	L'échangeur d'ions est une matrice solide qui va adsorber les ions métalliques présents dans l'effluent et les remplacer par des ions non toxiques de charge équivalente	Adsorption sur résines synthétiques	-Pas de réactifs chimiques -Peu ou pas de boues -Valorisation des métaux possibles	- Coût important des résines -Sensible au pH, aux MES, aux fortes concentrations de Fe, Al et Mn - Non adapté aux matrices complexes et au traitement des faibles concentrations en polluants métalliques -Pas de neutralisation du pH
	Extraction	Extraire les ions métalliques par un solvant organique	Extraction par solvant	-Adapté aux matrices complexes -Valorisation des métaux possibles	-Non adapté aux faibles concentrations en métaux/métalloïdes - Coût élevé du solvant -Transfert de solvant (parfois toxique) dans l'effluent à traiter -Pas de neutralisation du pH
			Extraction via une membrane liquide	-Adapté aux matrices complexes et aux effluents peu concentrés -Valorisation des métaux possibles -Utilisation de faible quantité de solvant	-Coût élevé du solvant -Transfert de solvant dans l'effluent à traiter -Sensible aux composés organiques -Pas de neutralisation du pH

Tableau 8 (suite) : Principes, avantages et limites des traitements actifs (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a ; Bru, 2006 ; ITRC, 2010 ; US EPA, 2015 ; Rakotonimaro, 2017 ; Moodley et al., 2018)

Type	Méthode	Principe	Technique	Avantages	Limites
PHYSICO-CHIMIE	Technologies basées sur un courant électrique	Précipitation des éléments métalliques directement sur une électrode (électrolyse) ou avec les ions libérés par sa dissolution (électrocoagulation). La cathode peut neutraliser le pH en réduisant les ions H ⁺ en H ₂ .	Electrolyse	-Valorisation des métaux -Pas de réactifs chimiques	-Efficace pour de fortes concentrations en éléments métalliques -Empoisonnement des électrodes -Sensible au Fe et matrice complexe -Besoin d'énergie -Utilisation essentiellement <i>ex-situ</i>
			Electrocoagulation	-Valorisation des métaux -Pas de réactifs chimiques -Neutralisation du pH -Bonne qualité des eaux traitées -Boues plus compactes	-Coût élevé -Besoin d'énergie -Remplacement régulier des électrodes -Inefficace à pH < 3 -Complexe à appliquer <i>in situ</i>
	Filtration	Rétention des ions métalliques suite au passage de l'effluent à traiter à travers une membrane sélective	Séparation par membranes (<i>e.g.</i> osmose inverse, électrodialyse, nanofiltration)	-Eau traitée de très bonne qualité -Faible coût d'exploitation -Large rang de polluants métalliques éliminés -Peu ou pas de boues -Valorisation des métaux -Pas de réactifs chimiques	-Coût élevé des membranes -Sensible aux variations de pH, aux microorganismes et MES -Colmatage -Nécessite un prétraitement -Besoin d'énergie
BIOLOGIE	Réduction des sulfates	Neutralisation et précipitation des éléments sous forme de sulfures métalliques suite à une sulfato-réduction biologique	Bioréacteur sulfidogénique	-Performance plus prédictibles et contrôlable que les autres traitements biologiques -Valorisation des métaux/métalloïdes possibles -Elimination des sulfates et éléments métalliques -Production d'alcalinité -Possibilité de modifier les paramètres opératoires du système afin de favoriser l'activité des BSR (<i>e.g.</i> substrat organique, débit, pH)	-Coût de construction et opérationnel important -Besoin d'énergie - Besoin de réactif (donneur d'électrons)

Les traitements passifs sont actuellement considérés comme une option de traitement plus durable pour la remédiation des DMA, particulièrement lorsque les activités minières ont cessé (Santos Jallath et al., 2018). Ils consistent à favoriser et contrôler les processus chimiques et biologiques qui naturellement atténuent l'impact des DMA (Brunet et Coste, 2000). En général, le besoin énergétique de ces technologies est minimisé par une valorisation de la topographie des sites en privilégiant l'écoulement gravitaire (Johnson et Hallberg, 2005a). Ils consomment moins d'énergie, nécessitent moins de maintenance et produisent des boues plus stables (Skousen et Ziemckiewicz, 2005 ; Zagury et al., 2007 ; Skousen et al., 2017). Au final, ces traitements nécessitent peu de ressource et minimisent les coûts financiers et environnementaux à long terme (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a).

Tout comme les traitements actifs, les traitements chimiques passifs reposent principalement sur des réactions d'alcalinisation. La disposition de drains ou lits calcaires, en condition oxique ou anoxique, va augmenter le pH suite à la formation de bicarbonate. En aérobiose, l'augmentation du pH entraîne la précipitation des (oxy)hydroxydes métalliques. Cette précipitation peut être favorisée par des réactions d'oxydation via l'utilisation de cascades d'aération (Trumm, 2010). L'utilisation de drains calcaires est une solution relativement simple qui est souvent couplée à d'autres systèmes de traitement. Leur durée de vie reste cependant limitée avec une efficacité dépendante de leurs limites d'application (Tableau 9) (Trumm, 2010 ; Skousen et al., 2017 ; Moodley et al., 2018).

Le traitement biologique passif utilise des organismes morts ou vivants. Par exemple, le traitement des effluents par biosorption peut désigner la séquestration passive des métaux et métalloïdes sur une biomasse inanimée, ou une séquestration active par des organismes vivants. Les plantes et les microorganismes sont les organismes vivants les plus utilisés pour la bioremédiation des DMA, avec une exploitation plus fréquente des bactéries (Brunet et Coste, 2000 ; Brown et al., 2002). Comme décrit précédemment, certaines bactéries interagissent avec les métaux via leur métabolisme, ce qui contribue à l'atténuation naturelle des DMA. Ces processus bactériens sont reproduits, voire stimulés quand les facteurs de contrôles sont connus, au sein de systèmes de traitement. Les systèmes les plus utilisés sont les lagunes aérobies ou anaérobies, les bioréacteurs, les systèmes successifs de production d'alcalinité (SAPS en anglais) et les bio-barrières réactives perméables. Ces technologies reposent sur la sulfato-réduction bactérienne en condition anaérobie et l'oxydation du Fe et/ou du Mn en condition aérobie (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a ; Skousen et al., 2017). Le tableau 9 résume les principaux avantages et limites de chacune de ces technologies, de plus amples détails seront donnés dans la suite du chapitre. De façon générale, ces traitements biologiques présentent l'avantage d'être vraiment autonomes suite à une période de latence due au développement des bactéries. En revanche, leur efficacité fluctue selon les conditions physico-chimiques, qui peuvent varier saisonnièrement et impacter la dynamique des communautés bactériennes impliquées dans la bioremédiation (Brunet et Coste, 2000 ; Brown et al., 2002).

La suite de notre étude se focalisera sur les systèmes de traitement biologique passifs, qui à ce stade semblent plus appropriés aux traitements des DMA abandonnés. Cependant, chaque technologie de traitement a ses avantages et ses limites, comme détaillé dans les tableaux 8 et 9. Ces caractéristiques sont à étudier en amont de toute tentative de remédiation en considérant à la fois les caractéristiques propres à l'effluent à traiter, les moyens disponibles et les objectifs

de traitement à atteindre. Au final, le couplage de ces différentes technologies est souvent nécessaire pour minimiser les limites de chaque système et optimiser l'efficacité globale.

Tableau 9 : Principes, avantages et limites des traitements passifs (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a ; Bru, 2006 ; ITRC, 2010 ; US EPA, 2015 ; Rakotonimaro, 2017 ; Moodley et al., 2018)

Type	Méthode	Principe	Technique	Avantages	Limites
Physico-chimie	Neutralisation passive	Augmenter le pH via la dissolution du calcaire afin de précipiter les éléments métalliques sous forme d'(oxy)hydroxydes	Drain anoxique calcaire (DAC)	-Simple -Neutralisation du pH -Pas de réactifs chimiques -Peu coûteux -Peu de maintenance -Adapté aux variations climatiques	-Colmatage -Non adapté aux fortes concentrations en éléments métalliques -Débit faible nécessaire -Élimination peu efficace des éléments métalliques (e.g. sulfate, Fe, Al) -Perte d'efficacité à long terme -Anoxie difficile à maintenir
			Lit/Tranchée oxique calcaire (LOC/TOC)	-Simple -Augmentation du pH -Élimination des polluants métalliques -Pas de réactifs chimiques -Peu coûteux -Peu de maintenance	-Colmatage -Sensible aux fortes concentrations en fer -Faible réactivité du matériau
	Oxydation passive	Utilisation de l'oxygène de l'air comme oxydant afin d'accélérer la précipitation des polluants métalliques sous forme d'(oxy)hydroxydes	Cascade d'aération	-Minimise le volume de boue -Pas de réactifs chimiques -Pas de maintenance -Peu coûteux	-A coupler à d'autres traitements
Biologie	Sorption	Sorption des polluants métalliques sur les réactifs chimiques qui composent une barrière	Barrière réactive perméable chimique	-Pas de réactifs chimiques -Peu coûteux -Pas de maintenance -Prévention d'une contamination des eaux souterraines -Pas d'espace au sol requis -Pas de traitement des boues	-Besoin de plusieurs substrats pour être efficace -Nécessite de bien caractériser et modéliser en amont le DMA à traiter -Colmatage -Adapté aux DMA qui se situe à moins de 20 m en dessous de la surface -Les performances à long terme sont encore à l'étude -Colmatage
	Réduction bactérienne	Neutralisation et précipitation de sulfures métalliques suite à l'activité des bactéries sulfato-réductrices dont la croissance est favorisée par le substrat dans la barrière	Barrière réactive perméable biologique	-Pas de réactifs chimiques -Peu de maintenance -Peu coûteux -Élimine les métaux et les sulfates -Efficace à long terme -Boues stables et produites en faible quantité -Neutralisation	-Besoin d'espace -Sensible aux variations environnementales -Temps de séjour hydraulique important -Efficacité relative sur les fortes concentrations en éléments métalliques -Coût initial de construction important -Traitement plus lent

Tableau 9 (suite) : Principes, avantages et limites des traitements passifs (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a ; Bru, 2006 ; ITRC, 2010 ; US EPA, 2015 ; Rakotonimaro, 2017 ; Moodley et al., 2018)

Type	Méthode	Principe	Technique	Avantages	Limites
BIOLOGIE		Neutralisation et élimination des polluants en combinant le traitement par la dissolution du calcaire et la lagune anaérobie	Systèmes successifs de production d'alcalinité (SAPS)	-Pas de réactifs chimiques -Neutralisation et élimination des éléments métalliques	-Colmatage -Besoin d'espace -Limiter selon la concentration en oxygène dissous initiale dans l'effluent -Coût élevé selon la complexité du système
	Réduction bactérienne	Neutralisation et précipitation des éléments métalliques, soit sous forme de sulfures métalliques suite à la sulfato-réduction bactérienne, soit avec les (oxy)hydroxydes de fer suite à la ferro-oxydation bactérienne	Bioréacteurs de sulfato-réduction passifs	-Pas de réactifs chimiques -Neutralisation, élimination des éléments métalliques et sulfates -Peu de maintenance	-Besoin d'espace -Sensibles aux variations environnementales et surtout au pH -Apport de substrat organique à adapter pour rester en traitement passif -Dépend de la diversité et de la dynamique des bactéries
	Oxydation bactérienne, oxygénation, sorption	Précipitation, sorption et bioaccumulation des polluants métalliques et neutralisation suite à l'activité combinée de plantes et bactéries oxydants les métaux ou métalloïdes en condition oxydante	Lagune aérobie plantée	-Pas de réactifs chimiques -Élimination des métaux -Peu de maintenance et peu coûteux -Efficace à long terme	-Besoin d'espace -Sensible aux variations environnementales -Temps de séjour hydraulique important -Efficacité relative sur les fortes concentrations en éléments métalliques -Coût initial de construction important -Traitement lent
	Oxydation bactérienne	Bio-oxydation et bio-précipitation d'(oxy)-hydroxydes, co-précipitation de métaux/métalloïdes	Biofiltre passif	-Pas de réactifs chimiques -Élimination des métaux -Peu de maintenance et peu coûteux -Efficace à long terme	- Colmatage - Efficacité relative sur les fortes concentrations en éléments métalliques
	Sorption	Séquestration passive des métaux et métalloïdes sur la biomasse, ou séquestration active par des organismes vivants	Biosorption	-Simple -Pas de réactifs chimiques	-Sorption réversible des métaux -Saturation rapide des sites de sorption

4.2. Traitements biologiques passifs des DMA

De nombreux traitements actifs ou passifs permettent le traitement des drainages miniers acides. Cependant, les traitements biologiques passifs sont actuellement considérés comme la meilleure option pour le traitement des DMA abandonnés. L'As, le Sb et le Tl sont susceptibles d'être éliminés des effluents miniers acides par des traitements aérobies ou anaérobies. Les traitements biologiques passifs anaérobies reposent sur la précipitation des sulfures métalliques suite à une sulfato-réduction, alors que les traitements aérobies favorisent la précipitation des (oxy)hydroxydes métalliques via des processus d'oxydation bactérienne. L'élimination de l'As, du Sb et du Tl via ces processus sera favorisée au sein de lagunes ou de bioréacteurs, dont les caractéristiques seront plus amplement détaillées dans cette partie.

4.2.1. Lagunage

Le système de lagunage s'inspire des zones humides naturelles qui permettent d'atténuer la concentration en métaux ou métalloïdes présents dans les DMA. Cette atténuation naturelle a été constatée dès 1978 dans l'Ohio et en West Virginia, aux Etats-Unis (Huntsman et al., 1978 ; Wieder et Lang, 1982). Cependant, les zones humides naturelles sont protégées dans de nombreux pays, d'où la création de zones humides artificielles comme systèmes de remédiation. Ces zones humides artificielles sont désignées comme « constructed wetland » en anglais mais peuvent être dénommées de différentes façons en français : terre humide, marais épurateur ou encore lagune (Brunet et Coste, 2000). Cette technologie combine des processus physiques, géochimiques et biologiques. Ils sont à ce jour le type de traitement passif le plus employé pour remédier les effluents miniers de façon passive. Deux types de lagunes ont été développées, celles dites aérobies et les anaérobies (Pat-Espadas et al., 2018).

4.2.1.1. Principe

Les lagunes sont constituées de façon générale d'un support physique (sol, roche, granulats de type calcaire, matières organiques ou autres), de l'effluent, de végétaux aquatiques et de communautés microbiennes. Tous ces composants vont jouer un rôle dans l'élimination des polluants et contribuer à un effet synergique. Le processus reposera principalement sur des réactions de réduction en condition anaérobie, alors que l'oxydation est favorisée en condition aérobie (Pat-Espadas et al., 2018).

- *Lagunes anaérobies*

Les conditions réductrices des lagunes anaérobies ou « de compost » favorisent la réduction des sulfates suivie de la précipitation des sulfures métalliques. L'effluent à traiter s'écoule horizontalement dans un milieu poreux, souvent alcalin, mélangé avec de la matière organique (Fig. 13). La lagune anaérobie à flux vertical ou réacteur à flux vertical est un dispositif alternatif pouvant combiner un traitement par du calcaire et le lagunage anaérobie (Brunet et Coste, 2000 ; Zipper et al., 2014 ; Skousen et al., 2017 ; Pat-Espadas et al., 2018). Le matériau calcaire peut être soit intégré au remplissage de la lagune, soit placé en amont de la lagune dans un drain. La végétation plantée en surface de la lagune permet une consommation de l'O₂

dissous au niveau des racines par la production d'exsudats racinaires, le renouvellement du substrat organique et un support de fixation pour les bactéries. Certaines espèces végétales peuvent aussi séquestrer les polluants métalliques (Pat-Espadas et al., 2018). Beaucoup d'études considèrent cependant que le rôle de la végétation est minoritaire par rapport à celui des microorganismes (Vymazal et Kröpfelová, 2008 ; Li et al., 2014 ; Adrados et al., 2014 ; Wu et al., 2014 ; Haydar et al., 2015). Les conditions réductrices dans ces systèmes favorisent principalement le développement et l'activité des BSR (Faulwetter et al., 2009 ; Zipper et al., 2014).



Figure 13 : Schéma d'une lagune anaérobie plantée (Zipper et al., 2014)

- Lagunes aérobies

Contrairement aux lagunes anaérobies, les lagunes aérobies fonctionnent essentiellement par des processus de surface (pas d'apport de matière organique sur une grande épaisseur). Le temps de résidence important des effluents dans une lagune aérobie permet leur aération, l'oxydation du fer et la précipitation des (oxy)hydroxydes métalliques. La formation d'oxydes de manganèse et d'aluminium contribue également à l'élimination des polluants métalliques par adsorption ou co-précipitation. La lagune consiste en un bassin d'eau libre, généralement situé au-dessus du sol, avec un écoulement horizontal. La lame d'eau atteint une hauteur maximum de 0,45 m afin de maintenir l'aérobiose (Fig. 14). Les macrophytes plantés dans ces systèmes sont majoritairement des *Typha*. Ils peuvent favoriser la régulation du débit, apportent de la matière organique (pour des bactéries aérobies hétérotrophes pouvant oxyder le manganèse), peuvent augmenter la surface de précipitation, accélérer l'oxydation du fer et stabiliser les précipités par effet de filtration. Cependant, le rôle de la végétation dans les lagunes aérobies est moindre qu'en condition anaérobie, et se limite fréquemment à un aspect esthétique (Brunet et Coste, 2000 ; Johnson et Hallberg, 2005a ; Skousen et al., 2017 ; Pat-Espadas et al., 2018).



Figure 14 : Schéma d'une lagune aérobie plantée (Zipper et al., 2014)

4.2.1.2. Efficacité du lagunage pour traiter l'As, le Sb et le Tl

L'Al, le Mn, le Ni et le Zn sont les éléments métalliques les mieux éliminés au sein des lagunes (Pat-Espadas et al., 2018). Aucune étude n'a été réalisée sur le thallium au sein de ces systèmes à ce jour. En revanche, l'élimination du Sb a bien été constatée au sein de lagunes naturelles ou construites mais à partir d'effluents miniers neutres (Palmer et al., 2015 ; Warnken et al., 2017). Finalement l'application de ces systèmes aux DMA arséniés a fait l'objet de quelques études.

Des expériences en laboratoire ont confirmé la faisabilité de l'élimination de l'As à partir de milieux acides, d'eaux synthétiques ou de DMA, au sein de lagunes aérobies et anaérobies (Buddhawong et al., 2005 ; Stottmeister et al., 2006 ; Lizama-Allende et al., 2014 ; Lizama-Allende et al., 2018). Buddhawong et al. (2005) ont montré que 95 % de l'As peut être éliminé par co-précipitation avec le fer dans un système de lagunage *in vitro* traitant une eau synthétique à pH initial 4 et avec une concentration d'As de 0,5 mg/L. Lizama-Allende et al. (2018) ont aussi réussi à éliminer plus de 99 % de l'As, à partir d'une eau synthétique à pH 2 et contenant 2 mg/L d'As, au sein d'une lagune de laboratoire anaérobie plantée constituée de zéolite ou de calcaire. Le traitement d'un drainage minier arsénié a aussi été mené *in situ* en combinant les deux types de lagunes à d'autres technologies (drains calcaires et bassin d'aération) (Hamilton et al., 1999 ; Kalin et Caetano Chaves, 2003 ; Whitehead et al., 2005 ; Elbaz-Poulichet et al., 2006 ; Macías et al., 2012). La combinaison de ces traitements permet d'éliminer entièrement l'arsenic présent dans ces DMA lorsque les concentrations initiales sont relativement faibles (< 3 mg/L) (Hamilton et al., 1999 ; Whitehead et al., 2005 ; Macías et al., 2012). En revanche, l'élimination de l'arsenic s'est avérée limitée (maximum 20 %) dans un système de traitement d'un DMA fortement concentré en As (50 à 250 mg/L) (Elbaz-Poulichet et al., 2006).

4.2.2. Bioréacteurs microbiens

Les bioréacteurs sont un autre type de traitements passifs employés pour le traitement des DMA. Contrairement aux lagunes qui combinent l'activité biologique de la végétation et de microorganismes, l'efficacité des bioréacteurs ne repose que sur l'activité de microorganismes. Le réacteur consiste en une cuve dans laquelle s'écoule horizontalement ou verticalement l'effluent à traiter en mode batch ou en régime continu. Les bactéries peuvent être fixées ou en suspension dans la solution respectivement au sein de bioréacteur à lit fixe ou fluidisé. Ce réacteur peut être fermé (anaérobie) ou ouvert (aérobie) selon les réactions rédox souhaitées.

4.2.2.1. Principe

- *Bioréacteurs ou biofiltres passifs anaérobies*

Les bioréacteurs fermés s'inspirent des lagunes anaérobies. Les conditions réductrices de ces systèmes favorisent la sulfato-réduction qui augmente le pH et précipite des sulfures métalliques. Par conséquent, l'objectif de l'optimisation de ces réacteurs est de promouvoir la croissance et l'activité de bactéries sulfato-réductrices. C'est pourquoi un mélange réactif est intégré à leur remplissage pour apporter une source de carbone organique et d'électrons, de l'azote et éventuellement un agent alcalin (Zagury et al., 2007 ; Kaksonen et Puhakka, 2007).

- ***Bioréacteurs à lit fixe ou fluidisé aérobies***

Les conditions oxydantes des bioréacteurs aérobies favorisent les microorganismes ferro-oxydants. Comme décrit dans la partie 3.2, ces microorganismes catalysent l'oxydation du fer initialement lente à pH acide. Les polluants métalliques sont ensuite co-précipités avec les oxydes de fer formés (Johnson et Hallberg, 2005a ; Johnson et al., 2016).

4.2.2.2. Efficacité des bioréacteurs pour traiter l'As, le Sb et le Tl

- ***Arsenic***

Des trois polluants étudiés, l'As est celui qui a bénéficié d'un plus grand nombre d'études. Ces dernières ont été effectuées aussi bien en conditions oxydantes que réductrices.

Dans une revue récente, Alam et McPhedran (2019) analysaient 8 publications qui se sont intéressées à la remédiation de l'As à partir de DMA, basée sur la sulfato-réduction, au sein de bioréacteurs de laboratoire en mode batch ou continu. Les taux d'abattement atteints varient de 39 à 100 % en fonction des études (Tableau 10). Le meilleur taux est de 2,5 mg d'As éliminé par litre et par heure au sein d'un bioréacteur colonne à lit fixé traitant une eau synthétique à un pH initial de 4,4 et une concentration en As de 100 mg/L (Battaglia-Brunet et al., 2012).

La remédiation de l'As via une co-précipitation avec des oxydes de fer, générés par des bactéries ferro-oxydantes, a aussi été explorée à l'échelle du réacteur de laboratoire (Ahoranta et al., 2016 ; Fernandez-rojo et al., 2017 et 2018 ; Tardy et al., 2018 ; Kamde et al., 2018). Comme pour les bioréacteurs anaérobies, les taux d'abattement varient entre les expérimentations avec des maximums entre 37 et 100 % (Tableau 10). Il est intéressant de noter que plusieurs de ces études observent une oxydation de l'As(III) en As(V) dans ces réacteurs (Ahoranta et al., 2016 ; Fernandez-rojo et al., 2017 ; Tardy et al., 2018). La détection du gène *aioA* dans deux de ces expériences suggère une oxydation microbienne de l'As, qui pourrait notamment être reliée à *Thiomonas* spp. (Fernandez-rojo et al., 2017 ; Tardy et al., 2018).

La faisabilité de ces traitements par bioréacteurs aérobies et anaérobies a été explorée pour traiter des drainages de mine riches en As *in situ*. En 2006, un bioréacteur à lit fixe rempli de pouzzolane a été installé sur le site minier de Lopérec (France), pour traiter une eau à pH neutre, contenant du fer ferreux (1 à 5 mg/L) et une concentration en As de 400 à 1800 µg/L. La concentration résiduelle totale d'As était inférieure à 100 µg/L, et la vitesse maximale d'abattement atteint 1900 µg/L.h. Cette atténuation a été attribuée à une oxydation microbienne de l'As, suivie de sa co-précipitation avec les oxydes de fer générés par les bactéries autochtones (Battaglia-Brunet et al., 2006b).

Un autre bioréacteur aérobie à l'échelle pilote a été installé en 2016 sur le site minier de Carnoulès (France) pour traiter un DMA riche en As (Fernandez-rojo et al., 2019). Le taux d'abattement au sein du système varie de 3 à 97 %, soit une moyenne de $(1,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-8}$ mol d'As éliminé par litre et par seconde, pour un influent de pH moyen de 3,2 et contenant environ 118 mg/L d'As. La présence de bactéries oxydant le Fe et l'As dans le bioréacteur semble être à l'origine de cette atténuation. La dynamique de ces bactéries sera plus amplement détaillée dans le chapitre 3 de la présente thèse.

Un système de traitement en série à l'échelle réelle, installé en Colombie-Britannique (Canada) a été particulièrement étudié (Mattes et al., 2011 ; Khoshnoodi et al., 2013 ; Baldwin et al., 2015 ; Baldwin et al., 2016). Il se compose de deux bioréacteurs suivis de deux lagunes, dont l'ensemble est en conditions réductrices. Dans ce système, l'arsenic, initialement présent en moyenne à 1,7 g/L dans l'effluent, est éliminé par co-précipitation avec les sulfures générés par des BSR. 99,6 % de l'As est éliminé au sein du système, dont 80,9 % au sein des bioréacteurs anaérobies.

Tableau 10 : Exemples de traitement de l'As en bioréacteurs en mode batch ou continu (modifié à partir de Alam et McPhedran, 2019)

Traitement	Echelle expérimentale	Source de carbone	pH	Bactéries autochtones ou inoculées	Type d'effluent traité	[As] Initiale (mg/L)	Durée	Abattement	Référence
Précipitation sous forme de sulfures métalliques générés par les BSR	Laboratoire/ Microcosme	Pelure de pommes de terre et fumier	6	NA	Eaux de lac	1-3	210 jours	~100 %	Castro et al., 1999
	Laboratoire/ Batch	Glycérol	4,5	NA	DMA	10	94 jours	80 %	Le Pape et al., 2017
	Laboratoire/ Batch	Lactate ou Ethanol	7	Culture mixte de BSR issues d'un stérile minier	Eaux usées synthétiques	5	14 jours	Jusqu'à 98,2 % en présence de Fe	Liu et al., 2018
	Laboratoire/ Colonne	Lactose	1,4 et 6,5	NA	DMA	0,14	95 jours	65 %	Costa et Duarte, 2005
	Laboratoire/ Colonne	Ethanol	6,3 et 8,2	NA	Eaux synthétiques	1	48 h	95 % en présence de Fe	Luo et al., 2008
	Laboratoire/ Colonne	Glycérol et/ou hydrogène	2,7 à 5	<i>Desulfosporosinus</i>	Eaux synthétiques	100	7 jours	2,5 mg/L.h	Battaglia-Brunet et al., 2012
	Laboratoire/ Colonne	Ethanol	4	<i>Desulfomicrobium baculatum</i> , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Desulfovibrio africanus</i> , <i>Desulfovibrio magneticus</i> , <i>Desulfovibrio</i> sp.	Eaux usées synthétiques	0,5-20	245 jours	85 %	Altun et al., 2014
	Laboratoire/ Bioréacteur	Sulfate	4	NA	Eaux synthétiques	8,5	104 jours	39-99 %	Jackson et al., 2013
	Laboratoire/ Bioréacteur	Ethanol	3 à 4	<i>Desulfomicrobium baculatum</i> , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Eaux synthétiques	10	500 jours	98-100 %	Sahinkaya et al., 2015
	<i>In situ</i>	Déchets de pâte à papier	5,8	<i>Methanocorpusculum</i> sp., <i>Methanosarcina</i> sp., <i>Bacteroidetes</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Rhodobium</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Comamonadaceae</i>	Effluents miniers	~170	5 ans	99,6 %	Mattes et al., 2011 ; Khoshnoodi et al., 2013 ; Baldwin et al., 2015 ; Baldwin et al., 2016

Tableau 10 (suite) : Exemples de traitement de l'As en bioréacteurs en mode batch ou continu (modifié à partir de Alam et McPhedran, 2019)

Traitement	Echelle expérimentale	Source de carbone	pH	Bactéries autochtones ou inoculées	Type d'effluent traité	[As] Initiale (mg/L)	Durée	Abattement	Référence
Co-précipitation avec des oxydes de fer suite à la ferro-oxydation bactérienne	Laboratoire/ Batch	Extrait de levure	4,7	<i>Gallionella</i> , <i>Thiomonas</i> , <i>Acidocella</i> , <i>Acidicapsa</i> , <i>Ferritrophicum</i>	DMA	53,8	8 jours	100 %	Tardy et al., 2018
	Laboratoire/ Batch	Aucune	2,5	<i>Acidothiobacillus ferrooxidans</i>	Milieu de culture	5	4 jours	80 à 85 %	Kamde et al., 2018
	Laboratoire/ Bioréacteur à lit fluidisé	Aucune	3	<i>Leptospirillum ferriphilum</i> et <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Eaux synthétiques	10	253 jours	99,5 %	Ahoranta et al., 2016
	Laboratoire/ Bioréacteur	Aucune	3 à 3,4	NA	DMA	30 à 40	35 jours	80 %	Fernandez-rojo et al., 2017
	Laboratoire/ Bioréacteur	Aucune	3,65	<i>Gallionella</i> et <i>Ferrovum</i>	DMA	35	19 jours	37 %	Fernandez-rojo et al., 2018
	<i>In situ</i>	Aucune	6 à 7	<i>Pseudomonas</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Methylophilus</i> , <i>Gallionella</i> , <i>Curvibacter</i> , <i>Herbaspirillum</i> , et <i>Flavobacterium</i>	Effluent minier	0.4 à 1.8	15 jours	1900 µg/L.h	Battaglia-Brunet et al., 2006b
	<i>In situ</i>	Aucune	3,2	<i>Gallionella</i> , <i>Sulfuriferula</i> , <i>Ferrovum</i>	DMA	118	6 mois	$1.8 \pm 0.8 \cdot 10^{-8}$ mol/L.s	Laroche et al., 2018 ; Fernandez-rojo et al., 2019

- *Antimoine*

En 2006, Huisman et al. indiquaient que l'un des meilleurs traitements pour éliminer les éléments métalliques et métalloïdes contenus dans les eaux, dont l'antimoine, consistait à les précipiter sous formes de sulfures. Des études de laboratoire ont depuis montré la faisabilité de ce traitement en utilisant des BSR issues d'environnements miniers (Wang et al., 2013 ; Zhang et al., 2016 ; Liu et al., 2018) (Tableau 11). Plus de 90 % du Sb a été éliminé au cours de chacune de ces études, en utilisant des solutions neutres contenant initialement de 5 à 25 mg/L du Sb. Au cours de ces expériences, Sb(V) est d'abord réduit en Sb(III) par les sulfures dissous, puis précipité sous forme de stibnite (Sb_2S_3) (Wang et al., 2013 ; Zhang et al., 2016). D'après Zhang et al. (2016), les BSR seraient incapables de réduire directement Sb via leurs enzymes.

Les BSR ne semblent pas être les microorganismes principalement responsables de la remédiation du Sb au sein d'un système du traitement *in situ* décrit par Sun et al. (2016b). Les auteurs ont étudié pendant un an un bioréacteur traitant un DMA riche en Sb (pH 2,8-3 ; [Sb] = 1,4 à 7,8 mg/L). Ce traitement est constitué de 5 unités disposées en séries : une unité de prétraitement aérobie, deux unités aérobies et deux unités micro-aérobies. Le bioréacteur permet l'abattement de 90 % du Sb, principalement dans les deux premières unités. La dominance de bactéries oxydant le Fe et l'As dans ces deux unités suggère leur implication dans cette bioremédiation. La co-précipitation avec les oxydes de fer, générés par ces bactéries, serait donc le mécanisme à l'origine de cette atténuation. Le Sb restant serait par la suite éliminé sous forme de sulfures via l'activité de BSR, qui se sont développées dans les dernières unités.

Tableau 11 : Traitement de l'antimoine en bioréacteurs en mode batch ou continu

Traitement	Echelle expérimentale	Source de carbone	pH	Bactéries autochtones ou inoculées	Type d'effluent traité	[Sb] Initiale (mg/L)	Durée (jours)	Abattement	Référence
	Laboratoire/ Batch	Extrait de levure et lactate	5, 7 et 9	Culture mixte de BSR	Eaux synthétiques	25	7	~99 %	Wang et al., 2013
Précipitation sous forme de sulfures métalliques générés par les BSR	Laboratoire/ Batch	Extrait de levure et lactate	5 à 9	Culture mixte de BSR issues de sédiments miniers, avec dominance du genre <i>Clostridium</i>	Eaux synthétiques	2,5 à 75	11	Jusqu'à 93 %	Zhang et al., 2016
	Laboratoire/ Batch	Lactate ou éthanol	7	Culture mixte de BSR issues d'un stérile minier (dont <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium</i> sp., et <i>Ruminococcaceae</i>)	Eaux usées synthétiques	5	14	Jusqu'à 98,2 % en présence de Fe	Liu et al., 2018
Co-précipitation avec des oxydes de fer suite à la ferro-oxydation bactérienne	<i>In situ</i>	Fumier dans les unités micro-aérobies	~3	<i>Ferrovum</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodanobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Thiomonas</i> , <i>Gallionella</i> , et <i>Leptospirillum</i>	DMA	1,4 à 7,8	365	~100 %	Sun et al., 2016b

- ***Thallium***

De manière générale, la remédiation du Tl d'effluents miniers a été peu étudiée (Tableau 12). Deux études ont d'abord constaté la possibilité de traiter par sulfato-réduction microbienne des drainages miniers neutres, dont la concentration en Tl était inférieure à 1,4 mg/L, au sein de bioréacteurs anaérobies, avec des rendements supérieurs à 99 % (Mueller, 2001 ; Blumenstein et al., 2008). Plus récemment, Zhang et al (2017) ont aussi démontré les performances de BSR, enrichies à partir de boues de traitement d'un DMA, pour traiter de fortes concentrations en Tl, 50 mg/L, à partir d'une eau synthétique à pH 6. Dans ces conditions, les BSR permettent la précipitation de 221 mg de Tl par gramme de biomasse bactérienne. La même équipe de recherche a également isolé une nouvelle BSR, *Citrobacter freundii*, qui présente des capacités intéressantes pour le traitement du Tl. En effet, elle est capable d'éliminer 99,6 % ou 96 % de Tl(I) dans un milieu de culture à pH neutre contenant respectivement 5 mg/L et 20 mg/L de Tl (Zhang et al., 2017b).

A ce jour un seul bioréacteur a été employé *in situ* pour traiter un DMA contenant du Tl. Ce bioréacteur à écoulement vertical a été installé et suivi pendant 27 mois sur le site minier de Stockton en Nouvelle-Zélande. L'écoulement vertical de l'effluent induit un gradient d'oxygène, avec une stratification des populations microbiennes impliquées dans le cycle du Fe et du S. Ce réacteur, rempli de coquilles de moules contenant des résidus de matière organique, permet de neutraliser le pH (initialement à 2,8) et d'atténuer 99,4 % du Tl, initialement à une concentration de $4,6 \cdot 10^{-3}$ mg/L. Les auteurs observent une précipitation préférentielle du Tl dans la zone anoxique, qui serait due à une complexation avec les sulfures produits par les bactéries sulfato-réductrices (Crombie et al., 2011 ; DiLoreto et al. 2016ab).

Tableau 12 : Traitement du thallium en bioréacteurs en mode batch ou continu.

Traitement	Echelle	Source de carbone	pH	Microorganismes autochtones ou inoculés	Type d'effluent traité	[Tl] initiale (mg/L)	Durée (jours)	Abattement	Référence
Précipitation sous forme de sulfures métalliques générés par les BSR	Laboratoire/ Colonne	Fumier et paille sèche	6,9	N.A	Eaux de surface et souterraines de site minier	0,45 à 0,79	225	99,70 %	Mueller, 2001
	Laboratoire/ Réacteur	Fumier, foin et copeaux de bois	7,2 à 8,3	N.A	Eaux de surface de site minier	~1,40	84	~99 %	Blumenstein et al., 2008
	Laboratoire/ Batch	Extrait de levure et lactate	6	BSR enrichies à partir de boues de traitement d'un DMA	Eaux synthétiques	50	1	Jusqu'à 221,34 mg de Tl/g de biomasse bactérienne	Zhang et al., 2017
	Laboratoire/ Batch	Extrait de levure et lactate	7	<i>Citrobacter freundii</i>	Eaux synthétiques	5	4	99,60 %	Zhang et al., 2017b
	<i>In situ</i>	Coquilles et résidus de moules	2,8	<i>Aidovorax</i> spp, <i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> , <i>Sideroxydans lithotrophicus</i> , <i>Methanosaeta concilli</i> et <i>Methanolinae tarda</i>	DMA	4,6 10 ⁻³	1027	99,4%	Crombie et al., 2011 ; Diloreto et al. 2016ab

4.2.3. Facteurs de contrôle

Les systèmes de traitement passifs reposent principalement sur des processus biologiques de sulfato-réduction ou ferro-oxydation. Or, comme décrit dans la partie 3.3, la diversité et l'activité des bactéries à l'origine de ces processus varient en fonction de nombreux paramètres environnementaux. Ces fluctuations peuvent limiter l'efficacité des systèmes de traitement *in situ* lors de variations saisonnières. A contrario, la connaissance des facteurs de contrôle, aussi bien environnementaux que biologiques, peut permettre l'optimisation des processus biologiques et par conséquent un meilleur abattement des polluants métalliques.

4.2.3.1. Oxygène

Les différents traitements présentés sont soit aérobies, soit anaérobies. Les conditions du traitement doivent promouvoir la croissance et l'activité des bactéries selon leur type respiratoire. C'est pourquoi, un apport en oxygène dans les bioréacteurs anaérobies crée des conditions non optimales pour l'activité des BSR, diminuant par conséquent l'efficacité du traitement (Leff et al., 2015 ; Vasquez et al., 2016ab, 2018). A contrario, la concentration en oxygène s'est avérée être un facteur limitant dans certains bioréacteurs aérobies traitant les DMA par ferro-oxydation (Elbaz-Poulichet et al., 2006 ; Fernandez-Rojo et al., 2017). C'est pourquoi Fernandez-Rojo et al. (2017) recommandent de maintenir une faible hauteur d'eau dans leurs bioréacteurs aérobies afin d'améliorer la diffusion de l'oxygène. De même, Lizama et al. (2011) indiquent un effet du mode d'écoulement de l'eau à traiter sur la disponibilité de l'oxygène dans les lagunes. Ainsi, un écoulement vertical permettra une meilleure oxygénation qu'un flux horizontal.

4.2.3.2. pH

Le pH est un facteur qui contrôle la croissance et l'activité des communautés bactériennes (cf partie 3.3.2.2), mais aussi la mobilité et la toxicité des éléments métalliques en modulant leurs spéciations (cf partie 2.2). C'est pourquoi des gammes de pH sont recommandées en fonction du type de traitement biologique passif employé.

Les lagunes aérobies sont généralement recommandées pour le traitement d'effluents neutres à alcalins, dont le pH favorise l'oxydation abiotique du Fe(II) et l'hydrolyse du Fe(III) (Johnson et Hallberg, 2005a ; Zipper et al., 2014). A ce pH, les (hydr)oxydes de fer sont chargés négativement et co-précipitent donc avec des cations métalliques. En revanche, les oxyanions tels que l'arsenic et l'antimoine, co-précipitent plus facilement à pH acide, avec les (hydr)oxydes de fer chargés positivement (Sheoran et Sheoran, 2006). L'emploi de bactéries acidophiles, plus particulièrement d'*A. ferrooxidans* et *Leptospirillum ferriphilum*, a permis de maintenir une oxydation du fer *in vitro* à des pH compris entre 0,9 et 2,2 (Karamanev et Nikolov, 1988 ; Kinnunen et Puhakka, 2005). Cependant, Ahoranta et al. (2016) observent une diminution de l'abattement de l'arsenic de 99,5 %, 80,1 % à 7,1 % lorsque le pH diminue de 3,0, 2,4 à 1,6 au sein d'un bioréacteur à lit fluidisé aérobie.

La découverte de BSR acidotolérantes ou acidophiles a permis le développement de réacteurs anaérobies adaptés aux effluents acides (Kaksonen et Puhakka, 2007). Nancuqueo et Johnson (2014) ont ainsi réussi à éliminer le sulfate d'effluent minier au sein d'un bioréacteur

dont le pH était maintenu entre 2,8 et 4,5. Un pH supérieur à 5,5 est cependant recommandé pour le traitement d'effluents miniers par sulfato-réduction (Neculita et al., 2007 ; Lizama et al., 2011). En effet, des pH inférieurs inhiberont l'activité des BSR, augmenteront la solubilité des sulfures métalliques (Dvorak et al., 1992), mais diminueront celle du sulfure d'arsenic (Eary, 1992). Des drains ou lits calcaires, ainsi que des réactifs alcalins, peuvent être utilisés en amont ou intégrés au sein des lagunes ou des bioréacteurs anaérobies pour traiter des DMA dont le pH est inférieur à 5,5. La fixation des BSR sur un support leur permet également de générer des microenvironnements propices à leur développement lorsque le pH est trop acide (Lyew et Sheppard, 1997).

4.2.3.3. Température

La variation saisonnière des températures représente un véritable défi pour l'implantation de systèmes de traitements biologiques passifs *in situ*. La majorité des bactéries impliquées dans ces traitements sont mésophiles (cf partie 3.3.2.3). C'est pourquoi la chute des températures en saison hivernale a été fréquemment citée comme un facteur limitant, tant pour l'activité biologique que pour la décomposition des substrats organiques et la solubilité de certaines substances (e.g. O₂, H₂S) (Neculita et al., 2007 ; Lizama et al., 2011 ; Alam et McPhedran, 2019). Quelques études menées *in vitro* et *in situ* ont cependant montré l'efficacité de bioréacteurs anaérobies à des températures inférieures à 10 °C (Reisinger et al., 2000 ; Zaluski et al., 2003 ; Tsukamoto et al., 2004 ; Kuyucak et al., 2006). Les résultats de ces études suggèrent que les BSR employées doivent être au préalable adaptées aux températures froides (Kuyucak et St-Germain, 1994 ; Tsukamoto et al., 2004).

La configuration des systèmes de traitement peut également permettre une meilleure adaptation de la microflore aux variations de températures. Les lagunes anaérobies sont par exemple plus adaptées au climat froid que les systèmes aérobies, car l'épaisseur de matière organique disposée en position supérieure des dispositifs favorise leur isolation (Wallace et al., 2001). L'installation d'un revêtement isolant, l'aménagement du réacteur dans la profondeur du sol, ou encore le contrôle de la température de l'effluent à traiter ont aussi été suggérés pour maintenir l'efficacité des bioréacteurs (Gusek, 2005 ; ITRC, 2010 ; Rutkowski, 2013 ; Ness et al., 2014). Contrôler la température de l'effluent est cependant peu compatible avec le développement d'un système passif. Gusek (2005) suggérait plutôt d'utiliser des eaux minières souterraines, dont la température varie moins, pour alimenter des réacteurs anaérobies.

4.2.3.4. Substrats organiques

Les DMA sont des environnements oligotrophes (COD < 10 mg/L) (Kolmert et Johnson, 2001). L'apport de substrats organiques peut donc être nécessaire lorsque le traitement emploie des bactéries qui utilisent une source d'énergie et/ou d'électrons organique. Les BSR notamment couplent la réduction des sulfates avec l'oxydation de carbone organique (cf partie 3.1).

Une multitude de substrats organiques ont ainsi été employés *in vitro* comme par exemple des alcools, des acides organiques, des sucres, du compost ou des copeaux de bois (Sheoran et al., 2010). Selon Muyzer et Stams (2008), les BSR ne seraient cependant pas capables de

dégrader certains de ces substrats (*e.g.* cellulose, acides nucléiques, composés organiques polymériques, protéines et amidon) et dépendraient des métabolites générés par d'autres microorganismes. L'utilisation de cultures mixtes s'avère aussi une bonne solution pour dégrader l'acétate généré par les BSR du groupe 1 (Kimura et al. 2006 ; Neculita et al., 2007). En effet, l'acétate est protoné (forme neutre) en conditions acides, donc il pénètre facilement dans les cellules et induit une toxicité qui diminue l'efficacité du traitement (Battaglia-Brunet et al., 2012). De même, une inhibition de la croissance des BSR est observée en présence de concentrations importantes en H₂S (Luo et al., 2008 ; Rodriguez-Freire et al., 2016). Même si ce composé est nécessaire à la formation des sulfures métalliques, il peut induire un dysfonctionnement des coenzymes, une dénaturation des protéines, une diminution de l'assimilation des sulfates et une augmentation du pH intracellulaire (Kaksonen et Puhakka, 2007). De plus, en présence d'arsenic, un excès de sulfure peut aboutir à la formation d'espèces thioarseniées solubles.

Plusieurs critères doivent finalement être considérés pour une utilisation d'un substrat organique *in situ* : la capacité à promouvoir l'activité des BSR, la durée de vie du substrat, son coût et le potentiel de génération de métabolites toxiques. Le tableau 13 présente les avantages et inconvénients de quelques substrats organiques.

Tableau 13 : Avantages et inconvénients de plusieurs substrats organiques utilisés pour la sulfato-réduction biologique (modifié à partir de Kaksonen et Puhakka, 2007)

Substrat organique	Avantages	Inconvénients
Formate	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisable par de nombreuses BSR - Abordable 	<ul style="list-style-type: none"> - Les méthanogènes concurrencent les BSR aux températures élevées (65-75°C)
Acétate		<ul style="list-style-type: none"> - Utilisable par peu de BSR - Compétition avec les méthanogènes - Faible rendement de biomasse
Lactate	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne source de carbone et d'électrons pour plusieurs BSR - Bon rendement de biomasse - Production d'alcalinité 	<ul style="list-style-type: none"> - Coûteux - Accumulation d'acétate en cas d'oxydation incomplète
Méthanol	<ul style="list-style-type: none"> - Abordable - Les BSR concurrencent les méthanogènes aux températures élevées (55-70°C) 	<ul style="list-style-type: none"> - Les méthanogènes concurrencent les BSR aux températures modérées - Utilisable par peu de BSR
Ethanol	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisable par de nombreuses BSR - Facilement oxydable par les BSR - Moins coûteux que le lactate 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de neutralisation et accumulation d'acétate en cas d'oxydation incomplète - Coûteux comparé à d'autres substrats
Glucose		<ul style="list-style-type: none"> - Fermentation possible qui diminue le pH par génération d'acide carboxylique - Coûteux comparé aux matières végétales
Matières végétales	<ul style="list-style-type: none"> - Abordable 	<ul style="list-style-type: none"> - Fermentation possible qui diminue le pH par génération d'acide carboxylique - Compétition possible
Déchets organiques	<ul style="list-style-type: none"> - Abordable 	<ul style="list-style-type: none"> - Compétition possible - Biodisponibilité possiblement limitée - Concentre l'effluent en carbone organique dissous si l'oxydation des déchets est incomplète

4.2.3.5. Concentrations en éléments métalliques et sulfates

Comme discuté dans la partie 3.3.2.5, les éléments métalliques et les sulfates peuvent moduler la croissance et l'activité des BFO et des BSR en fonction leur sensibilité à la toxicité de ces éléments. C'est pourquoi plusieurs auteurs observent une diminution de l'abattement de l'As, du Sb et du Tl en augmentant la concentration initiale de ces éléments dans l'effluent à traiter (Zhang et al., 2016 ; Briones-Gallardo et al., 2017 ; Zhang et al., 2017 ; Zhang et al., 2017b).

En revanche, un résultat intéressant est que la précipitation de l'As avec les sulfures augmente lors d'ajout de Zn ou de Fe (Luo et al., 2008 ; Jackson et al., 2013 ; Altun et al., 2014 ; Liu et al., 2018). Ces résultats ne s'appliquent pas à Sb malgré sa similitude structurale avec As (Liu et al., 2018). En présence de Zn, l'abattement de l'As augmente de 76 à 94 %. Les auteurs suggèrent que le Zn permettrait une meilleure stabilisation des sulfures d'arsenic et limiterait la formation de thioarsenates soluble (Jackson et al., 2013). L'ajout de Fe(II) augmente significativement les rendement d'élimination de l'arsenic, de 8 à 85 % (Altun et al., 2014), ou de 26,4 à 98,2 % (Liu et al., 2018) selon les études ou semble les maintenir à un taux fixe de 95 % (Luo et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'élimination de l'As est plus efficace suite à une co-précipitation avec des sulfures de fer (FeS), pyrite (FeS₂) ou arsénopyrite, plutôt que sous forme d'orpiment (As₂S₃), à condition de travailler à un pH suffisamment élevé pour permettre la précipitation de sulfures de fer. Lorsque le réacteur fonctionne à pH acide, le fer ne précipite pas et ce sont des sulfures d'arsenic qui sont formés (Le Pape et al., 2017).

4.2.3.6. Support physique

Dans les milieux naturels, les bactéries sont régulièrement attachées aux sols et sédiments sous forme de biofilms. C'est pourquoi de nombreuses études insistent sur l'importance d'un substrat physique pour la fixation du biofilm bactérien au sein des systèmes de traitement, particulièrement pour les BSR (Lyew et Sheppard, 1997 ; Nematy et al., 1998 ; Neculita et al., 2007). En effet, ce support permet de générer des microenvironnements propices au développement des BSR lorsque le pH est trop acide ou que l'effluent apporte de l'oxygène (Lyew et Sheppard, 1997). Le support physique idéal doit posséder une faible surface et une porosité importante afin d'augmenter le contact entre le biofilm et l'effluent, mais limiter le colmatage (Neculita et al., 2007). Cependant, les bactéries peuvent aussi être en suspension dans les bioréacteurs (bioréacteur à lit fluidisé). Une étude a ainsi montré l'efficacité de la remise en suspension d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* pour le traitement de concentration élevée en Fe(II) (70 g/L) (Nikolov et Karamanev, 1992). De plus, Özkaya et al. (2019) indiquent plusieurs avantages à l'utilisation de bioréacteur à lit fluidisé pour traiter des DMA par sulfato-réduction. Les avantages d'un tel système sont une meilleure résistance aux éléments toxiques et une meilleure rétention de la biomasse à un temps de résidence hydraulique faible.

4.2.3.7. Temps de résidence hydraulique (TRH)

Plusieurs études montrent l'influence du temps de résidence hydraulique dans différents systèmes de traitement biologique des DMA en conditions anaérobie et aérobie (Vasquez et al. 2016ab ; Fernandez-Rojo et al., 2017 ; Vasquez et al. 2018 ; Fernandez-Rojo et al., 2018). En effet, le temps de résidence hydraulique est un paramètre de dimensionnement qui peut impacter le métabolisme des bactéries à l'origine du traitement. Un TRH important augmentera le temps de contact entre les bactéries, l'effluent à traiter et les nutriments. Cependant il aboutira à une déplétion de la source de carbone, un colmatage plus important et possiblement une accumulation de métabolites toxiques (sulfures dans les bioréacteurs basés sur la sulfato-réduction ; Vasquez et al. 2016ab). A contrario une diminution trop importante du TRH limitera la fixation, l'activité et la croissance de la biomasse (Neculita et al., 2007). Vasquez et al. (2018) observent aussi une entrée d'oxygène qui inhibe l'activité des BSR. Au final le TRH devra être optimisé en fonction des caractéristiques de l'effluent à traiter, des bactéries présentes et du substrat organique utilisé.

5. Questions scientifiques et objectifs de la thèse

Les traitements biologiques passifs de DMA riches en As, Sb ou Tl, objets de cette thèse, reposent sur la réduction des sulfates et/ou l'oxydation du fer. La littérature indique que ces éléments peuvent être éliminés de la phase aqueuse par : 1) la formation de sulfures d'As, de Sb et de Tl suite à la sulfato-réduction microbienne en condition anaérobie ou 2) l'adsorption ou co-précipitation avec des (oxy)hydroxydes métalliques suite à la ferro-oxydation microbienne, en condition aérobie (As, Sb). Dans les deux cas, les microorganismes interviennent de manière indirecte, en catalysant la réduction du soufre ou l'oxydation du fer. Certains microorganismes peuvent aussi jouer un rôle direct en modifiant la spéciation du contaminant, en particulier son degré d'oxydation, ce qui dans certains cas, favorise son piégeage sur la phase solide.

Des procédés de traitement basés sur la sulfato-réduction biologique ont montré la possibilité de traiter des effluents miniers dont le principal polluant est l'As, le Sb ou le Tl. Leurs comportements biogéochimiques au sein de ces réacteurs restent cependant méconnus, particulièrement dans le cadre d'un traitement simultané de ces polluants à partir de DMA. En effet, des phénomènes de compétition entre les polluants, pour la précipitation avec le sulfure, pourraient moduler l'efficacité de ces dispositifs. Cette éventualité est d'autant plus probable pour l'arsenic et l'antimoine, deux métalloïdes proches dans la table périodique des éléments et présentant donc certaines propriétés communes. Par conséquent, trois questions scientifiques sont abordées au sein de cette thèse :

- (1) Peut-on éliminer simultanément l'As, le Sb et le Tl au sein d'un bioréacteur traitant un DMA par sulfato-réduction ?
- (2) L'antimoine affecte-t-il l'efficacité du procédé à traiter l'arsenic lorsque leurs concentrations sont équivalentes dans l'effluent à traiter ?
- (3) Quelle est la dynamique du consortium bactérien sulfato-réducteur, issu du DMA réel, au cours du traitement biologique ?

Concernant l'antimoine, il a été montré que cet élément co-précipitait avec le fer au cours de l'oxydation biologique du fer dans les DMA ; des tentatives d'exploiter ce processus pour traiter les DMA contenant de l'antimoine ont été effectuées. Néanmoins, alors que l'oxydation biologique de l'antimoine pourrait, comme dans le cas de l'arsenic, jouer un rôle déterminant dans l'efficacité du traitement, ce processus a jusqu'ici été relativement peu étudié, et uniquement dans des conditions de pH voisin de la neutralité. Aussi les questions scientifiques abordées dans cette thèse sont :

- (1) Peut-on obtenir un consortium microbien capable de se développer en condition acide typique d'un DMA et en présence de Sb(III), à partir d'une communauté microbienne allochtone à un environnement contaminé par de l'antimoine ?
- (2) Ce consortium microbien est-il capable de tolérer d'importantes concentration initiale en Sb(III) ?
- (3) Ce consortium microbien est-il capable d'oxyder Sb(III) en condition acide ?

Concernant l'arsenic, des procédés de traitement des DMA basés sur l'adsorption et la co-précipitation de l'As avec des oxydes de fer biogéniques ont été testés en laboratoire, à différentes échelles, du réacteur batch au pilote à flux continu, et sur le terrain. Toutefois, alors même que l'activité des microorganismes est à la base de ces traitements, la dynamique spatio-temporelle des communautés microbiennes au sein de ces systèmes et son contrôle par les variables physico-chimiques est rarement explorée. Dans cette thèse, seules les communautés bactériennes ont été étudiées car l'implication des genres bactériens tels que *Thiomonas*, *Gallionella* et *Ferrovum* dans l'oxydation biologique de l'arsenic et du fer est connue. Aussi, les questions scientifiques abordées dans cette thèse sont les suivantes :

- (1) Comment s'organisent les communautés bactériennes au sein d'un pilote de traitement à partir des communautés autochtones présentes dans l'eau ?
- (2) Quels sont les facteurs physico-chimiques de l'eau à traiter qui influencent la dynamique spatio-temporelle de ces communautés ?
- (3) Peut-on relier la dynamique des communautés bactériennes et l'efficacité du traitement ?

Pour aborder ces différentes questions scientifiques, cette thèse s'intéresse au comportement des polluants et à leurs interactions avec les microorganismes en lien avec les conditions physico-chimiques. Différentes échelles expérimentales permettent l'acquisition de données en milieu contrôlé, semi-contrôlé ou représentatif des conditions environnementales *in situ*. Au total trois études ont été menées :

- (1) Etude des capacités de résistance et d'oxydation de l'antimoine par des microorganismes dans des conditions équivalentes aux drainages miniers acides. Cette étude a été menée en laboratoire, dans des conditions contrôlées en mode batch et en condition aérobie. Les résultats de cette étude apporteront de nouvelles connaissances sur les transformations microbiennes de Sb en condition acide, plus particulièrement l'oxydation microbienne qui représente un intérêt particulier dans la bioremédiation de Sb.
- (2) Elimination simultanée de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium présents dans un drainage minier acide par sulfato-réduction au sein d'un bioréacteur en colonne de laboratoire. Les résultats de cette étude apporteront de nouvelles connaissances vis-à-vis du comportement géochimique de ces polluants au sein de ce type de réacteur. Une attention particulière sera accordée au comportement de l'As et du Sb dont les analogies structurales pourraient entraîner une compétition pour réagir avec le sulfure produit par les BSR. Le devenir du thallium dans ce système sera également considéré.
- (3) Etude de la dynamique des communautés bactériennes au sein d'un pilote de terrain traitant un drainage minier acide riche en arsenic. L'objectif est de mieux comprendre l'évolution de la diversité et de la structure des communautés bactériennes dans un pilote de traitement, en lien avec la variation de la physico-chimie et la microbiologie des eaux d'alimentation et la composition du bioprécipité.

Ces expérimentations reposent sur une approche pluridisciplinaire, basée à la fois sur des techniques microbiologiques classiques, moléculaires et physico-chimiques. Le traitement et l'analyse des données acquises requiert l'utilisation d'outils bio-informatiques et statistiques

afin d'être corrélés. Cette vision intégrative contribue à l'acquisition d'une compréhension globale des processus biogéochimiques complexes qui participent à la remédiation des métaux et métalloïdes au sein des drainages miniers acides. L'ensemble de ces études est exposé dans ce manuscrit sous forme de trois chapitres, organisés par ordre croissant d'échelle expérimentale (cultures en batch de laboratoire, culture en continu au laboratoire, biotraitement en continu sur site).

Chapitre II :
Bio-oxydation de l'antimoine et croissance microbienne
en conditions acides

1. Introduction, objectifs et démarche

L'antimoine est un polluant d'intérêt prioritaire (Council of the European Communities, 1976 ; USEPA, 1979) qui représente une menace environnementale émergente. La concentration naturelle en antimoine dans les sédiments est de l'ordre de quelques $\mu\text{g/g}$, et du ng/L au $\mu\text{g/L}$ pour les eaux douces (Filella et al., 2002a). Cependant, les rejets d'antimoine dans l'environnement ont augmenté au cours des deux derniers siècles, en lien avec un usage intensif dans l'industrie (Shotyk et al., 2005 ; Krachler et al., 2005 ; Dupont et al., 2016). Les activités minières sont la principale source anthropique de rejet d'antimoine dans les sols et les eaux au cours du dernier siècle (Guo et al., 2014a). La concentration en antimoine dans les eaux minières peut atteindre plusieurs dizaines de milligramme par litre (Hiller et al., 2012 ; Wang et al., 2011 ; He et al., 2018).

L'antimoine et l'arsenic présentent des propriétés physico-chimiques communes. Certains systèmes de traitement basés sur des processus microbiologiques, au préalable étudiés pour les drainages miniers riches en As (Battaglia-Brunet et al., 2006 ; Mattes et al., 2011 ; Khoshnoodi et al., 2013 ; Baldwin et al., 2015 ; Baldwin et al., 2016 ; Laroche et al., 2018 ; Fernandez-rojo et al., 2019), ont été transposés avec succès à l'antimoine (Wang et al., 2013 ; Sun et al., 2016b ; Zhang et al., 2016 ; Liu et al., 2018). Un bioréacteur traitant un DMA riche en Sb (pH 2,8-3 ; $[\text{Sb}] = 1,4 \text{ à } 7,8 \text{ mg/L}$) a ainsi éliminé jusqu'à 90 % de cet élément (Sun et al., 2016b). Les résultats de cette étude suggèrent que cette élimination résulte principalement de la co-précipitation de Sb avec les oxydes de fer générés par des bactéries. Plusieurs études ont d'ailleurs souligné les capacités d'adsorption de Sb sur les (hydro)oxydes de fer (Herath et al., 2017 ; He et al., 2018). La sorption de Sb sur ces phases solides est contrôlée par de nombreux facteurs dont le pH et la spéciation redox. L'antimonite (Sb(III)) s'adsorbe fortement sur la goethite et les oxyhydroxides de fer sur une large gamme de pH (3-12), tandis que le maximum d'adsorption de l'antimoniate (Sb(V)) est atteint à pH inférieur à 7 (Leuz et al., 2006a ; Guo et al., 2014b). Toutefois les études comparant l'adsorption des deux espèces redox sur des phases solides à un pH donné restent limitées (Herath et al., 2017 ; He et al., 2018). L'oxydation du Sb(III) en Sb(V) pourrait influencer l'atténuation du Sb présent dans les DMA. Pour ces raisons, il est essentiel de mieux comprendre dans quelles conditions le Sb peut être oxydé. L'oxydation permet également d'abaisser la toxicité du Sb (Filella et al., 2007 ; Herath et al., 2017). Ce processus pourrait donc être à privilégier pour le développement d'un procédé de remédiation. La cinétique d'oxydation abiotique de Sb est plus lente à pH acide qu'à pH neutre (Leuz and Johnson, 2005 ; Leuz et al., 2006b) ; cette réaction pourrait toutefois être catalysée par des microorganismes, de façon similaire à l'As.

Les études sur l'oxydation microbienne de Sb ont récemment augmenté de façon exponentielle au vu de leur intérêt tant au niveau fondamental que pour les applications potentielles en bioremédiation (Li et al., 2016 ; Herath et al., 2017 ; He et al., 2018). Plus de 60 bactéries oxydant l'antimoine ont été identifiées à partir d'environnements dont le pH est proche de la neutralité (Li et al., 2016). En condition acide, Asta et al. (2012) ont constaté une oxydation de l'antimoine par des oxydes de fer formés suite à une oxydation microbienne mais l'oxydation directe de Sb par des microorganismes en milieu acide n'a jamais été rapportée à ce jour.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer le potentiel de microorganismes à oxyder l'antimoine en condition acide, équivalente à celle d'un DMA. La première phase expérimentale a consisté en l'obtention d'enrichissements en microorganismes oxydant Sb(III) à partir d'un sol contaminé à l'antimoine (Auzon, Haute-Loire, [Sb] = 240 mg/kg). Dans un second temps, la tolérance et le potentiel d'oxydation de Sb de cet enrichissement microbien ont été évalués en condition acide (effet de la concentration initiale en Sb(III) et cinétique d'oxydation à pH 3,5). Des techniques moléculaires basées sur le gène bactérien de l'ARNr 16S ont finalement permis la caractérisation des communautés bactériennes présentes dans cet enrichissement et leur dynamique, selon les différentes conditions expérimentales appliquées (pH et concentration initiale en Sb(III)). Les recherches relatives à ce chapitre sont présentées sous forme d'un article en préparation.

2. Article: Microbially mediated Sb(III)-oxidation under acidic conditions

LAROCHE E^{1,2}, HERY M.², JOULIAN C.¹, DESOEUVRE A.², BATTAGLIA-BRUNET F.¹, CASIOT C.²

¹BRGM, Geomicrobiology and Environmental Monitoring Unit, Orléans, France

²HydroSciences Montpellier, CNRS, IRD, University of Montpellier, Montpellier, France

*Correspondence: marina.hery@umontpellier.fr

Abstract:

Antimony is a contaminant of emerging concern. Mining is the major factor of anthropogenic Sb flux. The fate and behavior of Sb in the mining environment may be controlled by microbial activity. Microbially mediated oxidation of Sb(III) to the less toxic Sb(V) may be exploited for the remediation of polluted environments. The ability of microorganisms to oxidize Sb(III) in acid mining environment remains poorly documented. The aim of this study is to gain insight into antimony biotransformations at acid pH. In this study, microorganisms were enriched from a moderately acid soil highly contaminated with Sb. The microbial consortium obtained tolerates high concentration of antimony (up to 100 mM Sb(III)), and mediated the oxidation of 0.1 mM Sb(III) when grown at an initial pH of 3.5. Although bacterial growth was associated with an increase of pH, evidence for Sb(III) oxidation was observed under acidic conditions (pH<4). Metabarcoding and fingerprinting approaches based on bacterial 16S rRNA gene showed that *Leifsonia*, *Burkholderiaceae*, *Rhodanobacter* and *Bradyrhizobiaceae* taxa dominated the bacterial consortium. These bacteria could play a role in Sb biogeochemical cycling in Sb-rich environments.

Keywords: Antimony, microbial process, Sb(III)-oxidation, Sb-tolerant microorganisms, acid pH

2.1. Introduction

Antimony is a priority pollutant (Council of the European Communities, 1976 ; USEPA, 1979) whose concentration has increased in the environment during the last decades (Shotyk et al., 2005; Krachler et al., 2005). Mining is considered as the major source of anthropogenic Sb at the global scale (Guo et al., 2014a). This metalloid is commonly found in sulfide minerals. It can be released into the water compartment through Acid Mine Drainage (AMD). AMD results from the oxidation of metal sulphides (especially pyrite) in mine tailings. It pollutes water resources due to acidity (pH ~3-4) and high concentrations of sulphate, iron and toxic metals and metalloids (Johnson, 1995). AMD may contain Sb at high concentration ranging from < 1 µg/L to dozen mg/L (Hiller et al., 2012; Wang et al., 2011; He et al., 2018).

Despite the toxicity of Sb, a wide range of microorganisms can thrive in Sb contaminated environments. Microbial transformations of Sb that promote immobilization into the solid phase are promising strategies for remediation of contaminated sediments and waters.

Natural attenuation of Sb was observed in mine drainage waters (Manaka et al., 2007; Filella et al., 2009b). It results from the immobilization of Sb by precipitation of Sb oxides (valentinite, senarmonite) or sorption onto neoformed Fe-oxyhydroxysulfate minerals (schwertmannite). Sorption of Sb on iron oxyhydroxides is controlled by several parameters such as pH and redox speciation. Antimonite (Sb(III)) strongly adsorbs onto goethite and hydrous ferric oxide (HFO) over a broad pH range (3-12), whereas maximum antimonate (Sb(V)) adsorption is reached below pH 7 (Leuz et al., 2006a; Guo et al., 2014b). Several studies proposed microbial Sb(III) oxidation as a way for performing environmental Sb bioremediation (Shi et al., 2013; Li et al., 2016; Nguyen et al., 2017), although this is not clear whether this process decreases or increases Sb mobility in AMD (Leuz et al., 2006a). The rate of abiotic Sb oxidation is strongly pH-dependent and decreases under acid condition (Leuz and Johnson, 2005; Leuz et al., 2006b). However, some microorganisms could catalyze Sb oxidation at acid pH.

The interest for antimony and its interaction with microorganisms is relatively recent (Li et al., 2016; Herath et al., 2017; He et al., 2018). Biotic antimonite oxidation can be mediated by As(III) oxidase AioAB and Sb(III) oxidase AnoA (Li et al., 2015; Wang et al., 2015). More than 60 Sb-oxidizing bacteria were isolated from neutral mining soils and contaminated environments (Lehr et al., 2007; Li et al., 2013; Hamamura et al., 2013; Shi et al., 2013; Nguyen and Lee, 2015; Terry et al., 2015; Nguyen et al., 2017, Li et al. 2016). Contrary to neutral environments, antimony oxidation under acidic conditions has been poorly documented. Microbial oxidation of Sb in AMD was investigated by Asta et al. (2012). Their results suggest that the Fe(III) formed by microbial oxidation abiotically oxidized Sb(III). To date, direct oxidation of Sb(III) by microorganisms under acidic condition has never been demonstrated.

In this study, Sb(III)-tolerant and oxidizing microorganisms were enriched from a moderately acid soil highly contaminated with Sb. The growth of the microbial enrichment was tested at acid pH equivalent to AMD (3.5) and at initial Sb(III) concentrations ranging from 0.1 to 100 mM. Microbial Sb oxidation kinetic was assessed under acidic condition. Biomolecular approaches targeting the bacterial 16S rRNA gene were applied to characterize the bacterial community and its dynamic under different conditions of pH and initial Sb(III) concentration. This study gave new insights into microbially-mediated Sb(III)-oxidation under acid conditions. It may contribute to the choice of appropriate remediation methods for AMD containing Sb.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Study area and sample collection

Soil sample was collected in the ancient industrial district of Auzon (France). The area is highly contaminated with Sb besides other metals and metalloids (Cancès et al., 2005). The soil was collected in May 2010 using a sterile hand auger. The total Sb concentration was 240 mg kg⁻¹, which was measured with a field portable X-Ray fluorescence spectrometer (Niton® XLt792WY, ThermoFisher) after sieving at 2 mm. The pH of the soil sample was 5.65. The soil was stored at 4°C until the beginning of the experiment.

2.2.2. Soil batch experiment and enrichment of Sb(III)-oxidizing microorganisms

Soil batch experiments were carried out in order to assess the Sb(III)-oxidizing ability of the soil microbial community. Batch were conducted in acid cleaned and autoclaved schott-bottles, filled with 100 ml CaSO₁ culture medium (Battaglia-Brunet et al., 2002), supplemented with 400 mg/L of yeast-extract and 0.1 mM of Sb(III) using a 0.1 M concentrated solution of potassium antimony(III) tartrate (C₄H₄KO₇Sb, 0.5H₂O). The pH was adjusted to 5.5 with H₂SO₄. Three conditions were tested, each in triplicate: biotic (culturing medium inoculated with five grams of soil), abiotic (culturing medium inoculated with sterilized soil) and control (culture medium). For the abiotic batch, soil sterilization was carried out by four successive autoclave treatments at 121°C during 20 min, separated by 24 hours intervals. All bottles were closed with a permeable foam stopper to maintain aerobic condition; they were incubated in the dark at 27°C under orbital agitation at 150 rpm. An aliquot of 1.5 ml was periodically sampled in each batch to measure pH and to determine the distribution of Sb(III) and Sb(V) species in the dissolved phase by HLPC-ICP-MS (see section 2.2.5). After four days, a sub-culturing was performed to renew the selection pressure with Sb(III) and provide nutrients; for this, ten milliliters of each batch were inoculated into 90 ml of new culture medium. After 11 days, sub-culturing was repeated 19 times for further enrichment in Sb(III)-oxidizing microorganisms. Then, one hundred microliters of the last sub-culture were spread (at a 10⁻³ dilution) on solid culture medium (CaSO₁ medium with 15 g/L of agar supplemented with 0.1 mM Sb(III)). Petri dishes were incubated at 27°C until the growth of colonies. One colony retrieved from a petri dish corresponded to a microbial consortium that was able to oxidize Sb(III). Further attempts to isolate pure strains was not successful. This consortium was for the next experiments.

2.2.3. Effect of pH on Sb-oxidizing consortium

Growth of the consortium at acid pH was assessed in batch reactors. The consortium, initially grown at pH 5.5, was subcultured into CaSO₁ culture medium at pH 3.5 and 3.25. The initial concentration of Sb(III) was maintained at 0.1 mM in order to avoid additional stress. Regular sampling was performed to monitor the evolution of pH, bacterial growth and the presence of dissolved Sb(III) in each batch bioreactor by colorimetric method (see section 2.2.5). Bacterial growth was monitored by measuring optical densities (OD) at 500 nm. The bacterial community was characterized in the consortium used as inoculum, and in the batch reactor at pH 3.25 and pH 3.5 after complete disappearance of dissolved Sb(III) (as evidenced by a colorimetric method according to Christopher and West, 1966). For this, ten milliliters of the Sb-oxidizing enrichment were filtrated in triplicates with a sterile 0.22 µm cellulose acetate filter; filters were stored at -80°C for further molecular analyzes.

A kinetic of Sb(III) oxidation was performed in a batch experiment conducted at pH 3.5 and 0.1 mM Sb, during 80 days. The batch bioreactors were prepared in a similar way than for the soil batch experiment. As previously described, three conditions were tested: three biotic batch experiments (90 ml of CaSO₁ culturing medium inoculated with 10 ml of microbial consortium cultured pH 3.5), one abiotic batch (90 ml CaSO₁ culturing medium inoculated with 10 ml of microbial consortium cultured at pH 3.5, previously sterilized by two autoclaving 20 min at

121°C, 48 hours apart) and one control batch (100 ml of CaSO₄ culturing medium at pH 3.5). Aliquots of 1.6 ml of each batch were periodically sampled during 80 days to measure pH, optical density and to determine the speciation of Sb in the dissolved phase by HPLC-ICP-MS (see section 2.2.5). The evolution of the bacterial community between the beginning and the end of Sb oxidation process was characterized using molecular techniques; for this, ten milliliters of each batch were filtrated with a sterile 0.22 µm cellulose acetate filter at the beginning and at the end of the monitoring period, then filters were stored at -80°C for molecular analyzes.

2.2.4. Effect of initial Sb concentration on Sb-oxidizing consortium at pH

The tolerance to Sb of the Sb-oxidizing consortium cultured at pH 3.5 was evaluated in batch experiments, following the procedure described above. The initial concentration of Sb(III) was 0.1, 1, 5, 10, 50 and 100 mM. The initial pH value was 3.5. Control batch experiments were performed (culturing medium without inoculation) with similar concentrations to ensure that no abiotic oxidation occurred. Regular sampling was performed to monitor the pH, optical density and the presence of dissolved Sb(III) in each batch reactor. Batch reactors were sacrificed when dissolved Sb(III) was not detected anymore by colorimetric method. The structure of the bacterial community at the end of the incubation period was analyzed using molecular techniques; for this, 10 ml of each batch were filtrated with a sterile 0.22 µm cellulose acetate filter, which was stored at -80°C for molecular analyzes.

2.2.5. Chemical Analyses

Two methods were used to detect or quantify dissolved antimony depending on the experiments. A colorimetric method was used to determine Sb(III) presence or absence in the experiments dedicated to the study of initial pH and Sb(III) concentration effect on microbial consortium. The HPLC-ICP-MS method was used to quantify precisely Sb(III) and Sb(V) concentration in the soil batch and enrichment experiment and in the kinetic experiment.

Dissolved Sb(III) was qualitatively detected by a colorimetric method developed by Christopher and West (1966). A solution of Bromopyrogallol Red reagent concentrated at 700 nM was prepared according to the authors' recommendations. In the present study, 0.5 M phosphate buffer at pH 6.6 was used: K₂HPO₄, 46 g and KH₂PO₄, 13.6 g in 1 liter of demineralized water. These solutions were kept at 4°C. Colorimetric test was performed by adding 1 mL of phosphate buffer, then 33 µL of Bromopyrogallol Red reagent to 0.4 mL of sample collected in the subcultures. The reagent yielded a blue complex when Sb(III) was present, and remained red in absence of Sb(III) in solution.

The speciation of Sb in the dissolved phase was quantified by High Performance Liquid Chromatography coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HPLC-ICP-MS), as described in Resongles et al. (2013). Briefly, Chromatographic separation was performed using an anion-exchange column (15 cm x 4.6 mm i.d., Hamilton PRP-X100) and a precolumn (2 cm x 4.6 mm i.d.) with a DIONEX ICS-5000+ TC HPLC (ThermoScientific) coupled to an ICP-MS (X Series II –Thermo Electron Corporation, France). The detection limits were 0.01 µg/L for Sb(V) and 0.03 µg/L for Sb(III) and the precision was better than 3% for Sb(V) and

5% for Sb(III). Prior to analysis, samples were filtrated at 0.22 μm then analyzed immediately or preserved at -20°C . Non-significant differences were found between the results obtained with fresh or frozen samples (Supplementary Figure S22).

2.2.6. Molecular analyses

2.2.6.1. DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from frozen filters (in triplicates) using the DNeasy PowerWater kit according to the manufacturer's recommendations (Qiagen, Hilden, Germany). The DNA extracts were quantified with the Quantus fluorometer (Promega, Madison, WI, USA) and used to determine the bacterial biomass, then the diversity and structure of bacterial communities.

2.2.6.2. Bacterial quantification by qPCR

The bacterial biomass was quantified by a real-time PCR targeting the 16S rRNA gene using universal bacterial primers 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') and 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'), as previously described (López-Gutiérrez et al., 2004).

The statistical significance of the bacterial biomass evolution was assessed with the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test. Statistical analyses were performed with R version 3.4.3.

2.2.6.3. 16S rRNA metabarcoding and bioinformatics analyses

Bacterial diversity was determined by Illumina high throughput sequencing of bacterial 16S rRNA genes from Sb-oxidizing consortium cultivated at pH 3.5 and 0.1 mM Sb(III). The 16S rRNA V3-V4 gene region was amplified by CIRAD MetaHealth platform (Montpellier, France), using the primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). Illumina specific overhang sequences were added to the specific primers in order to perform barcoding according to Illumina's protocol. For each sample, 0.5 g of DNA was used in 20 μL PCR reaction (10 μL of Phusion Flash High-Fidelity 2X Master Mix (Thermo Fisher), 300 ng T4 gene 32 (MP Bio), 0.25 μM for forward and reverse primers). A first PCR was run in duplicate in a Mastercycler ep 384 (Eppendorf) thermocycler under the following conditions : initial denaturation at 95°C for 2 min, 25 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final elongation at 72°C for 10 min. The second PCR implemented dual barcodes on PCR products. PCR reaction was conducted in a total volume of 15 μL (7.5 μL Biolabs Taq 2X mastermix, 2 μL of 10 μM for forward and reverse primers, and 2 μL of PCR product), under the following conditions : initial denaturation at 95°C for 2 min, 8 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final elongation at 72°C for 10 min. Amplicon library was quantified on a D5000 ScreenTape bioanalyzer (Agilent). Library concentration was thereafter validated by qPCR on a LC480 real-time thermocycler (Roche), using qPCR primers recommended in Illumina's qPCR protocol and Illumina's PhiX control library as standard (Illumina). All amplicon products and control library (5% PhiX library) were sequenced using paired-end Illumina MiSeq sequencing (2 \times 300 bp) by CIRAD MetaHealth platform (Montpellier, France).

Bioinformatic analyses were conducted on Illumina sequence reads using the Frogs (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution) pipeline (Escudié et al., 2018). First step was to merge paired-end reads with a maximum of 10% mismatch in the overlapped region by FLASH v1.2.11 (Magoč and Salzberg 2011). Full-length sequences were filtered to select high quality sequences with expected length (between 340 and 450 nucleotides), without ambiguous bases (N) and containing primer sequences. Clustering of the high quality sequences was done in two steps using the SWARM algorithm to obtain Operational Taxonomic Units (OTUs) with minimal distance ($d = 1$), then with an aggregation distance of 3 (Mahé et al., 2014). Chimeric sequences were detected and removed using VSEARCH with de novo UCHIME method (Edgar et al., 2011; Rognes et al., 2016), following by a cross-sample validation. Prior taxonomic affiliation, filtering tool was applied to select OTU according to their abundance (threshold = $5 \cdot 10^{-5}$, Bokulich et al, 2013). Taxonomic affiliation of each OTU was performed using BLAST tools against the SILVA reference database (v132, pintail score ≥ 80). Affiliation of the dominant OTU (relative abundance of reads $> 1\%$), was confirmed by NCBI BLAST analyses (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The raw datasets are available on the European Nucleotide Archive system under project accession number (submission in progress).

2.2.6.4. Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP)

The effect of pH and Sb(III) initial concentration on the bacterial community structure was assessed by Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP, Delbès et al., 2000). About 200 bp of the V3 region of 16S rRNA genes from DNA extracts were amplified with forward primer w49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3'; *Escherichia coli* position, 331) and reverse primer w34 (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'; *E. coli* position, 533), 5' end-labelled with the fluorescent dye FAM. The reaction mixture (20 μ l) contained 1X GoTaq-reaction buffer (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTP (Promega), 0.5 pmol/ μ L each primer, 1 U GoTaq DNA polymerase (Promega), and 1 μ L template DNA. 1. The program was as follows: 95 °C for 2 min, followed by 28 cycles of 95 °C for 30 s, 61 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 5 min. One milliliter of diluted PCR product (50-200 fold in nuclease-free water) was mixed with 18.8 mL of deionized formamide and 0.2 mL of Genescan-600 LIZ internal standard (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States). Samples were heat denatured for 5 min at 95 °C and immediately cooled on ice, to obtain single-strand DNA. CE-SSCP electrophoresis was performed on an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) with 47 cm capillary tubes filled with the nondenaturing 5.6% CAP polymer (Life Technologies), under the conditions detailed by Battaglia-Brunet et al. (2012). The dominant taxa detected by CE-SSCP were identified by constructing a 16S rRNA gene library from the DNA extract of Sb-oxidizing consortiumcultured at pH 3.5 with an initial Sb concentration of 0.1 mM. About 1,400 bp of the bacterial 16S rRNA gene were amplified with universal bacterial primers 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1406R (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3'). Purified PCR products (NucleoSpinR Gel and PCR clean-up, Macherey–Nagel) were cloned using the TOPO-TA Cloning Kit and TOP 10 chemically competent cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States). Thirty correct-length insert clones were picked up from the clone libraries, and

the two strands were sequenced with vector specific primers T3 and T7 binding on both sides of the insert (Sanger sequencing by GATC Biotech). A consensus sequence was obtained from the two complementary sequences using the software BioEdit v 7.0.4.1. The phylogenetic assignment of 16S rRNA gene sequences was based on comparison with reference sequences by the NCBI Blast tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All sequences were submitted to NCBI GenBank under Accession (submission under progress). Peak assignment was performed by analyzing by CE-SSCP the sequenced clones.

2.3. Results

2.3.1. Soil batch experiments

During the first four days of the soil batch experiment, Sb(III) concentration decreased by $99 \pm 1\%$ and $87 \pm 2\%$ in biotic and abiotic conditions, respectively, compared to day 0 (Fig. 15). In the control, the decrease averaged $18 \pm 7\%$. At the same time, Sb(V) concentration increased in the biotic batch. These results suggested that Sb(III) was oxidized in the biotic batch experiment. The sum of dissolved Sb(III) and Sb(V) decreased by 61%, 81% and 15% in biotic, abiotic and control batch experiments.

After sub-culturing, at day 11, the biotic batch contained 0,1 mM dissolved Sb(V) and undetectable Sb(III) concentration, while abiotic and control batch experiments contained 70 and 85 μM dissolved Sb(III) and less than 10 μM dissolved Sb(V). These results confirmed microbially mediated Sb(III) oxidation in biotic batch. In this second step a slight Sb removal from the dissolved phase was observed in abiotic and control batch.

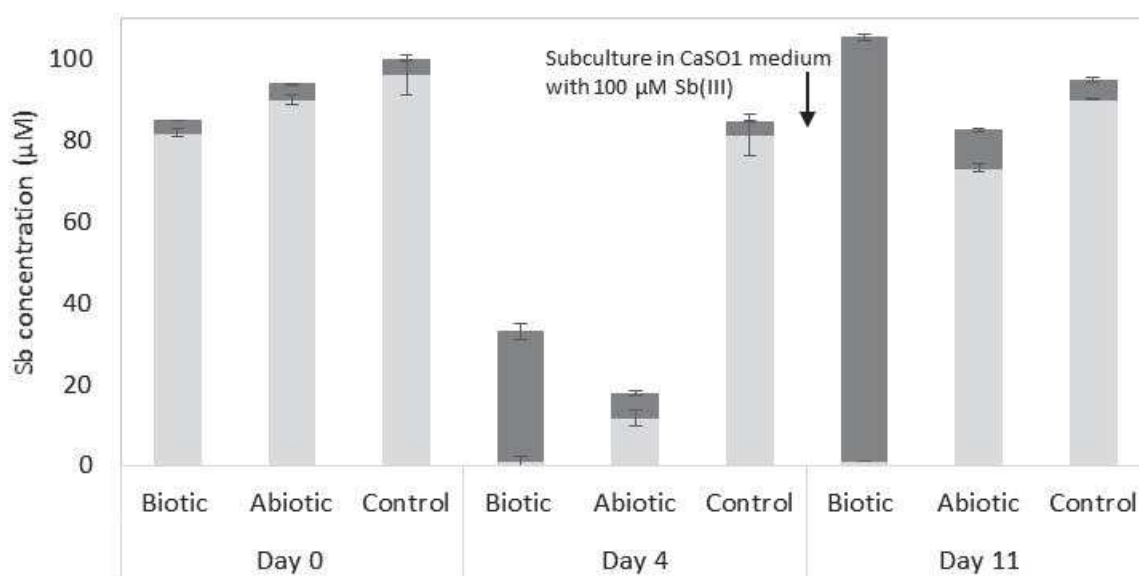


Figure 15: Evolution of Sb(III) concentration (light grey) and Sb(V) concentration (dark grey) in batch experiment at pH 5.5 inoculated with unsterilized (biotic) or sterilized (abiotic) Auzon soil, and in control batch experiment without soil. Arrow denotes the timing of subculture. Error bars indicate standard deviations of the mean for triplicates.

2.3.2. Characterization of the bacterial community in the Sb-oxidizing consortium

2.3.2.1. Taxonomic identification of Sb-oxidizing consortium cultured at initial pH 3.5

Sb-oxidizing consortium, obtained from the Auzon soil after a total of 21 sub-cultures, initially at pH 5.5, was finally subsampled into CaSO₄ culture media at pH 3.5 and at 0.1 mM of initial Sb(III) concentration. The bacterial community was identified by Illumina high throughput sequencing of 16S rRNA genes. A total of 10,717 sequences of 16S-rRNA gene corresponding to 7296 quality sequences and to 291 OTUs were obtained.

The majority of the 16S gene sequences was affiliated to *Actinobacteria* (58.9%), *Alpha*- and *Gamma-Proteobacteria* classes (29.9 and 9.8% respectively) (Fig. 16A). Bacterial community was dominated by an OTU affiliated to the *Leifsonia* genus representing an average of 49.2% of total sequences (Fig. 16B). The remaining OTUs were related to *Alsobacter* (8.5%), *Micrococcaceae* (8.4%), *Rhizobiaceae* (7.4%), and *Burkholderiaceae* (5.6%).

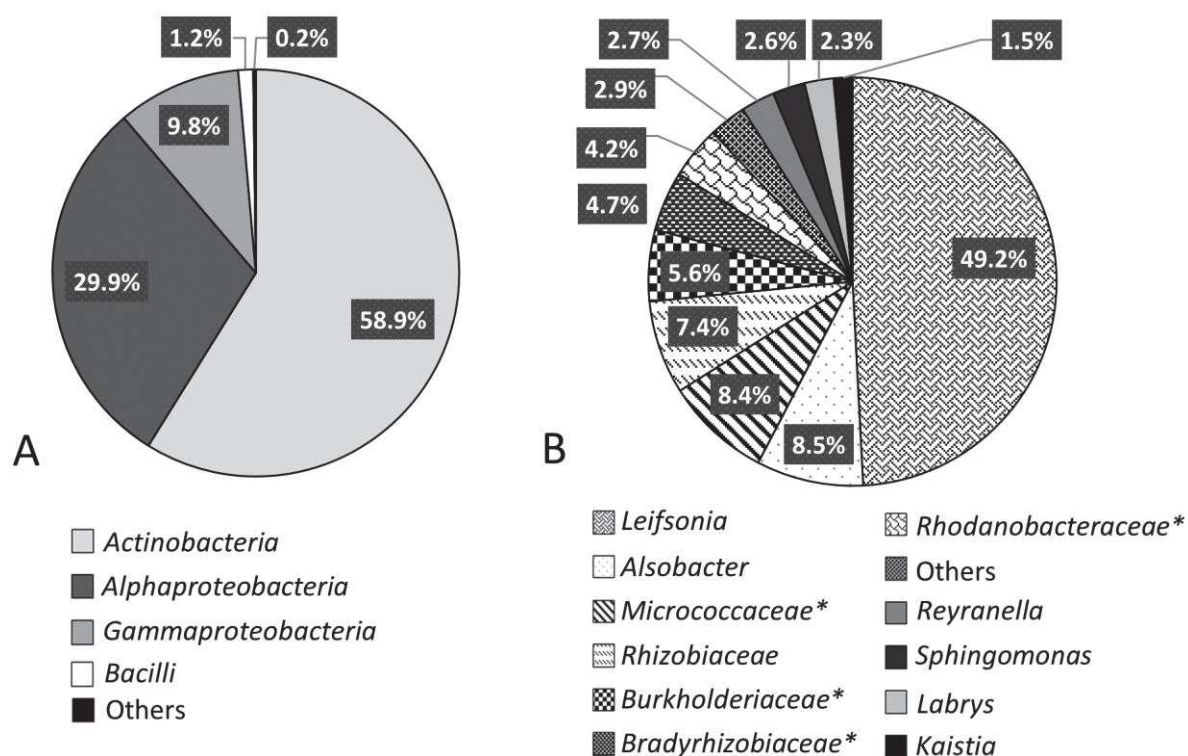


Figure 16: Taxonomic composition of bacterial communities at the class level (A) and at the genus level (B) in batch inoculated with microbial consortium and incubated at pH 3.5 and 0.1 mM of Sb(III) during 7 days. When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset.

2.3.2.2. Effect of pH and initial Sb(III) concentration on the bacterial consortium

Sb(III) was undetectable in the dissolved phase after 4 to 36 days cultivation of the microbial consortium, whatever the initial pH or the initial Sb(III) concentration (Table 14). The decrease of initial pH from 5.5 to 3.25 was associated with increasing delay (from 4 to 11 days) before Sb(III) became undetectable. At initial pH 3.5, there was no correlation between initial Sb(III) concentration and the time necessary for Sb(III) to be undetectable. It is noteworthy that the

final pH in all experiments differed from the initial pH; it tends to increase with initial Sb(III) concentration.

Table 14: Duration of enrichment batch experiments and final pH for the different experimental conditions. The experiments were stopped when Sb(III) was not detected anymore in solution by colorimetric method.

Enrichment batch experiments/Parameter tested	Experimental conditions		Duration until undetectable Sb(III) concentration (days)	Final pH
	Initial pH	Initial Sb(III) concentration (mM)		
Effect of initial pH	5.5	0.1	4	6.8
	3.5		7	6.1
	3.25		11	5.7
Effect of initial Sb(III) concentrations	3.5	0.1	8	5.9
		1	32	6.3
		5	22	7.2
		10	17	8.1
		50	15	9.0
		100	36	10.1

- *Effect of pH and initial Sb concentration on the bacterial biomass*

The bacterial biomass did not decrease significantly under acidification (from 9.1 ± 0.2 to 8.3 ± 0.1 log₁₀ of 16S rRNA gene copy numbers by ml of water for pH 5.5 to 3.25) (Fig. 17A). Conversely, a significant decrease was evidenced when the Sb(III) initial concentration increased (from 8.7 ± 0.2 to 6.3 ± 0.6 log₁₀ of 16S rRNA gene copy numbers by ml of water for Sb(III) initial concentration of 0.1 to 100 mM) (Fig. 17B).

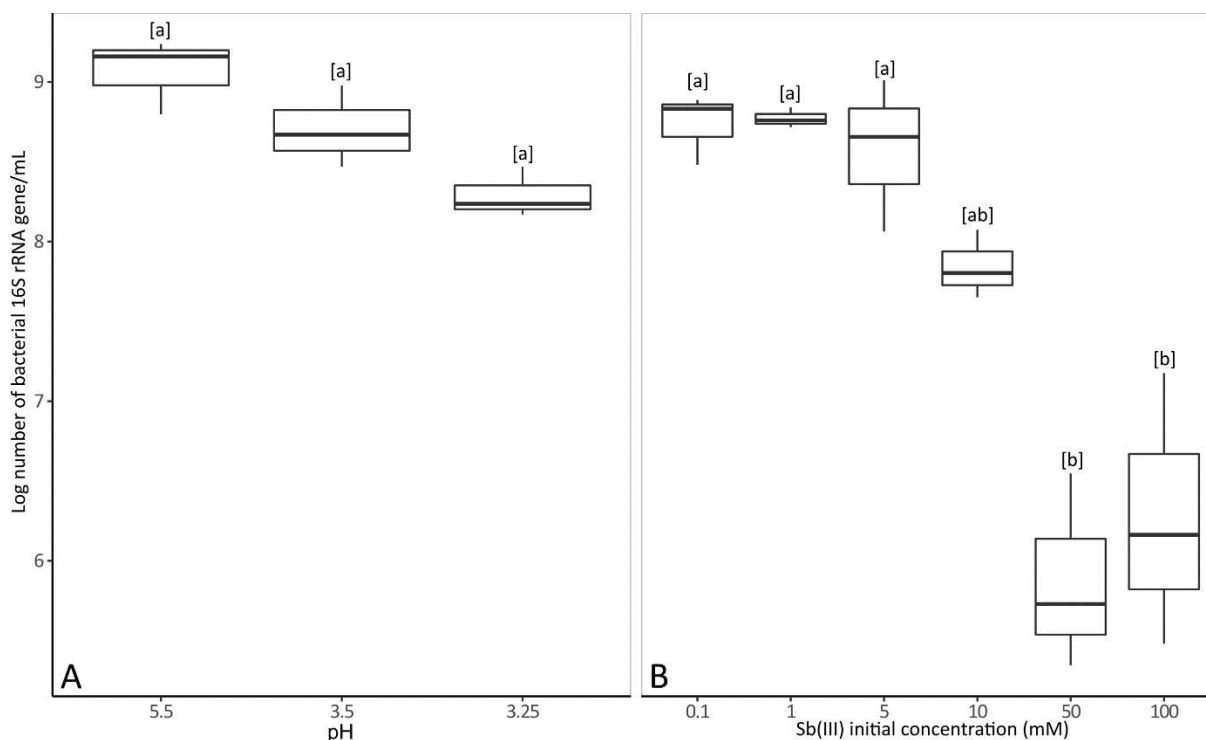


Figure 17: Evolution of bacterial biomass in the microbial consortium according to the pH at 0.1 mM of Sb(III) (A) and according to Sb(III) initial concentration at pH 3.5 (B).

- *Effect of pH and initial Sb concentration on the bacterial community structure*

CE-SSCP was used to highlight the effect of pH (Fig. 18) and initial Sb(III) concentration (Fig. 19) on the bacterial community structure in Sb-oxidizing consortium. The main SSCP peaks were assigned to *Burkholderiaceae*, *Rhodanobacter*, *Leifsonia* and *Bradyrhizobiaceae*.

At pH 5.5, the community was dominated by *Rhodanobacter* and *Burkholderiaceae*, while *Bradyrhizobiaceae* and *Leifsonia* were present in lower proportions. pH decrease to 3.5 and 3.25 led to the disappearance of the peak corresponding to *Bradyrhizobiaceae* and *Rhodanobacter* respectively. A new peak assigned to *Burkholderiaceae* emerged at both acid pH. *Leifsonia* remained relatively stable whatever the pH (Fig. 18).

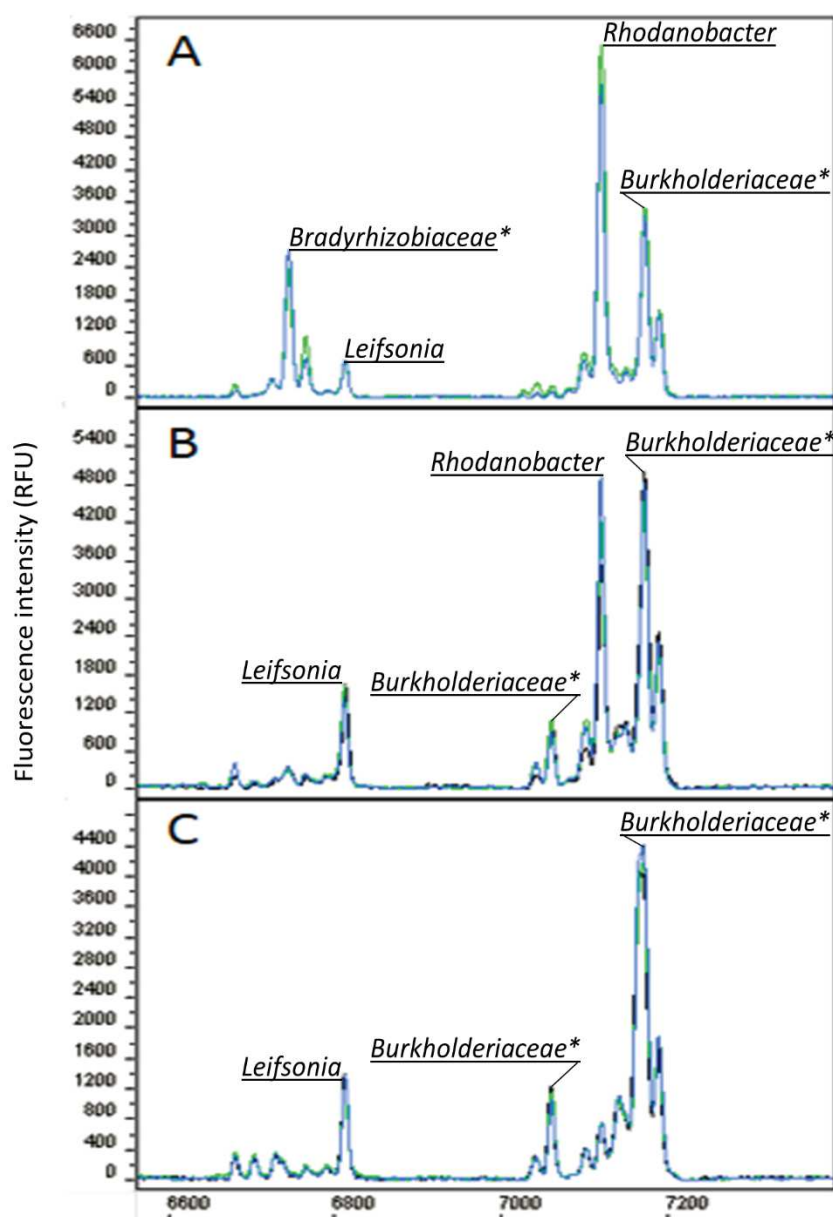


Figure 18: Comparison of the bacterial community structure (CE-SSCP profiles) obtained from Sb-oxidizing microbial consortium cultured at different pH : 5.5 (A), 3.5 (B) and 3.25 (C). Sb(III) concentration was 0.1 mM in all batch. Replicates are represented by different colors (blue, green and black).

Similar profiles were observed when identical experimental conditions (pH 3.5 and 0.1 mM initial Sb(III)) were applied (Fig. 18B and 19A). Sb(III) concentrations above 0.1 mM led to the emergence of a peak affiliated to *Bradyrhizobiaceae* (Fig. 19A to D). At 50 and 100 mM Sb(III), the bacterial community was highly enriched into *Bradyrhizobiaceae* (Fig. 19E and F), while the relative abundance of the other taxa was considerably reduced.

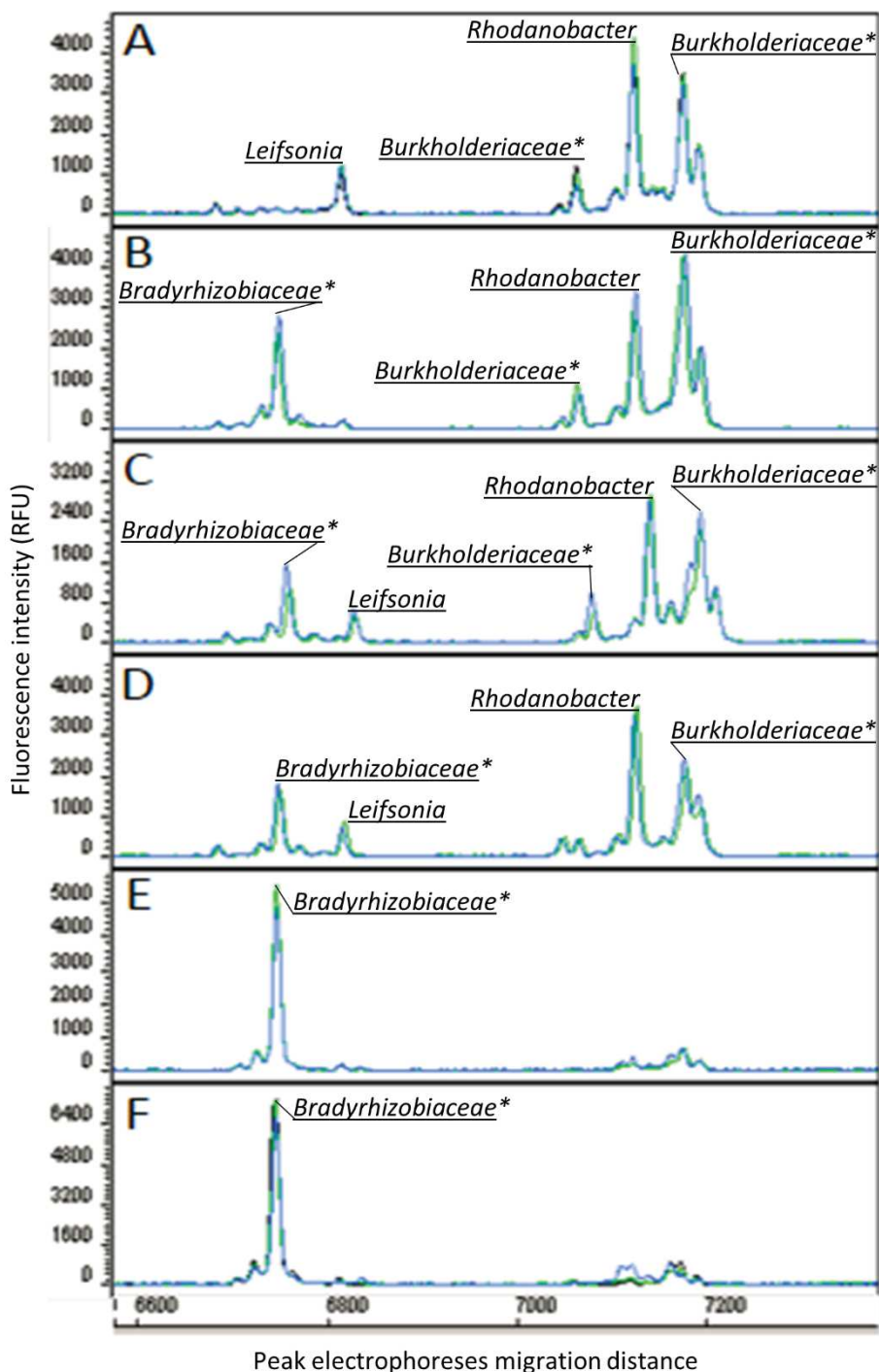


Figure 19: Comparison of the bacterial community structure (CE-SSCP profiles) obtained from microbial Sb-oxidizing consortium cultured at pH 3.5 and at different Sb(III) initial concentrations : 0.1 (A), 1 (B), 5 (C), 10 (D), 50 (E) and 100 mM (F). Replicates are represented by different colors (blue, green and black).

2.3.3. Sb(III) oxidation kinetic experiment at acid pH with the microbial consortium

2.3.3.1. Evolution of Sb species, cell concentration and pH

During the kinetic experiment, dissolved Sb(III) was not detectable anymore after 80 days in biotic batch experiment. An increase of dissolved Sb(V) concentration was observed after 28 days (Fig. 20A). The total Sb concentration increased from 98 ± 9 to 389 ± 84 μM along the experiment, which could be explained by evaporation that concentrated dissolved Sb in the batch. This process might also explain the increase of Sb(III) concentration measured in abiotic (from 87 to 120 μM) and control (from 97 to 166 μM) batch from 52 days (Fig. 20B). A low increase of Sb(V) concentration (from 15 to 22 μM in abiotic batch and from 3 to 16 μM in control batch) was detected in abiotic and control batch.

The cell concentration increased quickly during the first week ($\text{OD}_{500} = 0.31 \pm 0.01$) then more progressively until the 46th day ($\text{OD}_{500} = 0.65 \pm 0.07$), then it remained stable until the end of the monitoring period (Fig. 20A). No microbial growth was detected in abiotic and control batch (Fig. 20B). The pH remained stable around pH 3.5 until 37th day; it increased slightly of 0.3 pH units between 37th and 52nd day and more drastically from 3.5 to 6 between the 52nd and 9th day (Fig. 20C). It is noteworthy that the production of Sb(V) was evidenced at day 52, before the strong pH rise (Fig. 20A).

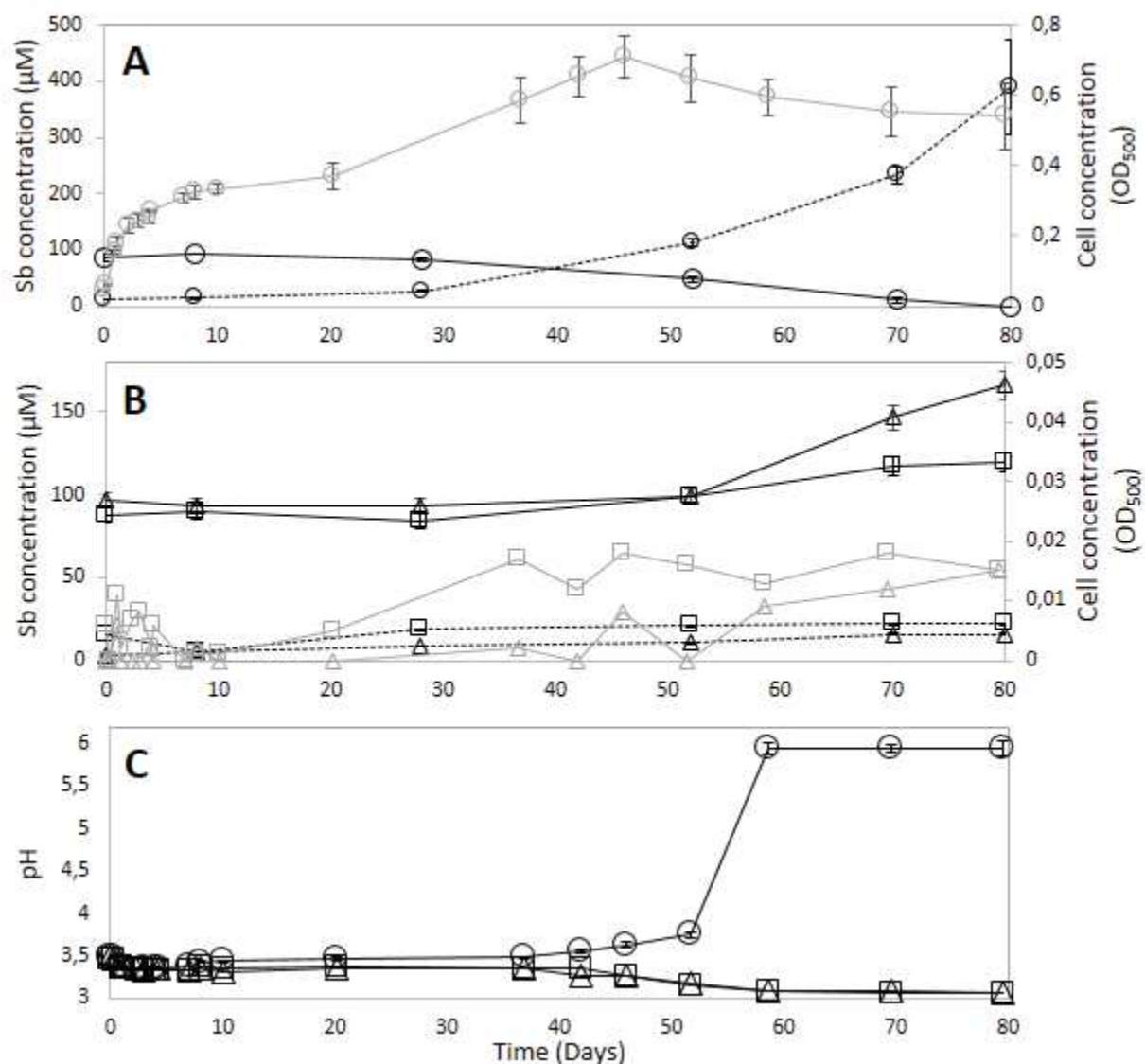


Figure 20: Evolution of (A) dissolved Sb(III) (solid black lines) and Sb(V) concentrations (dashed black lines) during growth of microbial consortium (solid grey lines) in biotic batch (circle), (B) in abiotic batch (square), control batch (triangle) and (C) pH. Error bars indicate standard deviations of the mean for biotic triplicates and analytical error (5%) for abiotic and control conditions. Experiments were conducted at pH 3.5 and 0.1 mM initial Sb concentration.

2.3.3.2. Bacterial community structure variation

The evolution of bacterial community structure during the kinetic experiment was assessed by CE-SSCP. It has to be noted that, at the beginning of the kinetic experiment, the consortium had a different structure compared to the two previous experiments conducted in similar conditions in terms of pH and Sb(III) conditions (Fig. 21A, 18B and 19A). Only two dominant peaks, associated with *Rhodanobacter* and *Burkholderiaceae*, were detected at the beginning of the experiment (Fig. 21A). After 80 days of monitoring, an unknown peak became dominant with the *Burkholderiaceae* peak, whereas the *Rhodanobacter* peak was not detected anymore (Fig. 21B).

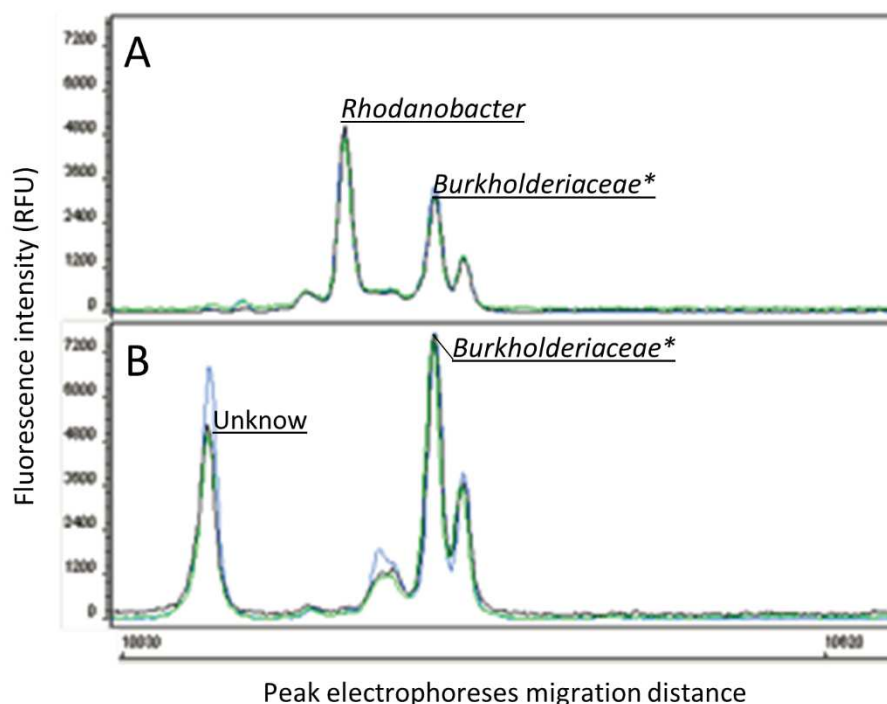


Figure 21: Comparison of the bacterial community structure (CE-SSCP profiles) obtained from microbial consortium at the beginning (A) and the end (B) of the experiment assessing the ability to oxidize 0.1 mM of Sb(III) at acid pH (3.5). Replicates are represented by different colors (blue, green and black).

2.4. Discussion

2.4.1. Microbial oxidation of antimony

The soil biotic batch experiment demonstrated that the microbial enrichment obtained from the Auzon soil oxidized Sb(III) at initial pH 5.5 and initial Sb(III) concentration of 0.1 mM. In the first step (before subculturing), a combination of two processes was evidenced: both Sb(III) oxidation and a removal of total Sb (Sb(III)+Sb(V)) from the dissolved phase. This might be related to sorption of Sb(III) and Sb(V) species onto soil particles, which were probably more abundant before subculturing than after subculturing. Indeed, sorption of antimony species on soil components is a major process of Sb retention in the environment; among these components, iron oxides are efficient sorbents for Sb(III) and Sb(V) at pH 5.5 (Leuz et al., 2006a). Although soil composition was not determined in the present study, we can assume that it contained iron oxides thus that adsorption of Sb(III) and Sb(V) on remaining soil particles was the main process responsible for dissolved Sb removal in step 1 of biotic and abiotic soil batch experiment. Leuz et al. (2006a) showed that abiotic Sb(III) oxidation occurred after Sb(III) adsorption on goethite at pH 3, 5.9 and 9.7, and Asta et al. (2012) suggested that Sb(III) oxidation in AMD was a biotic process occurring indirectly; they made the hypothesis that Sb(III) was abiotically oxidized in presence of Fe(III) produced by Fe(II)-oxidizing bacteria. In the present study, the difference in Sb(V) concentration between biotic and abiotic batch in step 2 showed that Sb(III) oxidation was a biotic process. In the present study, the mechanism, either direct (Sb(III) oxidation by microorganisms) or indirect (Sb(III) oxidation after biotic production of an oxidizing agent such as Fe(III)) cannot be inferred from our results; however,

no Fe was present in our culturing medium, suggesting a different process than that described by Asta et al. (2012).

In all experiments carried out at different pH and Sb(III) concentrations, dissolved Sb(III) concentration decrease was accompanied by pH increase. However, loss of Sb(III) was not detected when pH was artificially and abiotically increased from 3.5 to 10 in the culture medium (data not shown). This suggested that Sb(III) loss, as detected by the colorimetric method (which probably corresponded to Sb(III) oxidation into Sb(V)), was not related to pH increase. The pH increase detected in enrichment batch experiments and in kinetic experiment was the result of microbial activity since it did not occur in absence of microorganisms. The kinetic experiment provided evidence that Sb(III) oxidation began at acid pH; an important fraction of Sb(III) was oxidized below pH 3.8 (Fig. 20), although an important pH shift, from 3.8 to 6, occurred thereafter. This confirmed that some microorganisms from the consortium were able to oxidize Sb(III) at acid pH.

2.4.2. Composition of bacterial communities

Bacterial community of the consortium was characterized by two molecular approaches targeting the 16S rRNA genes. Although the use of next-generation sequencing (NGS) techniques has gained importance during the last decade, fingerprinting techniques are still considered as legitimate in microbial ecology studies. Although CE-SSCP is less sensitive (Tebbe et al., 2017), comparisons of NGS and fingerprinting techniques showed good correlation of the results in terms of richness and diversity (De La Fuente et al. 2014; van Dorst et al. 2014). In the present work, CE-SSCP was used to monitor the dynamic of bacterial communities under different experimental conditions (in term of initial pH or initial Sb(III) concentration). Because our priority was to study Sb oxidation mediated by microorganisms at acidic pH, an in deep characterization by Illumina sequencing was done on the consortium obtained after acidification (pH 3.5 and [Sb(III)] = 0.1 mM).

Four dominant taxa could be identified in the consortium cultured at pH 3.5 and at 0.1 mM of Sb(III) by CE-SSCP analyses. Dominant taxa were affiliated to the *Burkholderiaceae* family and the *Rhodanobacter* genus. Another taxa related to the *Burkholderiaceae* family and the *Leifsonia* genus were present in relatively minor proportions. These four taxa were also identified by Illumina sequencing, but in different proportions. Indeed *Leifsonia* was the dominant taxon with 49.2% of whole reads, whereas only 5.7% and 4.2% of reads were respectively affiliated at *Burkholderiaceae* and *Rhodanobacteraceae*. Metabarcoding identified eight other taxa with a relative abundance superior to 1%. These differences observed between the two techniques may be explained by PCR biases affecting taxa representativeness (Mathieu-Daudé et al., 1996; Peccoud and Jacob, 1996).

All these taxa were previously described in contaminated environments (Quéméneur et al., 2008; Weyens et al., 2013; Bao et al., 2014; Hong et al., 2015; Sun et al., 2016ab; Rangel et al., 2017; Zecchin et al., 2019) including in Sb contaminated soils (Shi et al., 2013 ; Li et al., 2013; Nguyen and Lee, 2014 and 2015 ; Nguyen et al., 2017; Kataoka et al., 2018; Li et al., 2018; Lu et al 2018; Sun et al., 2019). The *Burkholderiaceae* and the *Sphingomonas* genus include arsenite oxidizers (Rusch et al., 2015; Kinegam et al., 2008). These bacteria could hypothetically use similar metabolism in response to the Sb contamination because of the

chemical similarities between As and Sb. The consortium also contained taxa, which include bacteria able to metabolize Sb, as *Burkholderiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Micrococcaceae* and *Rhizobiaceae*. More than 60 bacteria were identified as able to oxidize Sb. However these Sb(III) oxidizing bacteria were isolated from neutral environment (Li et al., 2016). *Cupriavidus* sp. NL4 (*Burkholderiaceae* family) and *Bosea* sp. AS-1 (*Bradyrhizobiaceae* family) were able respectively to oxidize 100 μ M and 2 mM Sb(III) completely in 500 and 144 h (Nguyen and Lee, 2015; Lu et al., 2018). Shi et al. (2013) isolated a strain of *Arthrobacter* (*Arthrobacter* sp. LH11, *Micrococcaceae* family) able to oxidize Sb(III) from Sb mining soil collected in China. Based on genome analysis, five *Rhizobium* strains contain the antimonite oxidase gene *anoA* (Li et al., 2016). Moreover, *Rhizobium* and *Agrobacterium* (*Rhizobiaceae* family) have been recognized as closely related (Young et al., 2003) and 8 strains of *Agrobacterium* are reported as Sb-oxidizers (Lehr et al., 2007; Li et al., 2016). Interestingly, Nguyen et al. (2017) isolated two Sb-oxidizing bacteria included in *Rhizobiaceae* family. One of these strains was designated *Ensifer* sp. NLS4 and shared 100% sequence similarity to *Ensifer adhaerens* strain WJB36.

2.4.3. Impact of pH and Sb on the microbial biomass and bacterial dynamic

The decrease of the initial pH and the increase of initial Sb(III) concentration affected both bacterial biomass and diversity. *Bradyrhizobiaceae* and *Rhodanobacter*, initially present at initial pH 5.5, were not detected by CE-SSCP analyses when initial pH decreased at 3.5 and 3.25, respectively. *Burkholderiaceae* became dominant during acidification with two associated peaks. The relative abundance of *Leifsonia* was not impacted by the variation of pH. These two taxa seemed able to tolerate or to growth at a wide range of pH (3.25 to 5.5). *Leifsonia* spp. were used in acidic condition for cellulose production or uranium removal (Velmurugan et al., 2015; Ding et al., 2018). Stopnisek et al (2014) showed that *Burkholderia* species, included in *Burkholderiaceae* family, have a competitive advantage in acidic soil. As mentioned previously, this genus can potentially play a role in the Sb transformation. Interestingly, pH quickly increased in all biotic batch. The change of pH by growth and activity of soil bacteria is very common and can promote a shift of bacterial communities over time (Ratzke and Gore, 2018). This shift might explain the evolution of bacterial communities after an incubation period of 80 days in the enrichment batch assessing the ability to oxidize 0.1 mM of Sb at acid pH (3.5). Further analyses are needed to identify the unknown bacteria that appeared at the end of the incubation and to determine their potential role. *Leifsonia*, *Burkholderiaceae* and *Rhodanobacter* were detected at both acidic condition and high Sb concentration (up to 10 mM). As previously mentioned, these taxa have already been identified as able to grow in metal contaminated environment (Weyens et al., 2013; Chung et al., 2014; Nguyen and Lee, 2015; Li et al., 2018). Weyens et al. (2013) identified a Cd and Zn tolerant *Leifsonia* spp. in the rhizosphere on metal-contaminated soil, which represented a potential interest in phytoremediation. Several strains of *Rhodanobacter* tolerated up to 10 mM Sb(V) (Chung et al., 2014). Nguyen and Lee (2015) isolated two members of *Burkholderiaceae* family, *Burkholderia* sp. NL3 and *Cupriavidus* sp. NL4, with a culture medium containing 100 μ M Sb(III). *Cupriavidus* sp. NL4 and *Cupriavidus* sp. S1 were able to oxidize Sb(III) and strain S1 could also tolerate until 6 mM Sb(III) (Li et al., 2018). In the present study, *Bradyrhizobiaceae* taxa were detected when initial Sb(III) concentrations ranged between 1 to 100 mM. Here, the

development of *Bradyrhizobiaceae* despite the low initial pH (3.5) might be related to the increase of pH during incubation. *Bradyrhizobiaceae* was the only taxa detected when initial Sb(III) concentrations was equal to 50 mM and seemed to tolerate up to 100 mM of Sb(III). Among this family, *Bosea* sp. AS-1 could tolerate 50 mM of Sb(III) and oxidize 2 mM Sb(III) completely in 144 h using sodium lactate as carbon source (Lu et al., 2018). In our study, Sb(III), according to colorimetric method, was no longer detected in biotic batch after a period of 7 and 36 days. However, this method does not prove in an unequivocal manner the oxidation of Sb. Complementary analyses would be required to determine if organisms affiliated to *Bradyrhizobiaceae*, and more generally our microbial consortium, would be able to oxidize Sb at initial concentrations superior to 0.1 mM.

Although this study was focused on the bacteria, it is noteworthy that the consortium also contained eukaryotic biomass, certainly yeast according to microscope observations (Supplementary figure S23). The growth of these eukaryotes was favored in acidic condition contrary to bacteria, as seen previously (Gross and Robins, 2000; Rousk et al., 2009). Even if their biomass decreased when Sb(III) initial concentration increased, they seemed to be able to resist at high Sb concentration, up to 100 mM. Tolerance mechanism to Sb and As has been identified in a yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, based on the efflux of metalloids and the sequestration inside the vacuole (Bobrowicz and Ułaszewski, 1998; Ghosh et al., 1999; Wysocki et al., 2001; Filella et al., 2007). This mechanism is very similar to the Ars system involved in the As and Sb resistance in prokaryotes. Despite this similar metabolic behavior, the capacity to oxidize antimony or arsenic has not yet been described for any known yeast or fungi. However, understanding the role of these eukaryotes in the microbial interactions with Sb requires further investigations.

2.5. Conclusion

The present study suggests that the moderately acid soil from Auzon contained autochthonous microbial populations with the ability to oxidize Sb(III) under acidic conditions (pH<4). As evidenced by both CE-SSCP fingerprint and metabarcoding, *Leifsonia*, *Burkholderiaceae*, *Rhodanobacter* and *Bradyrhizobiaceae* taxa dominated the bacterial community in the consortium obtained from this soil. Some of the identified taxa included Sb-oxidizing bacteria (*Burkholderiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Micrococcaceae* and *Rhizobiaceae*). Initial Sb(III) concentration and initial pH impacted the structure of the bacterial consortium. *Bradyrhizobiaceae* taxa was highly enriched at high Sb(III) concentration (≥ 50 mM). The confirmation of the capacity of *Bradyrhizobiaceae* related bacteria to actually grow and oxidize 100 mM Sb(III) under acid pH would require further investigations.

Our results support the possibility to attenuate the toxicity of Sb in acid mine drainage using such a microbial consortium. The optimal conditions for Sb(V) entrapment in the solid phase remain to be determined. Further investigations are needed to characterize Sb(III)-oxidizing microorganisms and the exact mechanism of oxidation under acidic condition.

Acknowledgements

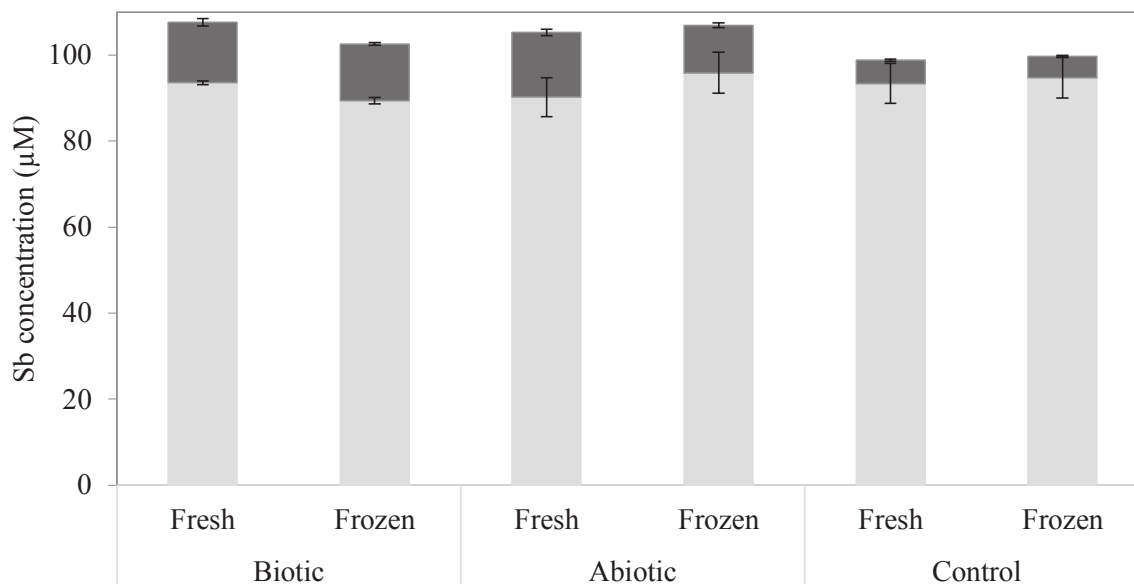
We thank ADEME, the French Agency for the Environment and Energy Management, and BRGM for jointly funding the PhD thesis of EL.

2.6. Supplementary material

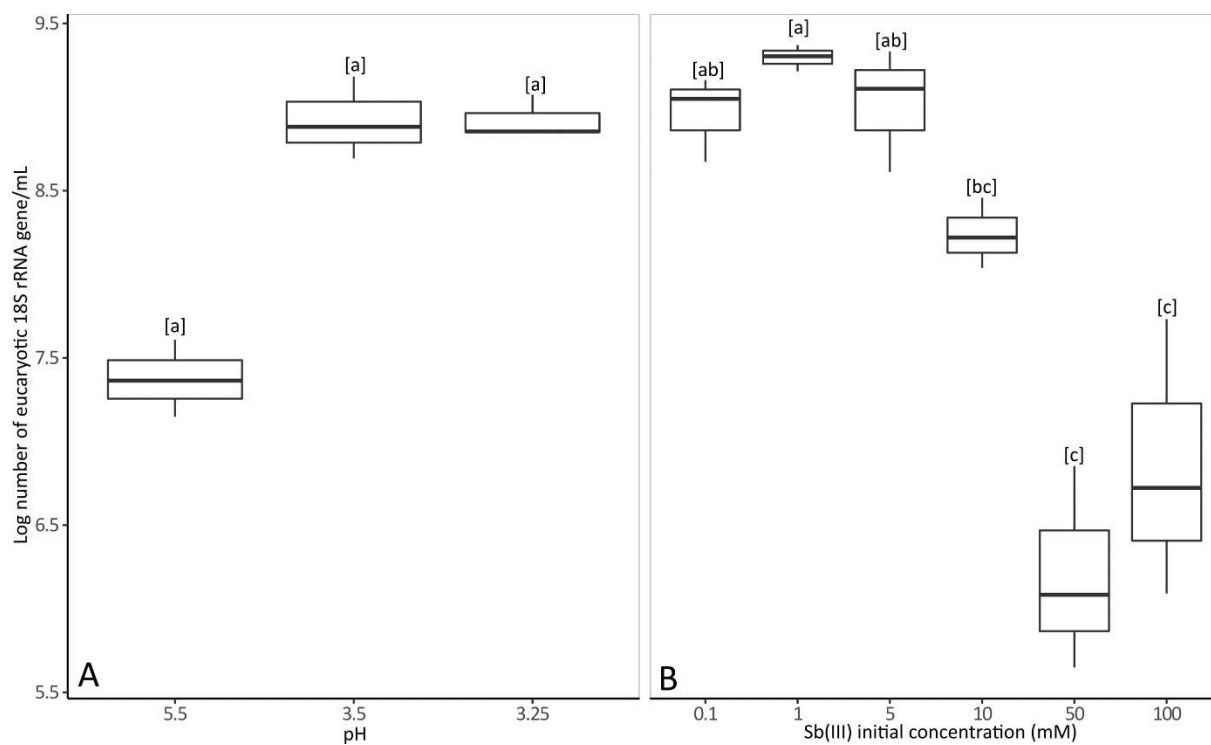
2.6.1. Supplementary data

The eukaryotic biomass was quantified following microscope observation of yeasts in Sb-oxidizing consortium. Quantification of the 18S rRNA was performed by qPCR with primers FR1 (5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3') and FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Prévost-Bouré et al., 2011). These primers designed for fungi are specific to the *Ascomycota* and *Basidiomycota* phyla, which include yeasts.

2.6.2. Supplementary figures and tables



Supplementary figure S22: Sb(III) (light grey) and Sb(V) concentrations (black grey) in fresh and frozen samples collected at day 8 during Sb(III) oxydation kinetic performed at pH 3.5 and 0.1 mM Sb(III). Error bars indicate standard deviations of the mean for biotic triplicates and analytical error (5%) for abiotic and control conditions.



Supplementary figure S23: Evolution of eukaryotic biomass from microbial consortium according to the pH at 0.1 mM of Sb(III) (A). Evolution of eukaryotic biomass from microbial consortium according to Sb(III) initial concentration at pH 3.5 (B).

Chapitre III :

Elimination simultanée de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium dans un drainage minier acide par sulfato- réduction au sein d'un bioréacteur en colonne

1. Introduction, objectifs et démarche

Les métaux et métalloïdes toxiques présents dans les DMA peuvent être traités via des processus biologiques en condition aérobie ou anaérobie (cf. chapitre I.4.2).

La première étude de cette thèse a démontré la capacité d'un enrichissement microbien à oxyder Sb en aérobiose en condition acide. Les résultats apportent des informations sur les processus intervenant dans la transformation et le piégeage de Sb dans des conditions proches de celles rencontrées dans les DMA et devraient contribuer à terme au développement de stratégies de remédiation de ces eaux.

En condition anaérobie, l'arsenic, l'antimoine et le thallium pourraient être éliminés de la phase liquide au sein de bioréacteurs anaérobies par la précipitation de sulfures générés par l'activité de bactéries sulfato-réductrices (BSR ; cf. chapitre I.4.2). Toutefois la précipitation simultanée de sulfures d'As, Sb et Tl dans un DMA par sulfato-réduction bactérienne n'a jamais été étudiée auparavant.

Un dispositif anaérobie de laboratoire traitant un DMA par sulfato-réduction bactérienne a été étudié au cours de la présente thèse afin de mieux comprendre les comportements biogéochimiques de l'As, du Sb et du Tl au cours d'un tel traitement, lorsqu'ils coexistent dans le DMA. Le bioréacteur anaérobie consiste en une colonne de laboratoire en verre d'une hauteur de 36 cm et d'un diamètre interne de 36 mm, présentant un volume utile de 400 ml. Ce volume est rempli avec un support de pouzzolane et une gélose nutritive nécessaire à l'activité des bactéries sulfato-réductrices, enrichies du DMA de Carnoulès et inoculées dans la colonne le 16 avril 2018. Leur croissance s'est effectuée d'abord en mode batch, à l'obscurité et à 25°C pendant 23 jours, afin de permettre aux BSR de coloniser le support. La colonne a ensuite été alimentée en mode continu avec le DMA de Carnoulès ([Fe] = 1150 mg/L, [As] = 100 mg/L, [Sb] = 1 mg/L, [Tl] = 0,3 mg/L, pH~3) ajusté à un pH de 4,5, filtré (0,22 µm) et supplémenté avec 0.5 g/L de glycérol comme source de carbone et d'énergie pour les BSR. Une période de 59 jours a été nécessaire pour stabiliser le réacteur (d'après le suivi des facteurs physico-chimiques) avant de commencer l'expérience. Trois phases expérimentales ont été menées, au cours desquelles la concentration en Sb a été progressivement augmentée dans l'eau d'alimentation. Un suivi régulier des paramètres physico-chimiques des eaux d'entrée et de sortie du bioréacteur a été effectué pendant 281 jours (pH, débit, concentrations en As, Sb, Tl, S et Fe). A chaque changement de phase expérimentale, du liquide a été prélevé à différentes hauteurs de la colonne pour des analyses chimiques et microbiologiques (quantification de la biomasse bactérienne par qPCR et caractérisation de la diversité bactérienne par métabarcoding du gène codant l'ARNr 16S bactérien). La première phase expérimentale a pour objectif de comprendre et d'évaluer les capacités de ce dispositif à éliminer les polluants naturellement présents au sein du DMA. Les phases suivantes approfondiront nos connaissances sur la compétition entre Sb et As pour la précipitation sous la forme de sulfures. La diversité bactérienne au sein du réacteur a été caractérisée afin de la relier aux conditions expérimentales et à l'efficacité du système.

L'ensemble de ces résultats est présenté sous forme d'article en préparation, au sein de ce troisième chapitre de thèse. A noter que l'abatement du thallium, naturellement présent dans

Chapitre III : Elimination simultanée de l'arsenic, de l'antimoine et du thallium dans un drainage minier acide par sulfato-réduction au sein d'un bioréacteur en colonne

le DMA de Carnoulès, est également considéré dans cette étude. Toutefois, l'article présenté est focalisé sur les processus à l'origine du traitement simultanée de l'arsenic et de l'antimoine ; les résultats relatifs au thallium sont présentés en information supplémentaire.

2. Article: Bio-precipitation of arsenic and antimony from acid mine water in a sulfate-reducing bioreactor

LAROCHE E.^{1,2}, JOULIAN C.¹, DUEE C.¹, CASIOT C.², HÉRY M.², BATTAGLIA-BRUNET F.¹

¹BRGM, Geomicrobiology and Environmental Monitoring Unit, Orléans, France

²HydroSciences Montpellier, CNRS, IRD, University of Montpellier, Montpellier, France

*Correspondence: f.battaglia@brgm.fr

Abstract:

Arsenic (As) and antimony (Sb) can be disseminated from mining sites to aquatic ecosystems by acid mine drainage (AMD). The precipitation of metal sulfides, based on sulfide production by sulfate-reducing bacteria (SRB) is a promising treatment option. As and Sb present structural analogies, however the bio-precipitation of these two elements as sulfides, when they are both present in a single AMD, has not been studied yet. Here, the possibility to remove concomitantly As and Sb from acidic waters by the activity of sulfate-reducing bacteria (SRB) was investigated in a fixed-bed column bioreactor. Results showed that the addition of Sb in the feed water did not negatively influence the efficiency of As bio-precipitation. Sb was removed efficiently (up to 97.9% removal) between the inlet and outlet of the bioreactor, together with As (up to 99.3% removal) at all tested Sb conditions. The soluble concentration of As and Sb varied along the reactor height. Similarly, the bacterial communities developed inside the reactor changed in time and space. Polymers degrader, fermenters, and acetate degrader dominated the bacterial community. Appreciable sulfate reduction occurring in the bioreactor could be linked to the stable presence of one SRB affiliated to *Desulfosporinus* genus. The efficiency of our system and the presence of functional groups with biotechnological relevance suggested that this treatment system could be applied to the treatment of Sb and As from AMD.

Keywords: Bioremediation, acid mine drainage, sulfate-reducing bacteria, arsenic, antimony

2.1. Introduction

Elevated concentrations of arsenic (As) and antimony (Sb) have been measured in diverse natural environments due to anthropogenic emissions (Smedley and Kinniburgh, 2002; Herath et al., 2017). These toxic metalloids are considered by European Union and United States Environmental Protection Agency as pollutants of priority interest (Council of the European Communities, 1976; EPA, 1982).

Mining activities are a major source of As and Sb dissemination in the environment (Smedley and Kinniburgh, 2002; He et al., 2019). Wastes generated by mineral extraction can contain up to 10,000 ppm As and 1000 ppm Sb associated with sulfide minerals (Smedley and Kinniburgh, 2002; Wu et al., 2011; Cidu et al., 2014). During inappropriate waste storage, oxidation of the sulfide minerals can generate mine drainage characterized by high concentrations of these elements, which are disseminated from mining sites to aquatic

ecosystems (Manaka et al., 2007; Resongles et al., 2013; Paikaray, 2015; Sun et al., 2016b). However, some processes contribute to limit the mobility of As and Sb; they can be immobilized by co-precipitation with insoluble metal (hydro)oxides or by precipitation as sulfides (Cullen et Reimer, 1989; Filella et al., 2002ab). These processes have been exploited in water treatment technology, and the combined removal of these two elements following iron addition was considered. However, in these physico-chemical processes, variable efficiencies of As and Sb adsorption onto iron compounds are reported due to synergic or competitive behavior according to the speciation of these elements (Lan et al., 2016; Qi and Pichler, 2017; Inam et al., 2018; Wu et al., 2018) and pH (Inam et al., 2018). Moreover, such treatment by coagulation/flocculation presents the disadvantages to need a constant maintenance and elevated cost of treatment. The development of passive treatment systems, without iron addition, exploiting biological processes is a low-cost promising strategy for the remediation of metals and metalloids present in acid mine drainage (AMD) (Skousen et al. 2000). Among these biological processes, bacterial sulfate-reduction proved to be efficient to treat As and Sb individually (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2016; Alam and McPhedran, 2019). Liu et al. (2018) also reported the concomitant removal of 5 mg/L As and Sb from a synthetic waste water at neutral pH by bacterial sulfate-reduction. In this batch experiment, the removal of As depended on the addition of Fe(II), whereas Sb was removed even without iron.

Although microbial sulfate-reduction has been described for a long time as a bioprocess inhibited in acidic conditions, progress has been made recently in the field of bio-precipitation of sulfides at low pH (Ñancucheo and Johnson, 2012 and 2014). More specifically, bio-precipitation of arsenic sulfide at low pH was reported (Battaglia-Brunet et al., 2012; Le Pape et al., 2017). From a chemical point of view, precipitation of arsenic sulfide should be favored at low pH, while soluble thio-As complexes form at neutral and alkaline pH. The same geochemical behavior was observed with antimony in geothermal systems (Planer-Friedrich and Scheinost, 2011). The pH is likely to affect the biogeochemical behavior of Sb in sulfate-reducing bioreactors. The combined removal by bacterial sulfate-reduction of both As and Sb, when they co-occur in an AMD has not yet been studied.

In this context, the aim of this study was to evaluate the efficiency of an upflow anaerobic fixed-bed reactor to treat concomitantly As and Sb present in an AMD by biological sulfate-reduction in acidic conditions. The removal of these pollutants was investigated during 10 months along a column bioreactor where Sb concentration was increased progressively. Physico-chemical parameters were monitored, together with mineral characterization of the bioprecipitates. The spatial and temporal evolution of the bacterial community colonizing the reactor was investigated by 16S rRNA metabarcoding. Altogether, the results are expected to improve our understanding of the biogeochemical behavior of As and Sb in the context of sulfate reduction and acid pH. The characterization of the mobility of As and Sb in relation with the dynamic of sulfate-reducing bacterial community will complement the understanding of the biogeochemical behavior of these two toxic elements.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Bioreactor design and operating conditions

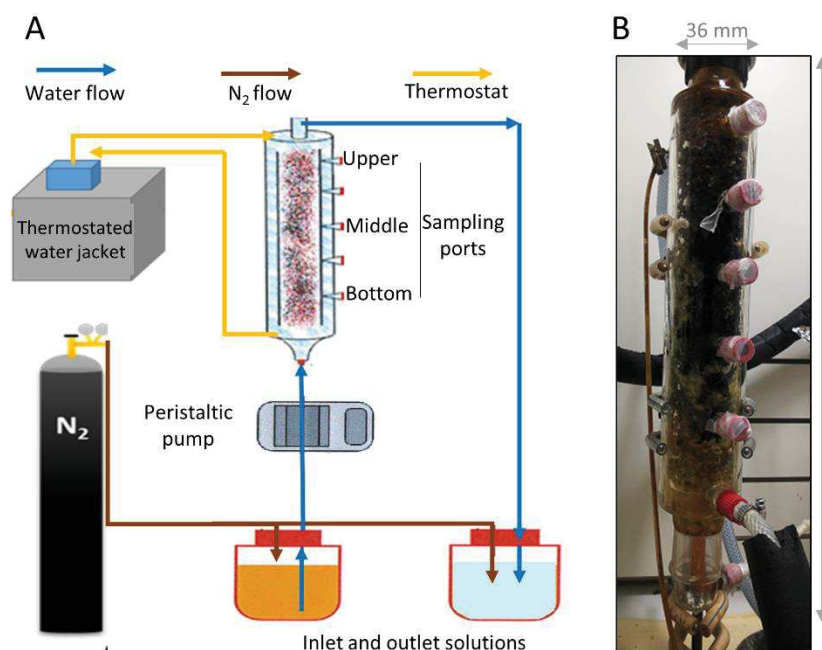


Figure 24: Schematic representation of the upflow anaerobic fixed-bed bioreactor (A). Picture of the column with filling material and yellow biogenic precipitates (B).

The lab-scale experiment was performed in a fixed-bed reactor, consisting of a 360 mm glass column with an internal diameter of 36 mm (Fig. 24). A water jacket regulated the column temperature at 25°C along the experiment and rubber-stopped sampling ports allowed liquid sampling from the middle, bottom and upper levels. The column was sterilised by autoclaving (120°C, 30 min) before filling with sterile materials composed of a mixture of pozzolana and nutritive agar in order to enhance both bacterial attachment and growth. The mixture was prepared with a total volume of 400 ml pozzolana, 400 ml agar at 25 g/L, 20 ml nutritive solution at pH 4.5 (20 g/L yeast extract and 7.8 g/L KH₂PO₄) and 0.4 ml trace element solution (3g/L EDTA ; 1.1 g/L FeSO₄, 7H₂O ; 65 mg/L MnSO₄, H₂O ; 89 mg/L ZnSO₄, 7H₂O ; 28 mg/L NiSO₄, 7H₂O ; 18 mg/L Na₂MoO₄, 2H₂O ; 0.3 g/L H₃BO₃ ; 2 mg/L CuCl₂ ; 130 mg/L CoSO₄, 7H₂O). The filled column was de-oxygenated by flushing with sterile N₂ during 3 days, then inoculated with an acid tolerant microbial consortium containing sulfate-reducing bacteria (SBR) originating from the AMD of Carnoulès (France) (Le Pape et al., 2017). Ten milliliters of this inoculum were centrifuged 10 min at 1422 g and the pellet stored at -80°C prior molecular analyses. A first step promoting bacterial growth inside the column was performed in batch mode during 23 days. Then, the column was fed in continuous mode with an AMD water sampled in January 2016 at the Carnoulès mine (Gard, France) and stored at 4°C under nitrogen until use. The main characteristics of this AMD are a pH close to 3, around 100 mg/L total dissolved As, 1000 mg/L total dissolved Fe, 20 mg/L total dissolved Zn (Le Pape et al., 2017), and less than 1 mg/L total dissolved Sb (Resongles et al., 2013). For the experiment, its pH was adjusted at 4.5 by adding NaOH. The water was filtrated (0.22 µm) and complemented with 0.5 g/L glycerol as electron donor for the SRB. The feeding water was maintained in anaerobic condition under N₂ atmosphere. The composition of the feeding solutions, prepared with the real AMD and used during the present experiment was determined (Table 15). The

variable parameter was the Sb concentration in the feed waters; it was increased by adding Sb in the real AMD water, as potassium Sb(III) tartrate, in three steps (corresponding to phase 1, 2 and 3) up to the molar equivalence between Sb and the As naturally present in the AMD (Table 15). The analysis of exploitable data started after the physico-chemical parameters had stabilized (59 days) in order to compare the acquired results during each experimental condition.

Table 15 : Average values of physico-chemical parameters of feeding water for each experimental condition.

Phase	Duration of the phase (days)	Sampling day for ICP-MS analysis	Flow (ml/h)	Hydraulic retention time (h)	pH	[Glycerol] (mg/L)	[As] (mM)	[Sb] (mM)
1	117	0, 82 and 117	1.5 ± 0.1	132 ± 10	4.3 ± 0.1	0.5	1.14 ± 0.16	0.008 ± 0.006
2	35	123, 141 and 152	1.3 ± 0.1	163 ± 19	4.1 ± 0.1	0.5	1.01 ± 0.09	0.70 ± 0.09
3	65	152, 155, 204 and 217	1.4 ± 0.1	149 ± 15	4.3 ± 0.2	0.5	1.02 ± 0.06	1.01 ± 0.07

2.2.2. Monitoring

Inlet and outlet waters were monitored over a 217 days period. The outlet solution was collected in a bottle maintained in anaerobic condition under N₂ atmosphere. The real flow-rate was calculated by weighting the cumulated outlet water collected in a bottle during a period of time. Inlet and outlet water pH were measured, and 10 ml of these waters were sampled, filtrated at 0.45 µm, acidified with one drop of concentrated nitric acid and stored at 4°C until chemical analyzes. The outlet water was sampled every day whereas the inlet water sampling was done at each renewal of feed water.

Vertical profiles of the water physico-chemical and microbial parameters were determined at the end of each phase along the column. Five milliliters of water were collected in triplicate in the inlet and outlet water bottles, then inside the column through the bottom, middle and upper septa with a sterile syringe. Samples were filtrated with a sterile 0.22 µm cellulose acetate filter which was stored at -80°C for molecular analyzes. The filtrate was acidified and kept at 4°C for chemical analysis.

At the end of the experiment (day 217), the column was opened in a glovebox under N₂ atmosphere and samples of the filling material were collected. Triplicate samples of solids were taken from the bottom, middle and upper parts of the column and stored at -80°C until biological analysis. Solid samples were also collected along the column and dried under N₂ flux in anaerobic Hungate glass tubes for mineralogical characterization.

2.2.3. Chemical analyses

As and Fe concentrations were first analysed on all water samples collected to check that stabilization was reached before changing the operating conditions. Total As and Fe were analysed by Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS, Varian SpectrAA 220 FS) after appropriate dilution.

A more complete characterization was performed on selected water samples from inlet and outlet (three for each feed phase except the Sb concentration from the inlet water in phase 1

that was not measured because the sample was lost, Table 1) and in samples from the vertical profiles collected at the end of each phase. In these samples, total dissolved concentrations of As, Sb, Fe, S and other elements (Zn, Tl and Pb) were analyzed using ICP-MS on the AETE-ISO platform (University of Montpellier).

2.2.4. Characterization of the bioprecipitates

The bioprecipitates collected at the end of the experiment were characterized by scanning electron microscopy (SEM). Prior Scanning Electron Microscopy (SEM), samples were submitted to plasma cleaner (Gambetti, Colibri, 300 s under Ar plasma) in order to remove organic phases. Then, a 20 nm carbon coating was done on the samples (Cressington, Carbon Coater 208C) to make them conductive. The SEM images were acquired on a field emission gun scanning electron microscope MIRA 3 XMU (TESCAN, Brno, Czech Republic), under high vacuum conditions with a 15 kV beam. EDS spectra and element mappings were recorded using an EDAX Pegasus EDS system.

2.2.5. Molecular analyses

Total genomic DNA was extracted from the pellet of the inoculum, frozen filters and bioprecipitates, using the FastDNA Spin Kit for soil according to the manufacturer's recommendations (MP Biomedicals, Illkirch, France). The DNA extracts were quantified with the Quantus fluorometer (Promega, Madison, WI, USA) and stored at -20°C until molecular analysis to determine the bacterial biomass and diversity.

The abundance of bacterial biomass in column bioreactor was quantified by a real-time PCR targeting the 16S rRNA gene using universal bacterial primers 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') and 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'), as previously described (López-Gutiérrez et al., 2004).

Bacterial diversity was determined by Illumina high throughput sequencing of bacterial 16S rRNA genes from inoculum and from samples collected from the column at the end of each phase. PCR amplifications and sequencing analysis were performed by the MetaHealth platform (CIRAD, Montpellier, France). The 16S rRNA V3-V4 gene region was amplified in a first time with the primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). This first PCR was run in duplicate in a Mastercycler ep 384 (Eppendorf) thermocycler with 20 µl PCR reaction (0.5 g of DNA, 10 µL of Phusion Flash High-Fidelity 2X Master Mix (Thermo Fisher), 300 ng T4 gene 32 (MP Bio), 0.25 µM for forward and reverse primers). The following conditions were applied: initial denaturation at 95°C for 2 min, 25 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final elongation at 72°C for 10 min. Illumina specific overhang sequences were added to the specific primers in order to perform barcoding according to Illumina's protocol. This second PCR implemented dual barcodes on PCR products. PCR reactions (15 µl) contained: 7.5 µL Biolabs Taq 2X mastermix, 2 µL of 10 µM for forward and reverse primers, and 2 µL of PCR product. The following conditions were applied: initial denaturation at 95°C for 2 min, 8 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final elongation at 72°C for 10 min. Final amplicons concentrations were quantified on a D5000 ScreenTape bioanalyzer (Agilent) and validated by

qPCR on a LC480 real-time thermocycler (Roche), using qPCR primers recommended in Illumina's qPCR protocol and Illumina's PhiX control library as standard (Illumina). All amplicon products and control library (5% PhiX library) were finally sequenced using paired-end Illumina MiSeq sequencing (2×300 bp). The raw datasets are available on the European Nucleotide Archive system under project accession number (submission in progresse).

2.2.6. Bioinformatic analyses

Illumina reads were processed with the pipeline Frogs (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution) (Escudié et al., 2018). Paired-end reads were firstly merged with a maximum of 10% mismatch in the overlapped region by FLASH v1.2.11 (Magoč and Salzberg 2011). Only full-length sequences with expected length (between 340 and 450 nucleotides), no ambiguous bases (N) and good primer sequence were kept for the further steps. These high quality sequences were clustered in two steps using the SWARM algorithm to obtain Operational Taxonomic Units (OTUs) with minimal distance ($d_g = 1$), then with an aggregation distance of 3 (Mahé et al., 2014). The removal of chimeric sequences was performed with VSEARCH with de novo UCHIME method (Edgar et al., 2011; Rognes et al., 2016), combined with a cross-sample validation. A filtering tool was used to select OTU according to their abundance (threshold = $5 \cdot 10^{-5}$, Bokulich et al, 2013). Subsampling to the lowest dataset (1110 reads) was performed by random selection in order to efficiently compare the datasets and avoid biased community comparisons. Each OTU was affiliated against the SILVA reference database (v132, pintail score ≥ 80). Statistics tools included in FROGS pipeline were used to generate OTU table and to calculate the alpha and beta diversity (diversity indices and bray-Curtis distances).

2.2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with R version 3.4.3 according to Laroche et al. (2018). A non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test evaluated the statistically significant differences between the bacterial biomass. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was based on the bray-Curtis distance to evaluate the dynamics of the bacterial communities structure. Adonis tests were performed to assess the significance of NMDS.

2.3. Results

2.3.1. pH variations

An increase of pH was always observed between the inlet and the outlet water of the reactor (Fig. 25A). The average pH increased from 4.29 ± 0.03 to 5.10 ± 0.25 during the phase 1, from 4.03 ± 0.06 to 5.05 ± 0.19 during the phase 2 and from 4.35 ± 0.20 to 4.91 ± 0.29 during phase 3 (Fig. 25B). This pH increase was gradual in phase 1. In phases 2 and 3, there was a strong pH increase (around 1 units) between the inlet and the bottom of the column, followed by little pH variation (< 0.3 units) between the bottom and the upper section and finally a pH decrease between the upper section and the outlet.

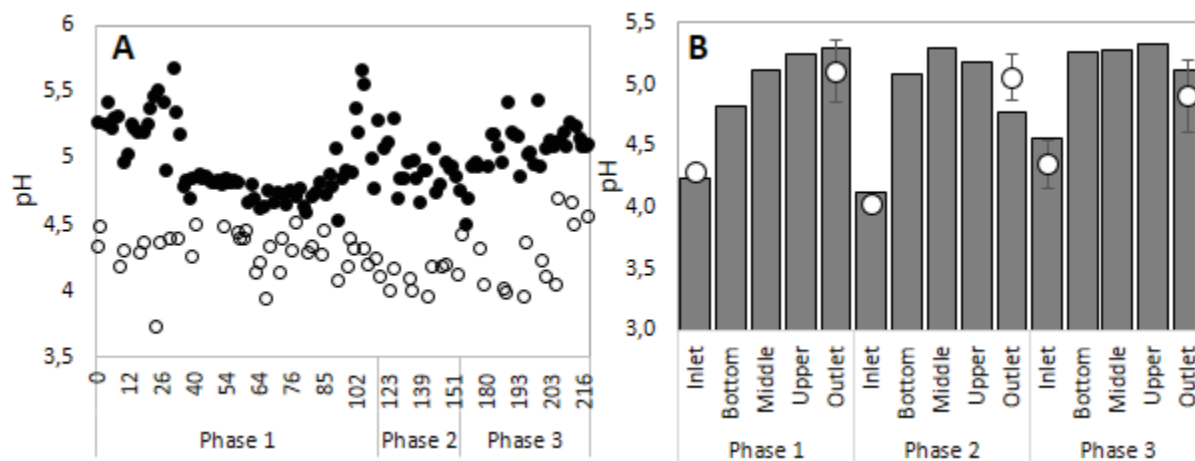


Figure 25: pH variations of inlet and outlet waters represented by white and black circles respectively (A). Histogram of pH vertical-profiles at the end of each phase in the column bioreactor (B); the white circles represent the average pH of inlet and outlet waters along each phase, and the error bars indicate standard deviations of the mean for three measurements for each feed condition.

2.3.2. As and Sb removal

The reactor removed from 96 to 99% of dissolved As, during the three phases of experiment (Fig. 26A). As removal occurred at different levels of the reactor depending to the experimental conditions. At the end of the first phase, 72% of As was removed between the bottom and the middle of the column reactor. In phase 2, arsenic concentration decreased gradually from 0.5 to 0.1 mM from the bottom to the top. In phase 3, arsenic was mainly removed between the feed point and the bottom of the reactor (99.8%).

During phase 1, antimony concentration in the feed solution was that of the natural AMD (less than 0.01 mM) thus it was too low to determine a precise removal rate. Antimony removal during the two next phases averaged 97% and 98% respectively. Sb was mainly removed in the bottom zone of the reactor in each phase (Fig. 26B). As for arsenic, its concentration decreased gradually from 0.018 to 0.004 mM along the column in phase 2. The dissolved Sb concentration in the outlet water was always higher than in the upper zone of the bioreactor. This phenomenon might be explained by evaporation that concentrates compounds in the outlet bottle.

Other toxic chemical substances (Pb, Tl and Zn) present in minor concentration in the feed water were removed inside the reactor (Supplementary Table S16).

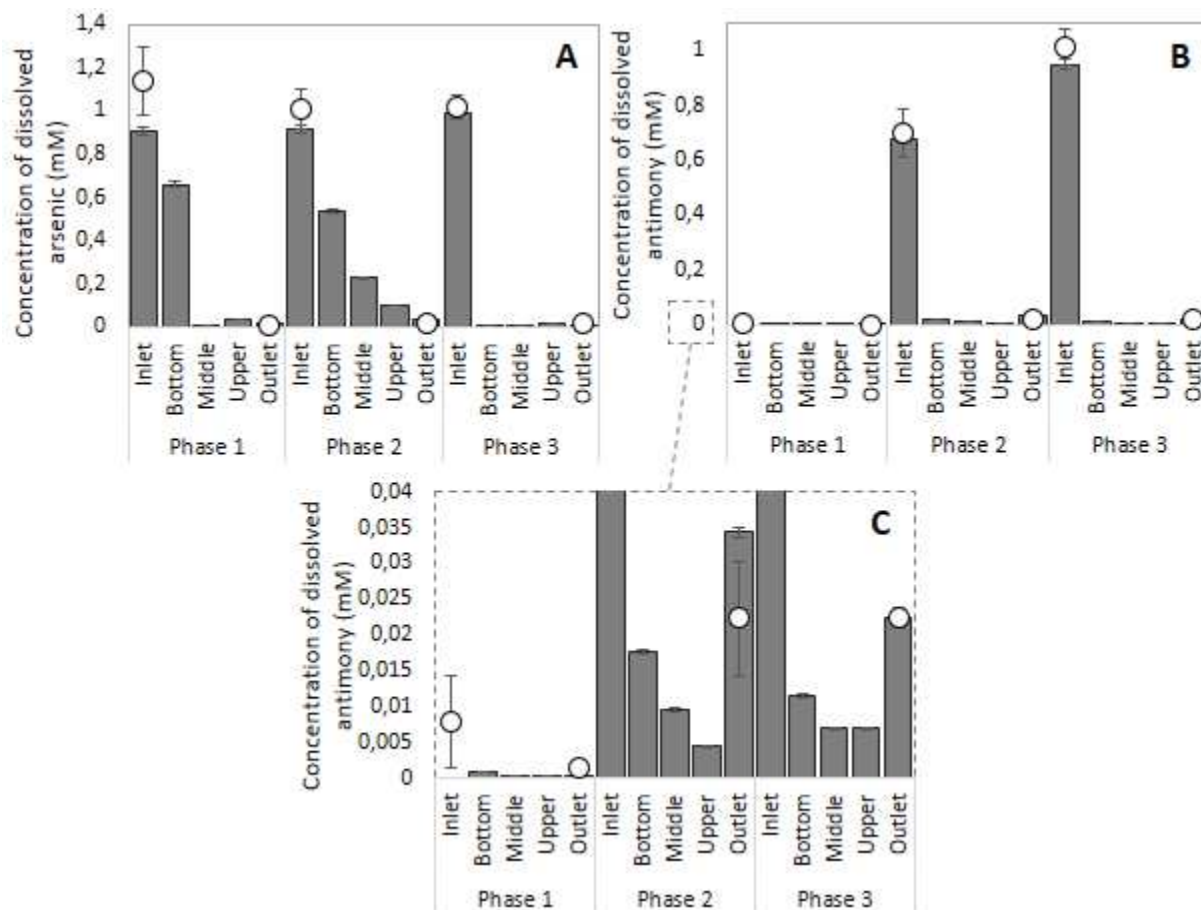


Figure 26: Vertical profiles of dissolved arsenic (A) and antimony (B) concentrations in the column bioreactor at the end of each phase (data missing for the Sb concentration in the inlet water in phase 1), the error bars indicate analytical error (2%). The white circles represent the average As and Sb concentrations of inlet and outlet waters for each phase, and the error bars indicate standard deviations of the mean for three measurements for each feed condition. The figure 3C represent a close up of the figure 3B.

2.3.3. Fe and S variation

The average dissolved iron and sulfur concentrations in the inlet water were respectively 21 ± 2 and 38 ± 3 mM (Fig. 27). Iron and sulfur removal varied respectively between 0-35% and 0-31% during the different phases of the experiment. Inside the column, the sulfur concentration decreased gradually from 33.8 to 30.4 mM at the end of the phase 1 (Fig. 27B). For the others phases, it stabilized around 32.30 ± 0.05 mM (phase 2) and 30.0 ± 0.5 mM (phase 3) between bottom and upper section and increased slightly in the outlet water. Similar trends were observed for iron concentration although the decrease in concentration was less marked during phase 1 (Fig. 27A).

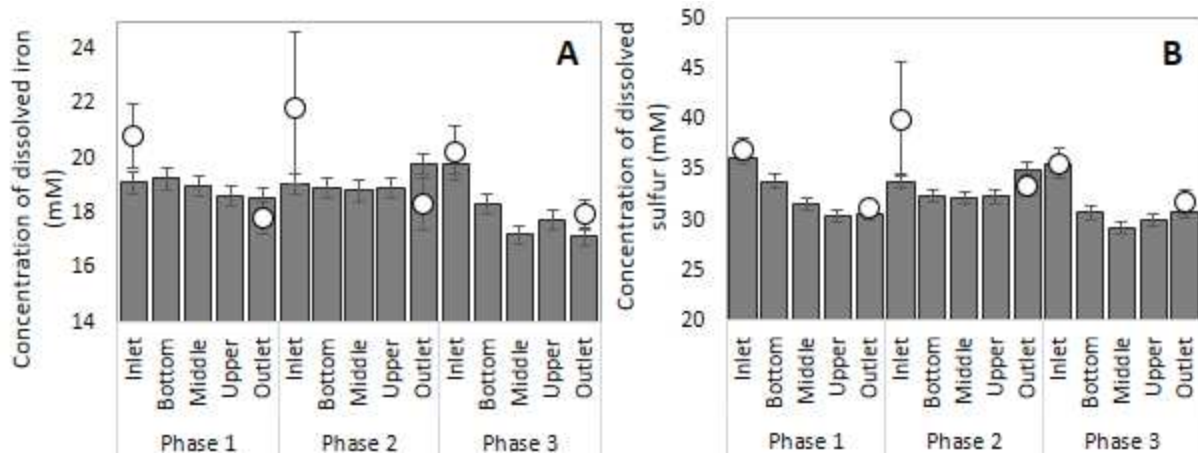


Figure 27: Vertical profiles of dissolved iron (A) and sulfur (B) concentrations in the column bioreactor at the end of each phase, with error bars that indicate analytical error (2%). The white circles represent the average Fe and S concentrations of inlet and outlet waters for these phases, and the error bars indicate standard deviations of the mean for three measurements for each feed condition.

2.3.4. Characterization of the bioprecipitates

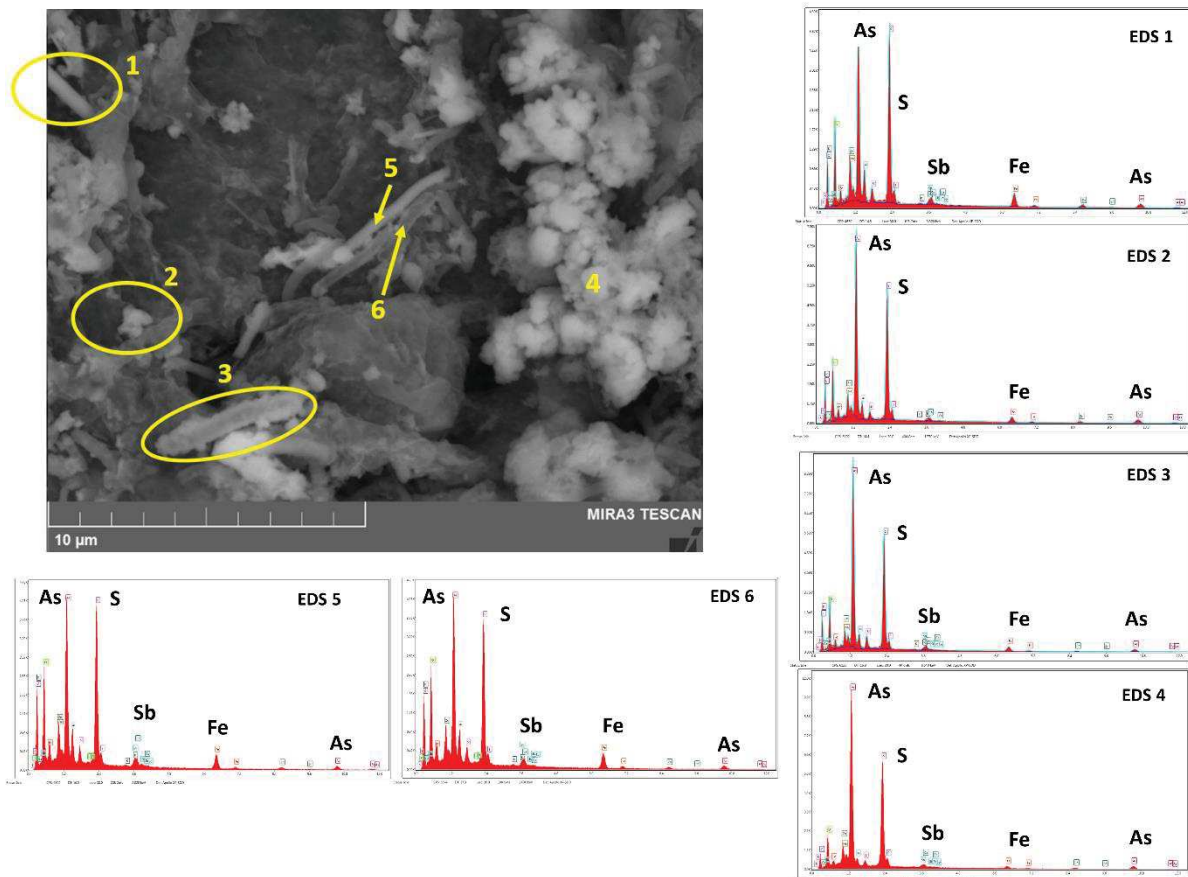


Figure 28: SEM image in backscattering electron mode showing different spots on the bioprecipitate collected at the surface of filled material (bottom zone of the column bioreactor) at the end of experiment. The EDS spectra of each spot shows the main occurrence of As and S signals.

SEM observation of the solid phase collected inside the bioreactor revealed the presence of mineral-crusted rod-shaped bacteria of different sizes, around 5 μm long and 0.5 to 2 μm large (see focus 3, 5 and 6 in Fig. 28). The EDS spectra of the mineral phases associated with these bacterial shapes revealed peaks of S and As sometimes associated with peaks of Fe and Sb (see focus 5 and 6 in Fig. 28). The morphology of some bioprecipitates appeared as aggregates of amorphous particles (see focus 2 and 4 in Fig. 28), however their composition seemed close to that of the rod-shaped minerals. Moreover, some amorphous nanoparticles seemed to be associated with the surface of bacteria (focus 3 in Fig. 28). Some rod-shape bioprecipitates embedded in the biofilm (Fig. 29A) collected in the middle section of the column presented association of S, As and Sb in their spectra, with higher peaks corresponding to antimony (Fig. 29B).

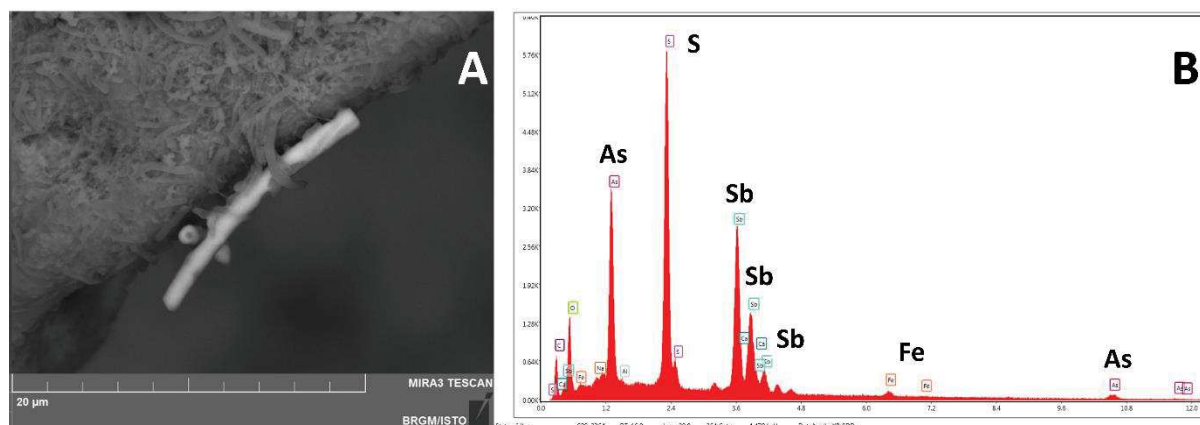


Figure 29: SEM image in backscattering electron mode showing a bacterial cell embedded in the bioprecipitate collected at the end of the experiment in the surface of filled material (middle zone of the column bioreactor) (A). EDS spectra of the Sb-As-S bearing phase (B).

Antimony was always detected with arsenic. However, the elemental map of one bioprecipitate showed differences between the distribution of As and Sb in the As-Sb-S bearing phase (Fig. 30). Moreover Fe was anti-correlated with As and Sb in this bioprecipitate.

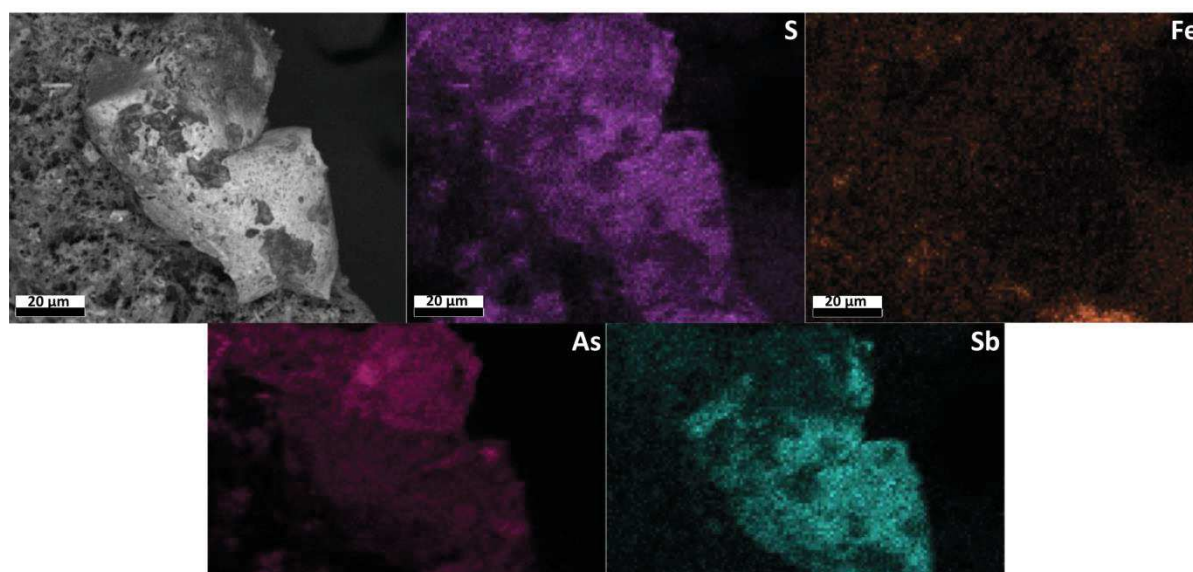


Figure 30: Elemental map showing the distribution of chemical compounds on bioprecipitate collected at the end of the experiment (middle zone of the column bioreactor).

2.3.5. Evolution of bacterial biomass and diversity in the column bioreactor

Bacterial biomass in the water collected inside the column during the whole experiment averaged $6.1 \pm 0.5 \log_{10}$ of 16S rRNA gene copy numbers per ml of water. When considering each sample individually, the main observation is that the biomass in the upper zone tended to be the lowest during phase 1 and to increase from phase 1 to phase 3 (4.8 ± 0.5 to $6.3 \pm 0.2 \log_{10}$ of 16S rRNA gene copy numbers per ml of water) (Fig. 31A). Complementary statistical tests, considering biomass at each level without distinction by phase, confirmed that the upper zone biomass was significantly distinct than for others zones. Similarly, biomass increased significantly between the phases 1 and 3 (from 5.8 ± 0.7 to $6.5 \pm 0.2 \log_{10}$ of 16S rRNA gene copy numbers per ml of water) when they were compared without distinction by level inside the reactor.

In the filling material collected at the end of the experiment, the biomass averaged $7.5 \pm 0.2 \log_{10}$ of 16S rRNA gene copy numbers per g of solid, with a higher bacterial number in the middle section of the bioreactor (Fig. 31B).

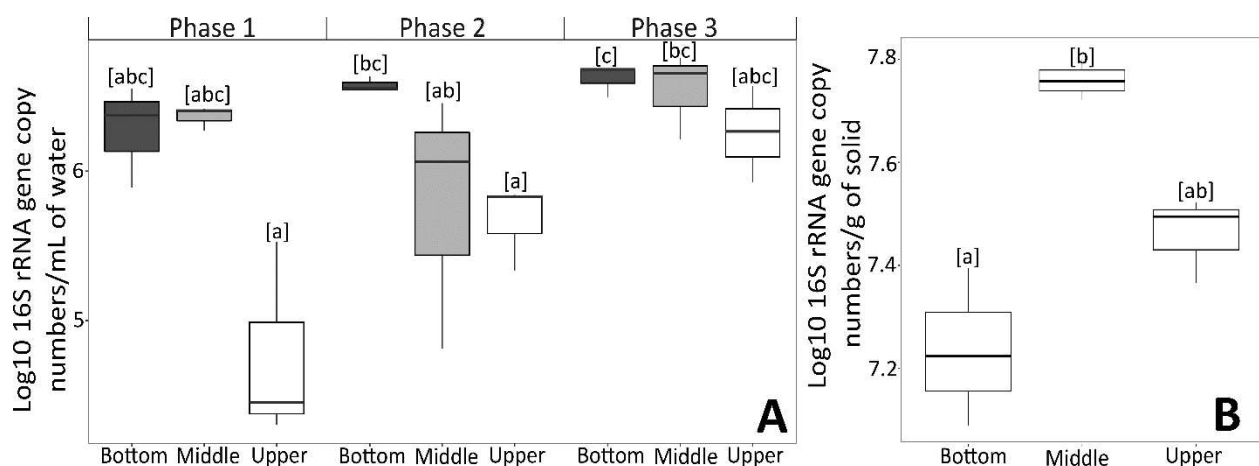


Figure 31: Spatial and temporal evolution of bacterial biomass, expressed in \log_{10} 16S rRNA gene copy numbers by ml of water collected inside the column bioreactor at the end of each phase (A). Spatial evolution of bacterial biomass associated to the solids at the end of the experiment, expressed in \log_{10} 16S rRNA gene copy numbers by g of solid (B).

Illumina sequencing of the inoculum, waters and solids collected inside the bioreactor yielded a total of 408,683 sequences of 16S rRNA gene. Among them, 1110 quality sequences per sample were sub-sampled and classified in a total of 63 OTUs. Overall, the richness (number of observed OTU) and the Shannon index (reflecting both richness and evenness) indicated a low bacterial diversity in all the samples (Fig. 32). The higher bacterial diversity was observed in water collected in the bottom of the column at the end of phase 3 (22 OTU observed and Shannon index of 1.5).

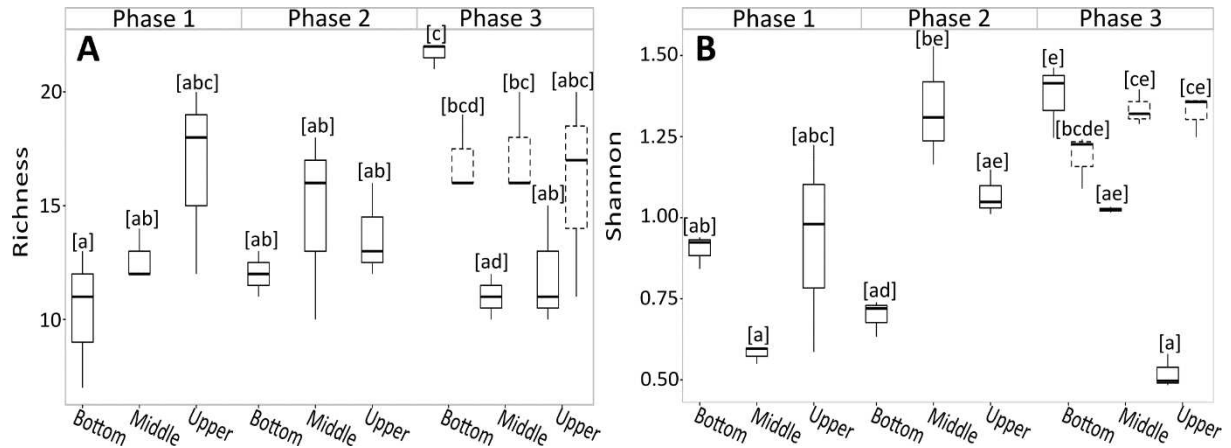


Figure 32: Bacterial species richness in number of OTUs observed (A) and Shannon diversity index (B) in the water samples (solid lines) and solid samples (dashed lines) collected inside the reactor.

The NMDS model represented the dynamics of the bacterial communities inside the bioreactor at the end of each phase (Fig. 33). The bacterial community structures in water samples evolved significantly according to the successive experimental conditions applied (ADONIS test, $R^2 = 0.31$, $P = 0.001$) and to their position inside the column ($R^2 = 0.21$, $P = 0.02$). At the end of phase 1, the spatial structuring of the communities is limited (Fig. 33, light gray symbols). Over time (phase 2 and then phase 3), the communities evolve and structure themselves more in space within the column (Fig. 33, dark gray and black symbols). Moreover, at the end of phase 3, the bacterial communities recovered from the solids were distinct from that recovered from the water (all phases) (ADONIS test, $R^2 = 0.39$, $P = 0.001$).

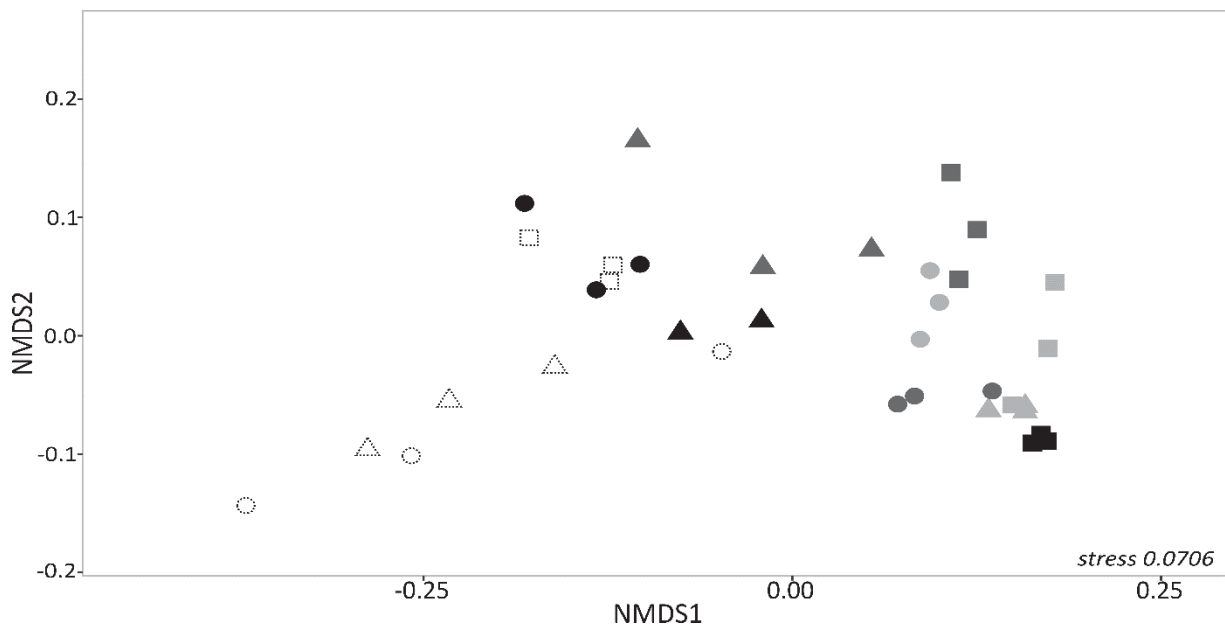


Figure 33: Bray-Curtis based non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination plot of samples collected at the bottom (circle), middle (triangle) and upper (square) level of the reactor during the phase 1 (light grey), 2 (dark grey) and 3 (black). Filled and dashed symbols represent respectively water and solid samples collected inside the reactor. Stress values for ordination plot were < 0.2 which indicates that these data were well-represented by the two-dimensional representation

Taxonomic affiliation of 16S rRNA genes showed a dominance of *Actinobacteria* phylum (94.1% of all the reads from the inoculum and from the reactor). *Proteobacteria* and *Firmicutes* phyla represented respectively 4.3 and 0.8% of the whole dataset. Only 10 different taxa had relative abundance of reads $\geq 1\%$ in at least one sample, when affiliation was performed at genus level (Fig. 34). The inoculum, corresponding to a culture able to reduce sulfates and enriched from the Carnoulès AMD, was composed of a large majority of *Cellulomonas* (94.1%), *Desulfosporosinus* (2.5%) and *Propionibacteriaceae* (0.5%) being in much lower proportion (Fig. 34).

Taxa retrieved in the column were affiliated to members of the *Cellulomonas* (45 to 94%), *Propionibacteriaceae* (0.5 to 51.4%), *Acidocella* (0 to 15.9%), *Cutibacterium* (0 to 7.7%), *Desulfosporosinus* (0 to 2.5%), *Granulicella* (0 to 2.1%), *Paracoccus* (0 to 5.3%), *Streptomyces* (0 to 1.1%), *Corynebacterium* (0 to 1.4%) and *Sphingomonas* (0 to 1.5%).

Cellulomonas was the dominant genus in all the samples (from 45 to 94% of reads). However, inside the column, *Cellulomonas* was less abundant than in the inoculum, and the relative proportion of others taxa increased.

The relative abundance of *Propionibacteriaceae*, *Acidocella* and *Desulfosporosinus* varied both in time and in space in the column. *Propionibacteriaceae* were always present at a relative abundance $\geq 5\%$. Its proportion in the upper level was lower than in the other levels, particularly during the phases 2 and 3. *Acidocella* was more abundant in the bottom level during phase 1 (almost 9.7%), then in the middle and upper levels of the reactor during phase 2 (an average of 9.3 and 11.5%); its relative abundance was the lowest during phase 3, with a maximum of 2.1% in the bottom level. The relative abundance of *Desulfosporosinus* was lower than 1% during phase 1, then increased to 2.5% in the middle level of the reactor during phase 2; it was finally retrieved in the bottom, middle and upper levels of the reactor at the end of phase 3 (up to 2%).

At the end of the experiment (phase 3), the main difference between solids and waters communities was the relative abundance of the *Cellulomonas* and *Propionibacteriaceae* taxa. *Cellulomonas* proportion was lower on the solids (45-77%) than in the water samples (67-93%), while higher *Propionibacteriaceae* proportion was retrieved from the solids (19-51%, compared to 5-21% in the water). The other taxa present at more than 1% on the solids were *Acidocella*, *Cutibacterium* and *Desulfosporosinus*.

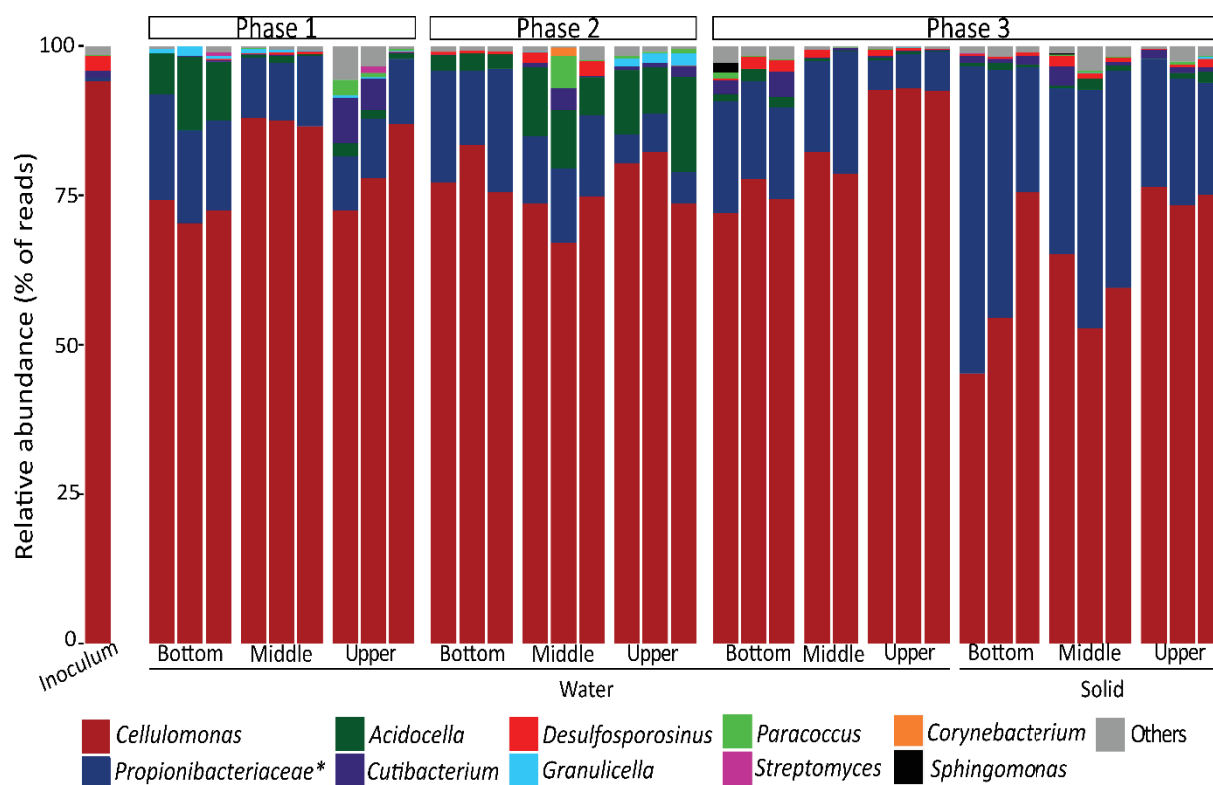


Figure 34: Taxonomic composition of bacterial communities (at the genus level) in the inoculum, the water and the solid samples collected along the reactor at the end of each phases (analyses performed in triplicates except for the inoculum). When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset.

2.4. Discussion

2.4.1. Removal of As and Sb along the experiment

After a stabilization phase (59 days), the upflow anaerobic fixed-bed bioreactor was efficient to remove As, Sb and other metal elements (Pb, Tl and Zn) present in the feeding water corresponding to a real AMD water amended with Sb (Supplementary Table S16). The maximum removal of As and Sb were respectively 99% and 98%.

Sb removal was efficient in both phases 2 and 3 (average 97% for initial concentrations 0.7 and 1.01 mM). More than 96% of As was removed inside the column reactor even with the increase of Sb concentration in the feeding water. Similarly, Liu et al. (2018) reported the concomitant precipitation of As and Sb (up to 98.2% and 99.4%) from synthetic waste water at neutral pH by bacterial sulfate-reduction, initially introduced at 0.07 mM of As(V) and 0.04 mM Sb(V). No competition behavior was observed between As and Sb for precipitation with sulfide. Efficient co-removal of As and Sb in our system is probably favored by a high metalloids/sulfide ratio. Indeed, increasing the metalloids/sulfide ratio is expected to decrease the potential of formation of soluble thio-As and thio-Sb (Planer-Friedrich and Scheinost, 2011). Another hypothesis might be that increasing the total metalloids concentration allowed a more efficient and rapid consumption of dissolved sulfide, in particular near the acidic feed supply at the bottom of the reactor, thus decreasing the toxicity for bacteria of free sulfide in acidic conditions.

The SEM-EDS observations strongly suggest that As and Sb precipitated inside the reactor as solid sulfides. These arsenic and antimony sulfide phases were detected covering rod-shaped bacteria, suggesting that they precipitated around the cell that excreted the dissolved sulfide. Such phenomenon was already observed in batch conditions with arsenic sulfide precipitating around bacterial cells growing in batch with AMD from Carnoules site (Le pape et al., 2017). Precipitation of As and Sb sulfides seemed to occur at the contact of the cells, but also far from the cells in the form of amorphous agglomerates. This suggests that all the biogenic sulfide did not immediately precipitate when it was excreted, but could also diffuse outside the biofilm. Here, arsenic was the element the most frequently found in the bioprecipitates, in agreement with its high concentration at the beginning of experiment. The Sb-bearing phases always contained As while the reverse was not always true. These results suggest either a co-precipitation in Sb- and As-containing sulfides, or a sorption phenomenon of arsenic on already formed Sb sulfides. The latter hypothesis has been proposed by Liu et al (2018). As a global way, the sorption/co-precipitation of As with metal sulfides was suggested by other studies (Jong and Parry, 2003 ; Sahinkaya et al., 2015). Among them, iron sulfides were regularly cited to enhance the removal of As inside sulfate-reducing bioreactor (Luo et al., 2008; Altun et al., 2014; Liu et al., 2018). In our column, the soluble iron and sulfur concentrations varied in a similar way, suggesting their concomitant precipitation. However, the elemental map and the low iron signals in EDS spectra indicated a minor presence of iron sulfide in Sb-As-bearing phases. Then, iron does not appear to play a significant role in the removal of As or Sb in the present study. This difference of behavior with previous studies can be explained by the acidic condition of our experiment. In fact, most of the iron remained in solution and the dominant reaction was the precipitation of As and Sb as sulfide minerals thanks to acidic conditions (Le Pape et al., 2017; Han et al., 2018).

2.4.2. Bacterial diversity and key functional groups

The bacterial communities colonizing the bioreactor were selected from a microbial consortium originating from the AMD of Carnoulès. Most of the taxa identified in the inoculum and in the bioreactor were previously observed in the Carnoulès ecosystem (Delavat et al., 2012 and 2013) and in anaerobic bioreactors treating artificial or real mine effluents by sulfate reduction (Battaglia-Brunet et al., 2012; Sánchez-Andrea et al., 2014).

A single known SRB was detected inside the reactor, affiliated to the genus *Desulfohalobium*, which is in agreement with previous finding in a similar system (Battaglia-Brunet et al., 2012). This genus includes acid tolerant SRB isolated from mining environment (Kimura et al., 2006; Church et al., 2007; Alazard et al., 2010; Jameson et al., 2010). Its relative abundance represents only a small portion of the microbial community inside the reactor (maximum 2.5%), as observed in similar systems treating mining drainage (Morales et al., 2005; Pruden et al., 2007; Hong et al., 2007; Pereyra et al., 2008 and 2010; Vasquez et al., 2016b). Despite this low abundance, the bacterial sulfate-reduction was evidenced by the decrease of dissolved sulfur concentration, metal sulfide precipitation, and the presence of SRB was confirmed by the detection of functional genes involved in sulfato-reduction (*dsrA* gene) (data not shown). Here, the gradual increase of pH in the bioreactor along the experiment (from

3.7 to 5.7) indicates a continuous activity of SRB, because the sulfate-reducing activity is expected to increase the pH. Thus, SRB were detected in low proportion but were active in the system.

The system was clearly dominated by *Actinobacteria*, a phylum that includes cellulose degraders and fermenters (Lynd et al., 2002; Ventura et al., 2007; Lewin et al., 2016). Members of the *Cellulomonas* and *Streptomyces* genera are able to degrade cellulose and *Granulicella* other complex polysaccharides (Lynd et al., 2002; Pankratov and Dedysh, 2010). *Sphingomonas* spp., generally associated with cellulose-decomposing bacteria, is a lignin decomposer (Dumova and Kruglov, 2009). Fermenters, as *Propionibacteraceae*, produce mainly acetate, propionate and CO₂ from sugar fermentation (Stackebrandt et al., 2006). Sulfate-reducing bacteria can use metabolites produced by the complex polysaccharides degraders and the fermenters as carbon and energy sources, but they are not able to metabolize cellulose. Association of these diverse metabolic groups inside an anaerobic process can promote synergic activities (Logan et al., 2005; Pereyra et al., 2010; Sánchez-Andrea et al., 2014; Vasquez et al., 2016). *Desulfosporosinus* species usually oxidize organic compounds incompletely, producing acetate (Alazard et al., 2010; Mayeux et al., 2013; Sánchez-Andrea et al., 2015; Vandieken et al., 2017); however, a recent study has reported complete oxidation of propionate, lactate, and acetate to CO₂ by a *Desulfosporosinus* strain (Hausmann et al., 2019).

In the bioreactor, interactions between the different identified metabolic groups are expected. As the bioreactor was fed with glycerol, a well-known substrate for acidotolerant *Desulfosporosinus* strains but also a substrate for *Cellulomonas* and *Propionibacteraceae*, a competition for glycerol could have limited the organic carbon availability for SRB. Other complex substrates, such as cellulose, were not added in the bioreactor, but it was filled with nutritive agar. Cellulotic degraders (*Cellulomonas*) and fermenters (*Propionibacteraceae*) may possibly be able to depolymerize and consume sugars from the agar phase, and generate metabolites for *Desulfosporosinus*.

Acidocella spp. is a heterotrophic acidophilic bacterium that also presents a metabolic interest. For instance, *Acidocella aromatica*, uses a limited range of organic substrates, such as acetate (Jones et al., 2013; Ñancucheo et al., 2016), and do not grow on yeast extract, glucose or glycerol. Acetate is a toxic compound at low pH, produced by several bacteria in our system, including SRB. It is also a potential inhibitor for sulfate reduction if it is not degraded (Kimura et al., 2006). In 2006, Kimura et al. proposed a syntrophic interaction between *Ac. aromatica* and *Desulfosporosinus* strain M1. *Ac. aromatica* generated carbon dioxide and hydrogen from acetate produced by *Desulfosporosinus*, the latter being used as a secondary electron donor for *Desulfosporosinus* strain M1, resulting in additional production of hydrogen sulfide. According to this result, Ñancucheo et al (2016) included *Ac. aromatica* in culture medium to promote the growth of an acidotolerant SRB. The hydrogen produced by *Acidocella* might also be used by autotrophic *Paracoccus* spp. present in the bioreactor, as it has been described for the sulfur-oxidizing *Paracoccus denitrificans* (Wodara et al., 1994).

Further identification and quantification of the organic molecules and metabolites inside the reactor would allow to better understand the metabolic interactions between organisms.

2.4.3. Evolution of bacterial communities and relation with As and Sb precipitation

Over time, the bacteria were able to develop and to colonize the reactor despite the increase of Sb concentration in the feed AMD water. Biomass increase and structuration of the bacterial community took place in the bottom, middle and upper levels, although initially all zones were inoculated with the same microbial consortium. The highest bacterial biomass was found at the bottom level, which could be explained because this zone of the bioreactor directly received the feed water containing glycerol used as organic substrate by several bacteria. According to the NMDs, the structure of bacterial communities changed over the three phases of the experiment. As we also observed variations of soluble Sb and As concentrations in the column over the three phases, changes in communities structures may be linked with As and Sb precipitation inside the reactor.

Arsenic was essentially removed between the bottom and the middle of the column bioreactor during the first phase. A possible explanation was the primary stratification of the reactor with the installation of active bacterial communities at the bottom and middle level. Then the bacterial communities were differentially distributed along the reactor during the phase 2. The soluble As and, in a lesser extent, Sb concentrations changed also according to a spatial gradient during this phase. At the end of the experiment, *Desulfosporosinus* was retrieved in all levels of the reactor. The maximum removal of As and Sb were reached and occurred between the feed point and the bottom of the reactor. These results suggested a better efficiency of the community contributing to the As and Sb precipitation at the end of the experiment.

The temporal and spatial dynamic of bacterial communities may be explained by the increase of Sb(III) concentration in the feed, and more generally by the variation of the physico-chemistry of the AMD water between the raw water entering and the treated water exiting the reactor. Hessler et al. (2018) observed also a stratification of microbial communities throughout a biological sulfate reducing up-flow anaerobic packed bed reactor. In this study, microbial communities were correlated with variable differing availability of lactate, volatile fatty acids produced from lactate degradation and sulfate concentration. Our study also highlighted the importance of sulfur compounds and suggested a potential role of organic substrates and metabolites. Further analyses would be required in order to determine the effect of chemical speciation of sulfur (dissolved sulfide in particular) and organic molecules resulting from the metabolism of glycerol and biodegradation of agar on the abundance and diversity of microbial communities.

2.5. Conclusion

This study demonstrated for the first time the possibility to remove concomitantly As and Sb as sulfides in a continuous column bioreactor fed with a real AMD and colonized with an acid tolerant microbial consortium. The reactor removed up to 98%-99% of dissolved As and Sb, with no competition between As and Sb for precipitation with sulfides when they co-occurred up to 1 mM each in the AMD. *Desulfosporosinus*, the only SRB detected in the bioreactor, was present in low abundance in a community including polymers degrader,

fermenters, and acetate degraders such as *Acidocella*. However, the biological reduction of the sulfates contained in the AMD provided enough sulfides to precipitate efficiently As and Sb. The bacterial community structure showed temporal and spatial variations, possibly linked with As and Sb precipitation. However, further investigations are needed to determine factors driving bacterial communities' activity and dynamic inside the system and help improving the efficiency of the process. The co-occurrence of SRB, polymers degraders and fermenters can be an advantage for future *in situ* passive treatment of AMD, in the perspective to use low-cost complex organic substrates to sustain long-term bacterial activity in a bioreactor. Overall, results of this study are promising for the perspective of passive bio-treatments of AMD containing metalloids such as antimony and arsenic.

Acknowledgements

We thank ADEME, the French Agency for the Environment and Energy Management, and BRGM for jointly funding the PhD thesis of EL.

2.6. Supplementary table

Supplementary Table S16: Average removal and concentrations of minor toxic elements from inlet and outlet waters during each phase.

Phase		1	2	3	
Pb	Concentration (mM)	Inlet	1.0 ± 0.9	0.7 ± 0.4	1.2 ± 0.5
		Outlet	$2 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$	$< 2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-3}$
	Removal (%)	99.9 ± 0.1	100	99.7 ± 0.4	
Tl	Concentration (mM)	Inlet	$1.5 \cdot 10^{-3} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3} \pm 3.2 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^{-3} \pm 6.2 \cdot 10^{-5}$
		Outlet	$2.1 \cdot 10^{-5} \pm 1.3 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-5} \pm 1.1 \cdot 10^{-5}$	$2.0 \cdot 10^{-5} \pm 1.5 \cdot 10^{-6}$
	Removal (%)	98.7 ± 0.8	99.0 ± 0.8	98.7 ± 0.1	
Zn	Concentration (mM)	Inlet	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.05	0.35 ± 0.05
		Outlet	$2.9 \cdot 10^{-3} \pm 1.9 \cdot 10^{-3}$	$9.8 \cdot 10^{-3} \pm 5.6 \cdot 10^{-3}$	$7.2 \cdot 10^{-3} \pm 9.0 \cdot 10^{-3}$
	Removal (%)	99.2 ± 0.5	97.4 ± 1.4	97.9 ± 2.7	

Chapitre IV :
Etude de la dynamique des communautés bactériennes
au sein d'un pilote de terrain traitant un drainage
minier acide riche en arsenic

1. Introduction, objectifs et démarche

Le traitement des DMA arséniés par oxydation biologique du fer a dépassé l'échelle du réacteur de laboratoire (Whitehead et al., 2005 ; Macías et al., 2012 ; Fernandez-Rojo et al., 2018 ; cf. chapitre I.4.2). Toutefois, l'efficacité de ce traitement en conditions réelles et sur le long terme reste variable. Un des verrous est la méconnaissance de la dynamique des communautés de microorganismes qui colonisent ces systèmes, en lien avec les variations de la physico-chimie des eaux à traiter et de paramètres environnementaux tels que la température. En effet, les conditions expérimentales sont mieux contrôlées à l'échelle du laboratoire que du terrain. Lors d'un traitement *in-situ*, la variabilité de la physico-chimie des eaux peut s'avérer limitante pour le développement d'un procédé robuste car elle peut affecter les communautés bactériennes impliquées dans le traitement, en particulier celles qui oxydent le Fe et l'As.

Dans ce contexte, un système de traitement biologique passif aérobie a été installé *in situ* pour traiter le DMA arsénié du site minier de Carnoulès. Contrairement au réacteur de laboratoire basé sur la sulfato-réduction, ce pilote de terrain vise à piéger l'arsenic dans des précipités biogéniques suite à l'oxydation biologique du fer. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle des communautés bactériennes dans le pilote de traitement, en lien avec la variation de la physico-chimie et la microbiologie des eaux d'alimentation et la composition du bioprécipité.

La conception du pilote est basée sur les conditions optimisées de fonctionnement définies avec un bioréacteur de laboratoire (Fernandez et al., 2017 et 2018). Il est formé de cinq bacs de 1,5 m² placés en série. Des prélèvements de bioprécipités et d'eaux ont été effectués régulièrement pendant six mois. Dans un premier temps, les rendements épuratoires (abattement de l'As notamment) ainsi que la nature chimique et minéralogique des précipités ont été déterminés au cours de la thèse de Lidia Fernandez-Rojo (2017). Ces analyses ont été complétées dans le cadre de la présente thèse par une caractérisation microbiologique des communautés bactériennes qui se développent au sein du bioréacteur. Ces analyses ont consisté en : (i) la caractérisation de la diversité bactérienne par metabarcoding du gène codant l'ARNr 16S bactérien; (ii) la quantification du gène marqueur de l'oxydation de l'arsenic (*aiOA*) par qPCR et (iii) la quantification du genre *Thiomonas* par CARD-FISH (expériences réalisées par Angélique Desoeuvre).

Ces travaux ont été valorisés par un article publié dans le journal « Frontiers in microbiology », dans la section spéciale « "Microbiotechnology, Ecotoxicology and Bioremediation" sous le topic « Microbial Ecotoxicology » (Laroche et al., 2019).

2. Article: Dynamics of bacterial communities mediating the treatment of an As-rich acid mine drainage in a field pilot



Dynamics of Bacterial Communities Mediating the Treatment of an As-Rich Acid Mine Drainage in a Field Pilot

Elia Laroche^{1,2}, Corinne Casiot¹, Lidia Fernandez-Rojo¹, Angélique Desoeuvre¹, Vincent Tardy¹, Odile Bruneel¹, Fabienne Battaglia-Brunet², Catherine Joulian² and Marina Héry^{1*}

¹HydroSciences Montpellier, CNRS, IRD, University of Montpellier, Montpellier, France, ²BRGM, Geomicrobiology and Environmental Monitoring Unit, Orléans, France

Abstract

Passive treatment based on iron biological oxidation is a promising strategy for Arsenic (As)-rich acid mine drainage (AMD) remediation. In the present study, we characterized by 16S rRNA metabarcoding the bacterial diversity in a field-pilot bioreactor treating extremely As-rich AMD *in situ*, over a 6 months monitoring period. Inside the bioreactor, the bacterial communities responsible for iron and arsenic removal formed a biofilm (“biogenic precipitate”) whose composition varied in time and space. These communities evolved from a structure at first similar to the one of the feed water used as an inoculum to a structure quite similar to the natural biofilm developing *in situ* in the AMD. Over the monitoring period, iron-oxidizing bacteria always largely dominated the biogenic precipitate, with distinct populations (*Gallionella*, *Ferrovum*, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Ferritrophicum*), whose relative proportions extensively varied among time and space. A spatial structuring was observed inside the trays (arranged in series) composing the bioreactor. This spatial dynamic could be linked to the variation of the physico-chemistry of the AMD water between the raw water entering and the treated water exiting the pilot. According to redundancy analysis (RDA), the following parameters exerted a control on the bacterial communities potentially involved in the water treatment process: dissolved oxygen, temperature, pH, dissolved sulfates, arsenic and Fe(II) concentrations and redox potential. Appreciable arsenite oxidation occurring in the bioreactor could be linked to the stable presence of two distinct monophylogenetic groups of *Thiomonas* related bacteria. The ubiquity and the physiological diversity of the bacteria identified, as well as the presence of bacteria of biotechnological relevance, suggested that this treatment system could be applied to the treatment of other AMD.

Keywords: acid mine drainage, arsenic, bioremediation, eco-engineering, iron-oxidizing bacteria, arsenicoxidizing bacteria, microbial ecotoxicology

2.1. Introduction

Mining activities produced large amount of wastes composed of sulfide minerals and toxic metallic elements, causing environmental hazard. During their inappropriate storage, oxidation of the sulfide minerals can generate acid mine drainage (AMD) characterized by acid pH and high concentrations in metals and metalloids. Arsenic (As) is a highly toxic metalloid often associated with this type of pollution (Paikaray, 2015). An AMD can self-sustain for several centuries, with dramatic consequences on the receiving aquatic ecosystems. In this context, the development of effective and sustainable remediation solution for the treatment of As-rich AMD is required for water resource and public health protection.

The dissemination of arsenic pollution can be naturally limited by its immobilization into the solid phase. This natural phenomenon relies on the biological oxidation of Fe(II) and its subsequent precipitation as Fe(III) oxyhydroxides. Arsenic is then removed from the dissolved phase by co-precipitation with Fe(III) or by adsorption to the newly formed ferric minerals. The less soluble form, arsenate [As(V)], is more efficiently trapped onto iron phases than the more mobile form, arsenite [As(III)] (Hug and Leupin, 2003). Then, the capacity of autochthonous bacteria to oxidize As(III) into As(V) together with the activity of iron-oxidizing bacteria (FeOB) contribute to the mitigation of the arsenic pollution. This natural attenuation has been described at various mining sites worldwide (Casiot et al., 2003; Asta et al., 2010; Egal et al., 2010; Chen and Jiang, 2012; Paikaray, 2015), as well as the diversity of AMD autochthonous microbial communities (Baker and Banfield, 2003; Bruneel et al., 2011; Volant et al., 2014; Méndez-García et al., 2015; Chen et al., 2016). Several studies have focused on the identity of FeOB and As(III)-oxidizing bacteria (AsOB) and their activity in relation with pollution attenuation (Battaglia-Brunet et al., 2002; Bruneel et al., 2003; Casiot et al., 2003; Duquesne et al., 2003; Egal et al., 2009). In particular, numerous evidences of the role of the As(III)-oxidizing *Thiomonas* spp. were reported (Bruneel et al., 2003, 2011; Casiot et al., 2003; Hovasse et al., 2016).

The development of passive treatment systems exploiting these microbially mediated processes is a promising strategy for the remediation of As-rich AMD (Hengen et al., 2014; Bruneel et al., 2017). The efficiency of such system was demonstrated in lab-scale bioreactors (González-Contreras et al., 2012; Hedrich and Johnson, 2014; Ahoranta et al., 2016; Fernandez-Rojo et al., 2017). Attempts of *in situ* treatment are scarce and mainly limited so far to AMD with arsenic concentrations lower than 3 mg L⁻¹ (Whitehead et al., 2005; Macías et al., 2012). One field-pilot treating high arsenic concentrations (50–250 mg L⁻¹) removed 20% of the dissolved arsenic (Elbaz-Poulichet et al., 2006). The treatment efficiency of these systems relies on microbial activity and thus may fluctuate depending on the identity and the dynamic of the microbial populations driving the biogeochemical reactions inside the bioreactor. Operating conditions as well as environmental conditions likely exert control over microbial diversity and activity (Heinzel et al., 2009b; Ahoranta et al., 2016; Fernandez-Rojo et al., 2017).

In a previous study, a passive field-scale bioreactor treating As-rich acid mine drainage from the Carnoulès mine (France) was monitored during 6 months (Fernandez-Rojo et al., 2019). Arsenic removal varied between 3 and 97% during the monitoring period for a flow rate

variation between 6 and 130 L h⁻¹. The proportion of As(V) in the biogenic precipitates formed inside the pilot increased over time, reaching nearly 100% of total As. Arsenate enrichment in the precipitate was associated with an increase of the abundance of the marker gene for bacterial arsenite oxidation (*aioA*) -quantified by qPCR-. Results strongly suggested that bacterial As(III) oxidation occurred in the bioreactor, leading to the formation of stable precipitates, advantageous in term of sludge management. However, the identity of the bacterial populations involved in arsenic and iron oxidation and removal were not determined. The aim of the present work was to improve our knowledge of the bacterial diversity driving As-rich AMD depollution in an *in situ* treatment device. In this context, the spatial and temporal dynamics of the bacterial communities colonizing the bioreactor were investigated by a 16S rRNA metabarcoding approach. Because of their central role in arsenic oxidation in Carnoulès AMD, we further characterized two distinct monophyletic *Thiomonas* groups by CARD-FISH. We also focused on the physico-chemical drivers of the bacterial diversity. To our knowledge, this is the first microbiological characterization performed on a field-pilot treating As-rich AMD by precipitation with biogenic iron phases.

2.2. Material and methods

2.2.1. Pilot scale passive treatment system description and sample collection

A field-scale pilot, made with five shallow trays (1.5x 1 x 0.11 m) stacked head to tail on a shelf, was implemented at the Carnoulès mine (France) for the treatment of AMD, as described in Fernandez-Rojo et al. (2019) (Fig. 35A). The bioreactor was settled on June 2016 10th and was monitored during 194 days. Nine sampling campaigns were conducted and inlet water and biogenic precipitates were characterized for their physico-chemical properties (Fernandez-Rojo et al., 2019). From the whole dataset and samples available, we selected seven dates for microbial characterization: 21st of June (D11); 29th of June (D19); 28th of July (D48); 3rd of October (D115); 28th of November (D171), 6th of December (D179), 13th of December (D186). Selection was based on the temporal variations of the As(V)/Fe molar ratio in the biogenic precipitate (Fig. 35B). Arsenic removal rates from water and Fe(II) oxidation rates are also given. Biogenic precipitates were collected from tray 1 (T1) and tray 5 (T5) for all the campaigns and from tray 1, 2, 3, 4, and 5 for the D48 and D171 campaigns.

Each tray was divided into three sections (Fig. 35A): “a” refers to the location close to the inlet of the tray, “b” corresponds to the middle section, and “c” refers to the location close to the outlet of the tray. Based on ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), bacterial community structures in the three sections (a, b, c) of a given tray exhibited similar genetic structure (data not shown). Then, for each tray, samples collected in sections a, b and c were used as triplicates for 16S rRNA metabarcoding analyses. For each tray, three composite samples were collected in Falcon tubes (50 mL) by scrapping the biogenic precipitates in each section with a sterile spatula. The tubes containing the composite samples were centrifuged for 10 min at 4400 x g (Sorwall ST40, Thermo Scientific). The supernatant was discarded and the precipitates were homogenized. An aliquot was dried in a vacuum desiccator for dry weight determination. The remaining precipitates were conserved in Eppendorf tubes (2 mL) at -80°C before DNA extraction. Sample names refer to the sampling day (counted from the day of

bioreactor settling, D1–D186) and the tray where the biogenic precipitate was sampled (T1–T5), e.g., D11–T1.

Inlet water was collected for all the campaigns but due to technical problem, water collected on October 3rd (D115) could not be analyzed. Triplicates of inlet water samples (300 mL) were filtered on sterile 0.22 mm cellulose acetate filter. The filters were stored at -80°C before DNA extraction. Water sample names refer to the sampling day (D1–D186) of inlet water sample (Win) (e.g., D11–Win).

For comparison between the bacterial communities established inside the bioreactor and the natural ecosystem, a point-in-time sampling of the AMD riverbed sediments (Reigous creek) was performed on the 28th of November (D171). Sediments (SED) were collected using a sterile spatula and were treated as described for the biogenic precipitates.

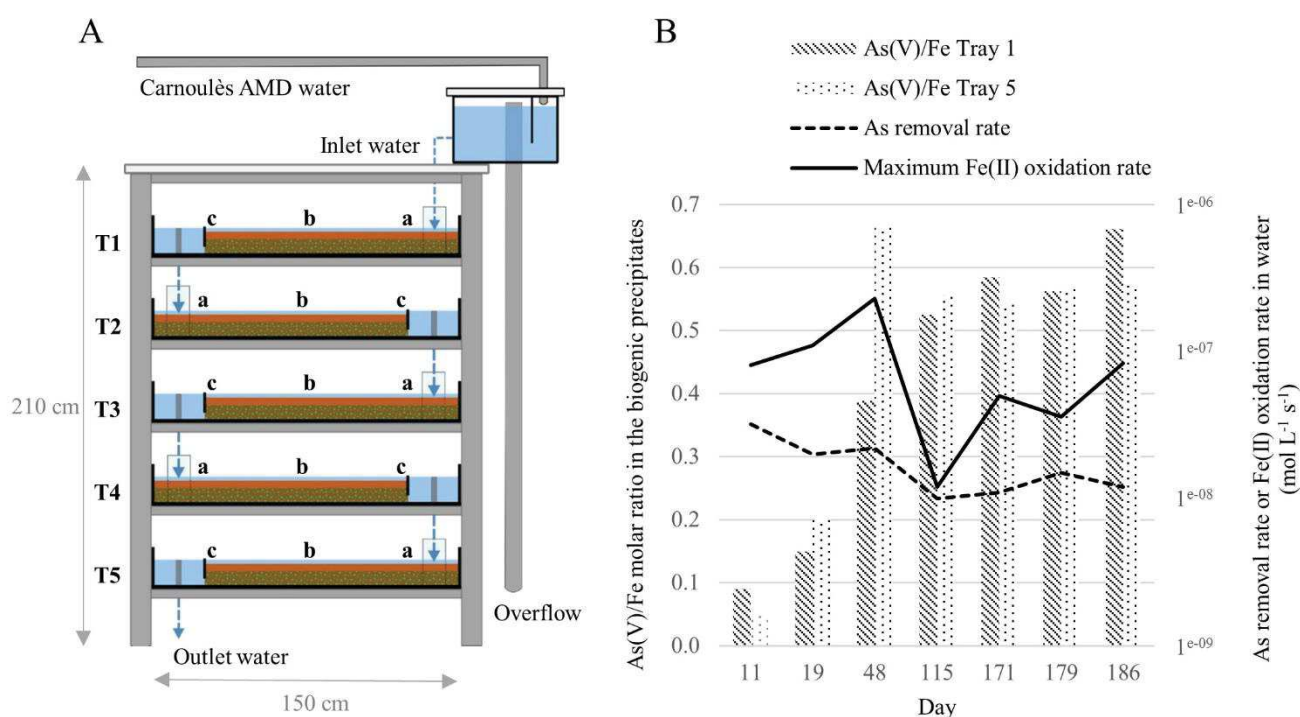


Figure 35: Schematic representation of the field-bioreactor composed of five trays (T = tray) adapted from Fernandez-Rojo et al. (2019) (A). Arsenic removal rates calculated from inlet and outlet dissolved As concentration and estimated hydraulic retention time and maximum Fe(II) oxidation rates estimated from analytical uncertainty on dissolved Fe(II) determination, according to Fernandez-Rojo et al. (2019) (B).

2.2.2. Physico-chemical characterization of inlet and outlet waters

The chemical characterization of the water (inlet and outlet) and the bioprecipitate samples was performed in our previous study (Fernandez-Rojo et al., 2019). Briefly, the concentrations of dissolved Fe(II) were determined using spectrophotometry after filtration through 0.22 mm. Total dissolved concentrations of Fe, As, and other elements [S (SO₄²⁻), Al, Zn, and Pb] were determined using ICP-MS. Arsenic redox speciation was determined using HPLC-ICP-MS. The data used in the present study are summarized in Figure 35B and Supplementary Table S18.

2.2.3. DNA extraction and quantification

Prior DNA extraction, biogenic precipitate and riverbed sediment samples were washed with 1 mL of TRIS-EDTA (100:40) HCl pH 8 and then centrifuged to 8,000 x g from 1 min. Total genomic DNA was then extracted using the DNeasy PowerSoil kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommendations (in triplicates for the biogenic precipitates). Extraction controls were performed without any biogenic precipitate sample to exclude any contamination from the kit. For water samples, DNA was extracted (in triplicates) from the cellulose acetate filters using DNeasy PowerWater kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. All the DNA extracts were quantified with a fluorometer (Qubit, Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) and stored at -20°C until further analysis.

2.2.4. Sequencing of bacterial 16S rRNA gene

The V4–V5 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified using primers PCR 515F (Barret et al., 2015) and PCR 928R (Wang and Qian, 2009). PCR amplification was conducted as described in Tardy et al. (2018). Amplification performed on the control DNA extracts (obtained without any biogenic precipitate sample) yielded no amplification signal. The PCR products were sequenced with an Illumina MiSeq sequencer in paired-end mode (2 x 300 bp) at GeT-PlaGe platform (Toulouse, France).

2.2.5. Bioinformatic analyses of 16S rRNA gene sequences

Pair-end sequences were merged by flash software version 1.2.6 (Magoè and Salzberg, 2011), with maximum 10% of mismatch into the overlap region. The raw datasets are available on the EBI database system under project accession number [PRJEB27907]. The average Phred score (Q-score) of these joined reads was superior to 30 for every base. Bioinformatic analyses were conducted using the software program Mothur version 1.39.5 (Schloss et al., 2009). First step was the selection of high quality sequences based on the following criteria: length between 330 and 460 bp, a homopolymer length inferior to 7 nt and no ambiguous bases. Singletons, chimeric and unaligned reads were removed using UCHIME (Edgar et al., 2011) and the SILVA reference database (Release 128). The pre-cluster command served to reduce sequencing noise by clustering reads differing by only one base every 100 bases. The high quality sequences were taxonomically assigned using the SILVA reference database, by the Bayesian method with a bootstrap confidence score of 80 (Wang et al., 2007). After the removal of sequences that were not assigned to the *Bacteria* kingdom, samples contained between 2227 and 34928 reads. A subsampling selected a random set of 6295 reads in each sample in order to efficiently compare the datasets. Samples containing less than 6295 reads were removed to maintain a sequencing effort that adequately covers the bacterial diversity. A distance matrix was generated with the remaining sequences and used to cluster these sequences into Operational Taxonomic Units (OTUs) defined at 97% cutoff, using the average neighbor algorithm. Complementary analyses (based on BLAST) were performed for the assignation of the dominant OTU (representing 41% of the whole reads) at the genus level. Mothur used the OTU table to calculate the coverage sample (rarefaction curve), the alpha and beta diversity (diversity indices and Unifrac distances) at a level of 97% sequence similarity.

2.2.6. CARD – FISH

CARD-FISH analyses were performed in triplicates on biogenic precipitates collected from tray (T1) and tray 5 (T5) on the 28th of July (D48) and the 28th of November 2016 (D171). Oligonucleotide probes EUB338, EUB338II and EUB338III were used for *Bacteria* quantification (Amann et al., 1990; Daims et al., 1999). Negative controls were performed with probe NON338, the complementary sequence of EUB338 (Wallner et al., 1993). Two probes were used for the quantification of two distinct monophyletic groups of *Thiomonas* spp. Probes TM1G0138 and TM2G0138 respectively target *Thiomonas* group1 and group2 according to Hallberg et al. (2006), which correspond respectively to monophyletic Group I and II according to Coupland et al. (2004) and Bryan et al. (2009). Detailed protocol for *in situ* hybridization, tyramide amplification, and microscopic observations is provided in Supplementary File.

2.2.7. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with R version 3.4.3 using mainly vegan package¹. The statistically significant differences between CARD-FISH data were assessed with the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test using Bonferroni p-value adjustment. Non-metric multidimensional scaling (NMDS), based on the weighted pairwise Unifrac distances, was used to illustrate the dynamics of the bacterial communities structure during the monitoring. The significance of the differences observed between groups of samples (phase I vs. phase II and tray 1 vs. tray 5) was assessed with an ADONIS test (999 permutations). Redundancy analysis (RDA) was performed to highlight the main environmental drivers shaping the bacterial community structure inside the bioreactor. This approach was chosen because an initial detrended correspondence analysis (DCA) indicated that bacterial community data had a linear distribution along the axis (<3.0). The physico-chemical characteristics of the AMD water, measured in the inlet and outlet waters (Supplementary Table S18), were tested as environmental variables to explain the variations of dominant taxa in the bioprecipitates collected in tray 1 and tray 5 respectively (relative abundance of reads $\geq 1\%$ in at least one bioprecipitate sample during the monitoring period). Indeed, the biofilm continually interacts with the inflowing water which provides the main energy source for the lithotrophic bacteria [Fe(II)]. Before the RDA, the normality of environmental variables was checked with a Shapiro–Wilk test. Environmental and biological variables were respectively log and Hellinger transformed (Legendre and Gallagher, 2001). A sub-set of environmental variables was selected to decrease the multicollinearity (variance inflation factors < 10) and to include only the significant predictors ($p < 0.05$ according Monte Carlo test with 999 permutations). Variation partitioning analyses enabled to evaluate the contribution of each variable to the bacterial community variation. The significance of the global model and the individual axes were checked with a Monte Carlo test (999 permutations).

¹ <http://www.r-project.org/>

2.3. Results

2.3.1. Bacterial diversity and structure in the treatment pilot

Illumina sequencing of the 79 samples yielded a total of 2,288,823 sequences of 16S rRNA gene. Among them, 6295 quality sequences per sample were sub-sampled for alpha and beta diversity analysis. Rarefaction curves approached an asymptote suggesting that the sequencing effort adequately covered the bacterial diversity in all the samples (Supplementary Figure S40).

In the biogenic precipitates, the richness increased from D11 to D19 as illustrated by the enrichment of observed OTUs (Fig. 36A). At D11 and D19, richness was higher in the top tray than in the bottom tray. From D48, the number of observed OTUs remained relatively stable and similar in both trays. Shannon index (reflecting both richness and evenness) also clearly increased during the first stages of the monitoring. Then it remained stable in tray 5 from D115 to D186, whereas it tended to decrease before increasing again in tray 1 (Fig. 36B). Diversity indexes in the sediments collected in the AMD riverbed on day 171 (point in time analysis) were comparable to those measured in the biogenic precipitates collected at the same date in the top tray (T1) (richness = 60 observed OTUs; Shannon = 1.87).

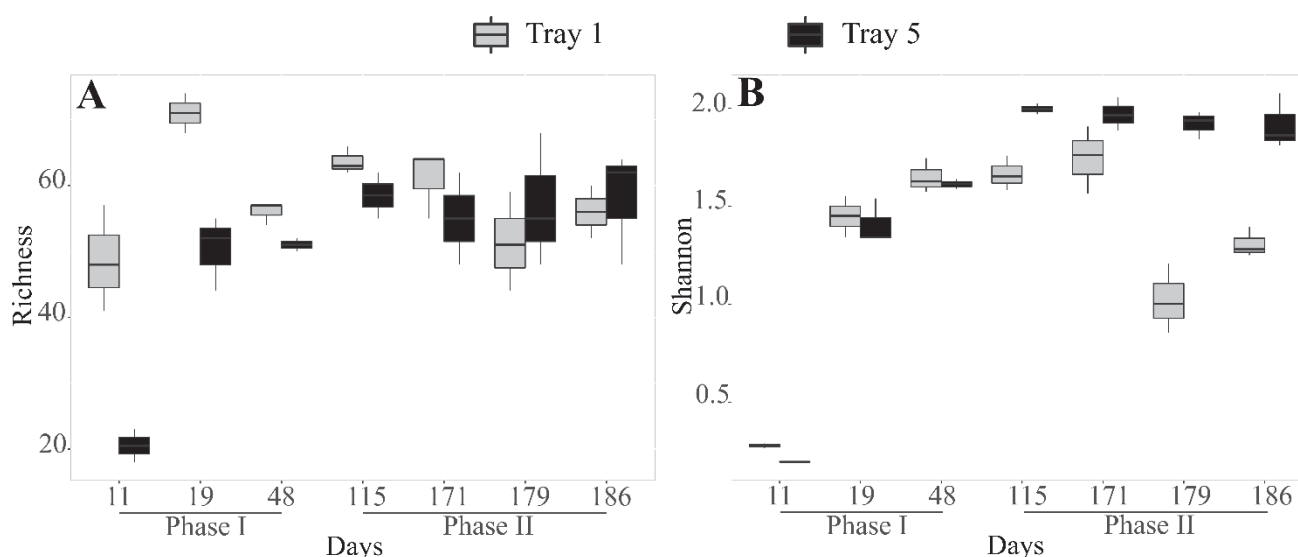


Figure 36: Bacterial species richness in number of OTUs observed (A) and Shannon diversity index (B) in the biogenic precipitates collected in the tray 1 (light gray) and tray 5 (black). Error bars represent standard deviation of the mean value (analyses performed in triplicates).

NMDS illustrates the dynamics of the structure of the bacterial communities in the biogenic precipitates and in the riverbed sediment (SED) (Fig.37). Samples were separated in two main groups (ADONIS test, $R^2 = 0.19$, $P = 0.001$). The first group, composed by the communities at D11, D19, and D48, corresponded to the first phase of the monitoring (phase I). The second group, composed by the communities at D115–D186 corresponded to the second phase of the monitoring (phase II). In addition, over the whole monitoring period, the bacterial communities in the top tray (tray 1) were distinct from those thriving in the bottom tray (tray 5) (ADONIS test, $R^2 = 0.14$, $P = 0.012$). This spatial structuring, visible from D48, became particularly marked from D115. Bacterial community thriving in the sediment collected in the AMD

riverbed (SED) grouped with those of the biogenic precipitates collected at the same date (D171) in the top tray (Fig.37).

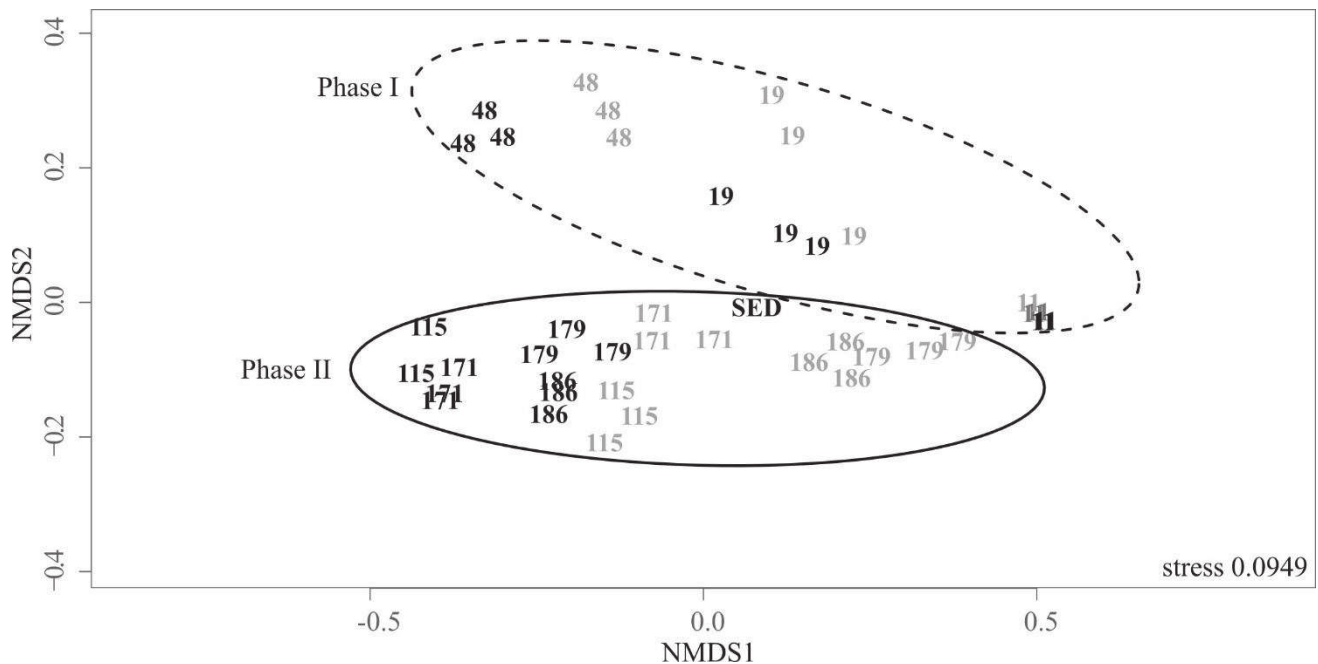


Figure 37: Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination plot of the weighted pairwise Unifrac distances of the bacterial community in the biogenic precipitates collected on the seven campaigns (the numbers indicate the days of sampling) in the tray 1 (gray) and the tray 5 (black) of the bioreactor (analyses performed in triplicates) and in the riverbed sediment (SED) collected on day 171. Stress values for ordination plot were < 0.2 which indicates that these data were well-represented by the two-dimensional representation.

2.3.2. Taxonomic composition of the bacterial communities

The majority of the 16S rRNA gene sequences retrieved from the biogenic precipitates, the riverbed sediments, and the AMD waters were affiliated with members of the *Beta-Proteobacteria* (between 65 and 99% of the total sequences). In the whole data set, the most abundant OTU was affiliated with genus *Gallionella*. *Alpha-* and *Gamma-Proteobacteria* were the second and the third most abundant taxonomic groups.

The composition of the bacterial communities remained relatively stable in the AMD waters over the monitoring period with always a large dominance of reads related to *Gallionella* (ranging from 63 to 96%). Other minor groups identified in the waters included *Sulfuriferula*, *Acidithiobacillus* and *Ferroplasma* (Supplementary Figure S41).

Eleven days after the pilot was set up (D11), the bacterial communities of the biogenic precipitates were quite similar to those of the feeding water and largely dominated by the *Gallionella* genus (Fig. 38). Then, notable temporal shifts rapidly occurred in the composition of the bacterial communities of the biogenic precipitates (phase I). From the 29th of June (D19), the proportion of *Gallionella* strongly decreased while those of *Sulfuriferula*, *Ferroplasma*, *Rickettsiales*, *Ferrotrophicum* and *Acidithiobacillus* increased. *Sulfuriferula* was dominant in the pilot between D48 and D171. From D115, the bacterial communities in the top tray and in the bottom tray were clearly distinct (phase II). The composition of the communities in T5

remained relatively stable, whereas in T1, the relative proportion of *Gallionella* increased again during this second phase of the monitoring (Fig. 38).

Overall, for the whole monitoring period, the top tray was characterized by higher proportion of *Gallionella* compared to the bottom tray. *Sulfuriferula*, *Ferrovum*, *Ferritrophicum*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* and *Acidicapsa* were more abundant in the bottom tray. Spatial structuring inside the pilot was confirmed with the characterization of the bacterial communities in the five trays for two sampling campaigns (D48 and D171). This analysis showed that communities thriving in tray 2 were comparable to those in tray 1 whereas communities thriving in trays 3 and 4 were comparable to those in tray 5 (Supplementary Figure S42).

The composition of the bacterial community in the sediments (SED) collected in the AMD riverbed at D171, was similar to that of the biogenic precipitates collected the same day inside the top tray (T1) of the bioreactor (Fig. 38). The relative proportion of *Thiomonas* in the Reigous creek sediments was comparable to that in the top tray of the treatment device (1.1% and 0.89 ± 0.25% respectively). The proportion of *Acidithiobacillus* was higher in the treatment pilot (2.8 and 9% respectively in tray 1 and 5) than in the riverbed sediment (0.6%).

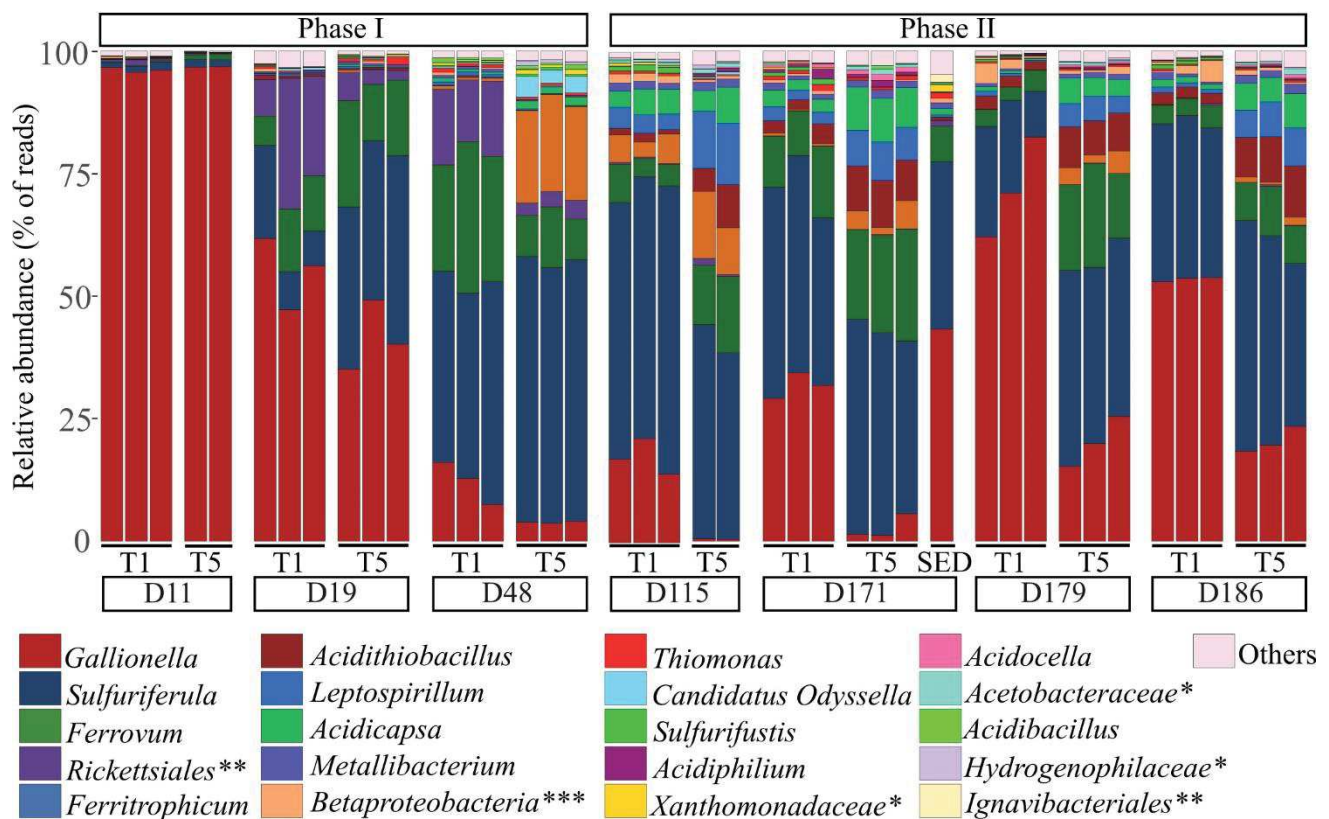


Figure 38: Taxonomic composition of bacterial communities (at the genus level) in the biogenic precipitates collected on the seven campaigns in the tray 1 (T1) and the tray 5 (T5) of the bioreactor (analyses performed in triplicates) and in the riverbed sediment (SED) collected on day 171. When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*), the order level (**), or the class level (***). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset.

2.3.3. Quantification of *Thiomonas* populations by CARD-FISH

Total bacteria and two distinct monophyletic groups of *Thiomonas*-related bacteria were quantified in the biogenic precipitates sampled in T1 and T5 at D48 (28th of July) and D171 (28th of November) by CARD-FISH (Table 17 and Supplementary Figure S43). Biogenic precipitates contained an average of $8 \pm 3 \times 10^7$ total bacterial cells/g of dry biogenic precipitates. No significant differences ($p > 0.05$) were observed for the total number of bacteria among the four samples analyzed. The total number of *Thiomonas* averaged $7 \pm 2 \times 10^6$ cells/g of dry biogenic precipitates, representing 8% of the DAPI-stained cells. *Thiomonas* belonging to group II (as defined by Bryan et al., 2009) were more abundant in the pilot than *Thiomonas* belonging to group I ($p < 0.05$). They corresponded respectively to an average of 4.9 and 3.1% of the DAPI-stained bacteria (Table 17). If no temporal differences were observed between D48 and D171, the total number of *Thiomonas* (Group I + II) was significantly higher in the bottom tray (T5) compared to the top tray (T1) in November (D171) ($p < 0.05$).

Table 17: Quantification by CARD-FISH of *Thiomonas* belonging to Group I (bacteria hybridized with the oligonucleotide probe TM2G0138) and of *Thiomonas* belonging to Group II (bacteria hybridized with the oligonucleotide probe TM1G0138).

Sample name	<i>Thiomonas</i> Group I		<i>Thiomonas</i> Group II		Bacteria (EUB I-III)	
	Nb of cells/g of dry biogenic precipitate	% of DAPI-stained cells	Nb of cells/g of dry biogenic precipitate	% of DAPI-stained cells	Nb of cells/g of dry biogenic precipitate	% of DAPI-stained cells
D48-T1	$2 \pm 1 \times 10^6$	3 ± 2	$5 \pm 3 \times 10^6$	6 ± 2	$6.1 \pm 0.7 \times 10^7$	88 ± 1
D48-T5	$3 \pm 2 \times 10^6$	4 ± 3	$5 \pm 3 \times 10^6$	5 ± 3	$7 \pm 5 \times 10^7$	82 ± 1
D171-T1	$1.0 \pm 0.3 \times 10^6$	2.0 ± 0.7	$3.4 \pm 0.2 \times 10^6$	4.6 ± 0.9	$6 \pm 1 \times 10^7$	87 ± 2
D171-T5	$4 \pm 3 \times 10^6$	4 ± 2	$6 \pm 2 \times 10^6$	5 ± 2	$1.2 \pm 0.8 \times 10^8$	83 ± 3

Standard deviations were calculated on biological triplicates.

2.3.4. Main drivers shaping the bacterial communities inside the pilot

Redundancy analysis (RDA) summarized the spatio-temporal dynamics of the bioprecipitates bacterial communities and highlighted the main environmental factors explaining these variations. The samples were arranged according to the same pattern as in the NDMS (Fig. 39). The model explained significantly 83.3% of bacterial community variation (Monte Carlo test, $P < 0.05$). According to variation partitioning, the dissolved oxygen (DO) was individually the best driver of this variability accounting for 36.5% of the total variance. It was followed by sulfate concentration (26.7%), temperature (16.5%), pH (15.2%), dissolved arsenic and ferrous iron concentration (11.1% and 10.2%, respectively) and the redox potential Eh (6%).

The bacterial communities thriving in the pilot during the first phase were clearly distributed along a temporal gradient and were associated with high values of temperature, pH, dissolved arsenic, and ferrous iron concentrations, and by low values of DO and Eh. Between D115 and D186, samples were divided into two subgroups corresponding respectively to tray 1 and tray

5. During this second phase, the structure of the bacterial communities was explained by high DO and Eh values, particularly in the tray 5 (Fig. 39).

The cosine of the angle between an environmental variable and a bacterial taxa provides an approximation of their correlation. Thus, it can be inferred from Figure 39 that the relative abundance of *Rickettsiales* was positively correlated with water temperature and negatively with Eh. On the contrary, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* and *Acidicapsa* were negatively correlated with temperature, pH and arsenic concentration in water and positively with Eh and DO. For the other taxa, no clear correlations could be drawn.

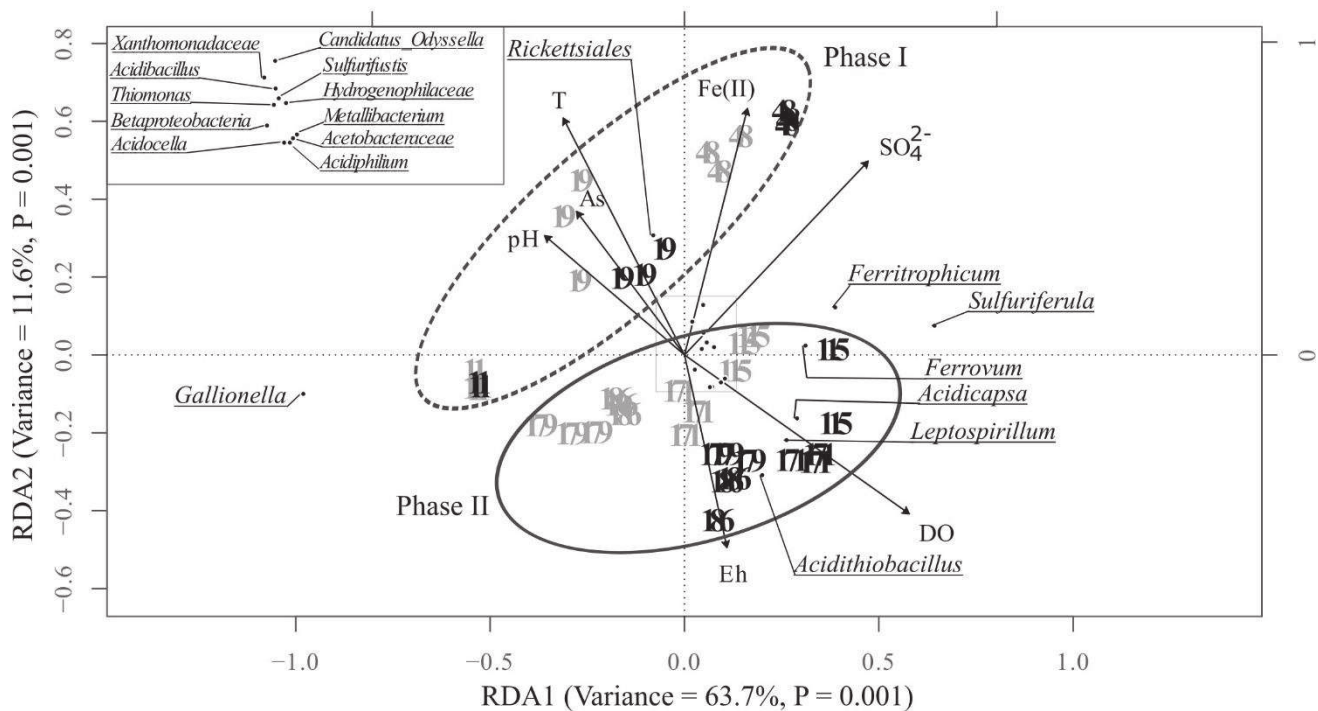


Figure 39: Redundancy analysis (RDA) illustrating the relationships between the environmental variables (DO, dissolved oxygen; SO₄²⁻, dissolved sulfate concentration; T, temperature; pH, As, dissolved arsenic concentration; Fe(II), dissolved ferrous iron concentration and the redox potential Eh) and the distribution of the major bacterial taxa in the bioprecipitates collected on the seven campaigns in the tray 1 (gray) and the tray 5 (black) of the bioreactor (only the taxa with a relative abundance $\geq 1\%$ in at least one bioprecipitate sample are included in this analysis). The analyses were performed in triplicates. The inset represents a close-up view of the center part of the RDA plot.

2.4. Discussion

In the *in situ* treatment device, iron and arsenic removal was driven by a microbial biofilm colonizing the surface of the five trays composing the pilot. The present study aimed at characterizing the bacterial diversity and its spatio-temporal dynamics in this engineered system, in relation with main environmental parameters.

2.4.1 Microbiology of the bioprecipitates

The biogenic precipitates that developed inside the pilot contained at least one order of magnitude higher bacterial biomass than what was observed in a lab-scale pilot treating the same AMD (Fernandez-Rojo et al., 2017) and in terraced iron formations reported elsewhere (Brown et al., 2011; Brantner et al., 2014). Thus, both the sand used to fill the trays and the

hydrodynamic conditions were favorable to a biofilm development. The microbial assemblages developing inside this engineered system reproduced, at least partially, the natural ecosystem established in the nearby AMD. The microbiology of the pilot was largely dominated by diverse iron-oxidizing bacteria (FeOB): *Gallionella*, *Ferrovum*, *Ferritrophicum* and, to a lesser extent, *Acidithiobacillus* and *Leptospirillum*. The main taxa identified were previously found in AMD ecosystems (Baker and Banfield, 2003; Baker et al., 2003; Méndez-García et al., 2015; Chen et al., 2016), including Carnoulès (Bertin et al., 2011; Bruneel et al., 2011; Volant et al., 2014), and in laboratory-based experiments (Fernandez-Rojo et al., 2018; Tardy et al., 2018).

Gallionella proved to be dominant in the Carnoulès ecosystem (Bruneel et al., 2006; Volant et al., 2014; Tardy et al., 2018) and in a lab-scale pilot treating Carnoulès water (Fernandez-Rojo et al., 2018). Genus *Ferrovum*, containing litho-autotrophic acidophilic FeOB with potential biotechnological relevance (Heinzel et al., 2009a,b; Hedrich and Johnson, 2012), was also described in diverse AMD, including iron-rich environments (Johnson et al., 2014). *Gallionella* and *Ferrovum* were dominant in pilot plants relying on biological iron oxidation (Heinzel et al., 2009a,b; Hedrich et al., 2011b; Hedrich and Johnson, 2012; Tischler et al., 2014; Sheng et al., 2016; Sun et al., 2016b). *Ferritrophicum* genus, also including FeOB (Weiss et al., 2007), was previously identified in AMD (González-Toril et al., 2011; Tardy et al., 2018).

The moderately acidic sulfur oxidizers *Sulfuriferula* spp. were described as potential key actors of sulfur-cycling in acidic mine waste containing sulfide minerals (Jones et al., 2017a). Their abundance in the pilot may be linked to the inflow of sulfide particles from the tailing pile into the pipe carrying the AMD water. The recent taxonomic reclassification of *Thiobacillus plumbophilus* to *Sulfuriferula plumbophilus* (Watanabe et al., 2015) may explain why *Sulfuriferula* spp. were underestimated so far in AMD. The capacity to oxidize iron or arsenic has not been described for any known *Sulfuriferula* species. “Sulfurdriven As(III) oxidation” was suggested in alkaline mono lake, through microbial thioarsenate transformation (Fisher et al., 2008). However, it is unlikely that similar process occurs under acidic and fully oxic conditions. Understanding the role of this genus (which mostly dominated the system from D48) in the treatment process requires further investigations.

Acidithiobacillus is considered as an important player in the attenuation process in Carnoulès (Egal et al., 2009; Bruneel et al., 2011; Bertin et al., 2011). This FeOB was detected in variable but relatively low proportions in the bioprecipitate (from 0.03 to 10.5%), in agreement with previous *in situ* observations (Volant et al., 2014). Sensibility to Fe(II) could explain the low abundance of *Acidithiobacillus* and the dominance of *Ferrovum* and *Gallionella* in the field-pilot where Fe(II) concentrations ranged between 649 and 1396 mg L⁻¹ (Jones et al., 2015). The importance of *Acidithiobacillus* in biooxidation plants has previously been questioned (Rawlings et al., 1999). Even when used as an inoculum, *A. ferrooxidans* was out competed by *Ferrovum* in a pilot plant treating acid mine waters (Heinzel et al., 2009a). Distinguish the specific contribution of each FeOB population to iron and arsenic removal in the present study would require further investigations.

The presence of iron-reducing bacteria (*Acidiphilium*, *Acidocella*, *Metallibacterium*) can be explained by the occurrence of anoxic niches inside acidophilic biofilm (Ziegler et al., 2013).

2.4.2. Dynamics of the bacterial communities inside the pilot

During the monitoring, biofilm colonization (phase I) was followed by a stationary phase (phase II) reached by the mature biofilm, and characterized by a stable bacterial biomass. The dominance of *Gallionella* in the bioprecipitates at the very beginning of the monitoring was linked to their dominance in the water used to feed the pilot. As the biofilm matured, spatial heterogeneities arose, resulting in the diversification of micro-habitats advantageous for other populations (Santegoeds et al., 1998; Woodcock and Sloan, 2017). The proportion of *Sulfuriferula*, *Ferrovum*, *Ferritrophicum*, *Rickettsiales* increased while those of the first colonizers *Gallionella* decreased. Increase of bacterial diversity and shifts in bacterial assemblages were previously described during acidophilic biofilm maturation (Wilmes et al., 2009; Mueller et al., 2011).

Ferrovum myxofaciens produces large amounts of extracellular polymeric substances, which facilitate attachment to surfaces (Rowe and Johnson, 2008). This capacity may provide a competitive advantage to *Ferrovum*-related bacteria in engineered systems. In two pilot plants treating acid mine water, *Gallionella* were dominant during a first phase associated with unstable operating conditions while *Ferrovum* became dominant during a second phase with stable conditions. *Gallionella* abundance increased again at the end of the monitoring (Heinzel et al., 2009b). Similarly, in the present study, *Gallionella* regained in importance during the later stages of the monitoring, particularly in the top tray.

The autochthonous bacterial communities of the AMD feeding the pilot remained stable and largely dominated by *Gallionella* during the 6 months monitoring. Thus, the temporal dynamic of the bacterial community in the bioprecipitate (particularly during phase I) can be more readily attributed to bacterial succession during biofilm establishment rather than to the modification of the seeding community.

During the second phase of the monitoring, the spatial structuring of the mature communities inside the pilot intensified. Differences observed between the top and the bottom trays can be linked to a modification of the chemistry of the overlying water while transiting inside the pilot. This chemical gradient between the inlet and the outlet water was particularly marked during this second phase (Supplementary Table S18).

2.4.3. Influence of environmental parameters on the bacterial communities

The range of physico-chemical variations observed in the AMD water during the 6 months monitoring was representative of the seasonal variations described during a 4 years *in situ* monitoring (Egal et al., 2010). The present study covered both summer (phase I) and autumn (phase II) periods. Thus, a seasonal effect on the whole dynamic may not be excluded. However, both autogenic (*e.g.*, internal and biotic) and allogenic (*e.g.*, external and abiotic) parameters are likely to govern bacterial dynamics during biofilm establishment. It is then difficult to distinguish the effect of seasonal variations from the autogenic parameters that may be particularly influential during the early phases of the biofilm development (Jackson et al., 2001; Lyautey et al., 2005). However, we can assume that once the biofilm has reached its maturity, the bacterial community dynamic was mainly driven by the variations of the physico-chemistry of the overlying water (Brown et al., 2011).

Redundancy analysis highlighted the key parameters susceptible to influence bacterial diversity in the pilot: DO, sulfate concentration, temperature, pH, dissolved As and Fe(II) concentration, and Eh (Rawlings et al., 1999; Dopson et al., 2007; Kupka et al., 2007; Candy et al., 2009; Volant et al., 2014; Jones et al., 2015; Sheng et al., 2016). *Gallionella* is a microaerophilic bacteria thriving at lower oxygen conditions than other FeOB as *Ferrovum*, *A. ferrooxidans* and *Leptospirillum* spp. (Hanert, 2006; Johnson et al., 2014). The persistence of microaerophilic bacteria in the bioprecipitates and in the sediments, including some *Gallionella* and *Ferritrophicum* (Weiss et al., 2007), could be explained by the possible occurrence of microaerobic niches, as seen elsewhere (Ziegler et al., 2013). On the contrary, higher abundances of *Ferrovum* were associated with increasing concentration of oxygen (Jwair et al., 2016; Fabisch et al., 2016; Fernandez-Rojo et al., 2018). Most of the FeOB characterized so far are mesophilic or thermophilic (Kupka et al., 2007). A better tolerance to low temperatures of *Acidithiobacillus* (Norris, 1990) may explain why its abundance was negatively correlated with temperature in the pilot. Batch experiments conducted with Carnoulès AMD water showed a clear effect of temperature on arsenite oxidizers: both the abundance of *Thiomonas* and the As(III) oxidation activity were stimulated at 35°C compared to 20°C (Tardy et al., 2018). In the temperature range covered by the present study (5.2-23.8°C), no correlation was evidenced between temperature and *Gallionella*, *Ferrovum* or *Thiomonas* relative abundances. Temperatures naturally reaching 30°C or more in the water column above the bioprecipitate during summer are not excluded, particularly in case of reduced water height and long residence times. Such high temperatures may have differential effect on the FeOB and AsOB activity depending on their physiology.

Regarding the pH, our results are congruent with the better adaptability of *Ferrovum*, *Acidithiobacillus*, and *Leptospirillum* to acidic conditions compared to *Gallionella* known to prefer pH above 3 (Rawlings et al., 1999; Jones et al., 2015; Grettenberger et al., 2017).

Fe(II) concentration also influences growth and activity of FeOB depending on their affinity for this energy source and on potential competition between different populations (Battaglia et al., 1994; Rawlings et al., 1999). The negative correlation of *Acidithiobacillus* with Fe(II) is in agreement with a previous study (Jones et al., 2015). Furthermore, different affinity for Fe(II) together with distinct sensitivity to Fe(III) inhibition may explain the effect of redox potential (conditioned by the ratio Fe(III)/Fe(II)) on the relative distribution of FeOB (Rawlings et al., 1999; Meruane et al., 2002; Kuang et al., 2013).

Occurrence of *Gallionella* was negatively correlated with sulfate concentrations. Sulfates are generally well tolerated by FeOB, with inhibitory effects reported for concentrations higher than the ones measured in the present study (Candy et al., 2009). However, sulfate concentrations were previously shown to drive bacterial community composition in the Carnoulès AMD waters (Volant et al., 2014).

Finally, dissolved arsenic concentration significantly contributed to the bacterial community structure inside the bioreactor. Similar influence was shown *in situ* (Volant et al., 2014). Nevertheless, no tendency was highlighted between the variations of dissolved arsenic concentration and the proportion of the arsenite-oxidizing *Thiomonas*. It can be hypothesized that in the range of concentrations measured in this study, arsenic was not a limiting factor for bacteria relying on arsenite oxidation for their growth, and was not toxic for the others

Thiomonas. *Acidithiobacillus* appeared to be negatively correlated with dissolved arsenic concentration although high resistance capacity was evidenced for some strains of *A. ferrooxidans* (up to 15 g L⁻¹ As(III), Dave et al., 2008). A possible explanation is that *Acidithiobacillus* contribute to arsenic removal from water and its abundance in the bioprecipitates is thus associated with lower dissolved arsenic concentrations.

2.4.4. Iron oxidation and precipitation

In spite of the large dominance of FeOB in the pilot, iron oxidation and precipitation did not exceed 20% and 11%, respectively (Fernandez-Rojo et al., 2019). Iron-oxidizing activity of *A. ferrooxidans* was strongly inhibited when the bacteria were attached to solid surfaces (Wakao et al., 1984). On the contrary, *Ferrovum* biofilms proved to be very effective in iron-oxidizing bioreactors (Hedrich and Johnson, 2012). Among several strains tested by Johnson et al. (2012) the highest iron oxidation rates were obtained with *Ferrovum* spp. In spite of their well-known efficiency and their adaptation to temperature and pH ranges observed in the pilot (Kuang et al., 2013; Johnson et al., 2014; Jones et al., 2015), the iron-oxidizing activity of FeOB (including *Ferrovum*) appeared limited in the present study possibly because of non-optimal operating conditions. The water height above the biofilm (1.5–7 cm), which is a key factor for iron oxidation kinetics, may have prevented a sufficient oxygenation of the water column (Brown et al., 2011; Fernandez-Rojo et al., 2017). Another possible limiting factor is an insufficient active surface of the biofilm in regard to the volume of overlying water to be treated. Probably due to these limitations, the important variations of FeOB distribution inside the pilot did not result in significant iron oxidation rate variation (Fig. 35B). Our results strongly suggest that the composition of the bacterial communities was not a limiting factor for iron oxidation in the bioreactor. Further work based on RNA will help to determine which bacterial taxa actively contribute to the treatment.

2.4.5. Bacterial arsenite oxidation in the pilot

As(III) oxidation by *Thiomonas* spp. can contribute to the formation of stable As(V)-rich precipitates. No clear temporal or spatial tendency was observed for *Thiomonas* genus based on metabarcoding. Further insights into the abundance and the identity of the *Thiomonas* spp. thriving in the pilot were gained by a CARD-FISH approach. In the biogenic precipitates sampled at D48 and D171, the proportion of *Thiomonas* related bacteria averaged 8% of the DAPI-stained bacteria, which is congruent with *in situ* observations (5-8.7%, Hovasse et al., 2016). Despite their low abundance, *Thiomonas*-related bacteria are considered to play a crucial role in the pollution mitigation (Bruneel et al., 2003, 2011; Hovasse et al., 2016). Metaproteomic approaches showed that they sustainably express an arsenite oxidase activity *in situ* in Carnoulès (Bertin et al., 2011; Hovasse et al., 2016). Inside the pilot, the *Thiomonas* belonging to group II (as defined by Bryan et al., 2009) were more abundant than those belonging to group I ($p < 0.05$), whereas the average proportions of the two groups were similar *in situ* (Hovasse et al., 2016). Both groups I and II contain arsenite-oxidizing *Thiomonas* strains isolated from the Carnoulès AMD (Bryan et al., 2009; Bertin et al., 2011; Hovasse et al., 2016). Group II includes *Thiomonas* sp. CARN2, which expressed its arsenite oxidation activity in the Carnoulès AMD sediments (Bertin et al., 2011). The As(III)-oxidation genetic potential

(expressed as the number of *aioA* genes ng^{-1} of DNA) increased tenfold in the bioprecipitate during the first 48 days suggesting the establishment of an active As(III)-oxidizing bacterial population during the early stages of the biofilm maturation (Fernandez-Rojo et al., 2019). Although the detection of *aioA* genes doesn't give evidence of its expression, we can hypothesize that the *Thiomonas*-related bacteria identified by CARD-FISH were responsible for the arsenic oxidation resulting in the formation of solid phases containing almost 100% of As(V).

2.5. Conclusion

The present study gave new insights into the bioremediation, at the field-scale, of As-rich AMD by biological iron and arsenic oxidation. Bacterial communities originating from the AMD water and organized in biofilm inside the pilot successfully removed soluble arsenic. It can be assumed that, during the first phase of the monitoring, the temporal dynamic of the biogenic precipitates communities was mostly due to ecological succession during biofilm installation. Once the biofilm was mature, the physico-chemistry of the overlying water exerted a complex control on the distribution of the biofilm bacterial populations. The co-existence of several FeOB populations characterized by distinct physiological traits (in term of optimal pH, temperature, DO, and Fe(II) affinity ...) permitted a good adaptation of the system toward variations in the chemistry of the AMD water to be treated. Ubiquity of the bacteria identified and the presence of bacteria of biotechnological relevance (*Ferrovum*, *Acidithiobacillus*) let expect that the application of this system to other As-and Fe-rich AMD worldwide is practicable.

We showed evidence of the stable presence of distinct populations of *Thiomonas* spp. in the pilot. Appreciable arsenite oxidation occurred in the field pilot. To determine the factors controlling arsenite oxidation activity in this treatment system, gene expression investigations are required.

The development of accurate biological treatment requires the stability of bacterial activity under seasonal variations. Furthermore, the bacterial diversity of the AMD water remained relatively stable during the 6 months monitoring whereas it proved to be more variable over a longer period of time (Volant et al., 2014). For these reasons, a monitoring on a longer period is required to guarantee the long-term stability and robustness of the treatment system.

Author contributions

CC and MH supervised the research project and the experiments. EL performed the metabarcoding analyses and interpretations. AD performed the CARD-FISH. CJ, FB-B, OB, and VT contributed to data interpretation. CC, EL, LF-R, MH, OB, and VT collected the samples. MH, EL, and CC wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank the IngECOST-DMA project (ANR-13-ECOT-0009), the OSU OREME (SO POLLUMINE Observatory, funded since 2009), the BRGM and ADEME (Ph.D. fellowship of

EL, 2016-2019) and the ADEME COMPAs project (GESIPOL 2017/34/003) for the financial support. We thank Jennifer Hellal for helpful discussion about statistical analyses and the Montpellier RIO Imaging microscopy platform for their kind assistance in microscopy.

2.6. Supplementary material

2.6.1. Supplementary data

2.6.1.1. CARD – FISH

Biogenic precipitates were fixed in freshly prepared 4% paraformaldehyde [1:10 w/v] for 2 h 30 at 4°C, washed with phosphate buffered saline (PBS), and stored at -20°C in 50% PBS/ethanol solution.

2.6.1.2. Oligonucleotide probes for hybridization

Probes (Biomers, Ulm, Germany) were labeled by horseradish peroxidase (HRP). The mixture of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), EUB338II (5'-GCAGCCACCCGTAGGTGT-3') and EUB338III (5'-GCTGCCACCCGTAGGTGT-3') were applied for Bacteria detection (Amann et al., 1990; Daims et al., 1999). Negative controls were performed with probe NON338 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3'), the complementary sequence of EUB338 (Wallner et al., 1993). Very few (< 1%) or no probe-positive cells were detected using the negative control. Two probes were used for the quantification of two distinct monophyletic groups of *Thiomonas* spp. Probes TM1G0138 (5'-GCAGTTATCCCCATCAAT-3') and TM2G0138 (5'-GTAGTTATCCCCATCACA-3') (Hallberg et al., 2006) target respectively the monophyletic Group II and I according to Coupland et al. (2004) and Bryan et al. (2009).

2.6.1.3. *In situ* hybridization

The first steps of the CARD-FISH procedure were conducted as described in Eickhorst and Tippkötter (2008), with some modifications. One hundred microliters of fixed sample were diluted in 900 µL MilliQ water (MQ), sonicated 35 s at 42 kHz, diluted in 9 mL of MQ and filtered on polycarbonate filters (0.2 µm, 47 mm in diameter, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The filter was dipped in 0.2% low melting point agarose and cells were permeabilized at 37°C during 1 h in lysozyme (10 mg mL⁻¹) solution and then during 30 min in achromopeptidase solution (60 U mL⁻¹). Endogenous peroxidase activity was inactivated by incubation in methanol containing 0.15% H₂O₂ for 30 min. Filter was dehydrated in 98% EtOH and air dried. Sections of filters were cut out and placed in 300 µL of hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10% (w/v) dextran sulphate, 2% (w/v) blocking reagent (Roche, Mannheim, Germany), 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS), 35% (v/v) formamide) containing 100 ng of HRP-labeled probes. After hybridization at 35°C for 2 h, a washing of not bound probes was performed: the slides were transferred into prewarmed washing buffer (3 mM NaCl, 5 mM EDTA [pH 8.0], 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.01% (w/v) SDS) at 37°C for 30 min followed by an incubation 15 min into 0.05% (v/v) Triton X100 amended PBS (PBS-T).

2.6.1.4. Tyramide amplification

Tyramide amplification was modified from Schmidt et al. (2012). Tyramide and amplification buffer were home-made. For the tyramide solution, triethylamine ($10 \mu\text{L mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich) and dimethylformamide (DMF) were mixed with tyramine HCl (10 mg mL^{-1} ; Sigma-Aldrich). 6-(fluorescein-5-carboxamido) hexanoic acid, succinimidyl ester (SFX; Invitrogen) was dissolved in DMF (10 mg mL^{-1}). The two solutions were mixed in the ratio of 1:3 (v/v) incubated for 6 h in the dark and diluted to a final concentration of 1 mg SFX mL^{-1} in DMF containing 2% [w/v] 3-iodophenolboronic acid (IPBA, Sigma-Aldrich) to a final concentration of 1 mg mL^{-1} (SFX-DMF).

For tyramide signal amplification, the filters sections were incubated for 15 min at 46°C in $500 \mu\text{L}$ amplification buffer AB2 ($0.1 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ dextran sulfate, 1% blocking reagent, 2 M NaCl, $1\times\text{PBS}$) containing 0.0015% H_2O_2 and $0.5 \mu\text{L}$ of fluorescein-labeled tyramide home-made solution. Sections were then washed with PBS-T for 15 min in dark, rinsed with MQ three times and air-dried.

Sections with CARD-FISH-stained samples were mounted with Vectashield H-1200 (Vector Laboratories, Burlingame, California) containing 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) to protect the fluorescence and to counterstain. The samples were analyzed using a microscope Axioimager Z2 apotome (Carl Zeiss, Jena, Germany). A minimum of 1,000 DAPI-stained cells per triplicate and per probe were counted on 15-25 randomly selected micrographs taken with objective 63x ($44648 \mu\text{m}^2$) and extrapolated to 1 g of biogenic precipitated (dry weight). Detection rates were calculated by the fraction of DAPI-stained cells detected with CARD-FISH.

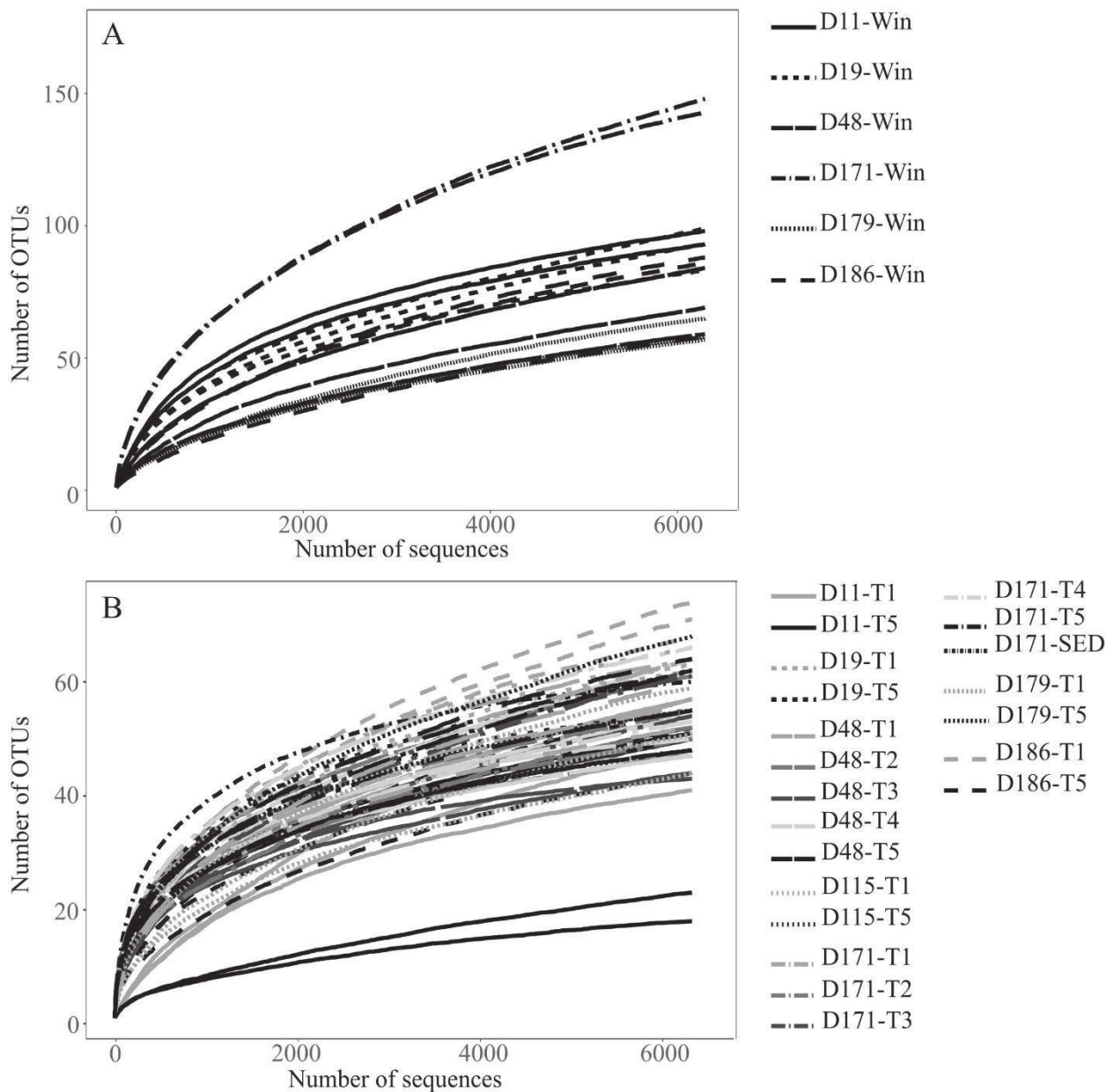
2.6.2. Supplementary figures and tables

2.6.2.1. Supplementary tables

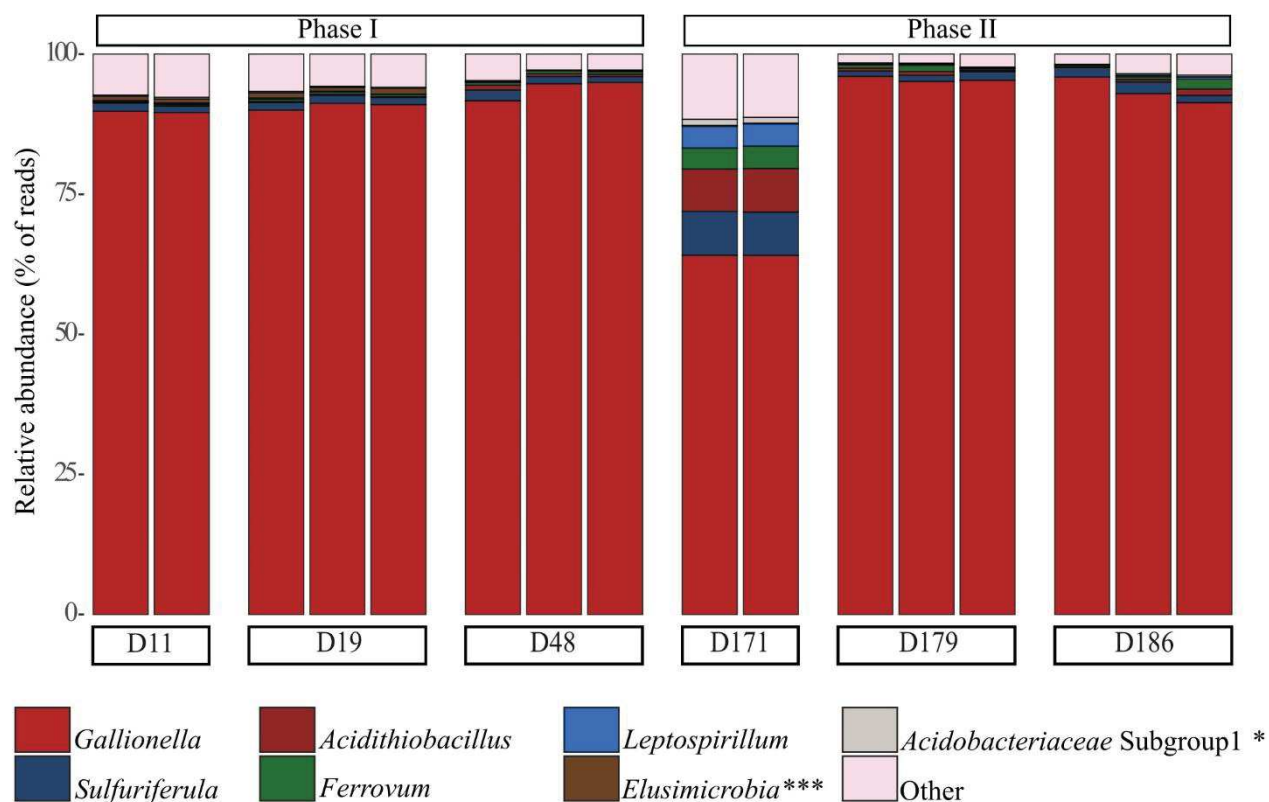
Supplementary Table S18: Physico-chemical characteristics of inlet (W_{in}) and outlet (W_{out}) waters tested as environmental variables in RDA analysis (T=temperature, Eh = redox potential, DO= dissolved oxygen concentration, EC = electrical conductivity, TDS = total dissolved solid, SO_4^{2-} = dissolved sulfate concentration, Fe(II)=dissolved ferrous iron concentration, Fe = dissolved iron concentration, As(III) = dissolved arsenite concentration, As(V) = dissolved arsenate concentration, As=dissolved arsenic concentration) (Fernandez-Rojo et al, 2019).

Sample name	pH	T (°C)	Eh (mV)	DO (mg L ⁻¹)	EC (mS cm ⁻¹)	TDS (mg L ⁻¹)	Flow rate (L h ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	Fe(II) (mg L ⁻¹)	Fe (mg L ⁻¹)	As(III) (mg L ⁻¹)	As(V) (mg L ⁻¹)	As (mg L ⁻¹)
D11-Win	3.28	21.7	530	2.23	3.79	1968	31.50	784	957	978	92	22	113
D11-Wout	2.87	19.8	580	3.68	3.79	1961	39.12	701	896	890	56	11	67
D19-Win	3.36	18.6	522	3.18	3.78	1962	77.94	825	1010	966	91	19	118
D19-Wout	3.1	19.3	535	4.08	3.76	1860	81.35	932	959	957	72	16	98
D48-Win	3.21	19.5	527	2.8	3.91	2230	107.14	1078	1295	1187	107	23	152
D48-Wout	3.04	18.1	546	6.96	3.87	2200	125.47	1132	1218	1227	100	23	147
D115-Win	3.23	18.8	467	5.77	4.39	2300	0.28	1167	1396	1314	94	26	134
D115-Wout	2.82	17.9	590	6.66	4.55	2370	6.36	1237	1350	1262	0	3	3.8
D171-Win	2.64	12.5	563	5.22	4.33	2310	47.37	859	806	833	53	15	84
D171-Wout	2.67	5.2	599	8.84	4.06	2100	48.65	758	763	761	42	15	63
D179-Win	3.11	11.3	584	5.16	3.86	2060	41.66	815	693	789	62	15	86
D179-Wout	2.91	5.6	603	8.37	4.06	2110	35.10	827	663	751	35	11	51
D186-Win	3.41	10.1	573	5.49	4.32	2250	49.01	830	874	814	68	15	93
D186-Wout	3.11	5.4	598	9.58	3.95	2050	35.42	811	649	768	48	12	62

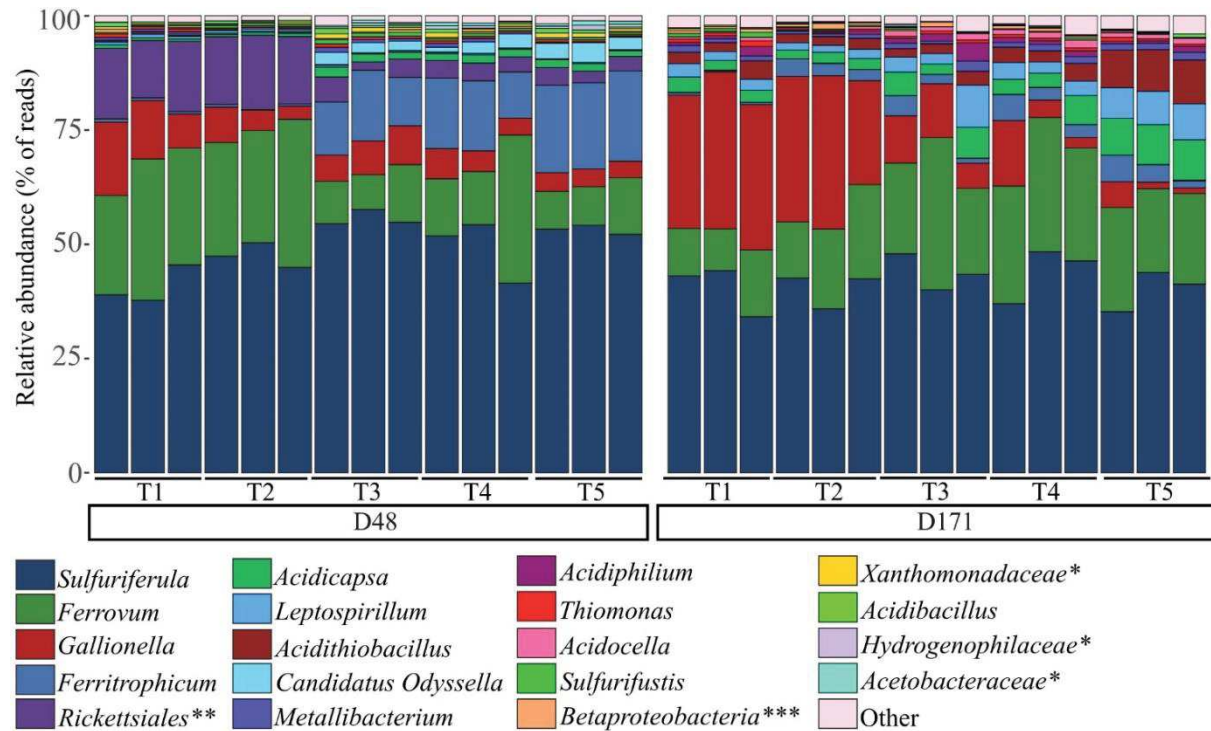
2.6.2.2. Supplementary figures



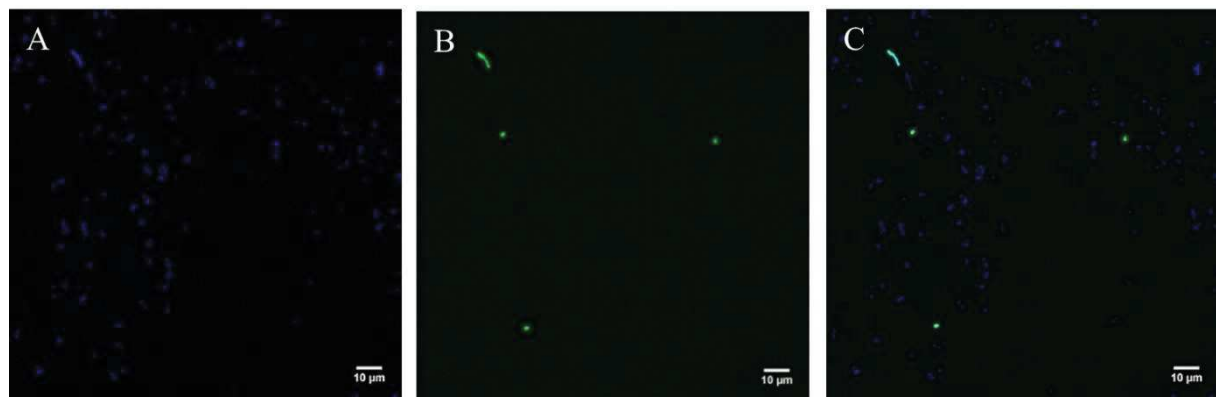
Supplementary figure S40: Rarefaction curves comparing the number of detected OTUs with the number of bacterial 16S rRNA gene sequences from the inlet waters (A) and the biogenic precipitates collected in the trays of the bioreactor (B) during the whole monitoring period. Analyses were performed in triplicates.



Supplementary figure S41: Taxonomic composition of bacterial communities (at the genus level) in the inlet waters during the whole monitoring period (except D115). When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*) or the class level (***). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset. Analyses were performed in triplicates.



Supplementary figure S42: Taxonomic composition of bacterial communities (at the genus level) in the biogenic precipitates collected on day 48 and on day 171 in all the trays (T1-T5). Analyses were performed on triplicates. When genus identification was not possible, classification was made at the family level (*), the order level (**), or the class level (***). “Others” represent the phylogenetic groups with a relative abundance < 1% calculated on the whole dataset.



Supplementary figure S43: CARD-FISH photomicrographs of bacterial cells from biogenic precipitates collected at D171 (November 2016). (A) DAPI-stained cells, in blue. (B): CARD-FISH staining of *Thiomonas* Group II cells with TM1G0138 probe, in green. (C): Merged images. Scale bar = 10 μm.

Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour objet l'étude des processus de bioremédiation microbienne des drainages miniers acides afin de contribuer à une meilleure gestion des anciens sites miniers pollués à l'arsenic, l'antimoine et le thallium. L'analyse bibliographique a permis d'établir deux objectifs scientifiques pour lever les verrous spécifiques à chacun de ces polluants. Le comportement biogéochimique de l'arsenic et ses interactions avec les microorganismes sont relativement bien connus comparés à ceux de l'antimoine et du thallium, qui représentent ainsi des problématiques émergentes au sein des sites miniers.

Le premier objectif consistait donc à améliorer nos connaissances concernant la biogéochimie de deux polluants émergents, le Sb et le Tl, afin d'évaluer la possibilité de les traiter par des procédés passifs basés sur des processus microbiens.

Le second objectif était de mieux caractériser les acteurs de la dépollution des DMA riches en As et la régulation de l'activité de ces microorganismes par les conditions environnementales. Les résultats correspondant à cet objectif doivent conduire à une meilleure maîtrise des procédés passifs disponibles pour le traitement de l'As.

Trois volets expérimentaux ont été mis en oeuvre en fonction de ces objectifs. Les expérimentations ont été menées à différentes échelles, du bioréacteur de paillasse de quelques décilitres au pilote de terrain de 250 litres, afin d'étudier le comportement géochimique des polluants et leurs interactions avec les microorganismes d'abord en conditions contrôlées (laboratoire), puis en conditions naturelles. Une approche pluridisciplinaire combinant des analyses physico-chimiques, des outils microbiologiques classiques, des outils moléculaires, bio-informatiques et statistiques ont permis d'appréhender au mieux les processus biogéochimiques complexes qui peuvent participer à la remédiation des métaux et métalloïdes au sein des drainages miniers acides.

La première partie expérimentale a été consacrée à l'acquisition de connaissances nouvelles sur les transformations microbiennes de Sb en condition acide, domaine très peu étudié jusqu'à présent. L'expérimentation réalisée dans le cadre de cette thèse a permis d'évaluer la capacité d'un consortium microbien à tolérer et oxyder l'antimoine en conditions acides, équivalentes à celles des DMA.

Ce consortium microbien a été enrichi à partir d'un sol modérément acide et contaminé à l'antimoine. Cet enrichissement a été adapté pour se développer dans des conditions initiales acides, jusqu'à pH 3,25, et en présence de concentrations initiales élevées en antimonite, jusqu'à 100 mM. Une oxydation complète de 0,1 mM de Sb(III) a été observée à un pH initial de 3,5. Même si le pH augmente au cours de l'incubation, nos résultats montrent une oxydation de Sb(III) par le consortium à pH acide ($< \text{pH}4$). Ce consortium est composé de levures et de bactéries, dont certains taxa bactériens incluent des souches identifiées au préalable comme tolérantes et oxydantes de l'antimoine. La diversité et la structure des communautés bactériennes se sont avérées affectées par les variations de pH et de concentration en Sb(III). Les taxa affiliés à *Leifsonia*, *Burkholderiaceae* et *Rhodanobacter* semblent tolérer à la fois des pH acides (jusqu'à 3,25) et une concentration initiale en Sb(III) de 10 mM. Une exposition à

des concentrations élevées en Sb(III) (50-100 mM) a fortement sélectionné au sein du consortium des bactéries appartenant à la famille *Bradyrhizobiaceae*. Cependant ces dernières ne semblent favorisées qu'à des pH relativement peu acides (pH 5,5). Un résultat intéressant de cette étude est la capacité du consortium microbien à moduler le pH de son milieu de culture, ce qui pourrait être utile pour remédier un DMA.

Au vu des capacités d'oxydation et de résistance au Sb connues chez les taxa dominants le consortium (*Leifsonia*, *Burkholderiaceae*, *Rhodanobacter* et *Bradyrhizobiaceae*), elles pourraient être à l'origine de l'oxydation de Sb. Distinguer le rôle précis de chacune des populations bactériennes présentes dans le consortium et élucider les processus à l'origine des phénomènes observés nécessitera de plus amples investigations.

Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur les processus microbiens à l'origine d'une oxydation et de la précipitation de Sb à partir d'une eau initialement acide. Les capacités du consortium microbien obtenu dans cette étude offrent de nouvelles données utiles pour les futures études visant à comprendre le comportement du Sb au sein des DMA en condition oxydante. Des études complémentaires sont nécessaires pour identifier les microorganismes oxydant Sb au sein de ce consortium et les mécanismes d'oxydation correspondants.

En condition anaérobie, l'antimoine, tout comme l'arsenic et le thallium, peuvent être éliminés de la phase dissoute suite à leur précipitation sous forme de sulfures. Notre seconde étude a donc consisté à étudier le comportement biogéochimique de ces polluants à l'échelle d'un bioréacteur colonne de laboratoire traitant des eaux minières par sulfato-réduction. Le comportement de l'As et du Sb a été plus particulièrement étudié au vu de leur co-occurrence dans les DMA et du risque de compétition entre ces deux éléments pour réagir avec le sulfure produit par les BSR.

Dans le bioréacteur, 99 % de l'arsenic et 98 % de l'antimoine ont été éliminés sous forme de sulfures. La proportion Sb/As a été augmentée jusqu'à 1 dans l'eau d'alimentation, les concentrations de chacun de ces deux éléments atteignant 1 mM, sans que les performances du bioréacteur soient affectées. Enfin, environ 99 % du thallium est éliminé au sein du réacteur à partir d'une eau de drainage minier acide contenant initialement $1.5 \cdot 10^{-3}$ mM de Tl. La forme sous laquelle le Tl est éliminé reste à déterminer.

La communauté bactérienne qui se développe au sein de ce réacteur inclut des dégradeurs de polymères et d'acétate, des fermenteurs et un sulfato-réducteur. Ce dernier est affilié à la BSR acidotolérante *Desulfosporosinus*, et reste minoritaire au sein de la communauté. Malgré la faible abondance relative (< 2,5 %) de ce microorganisme, la réduction biologique des sulfates en sulfures permet une précipitation efficace de l'As et du Sb au sein du réacteur. Cette précipitation et la dynamique spatio-temporelle des communautés bactériennes semblent liées. De plus, des interactions biotiques sont suggérées par la présence de différents groupes métaboliques au sein de cette communauté. La dégradation biologique de l'acétate, produit potentiel de la sulfato-réduction et inhibiteur de cette dernière en milieu acide, pourrait ainsi contribuer à l'efficacité du système de traitement. De façon similaire, les dégradeurs de polymères et les fermentateurs offrent la perspective d'utiliser des substrats organiques complexes peu coûteux, pour générer une source de carbone disponible à long-terme aux BSR, dans le cadre d'un système de traitement passif des DMA à l'échelle industrielle.

Les résultats acquis au cours de cette étude témoignent de l'efficacité d'un système de traitement basé sur la sulfato-réduction biologique pour traiter l'As et le Sb présent au sein de DMA, et suggèrent également une efficacité de ce procédé pour le traitement du Tl. Une meilleure compréhension des interactions biotiques et des facteurs de contrôle des communautés bactériennes au sein du réacteur contribuerait à optimiser l'efficacité des systèmes de traitement basés sur la sulfato-réduction. Le consortium bactérien de cette étude, issu du sédiment du DMA réel de Carnoulès, possède des attributs prometteurs pour le développement de systèmes de traitement à l'échelle du terrain.

Sur site, les variations physico-chimiques sont plus difficiles à maîtriser qu'au cours d'une expérience de laboratoire. La fluctuation de la diversité et de la structure des communautés bactériennes pourrait au final moduler l'efficacité des processus de traitement des drainages miniers acides. Le dernier volet expérimental de cette thèse avait donc pour objectif de mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle des communautés bactériennes dans un bioréacteur installé *in situ*, en lien avec les variations de la physico-chimie et de la microbiologie des eaux d'alimentation, ainsi que de la composition du bioprécipité formé au cours du traitement.

Les communautés bactériennes se sont initialement installées dans le réacteur sous la forme d'un biofilm à partir des communautés autochtones du DMA. La première phase du suivi correspondait à la maturation de ce biofilm bactérien. Cette maturation fut associée à un enrichissement en As(V) et en gènes *aioA* dans les bioprécipités. Les facteurs physico-chimiques de l'eau (l'oxygène dissous, la température, le pH, les concentrations en sulfates, arsenic et fer, et le potentiel redox) ont structuré les communautés bactériennes formant le biofilm mature. Cette seconde phase fut alors associée à une teneur maximale en As(V) d'environ 100 % dans les bioprécipités.

Globalement, les communautés bactériennes dans les eaux et les précipités du bioréacteur étaient dominées par des bactéries ferro-oxydantes telles que *Gallionella*, *Ferrovum* et *Ferritrophicum*. Certaines espèces ferro-oxydantes du genre *Ferrovum* présentent un grand intérêt pour de tels systèmes de remédiation. Le genre *Thiomonas*, qui inclue des bactéries arsénite-oxydantes, était également présent en relativement faible proportion (en moyenne 8 %). La détection de *Thiomonas*, associée à la proportion d'As(V) dans les bioprécipités et la présence du gène d'oxydation de l'arsenic, *aioA*, suggéraient qu'une oxydation biologique de l'As a eu lieu dans le bioréacteur. La détection de bactéries communes aux DMA et ayant un intérêt particulier pour les biotechnologies (*Ferrovum*, *Acidithiobacillus* et *Thiomonas*) laisse supposer que notre système de traitement pourrait être transposé à d'autres DMA riches en As et en Fe(II).

Aucun lien direct n'a pu être établi entre le changement de structure des communautés bactériennes au cours du temps de fonctionnement du pilote et les variations des performances du système. La dynamique bactérienne n'apparaît pas comme le facteur limitant les performances en termes d'abattement de l'arsenic et du fer. L'oxydation complète de l'arsenic dans les bioprécipités et le rapport As/Fe élevé (jusqu'à 0,86) sont intéressants dans la perspective de l'évacuation et du stockage de ces résidus sur le long terme. Les faibles quantités de fer précipité limitent le volume des déchets ultimes produits et donc les coûts liés à leur

stockage en décharge. L'importance de ce paramètre en termes d'application du procédé justifie que des recherches et analyses supplémentaires soient entreprises pour identifier les facteurs susceptibles de réguler l'expression du potentiel génétique d'oxydation de l'As au sein du réacteur.

L'ensemble des résultats de cette thèse apporte de nouvelles connaissances sur l'écologie microbienne appliquée à la remédiation des DMA riches en As, Sb et Tl. Ces connaissances pourront être prises en compte pour (i) la mise en oeuvre de nouvelles expérimentations visant à caractériser le comportement biogéochimique des polluants émergents Sb et Tl, (ii) la mise en place d'un système de traitement biologique passif d'un DMA riche en As, et, dans une moindre mesure, Sb et Tl, sur l'ancien site minier de Carnoulès. De nouvelles pistes de recherche sont également suggérées sur la base des connaissances acquises.

Perspectives

Vers une meilleure compréhension du comportement des polluants émergents dans les réacteurs

L'antimoine et le thallium sont deux polluants émergents, relativement mal connus. Les travaux de cette thèse ont montré la possibilité d'oxyder biologiquement Sb en condition initialement acide, et, de traiter à la fois le Sb et le Tl au sein d'un système de basé sur la sulfato-réduction. Ces résultats étendent le périmètre de nos connaissances sur ces polluants, mais demeurent une première étape dans la compréhension de leurs comportements biogéochimiques au sein des bioréacteurs passifs. Sur la base de nos travaux, des études complémentaires sont suggérées.

La capacité d'oxydation de Sb en condition acide du consortium issu de nos expériences en batch peut être exploitée pour étudier le comportement de Sb au cours d'étapes de traitement de DMA riches en Sb, et en autres métaux et métalloïdes, en condition aérobie. L'échelle batch de laboratoire impose des limitations que des expériences en continu devraient permettre de surmonter. Une nouvelle expérience à l'échelle du laboratoire, en mode continu, permettrait ainsi de :

- (1) Imposer un pH stable dans le bioréacteur alimenté avec un DMA artificiel.
- (2) Déterminer les performances de ce réacteur vis-à-vis de la précipitation de l'antimoine suite à un ajout de fer dans le DMA artificiel.
- (3) Alimenter ce réacteur avec un vrai DMA contenant du Sb(III), ce qui éviterait l'utilisation d'un produit riche en tartrate.

Notre bioréacteur de sulfato-réduction de laboratoire est capable de traiter efficacement un DMA concentré en Sb en le précipitant sous forme de sulfure. Nos résultats suggèrent également une efficacité de ce procédé pour le traitement du Tl, mais la forme sous laquelle le Tl est éliminé demeure à déterminer. Pour élucider cette question, les protocoles expérimentaux développés pour Sb pourraient être transposés à l'étude du Tl. Le bioréacteur colonne de laboratoire, inoculé avec le consortium bactérien sulfato-réducteur, serait cette fois-ci alimenté en continu avec un DMA concentré en Tl. La caractérisation minéralogique, le suivi microbiologique et physico-chimique permettraient au final d'évaluer :

- (1) L'effet du Tl sur la structure et la diversité du consortium microbien,
- (2) La minéralogie des précipités formés,
- (3) L'efficacité du système pour traiter des eaux minières acides concentrées en Tl.

Développement sur site d'un dispositif combinant des techniques de (bio)-traitement appliquées aux drainages miniers acides arséniés

Deux procédés de traitement biologique ont été étudiés au cours de cette thèse, l'un en condition anaérobie et l'autre en condition aérobie. Les deux systèmes ont permis une élimination efficace de l'arsenic. Le procédé anaérobie a également permis la précipitation d'autres éléments, métaux ou métalloïdes, tel que le Sb, le Tl ou encore le Zn. Il permet également d'augmenter le pH initial des eaux minières acides. A contrario, l'oxydation biologique du fer dans le système de traitement aérobie acidifie l'effluent traité, mais permet l'abattement d'une partie du fer, contrairement au traitement anaérobie. Ces deux types de traitements apparaissent donc complémentaires. Leur combinaison sur l'ancien site minier de Carnoulès sera prochainement expérimentée dans le cadre du projet COMPAs, financé par l'ADEME (Programme GESIPOL). Le dispositif de traitement par sulfato-réduction sera disposé en amont du traitement basé sur l'oxydation du fer, ce dernier étant suivi de drains calcaires qui neutraliseront l'acidité et permettront la précipitation des polluants métalliques résiduels. La conception des deux unités de traitement en condition anaérobie et aérobie se basera sur les résultats obtenus au préalable au cours du projet IngECOST-DMA (ANR-13-ECOT-0009), retranscrits notamment dans la thèse de Lidia Fernandez-Rojo (2017) et du présent manuscrit.

Des aménagements spécifiques au système de traitement en condition aérobie ont été prévus pour promouvoir l'activité des communautés microbiennes et donc l'efficacité du système. Le support physique initial (sable) sera remplacé par des matériaux inertes de porosité élevée (copeaux de bois, pouzzolane et support plastique) qui limiteront ainsi le colmatage et augmenteront le rapport entre la surface du biofilm et le volume d'eau traité. L'oxygène a été préalablement identifié comme le principal facteur qui limite les performances du système (Fernandez-Rojo et al., 2018 ; 2019) et qui contrôle la dynamique des communautés bactériennes (Laroche et al., 2018). Par conséquent, une aération forcée permettra d'oxygéner l'eau immédiatement après sa sortie du réacteur anaérobie, et éventuellement de promouvoir l'efficacité du traitement.

Les deux systèmes biologiques qui seront couplés, c'est-à-dire le réacteur anaérobie et le réacteur aérobie, nécessitent une première période de stabilisation. Cette période permettra l'installation d'un biofilm microbien actif pour la suite du traitement. Lors du démarrage sur le terrain, une incubation en mode batch permettrait le développement du consortium bactérien sulfato-réducteur dans l'ensemble du système de traitement en condition anaérobie. Ce dernier sera ainsi davantage susceptible de résister à une alimentation par le DMA de Carnoulès initialement plus acide que dans nos expériences de laboratoire. Le couplage des réacteurs semble également à proscrire au cours de cette première phase. En effet les communautés bactériennes actives dans le système de traitement aérobie se sont développées à partir des communautés apportées par le DMA. Comme précédemment, l'établissement d'un biofilm stable, directement à partir du DMA, permettra par la suite une moindre variation des communautés suite à l'alimentation du réacteur avec les effluents issus du traitement anaérobie.

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente thèse ont montré une évolution du biofilm microbien sous l'effet des conditions environnementales, au sein du pilote aérobie de terrain. La dynamique des communautés microbiennes pendant cette phase n'est pas apparue limitante vis-à-vis de l'efficacité du système. Cependant nous n'avons pu observer cette maturation que pendant une période limitée de 71 jours avant le démantèlement du réacteur, ce qui ne permet pas de présumer de la stabilité de l'activité microbienne lors des variations saisonnières à long terme. L'influence de ces aléas liés au traitement sur site sera d'autant plus importante à étudier pour le système de traitement par sulfato-réduction, qui à ce jour n'a été étudié qu'en conditions contrôlées de laboratoire. Une attention particulière devra donc être apportée à l'effet du changement d'échelle sur les communautés bactériennes à la base du traitement en sulfato-réduction. De façon plus générale, nos résultats montrent que le consortium bactérien sulfato-réducteur a le potentiel pour être utilisé au sein d'un système de traitement en condition anaérobie *in situ*. Il serait envisageable d'utiliser une source de carbone complexe, telle que la cellulose issue de déchets végétaux, pour développer un système peu coûteux et efficace à long terme.

Pistes de recherche sur les mécanismes biologiques

L'originalité de ces travaux de thèse est liée à l'adoption d'une approche pluridisciplinaire, qui apporte une vision intégrée des processus microbiologiques et géochimiques complexes qui participent à la remédiation des métaux et métalloïdes au sein des drainages miniers acides. De plus amples connaissances ont ainsi été acquises concernant la composition et le comportement des communautés bactériennes qui transforment directement ou indirectement les polluants métalliques au sein de systèmes de traitement appliqués aux DMA.

L'application d'une approche métagénomique basée sur le gène de l'ARNr 16S nous a permis d'acquérir des informations sur la diversité, la structure et la dynamique des communautés bactériennes. Une approche similaire basée sur le gène de l'ARNr 18S permettrait d'acquérir les mêmes informations concernant les communautés eucaryotes. Le deuxième chapitre de cette thèse a soulevé des questions concernant les eucaryotes, qui pourraient jouer un rôle direct ou indirect dans l'oxydation de Sb en condition acide. De plus, les communautés eucaryotes du DMA de Carnoulès, caractérisées par Volant (2012), pourraient contribuer de façon probablement non négligeable au fonctionnement de cet écosystème. Or, l'écologie de ces dernières au sein des systèmes de traitement reste encore méconnue.

Les méthodes traditionnelles de culture et d'isolement apparaissent comme complémentaires aux approches métagénomiques. Elles permettraient l'identification précise des microorganismes, de leur physiologie, de leur métabolisme et de leurs rôles au sein de la communauté et/ou dans la transformation des polluants métalliques. Ces approches permettraient par conséquent de caractériser les microorganismes qui modulent le pH et/ou oxydent Sb au sein du consortium obtenu lors de notre première étude.

Les outils basés sur l'ADN ne permettent pas de quantifier l'expression du potentiel génétique fonctionnel des bactéries d'intérêt. La métatranscriptomique, basée sur l'étude de l'ARN, permettrait d'accéder aux fonctions réellement exprimées au sein des systèmes de traitement. Une meilleure compréhension des facteurs physico-chimiques qui contrôlent

l'expression des gènes d'oxydation de l'As, de Sb, du Fe, et de la réduction du SO_4^{2-} , permettra une meilleure maîtrise des systèmes de traitements.

L'intégration de tels outils microbiologiques et moléculaires permettrait de mieux appréhender l'écologie microbienne et ses applications dans le domaine de la remédiation minière.

Références

- Abin, C.A., Hollibaugh, J.T., 2014. Dissimilatory antimonate reduction and production of antimony trioxide microcrystals by a novel microorganism. *Environ. Sci. Technol.* 48, 681–688. doi:10.1021/es404098z
- Abin, C.A., Hollibaugh, J.T., 2017. *Desulfuribacillus stibiiarsenatis* sp. nov., an obligately anaerobic, dissimilatory antimonate- and arsenate-reducing bacterium isolated from anoxic sediments, and emended description of the genus *Desulfuribacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1011–1017. doi:10.1099/ijsem.0.001732
- Abin, C.A., Hollibaugh, J.T., 2019. Transcriptional response of the obligate anaerobe *Desulfuribacillus stibiiarsenatis* MLFW-2T to growth on antimonate and other terminal electron acceptors. *Environ. Microbiol.* 21, 618–630. doi:10.1111/1462-2920.14503
- Adrados, B., Sánchez, O., Arias, C.A., Becares, E., Garrido, L., Mas, J., Brix, H., Morató, J., 2014. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. *Water Research* 55, 304–312. doi:10.1016/j.watres.2014.02.011
- Afkar, E., Lisak, J., Saltikov, C., Basu, P., Oremland, R.S., Stolz, J.F., 2003. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 107–112. doi:10.1016/S0378-1097(03)00609-8
- Ahoranta, S.H., Kokko, M.E., Papirio, S., Özkaya, B., Puhakka, J.A., 2016. Arsenic removal from acidic solutions with biogenic ferric precipitates. *J. Hazard. Mater.* 306, 124–132. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.12.012
- Akcil, A., Koldas, S., 2006. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production* 14, 1139–1145. doi:10.1016/j.jclepro.2004.09.006
- Alam, R., McPhedran, K., 2019. Applications of biological sulfate reduction for remediation of arsenic – A review. *Chemosphere* 222, 932–944. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.194
- Alazard, D., Joseph, M., Battaglia-Brunet, F., Cayol, J.-L., Ollivier, B., 2010. *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments: New taxa: *Firmicutes* (Class *Clostridia*, Order *Clostridiales*, Family *Peptococcaceae*). *Extremophiles* 14, 305–312. doi:10.1007/s00792-010-0309-4
- Altun, M., Sahinkaya, E., Durukan, I., Bektas, S., Komnitsas, K., 2014. Arsenic removal in a sulfidogenic fixed-bed column bioreactor. *Journal of Hazardous Materials, Research Frontiers in Chalcogen Cycle Based Environmental Technologies* 269, 31–37. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.11.047
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919–1925.
- Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Aguilera, Á., Rodríguez, N., Malki, M., García-Moyano, A., Fairén, A.G., de la Fuente, V., Luis Sanz, J., 2007. Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The Rio Tinto case. *Planetary and Space Science, Planet Mars II* 55, 370–381. doi:10.1016/j.pss.2006.02.006
- Anderson, G.L., Williams, J., Hille, R., 1992. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 267, 23674–23682.
- Andrewes, P., Cullen, W.R., Polishchuk, E., 2000. Arsenic and Antimony Biomethylation by *Scopulariopsis brevicaulis*: Interaction of Arsenic and Antimony Compounds. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2249–2253. doi:10.1021/es991269p
- ANSES. 2012. Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de thallium dans les eaux destinées à la consommation humaine. Maisons-Alfort: Anses. www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2012sa0100.pdf (accessed 8.25.19).
- Asta, M.P., Ayora, C., Acero, P., Cama, J., 2010. Field rates for natural attenuation of arsenic in Tinto Santa Rosa acid mine drainage (SW Spain). *Journal of Hazardous Materials* 177, 1102–1111. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.01.034
- Asta, M.P., Nordstrom, D.K., McCleskey, R.B., 2012. Simultaneous oxidation of arsenic and antimony at low and circumneutral pH, with and without microbial catalysis. *Applied Geochemistry* 27, 281291. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.09.002
- Baes, C.F., Mesmer, R.E., 1976. The hydrolysis of cations. Wiley.
- Baeyens, W., de Brauwere, A., Brion, N., De Gieter, M., Leermakers, M., 2007. Arsenic speciation in the River Zenne, Belgium. *Sci. Total Environ.* 384, 409–419. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.05.044

- Bak, F., Pfennig, N., 1987. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Arch. Microbiol.* 147, 184–189. doi:10.1007/BF00415282
- Baker, B.J., Banfield, J.F., 2003. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 139–152. doi:10.1016/S0168-6496(03)00028-X
- Baker, B.J., Hugenholtz, P., Dawson, S.C., Banfield, J.F., 2003. Extremely Acidophilic Protists from Acid Mine Drainage Host *Rickettsiales*-Lineage Endosymbionts That Have Intervening Sequences in Their 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5512–5518. doi:10.1128/AEM.69.9.5512-5518.2003
- Baker, B.A., Cassano, V.A., Murray, C., Exposure, A.T.F. on A., 2018. Arsenic Exposure, Assessment, Toxicity, Diagnosis, and Management: Guidance for Occupational and Environmental Physicians. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 60, e634. doi:10.1097/JOM.0000000000001485
- Baker-Austin, C., Dopson, M., 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* 15, 165–171. doi:10.1016/j.tim.2007.02.005
- Baldwin, S.A., Khoshnoodi, M., Rezadehbashi, M., Taupp, M., Hallam, S., Mattes, A., Sanei, H., 2015. The microbial community of a passive biochemical reactor treating arsenic, zinc, and sulfate-rich seepage. *Front Bioeng Biotechnol* 3, 27. doi:10.3389/fbioe.2015.00027
- Baldwin, S., Mattes, A., Rezadehbashi, M., Taylor, J., 2016. Seasonal Microbial Population Shifts in a Bioremediation System Treating Metal and Sulfate-Rich Seepage. *Minerals* 6, 36. doi:10.3390/min6020036
- Bao, Z., Sato, Y., Fujimura, R., Ohta, H., 2014. *Alsobacter metallidurans* gen. nov., sp. nov., a thallium-tolerant soil bacterium in the order *Rhizobiales*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 775–780. doi:10.1099/ijs.0.054783-0
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Prévieux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., Jacques, M.-A., 2015. Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1257–1266. doi:10.1128/AEM.03722-14
- Batley, G.E., Florence, T.M., 1975. Determination of thallium in natural waters by anodic stripping voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 61, 205–211. doi:10.1016/S0022-0728(75)80251-8
- 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. doi:10.1007/BF00882763
- Battaglia, M., Hose, G.C., Turak, E., Warden, B., 2005. Depauperate macroinvertebrates in a mine affected stream: clean water may be the key to recovery. *Environ. Pollut.* 138, 132–141. doi:10.1016/j.envpol.2005.02.022
- 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, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* 93, 656–667.
- Battaglia-Brunet, F., Joulain, C., Garrido, F., Dictor, M.-C., Morin, D., Coupland, K., Barrie Johnson, D., Hallberg, K.B., Baranger, P., 2006a. Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 99–108. doi:10.1007/s10482-005-9013-2
- Battaglia-Brunet, F., Itard, Y., Garrido, F., Delorme, F., Crouzet, C., Greffié, C., Joulain, C., 2006b. A Simple Biogeochemical Process Removing Arsenic from a Mine Drainage Water. *Geomicrobiology Journal* 23, 201–211. doi:10.1080/01490450600724282
- Battaglia-Brunet, F., El Achbouni, H., Quéméneur, M., Hallberg, K.B., Kelly, D.P., Joulain, C., 2011. Proposal that the arsenite-oxidizing organisms *Thiomonas cuprina* and “*Thiomonas arsenivorans*” be reclassified as strains of *Thiomonas delicata*, and emended description of *Thiomonas delicata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2816–2821. doi:10.1099/ijs.0.023408-0
- Battaglia-Brunet, F., Crouzet, C., Burnol, A., Coulon, S., Morin, D., Joulain, C., 2012. Precipitation of arsenic sulphide from acidic water in a fixed-film bioreactor. *Water Research* 46, 3923–3933. doi:10.1016/j.watres.2012.04.035
- Belzile, N., Chen, Y.-W., Wang, Z., 2001. Oxidation of antimony (III) by amorphous iron and manganese oxyhydroxides. *Chemical Geology* 174, 379–387. doi:10.1016/S0009-2541(00)00287-4
- Belzile, N., Chen, Y.-W., 2017. Thallium in the environment: A critical review focused on natural waters, soils, sediments and airborne particles. *Applied Geochemistry* 84, 218–243. doi:10.1016/j.apgeochem.2017.06.013
- Bentley, R., Chasteen, T.G., 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 250–271. doi:10.1128/mmlr.66.2.250-271.2002
- Benzerara, K., Morin, G., Yoon, T.H., Miot, J., Tyliszczak, T., Casiot, C., Bruneel, O., Farges, F., Brown, G.E., 2008. Nanoscale study of As biomineralization in an acid mine drainage system. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 3949–3963. doi:10.1016/j.gca.2008.05.046

- Bertin, P.N., Heinrich-Salmeron, A., Pelletier, E., Goulhen-Chollet, F., Arsène-Ploetze, F., Gallien, S., Lauga, B., Casiot, C., Calteau, A., Vallenet, D., Bonnefoy, V., Bruneel, O., Chane-Woon-Ming, B., Cleiss-Arnold, J., Duran, R., Elbaz-Poulichet, F., Fonknechten, N., Giloteaux, L., Halter, D., Koechler, S., Marchal, M., Mornico, D., Schaeffer, C., Smith, A.A.T., Van Dorsselaer, A., Weissenbach, J., Médigue, C., Le Paslier, D., 2011. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *ISME J* 5, 1735–1747. doi:10.1038/ismej.2011.51
- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., May, T.W., Church, S.E., Kimball, B.A., 2001. Bioavailability of metals in stream food webs and hazards to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in the upper Animas River watershed, Colorado. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 48–59. doi:10.1007/s002440010147
- Bigam, J.M., Schwertmann, U., Traina, S.J., Winland, R.L., Wolf, M., 1996. Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60, 2111–2121. doi:10.1016/0016-7037(96)00091-9
- Bird, L.J., Bonnefoy, V., Newman, D.K., 2011. Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends Microbiol.* 19, 330–340. doi:10.1016/j.tim.2011.05.001
- Bissen, M., Frimmel, F.H., 2003. Arsenic — a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31, 9–18. doi:10.1002/ahch.200390025
- Blumenstein, E.P., Volberding, J., Gusek, J., 2008. Designing a Biochemical Reactor for Selenium and Thallium Removal, from Bench Scale Testing Through Pilot Construction, Proceedings America Society of Mining and Reclamation, 2008 pp 148-179. doi:10.21000/JASMR08010148
- Bobrowicz, P., S, U., 1998. Arsenical - induced transcriptional activation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 and ACR3 genes requires the presence of the ACR1 gene product. *Cellular and Molecular Biology Letters* 1.
- Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
- Bonnefoy, V., Holmes, D.S., 2012. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environmental Microbiology* 14, 1597–1611. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02626.x
- Boonstra, J., van Lier, R., Janssen, G., Dijkman, H., Buisman, C.J.N., 1999. Biological treatment of acid mine drainage, in: Amils, R., Ballester, A. (Eds.), *Process Metallurgy, Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21 Century - Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium*. Elsevier, pp. 559–567. doi:10.1016/S1572-4409(99)80145-X
- Brantner, J.S., Haake, Z.J., Burwick, J.E., Menge, C.M., Hotchkiss, S.T., Senko, J.M., 2014. Depth-dependent geochemical and microbiological gradients in Fe(III) deposits resulting from coal mine-derived acid mine drainage. *Front Microbiol* 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00215
- Bray, J., Broady, P., Niyogi, D., Harding, J., 2008. Periphyton communities in New Zealand streams impacted by acid mine drainage. *Marine and Freshwater Research - MAR FRESHWATER RES* 59. doi:10.1071/MF08146
- Briones-Gallardo, R., Escot-Espinoza, V.M., Cervantes-González, E., 2017. Removing arsenic and hydrogen sulfide production using arsenic-tolerant sulfate-reducing bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 14, 609–622. doi:10.1007/s13762-016-1174-1
- Brown, M., Barley, B., Wood, H., 2002. *Minewater Treatment*. IWA Publishing.
- Brown, J.F., Jones, D.S., Mills, D.B., Macalady, J.L., Burgos, W.D., 2011. Application of a depositional facies model to an acid mine drainage site. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 545–554. doi:10.1128/AEM.01550-10
- Bru, K., 2006. Etat de l'art des procédés de récupération sélective et de valorisation des métaux présents dans les Drainages Miniers Acides des mines métalliques. BRGM/RP-54910-FR, 79 p.
- Bruneel, O., Personné, J.-C., Casiot, C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Mahler, B.J., Le Flèche, A., Grimont, P. a. D., 2003. Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France). *J. Appl. Microbiol.* 95, 492–499.
- Bruneel, O., Duran, R., Koffi, K., Casiot, C., Fourçans, A., Elbaz-Poulichet, F., Personné, J.-C., 2005. Microbial Diversity in a Pyrite-Rich Tailings Impoundment (Carnoulès, France). *Geomicrobiology Journal* 22, 249–257. doi:10.1080/01490450590947805
- Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Personné, J.-C., 2006. Diversity of Microorganisms in Fe-As-Rich Acid Mine Drainage Waters of Carnoulès, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 551–556. doi:10.1128/AEM.72.1.551-556.2006
- Bruneel, O., Volant, A., Gallien, S., Chaumande, B., Casiot, C., Carapito, C., Bardil, A., Morin, G., Brown, G.E., Personné, C.J., Le Paslier, D., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Bertin, P.N., Elbaz-Poulichet, F., Arsène-Ploetze,

- F., 2011. Characterization of the active bacterial community involved in natural attenuation processes in arsenic-rich creek sediments. *Microb. Ecol.* 61, 793–810. doi:10.1007/s00248-011-9808-9
- Bruneel, O., Héry, M., Laroche, E., Dahmani, I., Fernandez-Rojo, L., Casiot, C., 2017. Microbial transformations of Arsenic: From metabolism to bioremediation. In: *Metal-Microbe interactions and bioremediation: Principle and applications for toxic metals*, Ed. Surajit Das and Hirak R. Dash, Taylor & Francis, CRC Press Book.
- Brunet J.F., Coste, B., 2000. Bibliographie préliminaire à la gestion des DMA de Rosia Poieni (Roumanie). Rap. BRGM RP50626-FR, 116p.
- Bryan, C.G., Marchal, M., Battaglia-Brunet, F., Kugler, V., Lemaitre-Guillier, C., Lièvremon, D., Bertin, P.N., Arsène-Ploetze, F., 2009. Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes. *BMC Microbiol.* 9, 127. doi:10.1186/1471-2180-9-127
- Buddhawong, S., Kusch, P., Mattusch, J., Wiessner, A., Stottmeister, U., 2005. Removal of Arsenic and Zinc Using Different Laboratory Model Wetland Systems. *Engineering in Life Sciences* 5, 247–252. doi:10.1002/elsc.200520076
- Cain, D., Carter, J., Fend, S., Luoma, S., Alpers, C., Taylor, H., 2000. Metal exposure in a benthic macroinvertebrate, *Hydropsyche californica*, related to mine drainage in the Sacramento River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences - CAN J FISHERIES AQUAT SCI* 57, 380–390. doi:10.1139/cjfas-57-2-380
- Campanella, B., Onor, M., D’Ulivo, A., Giannechini, R., D’Orazio, M., Petrini, R., Bramanti, E., 2016. Human exposure to thallium through tap water: A study from Valdicastello Carducci and Pietrasanta (northern Tuscany, Italy). *Science of The Total Environment* 548–549, 33–42. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.010
- Campanella, B., Casiot, C., Onor, M., Perotti, M., Petrini, R., Bramanti, E., 2017. Thallium release from acid mine drainages: Speciation in river and tap water from Valdicastello mining district (northwest Tuscany). *Talanta* 171, 255–261. doi:10.1016/j.talanta.2017.05.009
- Campbell, L.L., Kasprzycki, M.A., Postgate, J.R., 1966. *Desulfovibrio africanus* sp. n., a New Dissimilatory Sulfate-reducing Bacterium. *J Bacteriol* 92, 1122–1127.
- Cancès, B., Juillot, F., Morin, G., Laperche, V., Alvarez, L., Proux, O., Hazemann, J.-L., Brown, G.E., Calas, G., 2005. XAS Evidence of As(V) Association with Iron Oxyhydroxides in a Contaminated Soil at a Former Arsenical Pesticide Processing Plant. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9398–9405. doi:10.1021/es050920n
- Candy, R.M., Blight, K.R., Ralph, D.E., 2009. Specific iron oxidation and cell growth rates of bacteria in batch culture. *Hydrometallurgy* 98, 148–155. doi:10.1016/j.hydromet.2009.04.013
- Carlson-Gunnoe, N.E., Law, C.B., Bissonnette, G.K., 1983. *In situ* persistence of indicator bacteria in streams polluted with acid mine drainage. *Water Research* 17, 1119–1124. doi:10.1016/0043-1354(83)90052-0
- Casiot, C., Morin, G., Juillot, F., Bruneel, O., Personné, J.-C., Leblanc, M., Duquesne, K., Bonnefoy, V., Elbaz-Poulichet, F., 2003. Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Research* 37, 2929–2936. doi:10.1016/S0043-1354(03)00080-0
- Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., 2004. Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoulès, France). *Sci. Total Environ.* 320, 259–267. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.08.004
- Casiot, C., Egal, M., Bruneel, O., Verma, N., Parmentier, M., Elbaz-Poulichet, F., 2011. Predominance of Aqueous Tl(I) Species in the River System Downstream from the Abandoned Carnoulès Mine (Southern France). *Environ. Sci. Technol.* 45, 2056–2064. doi:10.1021/es102064r
- Castro, J.M., Wielinga, B.W., Gannon, J.E., Moore, J.N., 1999. Stimulation of Sulfate-Reducing Bacteria in Lake Water from a Former Open-Pit Mine through Addition of Organic Wastes. *Water Environment Research* 71, 218–223.
- Challenger, F., 1945. Biological Methylation. *Chem. Rev.* 36, 315–361. doi:10.1021/cr60115a003
- Charles N., Dupuy J.-J., Christmann P., Galin R., Guillon D., 2017. Industrie minérale et activité minière en France. Collection « La mine en France ». Tome 1, 25 p., 5 fig., 2 tabl.
- Chen, A., Lin, C., Lu, W., Wu, Y., Ma, Y., Li, J., Zhu, L., 2007. Well water contaminated by acidic mine water from the Dabaoshan Mine, south China: chemistry and toxicity. *Chemosphere* 70, 248–255. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.041
- Chen, C.-J., Jiang, W.-T., 2012. Influence of waterfall aeration and seasonal temperature variation on the iron and arsenic attenuation rates in an acid mine drainage system. *Applied Geochemistry* 27, 1966–1978. doi:10.1016/j.apgeochem.2012.06.003
- Chen, L., Huang, L., Méndez-García, C., Kuang, J., Hua, Z., Liu, J., Shu, W., 2016. Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystems. *Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology • Environmental biotechnology* 38, 150–158. doi:10.1016/j.copbio.2016.01.013

- Cheng, H., Hu, Y., Luo, J., Xu, B., Zhao, J., 2009. Geochemical processes controlling fate and transport of arsenic in acid mine drainage (AMD) and natural systems. *Journal of Hazardous Materials* 165, 13–26. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.10.070
- Cherry, D.S., Currie, R.J., Soucek, D.J., Latimer, H.A., Trent, G.C., 2001. An integrative assessment of a watershed impacted by abandoned mined land discharges. *Environ. Pollut.* 111, 377–388. doi:10.1016/s0269-7491(00)00093-2
- Chevalier, P., 1996. Technologies d’assainissement et prévention de la pollution, Télé-Université, 439 p.
- Choudhury, B.U., Malang, A., Webster, R., Mohapatra, K.P., Verma, B.C., Kumar, M., Das, A., Islam, M., Hazarika, S., 2017. Acid drainage from coal mining: Effect on paddy soil and productivity of rice. *Sci. Total Environ.* 583, 344–351. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.074
- Christopher, D.H., West, T.S., 1966. Spectrophotometric determination of antimony with bromopyrogallol red. *Talanta* 13, 507–513. doi:10.1016/0039-9140(66)80070-X
- Chung, A.P., Sousa, T., Pereira, A., Morais, P.V., 2014. Microorganisms – Tools for Bioremediation of Uranium Contaminated Environments. *Procedia Earth and Planetary Science, International Workshop “Uranium, Environment and Public Health” (UrEnv 2013)* 8, 53–58. doi:10.1016/j.proeps.2014.05.012
- Church, C.D., Wilkin, R.T., Alpers, C.N., Rye, R.O., McCleskey, R.B., 2007. Microbial sulfate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water. *Geochem Trans* 8, 10. doi:10.1186/1467-4866-8-10
- Cidu, R., Biddau, R., Dore, E., Vacca, A., Marini, L., 2014. Antimony in the soil-water-plant system at the Su Suergiu abandoned mine (Sardinia, Italy): strategies to mitigate contamination. *Sci. Total Environ.* 497–498, 319–331. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.117
- Clarke, W.A., Konhauser, K.O., Thomas, J.C., Bottrell, S.H., 1997. Ferric hydroxide and ferric hydroxysulfate precipitation by bacteria in an acid mine drainage lagoon. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 351–361. doi:10.1016/S0168-6445(97)00017-X
- Cooper, D.A., Pendergrass, E.P., Vorwald, A.J., Mayock, R.L., Brieger, H., 1968. *Pneumoconiosis* among workers in an antimony industry. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 103, 496–508.
- 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. doi:10.1128/AEM.68.2.838-845.2002
- Corstjens, P.L., de Vrind, J.P., Westbroek, P., de Vrind-de Jong, E.W., 1992. Enzymatic iron oxidation by *Leptothrix discophora*: identification of an iron-oxidizing protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 450–454.
- Costa, M.C., Duarte, J.C., 2005. Bioremediation of Acid Mine Drainage Using Acidic Soil and Organic Wastes for Promoting Sulphate-Reducing Bacteria Activity on a Column Reactor. *Water Air Soil Pollut* 165, 325–345. doi:10.1007/s11270-005-6914-7
- Council of the European Communities (76/464/EEC) of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. *Official Journal L* 129, 0023–0029. European Environment Agency. www.eea.europa.eu/policy-documents/council-directive-76-464-eeec (accessed 2.5.19).
- Coup, K.M., Swedlund, P.J., 2015. Demystifying the interfacial aquatic geochemistry of thallium(I): New and old data reveal just a regular cation. *Chemical Geology* 398, 97–103. doi:10.1016/j.chemgeo.2015.02.003
- Crombie, F.M., Weber, P., Lindsay, P., Thomas, D.G., Rutter, G.A., Shi, P., Rossiter, P., Pizey, M.H., 2011. Passive treatment of acid mine drainage using waste mussel shell, Stockton Coal Mine, New Zealand. *Proceedings of the Seventh Australian Workshop on Acid and Metalliferous Drainage, Darwin, Northern Territory* 393–405.
- Cullen, W.R., Reimer, K.J., 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* 89, 713–764. doi:10.1021/cr00094a002
- Dahl, C., Kredich, N.M., Deutzmann, R., Trüper, H.G., 1993. Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1817–1828. doi:10.1099/00221287-139-8-1817
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434–444. doi:10.1016/S0723-2020(99)80053-8
- Dave, S.R., Gupta, K.H., Tipre, D.R., 2008. Characterization of arsenic resistant and arsenopyrite oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* from Hutti gold leachate and effluents. *Bioresour. Technol.* 99, 7514–7520. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.019
- Décret n° 2001-1220 du 20/12/01 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l’exclusion des eaux minérales naturelles | AIDA. aida.ineris.fr/consultation_document/2955 (accessed 2.19.19).

- Deditius, A.P., Utsunomiya, S., Reich, M., Kesler, S.E., Ewing, R.C., Hough, R., Walshe, J., 2011. Trace metal nanoparticles in pyrite. *Ore Geology Reviews*, Nanogeoscience in ore systems research: principles, methods, and applications 42, 32–46. doi:10.1016/j.oregeorev.2011.03.003
- De La Fuente, G. de la, Belanche, A., Girwood, S.E., Pinloche, E., Wilkinson, T., Newbold, C.J., 2014. Pros and Cons of Ion-Torrent Next Generation Sequencing versus Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism T-RFLP for Studying the Rumen Bacterial Community. *PLOS ONE* 9, e101435. doi:10.1371/journal.pone.0101435
- Delavat, F., Lett, M.-C., Lièvremon, D., 2012. Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches. *Biol. Direct* 7, 28. doi:10.1186/1745-6150-7-28
- Delavat, F., Lett, M.-C., Lièvremon, D., 2013. Yeast and bacterial diversity along a transect in an acidic, As-Fe rich environment revealed by cultural approaches. *Sci. Total Environ.* 463–464, 823–828. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.06.023
- Delbès, C., Moletta, R., Godon, J.J., 2000. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction--single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* 2, 506–515.
- DeWeerd, K.A., Mandelco, L., Tanner, R.S., Woese, C.R., Suflita, J.M., 1990. *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 154, 23–30. doi:10.1007/BF00249173
- Dhillon, A., Goswami, S., Riley, M., Teske, A., Sogin, M., 2005. Domain evolution and functional diversification of sulfite reductases. *Astrobiology* 5, 18–29. doi:10.1089/ast.2005.5.18
- DiLoreto, Z.A., Weber, P.A., Olds, W., Pope, J., Trumm, D., Chaganti, S.R., Heath, D.D., Weisener, C.G., 2016a. Novel cost effective full scale mussel shell bioreactors for metal removal and acid neutralization. *Journal of Environmental Management* 183, 601–612. doi:10.1016/j.jenvman.2016.09.023
- DiLoreto, Z.A., Weber, P.A., Weisener, C.G., 2016b. Solid phase characterization and metal deportment in a mussel shell bioreactor for the treatment of AMD, Stockton Coal Mine, New Zealand. *Applied Geochemistry* 67, 133–143. doi:10.1016/j.apgeochem.2016.02.011
- Ding, L., Tan, W.-F., Xie, S.-B., Mumford, K., Lv, J.-W., Wang, H.-Q., Fang, Q., Zhang, X.-W., Wu, X.-Y., Li, M., 2018. Uranium adsorption and subsequent re-oxidation under aerobic conditions by *Leifsonia* sp. - Coated biochar as green trapping agent. *Environ. Pollut.* 242, 778–787. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.050
- Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, 1998. , 330.
- Dixit, S., Hering, J.G., 2003. Comparison of Arsenic(V) and Arsenic(III) Sorption onto Iron Oxide Minerals: Implications for Arsenic Mobility. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4182–4189. doi:10.1021/es030309t
- Dogaru, D., Zobrist, J., Balteanu, D., Popescu, C., Sima, M., Amini, M., Yang, H., 2009. Community perception of water quality in a mining-affected area: a case study for the Certej catchment in the Apuseni Mountains in Romania. *Environ Manage.* 43, 1131–1145. doi:10.1007/s00267-008-9245-9
- Donati, E.R., Sand, W., 2007. *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Springer Science & Business Media.
- Dopson, M., Lindström, E.B., 2004. Analysis of community composition during moderately thermophilic bioleaching of pyrite, arsenical pyrite, and chalcopyrite. *Microb. Ecol.* 48, 19–28. doi:10.1007/s00248-003-2028-1
- Dopson, M., Halinen, A.-K., Rahunen, N., Ozkaya, B., Sahinkaya, E., Kaksonen, A.H., Lindström, E.B., Puhakka, J.A., 2007. Mineral and iron oxidation at low temperatures by pure and mixed cultures of acidophilic microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 1205–1215. doi:10.1002/bit.21312
- Down, C.G., Stocks, J., 1977. Environmental impact of mining. *Environmental impact of mining*.
- Drahota, P., Filippi, M., 2009. Secondary arsenic minerals in the environment: A review. *Environment International* 35, 1243–1255. doi:10.1016/j.envint.2009.07.004
- Drobner, E., Huber, H., Rachel, R., Stetter, K.O., 1992. *Thiobacillus plumbophilus* spec. nov., a novel galena and hydrogen oxidizer. *Arch. Microbiol.* 157, 213–217. doi:10.1007/BF00245152
- Dumova, V.A., Kruglov, Y.V., 2009. A cellulose-decomposing bacterial association. *Microbiology* 78, 234–239. doi:10.1134/S0026261709020155
- Dupont, D., Arnout, S., Jones, P.T., Binnemans, K., 2016. Antimony Recovery from End-of-Life Products and Industrial Process Residues: A Critical Review. *J. Sustain. Metall.* 2, 79–103. doi:10.1007/s40831-016-0043-y
- Duquesne, K., Lebrun, S., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Leblanc, M., Elbaz-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. doi:10.1128/AEM.69.10.6165-6173.2003

- Duquesne, K., Lieutaud, A., Ratouchniak, J., Muller, D., Lett, M.-C., Bonnefoy, V., 2008. Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ. Microbiol.* 10, 228–237. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01447.x
- Dvorak, D.H., Hedin, R.S., Edenborn, H.M., McIntire, P.E., 1992. Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 609–616. doi:10.1002/bit.260400508
- Eary, L.E., 1992. The solubility of amorphous As₂S₃ from 25 to 90°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 2267–2280. doi:10.1016/0016-7037(92)90188-O
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- Edwards, K., Schrenk, M., Hamers, R. & Banfield, J. Microbial oxidation of pyrite: Experiments using microorganisms from an extreme acidic environment. *American Mineralogist* 83, 1444–1453 (1998).
- Edwards, K., Goebel, B., Rodgers, T., Schrenk, M., Gihring, T., Cardona, M., Hu, B., McGuire, M., Hamers, R., Pace, N., Banfield, J.F., 1999. Geomicrobiology of pyrite (FeS₂) dissolution: Case study at Iron Mountain, California. *Geomicrobiology Journal* 16, 155–179.
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Banfield, J.F., 2000. Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: a chemotactic response to sulphur minerals? *Environ. Microbiol.* 2, 324–332.
- Edwards, K.J., Hu, B., Hamers, R.J., Banfield, J.F., 2001. A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. *FEMS Microbiol Ecol* 34, 197–206. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00770.x
- Egal, M., Elbaz-Poulichet, F., Casiot, C., Motelica-Heino, M., Négrel, P., Bruneel, O., Sarmiento, A.M., Nieto, J.M., 2008. Iron isotopes in acid mine waters and iron-rich solids from the Tinto–Odiel Basin (Iberian Pyrite Belt, Southwest Spain). *Chemical Geology* 253, 162–171. doi:10.1016/j.chemgeo.2008.05.006
- Egal, M., Casiot, C., Morin, G., Parmentier, M., Bruneel, O., Lebrun, S., Elbaz-Poulichet, F., 2009. Kinetic control on the formation of tooeleite, schwertmannite and jarosite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains in an As(III)-rich acid mine water. *Chemical Geology* 265, 432–441. doi:10.1016/j.chemgeo.2009.05.008
- Egal, M., Casiot, C., Morin, G., Elbaz-Poulichet, F., Cordier, M.-A., Bruneel, O., 2010. An updated insight into the natural attenuation of As concentrations in Reigous Creek (southern France). *Applied Geochemistry* 25, 1949–1957. doi:10.1016/j.apgeochem.2010.10.012
- Ehrlich, H.L., 2002. *Geomicrobiology*, Fourth Edition, rev. New-York: Marcel Dekker. CRC Press.
- Eickhorst, T., Tippkötter, R., 2008. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1883–1891. doi:10.1016/j.soilbio.2008.03.024
- El Shanawany, S., Foda, N., Hashad, D.I., Salama, N., Sobh, Z., 2017. The potential DNA toxic changes among workers exposed to antimony trioxide. *Environ Sci Pollut Res* 24, 12455–12461. doi:10.1007/s11356-017-8805-z
- Elbaz-Poulichet, F., Bruneel, O., Casiot, C., 2006. The Carnoules mine. Generation of As-rich acid mine drainage, natural attenuation processes and solutions for passive in-situ remediation, in: *Difpolmine (Diffuse Pollution From Mining Activities)*. Montpellier, France.
- Ellis, P.J., Conrads, T., Hille, R., Kuhn, P., 2001. Crystal Structure of the 100 kDa Arsenite Oxidase from *Alcaligenes faecalis* in Two Crystal Forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* 9, 125–132. doi:10.1016/S0969-2126(01)00566-4
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. doi:10.1093/bioinformatics/btx791
- Evangelou, V.P., 1995. *Pyrite Oxidation and Its Control*. CRC Press. doi:10.1201/9780203741641
- Fabisch, M., Freyer, G., Johnson, C.A., Büchel, G., Akob, D.M., Neu, T.R., Küsel, K., 2016. Dominance of ‘*Gallionella capsiferriformans*’ and heavy metal association with *Gallionella*-like stalks in metal-rich pH 6 mine water discharge. *Geobiology* 14, 68–90. doi:10.1111/gbi.12162
- Falagán, C., Johnson, D.B., 2016. *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 206–211. doi:10.1099/ijsem.0.000698
- Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Stein, O.R., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering, Molecular and microbial advances in wetland science* 35, 987–1004. doi:10.1016/j.ecoleng.2008.12.030
- Favas, P., Sarkar, S., Rakshit, D., Perumal, V., Majeti, P., 2016. *Acid Mine Drainages From Abandoned Mines: Hydrochemistry, Environmental Impact, Resource Recovery, and Prevention of Pollution*. pp. 413–462. doi:10.1016/B978-0-12-803837-6.00017-2

- Fekih, I.B., Zhang, C., Li, Y.P., Zhao, Y., Alwathnani, H.A., Saquib, Q., Rensing, C., Cervantes, C., 2018. Distribution of Arsenic Resistance Genes in Prokaryotes. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02473
- Ferguson, S.J., Ingledew, W.J., 2008. Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777, 1471–1479. doi:10.1016/j.bbabi.2008.08.012
- Fernandez Rojo, L., 2017. Vers un traitement passif des drainages miniers acides (DMA) riches en arsenic par oxydation biologique du fer et de l'arsenic. <http://www.theses.fr/2017MONTT153> (accessed 8.23.19).
- Fernandez-Rojo, L., Héry, M., Le Pape, P., Braungardt, C., Desoeuvre, A., Torres, E., Tardy, V., Resongles, E., Laroche, E., Delpoux, S., Joulain, C., Battaglia-Brunet, F., Boisson, J., Grapin, G., Morin, G., Casiot, C., 2017. Biological attenuation of arsenic and iron in a continuous flow bioreactor treating acid mine drainage (AMD). *Water Res.* 123, 594–606. doi:10.1016/j.watres.2017.06.059
- Fernandez-Rojo, L., Casiot, C., Tardy, V., Laroche, E., Le Pape, P., Morin, G., Joulain, C., Battaglia-Brunet, F., Braungardt, C., Desoeuvre, A., Delpoux, S., Boisson, J., Héry, M., 2018. Hydraulic retention time affects bacterial community structure in an As-rich acid mine drainage (AMD) biotreatment process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 9803–9813. doi:10.1007/s00253-018-9290-0
- Fernandez-Rojo, L., Casiot, C., Laroche, E., Tardy, V., Bruneel, O., Delpoux, S., Desoeuvre, A., Grapin, G., Savignac, J., Boisson, J., Morin, G., Battaglia-Brunet, F., Joulain, C., Héry, M., 2019. A field-pilot for passive bioremediation of As-rich acid mine drainage. *Journal of Environmental Management* 232, 910–918. doi:10.1016/j.jenvman.2018.11.116
- Filella, M., Belzile, N., Chen, Y.-W., 2002a. Antimony in the environment: a review focused on natural waters: I. Occurrence. *Earth-Science Reviews* 57, 125–176. doi:10.1016/S0012-8252(01)00070-8
- Filella, M., Belzile, N., Chen, Y.-W., 2002b. Antimony in the environment: a review focused on natural waters: II. Relevant solution chemistry. *Earth-Science Reviews* 59, 265–285. doi:10.1016/S0012-8252(02)00089-2
- Filella, M., Belzile, N., Lett, M.-C., 2007. Antimony in the environment: A review focused on natural waters. III. Microbiota relevant interactions. *Earth-Science Reviews* 80, 195–217. doi:10.1016/j.earscirev.2006.09.003
- Filella, M., Williams, P.A., Belzile, N., 2009a. Antimony in the environment: knowns and unknowns. *Environ. Chem.* 6, 95–105. doi:10.1071/EN09007
- Filella, M., Philippo, S., Belzile, N., Chen, Y., Quentel, F., 2009b. Natural attenuation processes applying to antimony: A study in the abandoned antimony mine in Goesdorf, Luxembourg. *Science of The Total Environment* 407, 6205–6216. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.08.027
- Filella, M., 2010. Alkyl derivatives of antimony in the environment. *Metal ions in life sciences* 7, 267–301. doi:10.1039/BK9781847551771-00267
- Fisher, J.C., Wallschläger, D., Planer-Friedrich, B., Hollibaugh, J.T., 2008. A New Role for Sulfur in Arsenic Cycling. *Environ. Sci. Technol.* 42, 81–85. doi:10.1021/es0713936
- Fowler, T.A., Holmes, P.R., Crundwell, F.K., 1999. Mechanism of Pyrite Dissolution in the Presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 65, 2987–2993.
- Fritz, G., Büchert, T., Huber, H., Stetter, K.O., Kroneck, P.M., 2000. Adenylylsulfate reductases from *Archaea* and *Bacteria* are 1:1 alphabeta-heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes--high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism. *FEBS Lett.* 473, 63–66. doi:10.1016/s0014-5793(00)01500-3
- Fukushi, K., Sasaki, M., Sato, T., Yanase, N., Amano, H., Ikeda, H., 2003. A natural attenuation of arsenic in drainage from an abandoned arsenic mine dump. *Applied Geochemistry* 18, 1267–1278. doi:10.1016/S0883-2927(03)00011-8
- Garrido, A.E., Condori, J., Strosnider, W., Nairn, R., 2009. Acid mine drainage impacts on irrigation water resources, agricultural soils, and potatoes in potosí, Bolivia. 26th Annual Meetings of the American Society of Mining and Reclamation and 11th Billings Land Reclamation Symposium 2009 1. doi:10.21000/JASMR09010486
- Ghose, A.K., 2009. Technology vision 2050 for sustainable mining. *Procedia Earth and Planetary Science*, special issue title: Proceedings of the International Conference on Mining Science & Technology (ICMST2009) 1, 2–6. doi:10.1016/j.proeps.2009.09.003
- Ghosh, M., Shen, J., Rosen, B.P., 1999. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5001–5006. doi:10.1073/pnas.96.9.5001
- Gilmour, C.C., Elias, D.A., Kucken, A.M., Brown, S.D., Palumbo, A.V., Schadt, C.W., Wall, J.D., 2011. Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a Model for Understanding Bacterial Mercury Methylation. *Appl Environ Microbiol* 77, 3938–3951. doi:10.1128/AEM.02993-10
- Giloteaux, L., 2009. Dynamique de la communauté microbienne sulfato-réductrice d'un drainage minier acide riche en arsenic : (Carnoulès, France) (thesis). Pau.

- Giloteaux, L., Duran, R., Casiot, C., Bruneel, O., Elbaz-Poulichet, F., Goñi-Urriza, M., 2013. Three-year survey of sulfate-reducing bacteria community structure in Carnoulès acid mine drainage (France), highly contaminated by arsenic. *FEMS Microbiology Ecology* 83, 724–737. doi:10.1111/1574-6941.12028
- González-Contreras, P., Weijma, J., Buisman, C.J.N., 2012. Continuous bioscorodite crystallization in CSTRs for arsenic removal and disposal. *Water Res.* 46, 5883–5892. doi:10.1016/j.watres.2012.07.055
- González-Toril, E., Aguilera, Á., Souza-Egipsy, V., Pamo, E.L., España, J.S., Amils, R., 2011. Geomicrobiology of La Zarza-Perrunal Acid Mine Effluent (Iberian Pyritic Belt, Spain). *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2685–2694. doi:10.1128/AEM.02459-10
- Goyer, R.A., Clarkson, T.W., 2001. TOXIC EFFECTS OF METALS 57.
- Gray, N.F., 1997. Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. *Environmental Geology* 30, 62–71. doi:10.1007/s002540050133
- Gray, N.F., Delaney, E., 2008. Comparison of benthic macroinvertebrate indices for the assessment of the impact of acid mine drainage on an Irish river below an abandoned Cu-S mine. *Environ. Pollut.* 155, 31–40. doi:10.1016/j.envpol.2007.11.002
- Green, H. H. 1918. Isolation and description of a bacterium causing oxidation of arsenite to arsenate in cattle-dipping baths. *Rep. Dir. Vet. S. Afr.* 6:593–599.
- Greffié, C., Artignan, D., Deschamps, Y., Itard, Y., 2004. Caractérisation des pollutions potentielles relatives aux sites miniers du territoire français métropolitain, Rapport final. BRGM/RP-52816-FR..
- Greig, H.S., Niyogi, D.K., Hogsden, K.L., Jellyman, P.G., Harding, J.S., 2010. Heavy metals: confounding factors in the response of New Zealand freshwater fish assemblages to natural and anthropogenic acidity. *Science of The Total Environment* 408, 3240–3250. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.04.006
- Grettenberger, C.L., Pearce, A.R., Bibby, K.J., Jones, D.S., Burgos, W.D., Macalady, J.L., 2017. Efficient Low-pH Iron Removal by a Microbial Iron Oxide Mound Ecosystem at Scalp Level Run. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00015-17. doi:10.1128/AEM.00015-17
- Grob, M., Wilcke, W., Mestrot, A., 2018. Release and Biomethylation of Antimony in Shooting Range Soils upon Flooding. *Soil Systems* 2, 34. doi:10.3390/soilsystems2020034
- Gross, S., Robbins, E.I., 2000. Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hydrobiologia* 433, 91–109. doi:10.1023/A:1004014603333
- Guo, X., Wang, K., He, M., Liu, Z., Yang, H., Li, S., 2014a. Antimony smelting process generating solid wastes and dust: Characterization and leaching behaviors. *Journal of Environmental Sciences* 26, 1549–1556. doi:10.1016/j.jes.2014.05.022
- Guo, X., Wu, Z., He, M., Meng, X., Jin, X., Qiu, N., Zhang, J., 2014b. Adsorption of antimony onto iron oxyhydroxides: adsorption behavior and surface structure. *J. Hazard. Mater.* 276, 339–345. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.05.025
- Gusek, J., 2005. Design Challenges for Large Scale Sulfate Reducing Bioreactors, in: *Journal American Society of Mining and Reclamation*. pp. 33–44. doi:10.1007/0-387-23079-3_4
- Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2003. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy, Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development* 71, 139–148. doi:10.1016/S0304-386X(03)00150-6
- Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2005. Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. *Sci. Total Environ.* 338, 53–66. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.09.005
- Hallberg, K.B., Coupland, K., Kimura, S., Johnson, 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. doi:10.1128/AEM.72.3.2022-2030.2006
- Hallberg, K.B., 2010. New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy, 18th International Biohydrometallurgy Symposium, IBS2009, Bariloche-Argentina, 13-17 September 2009* 104, 448–453. doi:10.1016/j.hydromet.2009.12.013
- Hallberg, K.B., González-Toril, E., Johnson, D.B., 2010. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14, 9–19. doi:10.1007/s00792-009-0282-y
- Halter, D., Goulhen-Chollet, F., Gallien, S., Casiot, C., Hamelin, J., Gilard, F., Heintz, D., Schaeffer, C., Carapito, C., Van Dorsseleer, A., Tcherkez, G., Arsène-Ploetze, F., Bertin, P.N., 2012. *In situ* proteo-metabolomics reveals metabolite secretion by the acid mine drainage bio-indicator, *Euglena mutabilis*. *ISME J* 6, 1391–1402. doi:10.1038/ismej.2011.198
- Hamamura, N., Fukushima, K., Itai, T., 2013. Identification of antimony- and arsenic-oxidizing bacteria associated with antimony mine tailing. *Microbes Environ.* 28, 257–263. doi:10.1264/jsme2.me12217

- Hamilton, Q.U.I., Lamb, H.M., Hallett, C., Proctor, J.A., 1999. Passive Treatment Systems for the Remediation of Acid Mine Drainage at Wheal Jane, Cornwall. *Water and Environment Journal* 13, 93–103. doi:10.1111/j.1747-6593.1999.tb01014.x
- Han, Y.S., Seong, H.J., Chon, C.-M., Park, J.H., Nam, I.-H., Yoo, K., Ahn, J.S., 2018. Interaction of Sb(III) with iron sulfide under anoxic conditions: Similarities and differences compared to As(III) interactions. *Chemosphere* 195, 762–770. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.133
- Hanert, H.H., 2006. The Genus *Gallionella*, in: *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY, pp. 990–995. doi:10.1007/0-387-30747-8_46
- Hao, O.J., Chen, J.M., Huang, L., Buglass, R.L., 1996. Sulfate-reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26, 155–187. doi:10.1080/10643389609388489
- Hausmann, B., Pelikan, C., Rattei, T., Loy, A., Pester, M., 2019. Long-Term Transcriptional Activity at Zero Growth of a Cosmopolitan Rare Biosphere Member. *mBio* 10, e02189-18. doi:10.1128/mBio.02189-18
- Haydar, S., Haider, H., Nadeem, O., Hussain, G., Zahra, S., 2015. Proposed Model for Wastewater Treatment in Lahore using Constructed Wetlands. *JOURNAL OF FACULTY OF ENGINEERING & TECHNOLOGY* 22, 9-19-19.
- He, F., Jiang, W., Tang, T., Cai, Q., 2015. Assessing impact of acid mine drainage on benthic macroinvertebrates: can functional diversity metrics be used as indicators? *Journal of Freshwater Ecology* 30, 513–524. doi:10.1080/02705060.2014.998730
- He, M., Wang, N., Long, X., Zhang, C., Ma, C., Zhong, Q., Wang, A., Wang, Y., Pervaiz, A., Shan, J., 2019. Antimony speciation in the environment: Recent advances in understanding the biogeochemical processes and ecological effects. *Journal of Environmental Sciences* 75, 14–39. doi:10.1016/j.jes.2018.05.023
- Hedrich, S., Schlömann, M., Johnson, D.B., 2011a. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology (Reading, Engl.)* 157, 1551–1564. doi:10.1099/mic.0.045344-0
- Hedrich, S., Lünsdorf, H., Kleeberg, R., Heide, G., Seifert, J., Schlömann, M., 2011b. Schwertmannite formation adjacent to bacterial cells in a mine water treatment plant and in pure cultures of *Ferrovum myxofaciens*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7685–7692. doi:10.1021/es201564g
- Hedrich, S., Johnson, D.B., 2012. A modular continuous flow reactor system for the selective bio-oxidation of iron and precipitation of schwertmannite from mine-impacted waters. *Bioresour. Technol.* 106, 44–49. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.130
- Hedrich, S., Johnson, D.B., 2013. *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 4018–4025. doi:10.1099/ijs.0.049759-0
- Hedrich, S., and Johnson, D. B. (2014). Remediation and selective recovery of metals from acidic mine waters using novel modular bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12206–12212. doi: 10.1021/es5030367
- Heinzel, E., Hedrich, S., Janneck, E., Glombitza, F., Seifert, J., Schlömann, M., 2009a. Bacterial diversity in a mine water treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 858–861. doi:10.1128/AEM.01045-08
- Heinzel, E., Janneck, E., Glombitza, F., Schlömann, M., Seifert, J., 2009b. Population Dynamics of Iron-Oxidizing Communities in Pilot Plants for the Treatment of Acid Mine Waters. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6138–6144. doi:10.1021/es900067d
- Hengen, T.J., Squillace, M.K., O’Sullivan, A.D., Stone, J.J., 2014. Life cycle assessment analysis of active and passive acid mine drainage treatment technologies. *Resources, Conservation and Recycling* 86, 160–167. doi:10.1016/j.resconrec.2014.01.003
- Herath, I., Vithanage, M., Bundschuh, J., 2017. Antimony as a global dilemma: Geochemistry, mobility, fate and transport. *Environ. Pollut.* 223, 545–559. doi:10.1016/j.envpol.2017.01.057
- Héry, M., Gault, A.G., Rowland, H.A.L., Lear, G., Polya, D.A., Lloyd, J.R., 2008. Molecular and cultivation-dependent analysis of metal-reducing bacteria implicated in arsenic mobilisation in south-east asian aquifers. *Applied Geochemistry, Arsenic in groundwaters of South-East Asia: With emphasis on Cambodia and Vietnam* 23, 3215–3223. doi:10.1016/j.apgeochem.2008.07.003
- Hessler, T., Harrison, S.T.L., Huddy, R.J., 2018. Stratification of microbial communities throughout a biological sulphate reducing up-flow anaerobic packed bed reactor, revealed through 16S metagenomics. *Res. Microbiol.* 169, 543–551. doi:10.1016/j.resmic.2018.09.003
- Hiller, E., Lalinská, B., Chovan, M., Jurkovič, E., Klimko, T., Jankulár, M., Hovorič, R., Šottník, P., Fláková, R., Ženišová, Z., Ondrejková, I., 2012. Arsenic and antimony contamination of waters, stream sediments and soils in the vicinity of abandoned antimony mines in the Western Carpathians, Slovakia. *Applied Geochemistry* 27, 598–614. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.12.005

- Hipp, W.M., Pott, A.S., Thum-Schmitz, N., Faath, I., Dahl, C., Trüper, H.G., 1997. Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology (Reading, Engl.)* 143 (Pt 9), 2891–2902. doi:10.1099/00221287-143-9-2891
- Hobbs, P., Oelofse, S.H.H., Rascher, J., 2008. Management of Environmental Impacts from Coal Mining in the Upper Olifants River Catchment as a Function of Age and Scale. *International Journal of Water Resources Development* 24, 417–431. doi:10.1080/07900620802127366
- Hoefl, S.E., Kulp, T.R., Stolz, J.F., Hollibaugh, J.T., Oremland, R.S., 2004. Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as electron donor: experiments with mono lake water and Isolation of strain MLMS-1, a chemoautotrophic arsenate respirer. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2741–2747. doi:10.1128/aem.70.5.2741-2747.2004
- Hoehn, R.C., Sizemore, D.R., 1977. Acid Mine Drainage (amd) and Its Impact on a Small Virginia Stream1. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* 13, 153–160. doi:10.1111/j.1752-1688.1977.tb02000.x
- Hogsden, K.L., Harding, J.S., 2012. Consequences of acid mine drainage for the structure and function of benthic stream communities: a review. *Freshwater Science* 31, 108–120. doi:10.1899/11-091.1
- Hong, H., Pruden A., Reardon KF. 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J Microbiol Methods* 69:52–64.
- Hong, C., Si, Y., Xing, Y., Li, Y., 2015. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environ Sci Pollut Res* 22, 10788–10799. doi:10.1007/s11356-015-4186-3
- Hossain, M.F., 2006. Arsenic contamination in Bangladesh—An overview. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 113, 1–16. doi:10.1016/j.agee.2005.08.034
- Hovasse, A., Bruneel, O., Casiot, C., Desoeuvre, A., Farasin, J., Héry, M., Van Dorsselaer, A., Carapito, C., Arsène-Ploetze, F., 2016. Spatio-Temporal Detection of the *Thiomonas* Population and the *Thiomonas* Arsenite Oxidase Involved in Natural Arsenite Attenuation Processes in the Carnoulès Acid Mine Drainage. *Front Cell Dev Biol* 4. doi:10.3389/fcell.2016.00003
- Huber, F., Kirchmann, H., 1978. Biomethylation of Tl (I) compounds. *Inorganica Chimica Acta* 29, L249–L250.
- Hudson-Edwards, K.A., Jamieson, H.E., Lottermoser, B.G., 2011. Mine Wastes: Past, Present, Future. *Elements* 7, 375–380. doi:10.2113/gselements.7.6.375
- Hug, S.J., Leupin, O., 2003. Iron-Catalyzed Oxidation of Arsenic(III) by Oxygen and by Hydrogen Peroxide: pH-Dependent Formation of Oxidants in the Fenton Reaction. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2734–2742. doi:10.1021/es026208x
- Huisman, J.L., 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. *Hydrometallurgy, 16th International Biohydrometallurgy Symposium* 83, 106–113. doi:10.1016/j.hydromet.2006.03.017
- Huntsman, B., Solch, J., Porter, M., 1978. Utilization of *Sphagnum* species dominated bog for coal acid mine drainage abatement.
- Hussain, A., Hasan, A., Javid, A., Qazi, J.I., 2016. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. *3 Biotech* 6, 119. doi:10.1007/s13205-016-0437-3
- Inam, M.A., Khan, R., Park, D.R., Ali, B.A., Uddin, A., Yeom, I.T., 2018. Influence of pH and Contaminant Redox Form on the Competitive Removal of Arsenic and Antimony from Aqueous Media by Coagulation. *Minerals* 8, 574. doi:10.3390/min8120574
- Inglede, W.J., 1982. *Thiobacillus Ferrooxidans* the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 683, 89–117. doi:10.1016/0304-4173(82)90007-6
- Ito, A., Miura, J., Ishikawa, N., Umita, T., 2012. Biological oxidation of arsenite in synthetic groundwater using immobilised bacteria. *Water Research* 46, 4825–4831. doi:10.1016/j.watres.2012.06.013
- ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council). 2010. *Biochemical Reactors*. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Mining Waste Team. www.itrcweb.org.
- Jackson, B.E., McInerney, M.J., 2000. *Thiosulfate Disproportionation* by *Desulfotomaculum thermobenzoicum*. *Appl Environ Microbiol* 66, 3650–3653.
- Jackson, C.K., Koch, I., Reimer, K.J., 2013. Mechanisms of dissolved arsenic removal by biochemical reactors: A bench- and field-scale study. *Applied Geochemistry* 29, 174–181. doi:10.1016/j.apgeochem.2012.11.012
- Jackson, C.R., Churchill, P.F., Roden, E.E., 2001. Successional Changes in Bacterial Assemblage Structure During Epilithic Biofilm Development. *Ecology* 82, 555–566. doi:10.1890/0012-9658(2001)082[0555:SCIBAS]2.0.CO;2
- Jacobson, A.R., McBride, M.B., Baveye, P., Steenhuis, T.S., 2005. Environmental factors determining the trace-level sorption of silver and thallium to soils. *Sci. Total Environ.* 345, 191–205. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.10.027

- Jameson, E., Rowe, O.F., Hallberg, K.B., Johnson, D., 2010. Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus* spp. and acidophilic sulfate-reducing bacteria. *Hydrometallurgy* 104, 488–493. doi:10.1016/j.hydromet.2010.03.029
- Javerliat, F., 2014. Étude de la structuration des communautés procaryotes des drainages miniers acides par le séquençage haut débit (phdthesis). Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- Johnson, D.B., Rang, L., 1993. Effects of acidophilic *protozoa* on populations of metal-mobilizing bacteria during the leaching of pyritic coal. *Microbiology*, 139, 1417–1423. doi:10.1099/00221287-139-7-1417
- Johnson, D.B., 1995. Acidophilic microbial communities: Candidates for bioremediation of acidic mine effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation, Biosorption and Bioremediation* 35, 41–58. doi:10.1016/0964-8305(95)00065-D
- Johnson, D.B., 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 307–317. doi:10.1111/j.1574-6941.1998.tb00547.x
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* 154, 466–473. doi:10.1016/S0923-2508(03)00114-1
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2005a. Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of The Total Environment, Bioremediation of Acid Mine Drainage: The Wheal Jane Mine Wetlands Project* 338, 3–14. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.09.002
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2005b. Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Sci. Total Environ.* 338, 81–93. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.09.008
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2008. Carbon, Iron and Sulfur Metabolism in Acidophilic Micro-Organisms, in: Poole, R.K. (Ed.), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 201–255. doi:10.1016/S0065-2911(08)00003-9
- Johnson, D.B., Bacelar-Nicolau, P., Okibe, N., Thomas, A., Hallberg, K.B., 2009. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1082–1089. doi:10.1099/ijs.0.65409-0
- Johnson, D.B., Kanao, T., Hedrich, S., 2012. Redox Transformations of Iron at Extremely Low pH: Fundamental and Applied Aspects. *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00096
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., Hedrich, S., 2014. Uncovering a Microbial Enigma: Isolation and Characterization of the Streamer-Generating, Iron-Oxidizing, Acidophilic Bacterium “*Ferrovum myxofaciens*.” *Appl Environ Microbiol* 80, 672–680. doi:10.1128/AEM.03230-13
- Johnson, D.B., Santos, A.L., Falagán, C., Jones, R.M., Grail, B.M., Holanda, R., Hedrich, S., 2016. Developing Sustainable Biotechnologies for Mine Water Treatment in the 21ST Century 8. *Proceedings IMWA 2016, Freiberg/Germany*.
- Johnson, D.L., Pilson, M.E.Q., 1975. The Oxidation of Arsenite in Seawater. *Environmental Letters* 8, 157–171. doi:10.1080/00139307509437429
- Jones, D.S., Kohl, C., Grettenberger, C., Larson, L.N., Burgos, W.D., Macalady, J.L., 2015. Geochemical Niches of Iron-Oxidizing Acidophiles in Acidic Coal Mine Drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1242–1250. doi:10.1128/AEM.02919-14
- Jones, D.S., Lapakko, K.A., Wenz, Z.J., Olson, M.C., Roepke, E.W., Sadowsky, M.J., Novak, P.J., Bailey, J.V., 2017a. Novel Microbial Assemblages Dominate Weathered Sulfide-Bearing Rock from Copper-Nickel Deposits in the Duluth Complex, Minnesota, USA. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. doi:10.1128/AEM.00909-17
- Jones, D.S., Roepke, E.W., Hua, A.A., Flood, B.E., Bailey, J.V., 2017b. Complete Genome Sequence of *Sulfuriferula* sp. Strain AH1, a Sulfur-Oxidizing Autotroph Isolated from Weathered Mine Tailings from the Duluth Complex in Minnesota. *Genome Announc* 5. doi:10.1128/genomeA.00673-17
- Jones, R.M., Hedrich, S., Johnson, D.B., 2013. *Acidocella aromatica* sp. nov.: an acidophilic heterotrophic alphaproteobacterium with unusual phenotypic traits. *Extremophiles* 17, 841–850. doi:10.1007/s00792-013-0566-0
- Jones, R.M., Barrie Johnson, D., 2015. *Acidithrix ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.; a filamentous and obligately heterotrophic, acidophilic member of the *Actinobacteria* that catalyzes dissimilatory oxido-reduction of iron. *Research in Microbiology* 166, 111–120. doi:10.1016/j.resmic.2015.01.003
- Jong, T., Parry, D.L., 2003. Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research* 37, 3379–3389. doi:10.1016/S0043-1354(03)00165-9
- Jwair, R., Tischler, J.S., Janneck, E., Schlömann, M., 2016. Acid Mine Water Treatment Using Novel Acidophilic Iron-Oxidizing Bacteria of the Genus “*Ferrovum*”: Effect of Oxygen and Carbon Dioxide on Survival 4.

- Kaksonen, A.H., Puhakka, J.A., 2007. Sulfate Reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals. *Engineering in Life Sciences* 7, 541–564. doi:10.1002/elsc.200720216
- Kalin, M., Caetano Chaves, W.L., 2003. Acid reduction using microbiology: treating AMD effluent emerging from an abandoned mine portal. *Hydrometallurgy, Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development* 71, 217–225. doi:10.1016/S0304-386X(03)00159-2
- Kamde, K., Pandey, R.A., Thul, S.T., Dahake, R., Shinde, V.M., Bansiwai, A., 2018. Microbially assisted arsenic removal using *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediated by iron oxidation. *Environmental Technology & Innovation* 10, 78–90. doi:10.1016/j.eti.2018.01.010
- Kaplan, D. I., Mattigod, S. V., 1998. Aqueous geochemistry of thallium. In *Thallium in the Environment*; Nriagu, J. O., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, pp 15-29.
- Karamanev, D.G., Nikolov, L., 1988. Influence of some physicochemical parameters on bacterial activity of biofilm: Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and bioengineering* 31, 295–299. doi:10.1002/bit.260310403
- Karbowska, B., 2016. Presence of thallium in the environment: sources of contaminations, distribution and monitoring methods. *Environ Monit Assess* 188, 640. doi:10.1007/s10661-016-5647-y
- Karbowska, B., Zembruski, W., 2016. Fractionation and Mobility of Thallium in Volcanic Ashes after Eruption of Eyjafjallajökull (2010) in Iceland. *Bull Environ Contam Toxicol* 97, 37–43. doi:10.1007/s00128-016-1831-6
- Karkhoff-Schweizer, R.R., Huber, D.P., Voordouw, G., 1995. Conservation of the genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR. *Appl Environ Microbiol* 61, 290–296.
- Kashyap, D.R., Botero, L.M., Franck, W.L., Hassett, D.J., McDermott, T.R., 2006. Complex Regulation of Arsenite Oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 188, 1081–1088. doi:10.1128/JB.188.3.1081-1088.2006
- Kataoka, T., Mitsunobu, S., Hamamura, N., 2018. Influence of the Chemical Form of Antimony on Soil Microbial Community Structure and Arsenite Oxidation Activity. *Microbes Environ.* 33, 214–221. doi:10.1264/jsme2.ME17182
- Kawano, M., Tomita, K., 2001. Geochemical modeling of bacterially induced mineralization of schwertmannite and jarosite in sulfuric acid spring water. *American Mineralogist* 86, 1156–1165. doi:10.2138/am-2001-1005
- Kazantzis, G., 2000. Thallium in the Environment and Health Effects. *Environmental Geochemistry and Health* 22, 275–280. doi:10.1023/A:1006791514080
- Kefeni, K.K., Msagati, T.A.M., Mamba, B.B., 2017. Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource recovery: A review. *Journal of Cleaner Production* 151, 475–493. doi:10.1016/j.jclepro.2017.03.082
- Kelly, D.P., Wood, A.P., 2015. *Incertae Sedis* VIII. *Thiomonas*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. American Cancer Society, pp. 1–7. doi:10.1002/9781118960608.gbm00960
- Kelly, M., Allison, W.J., Garman, A.R., Symon, C.J., 1988. *Mining and the Freshwater Environment*. Springer Netherlands.
- Khoshnoodi, M., Dipple, G., Baldwin, S., 2013. Mineralogical Study of a Biologically-Based Treatment System That Removes Arsenic, Zinc and Copper from Landfill Leachate. *Minerals* 3, 427–449. doi:10.3390/min3040427
- 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. doi:10.1007/s10532-005-3050-4
- Kinegam, S., Yingprasertchai, T., Tanasupawat, S., Leepipatpiboon, N., Akaracharanya, A., Kim, K.-W., 2008. Isolation and characterization of arsenite-oxidizing bacteria from arsenic-contaminated soils in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 3091–3096. doi:10.1007/s11274-008-9821-4
- Kinnunen, P.H.-M., Puhakka, J.A., 2005. High-rate iron oxidation at below pH 1 and at elevated iron and copper concentrations by a *Leptospirillum ferriphilum* dominated biofilm. *Process Biochemistry* 40, 3536–3541. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.050
- Kolmert, Å., Johnson, D.B., 2001. Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 76, 836–843. doi:10.1002/jctb.453
- Koschorreck, M., 2008. Microbial sulphate reduction at a low pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 329–342. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00482.x
- Krachler, M., Zheng, J., Koerner, R., Zdanowicz, C., Fisher, D., Shoty, W., 2005. Increasing atmospheric antimony contamination in the northern hemisphere: snow and ice evidence from Devon Island, Arctic Canada. *J Environ Monit* 7, 1169–1176. doi:10.1039/b509373b
- Krafft, T., Macy, J.M., 1998. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.* 255, 647–653. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2550647.x

- Kruger, M.C., Bertin, P.N., Heipieper, H.J., Arsène-Ploetze, F., 2013. Bacterial metabolism of environmental arsenic--mechanisms and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3827–3841. doi:10.1007/s00253-013-4838-5
- Kuang, J., Huang, L., Chen, L., Hua, Z., Li, S., Hu, M., Li, J.-T., Shu, W., 2013. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *ISME J* 7, 1038–1050. doi:10.1038/ismej.2012.139
- Kupka, D., Rzhapishevskaya, O.I., Dopson, M., Lindström, E.B., Karnachuk, O.V., Tuovinen, O.H., 2007. Bacterial oxidation of ferrous iron at low temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 1470–1478. doi:10.1002/bit.21371
- Kuyucak, N., St-Germain, P., 1994. *In situ* treatment of acid mine drainage by sulphate reducing bacteria in open pits: scale-up experiences. doi:10.21000/jasmr94020303
- Kuyucak, N., Chabot, F., Martschuk, J., 2006. Successful implementation and operation of a passive treatment system in an extremely cold climate, northern Quebec, Canada. *Journal American Society of Mining and Reclamation* 2006. doi:10.21000/JASMR06020980
- Lai, C.Y., Wen, L.L., Zhang, Y., Luo, S.S., Wang, Q.Y., Luo, Y.H., Chen, R., Yang, X., Rittmann, B.E., Zhao, H.P., 2016. Autotrophic antimonate bio-reduction using hydrogen as the electron donor. *Water Res.* 88, 467–474. doi:10.1016/j.watres.2015.10.042
- Lan, B., Wang, Y., Wang, X., Zhou, X., Kang, Y., Li, L., 2016. Aqueous arsenic (As) and antimony (Sb) removal by potassium ferrate. *Chemical Engineering Journal* 292, 389–397. doi:10.1016/j.cej.2016.02.019
- Laroche, E., Casiot, C., Fernandez-Rojo, L., Desoeuvre, A., Tardy, V., Bruneel, O., Battaglia-Brunet, F., Jouliau, C., Héry, M., 2018. Dynamics of Bacterial Communities Mediating the Treatment of an As-Rich Acid Mine Drainage in a Field Pilot. *Front Microbiol* 9, 3169. doi:10.3389/fmicb.2018.03169
- Larsen, O., Lien, T., Birkeland, N.K., 1999. Dissimilatory sulfite reductase from *Archaeoglobus profundus* and *Desulfotomaculum thermocisternum*: phylogenetic and structural implications from gene sequences. *Extremophiles* 3, 63–70.
- Larsson, L., Olsson, G., Hoist, O., Karlsson, H.T., 1993. Oxidation of pyrite by *Acidithiobacillus brierleyi*: Importance of close contact between the pyrite and the microorganisms. *Biotechnol Lett* 15, 99–104. doi:10.1007/BF00131561
- Lauwers, L.F., Roelants, A., Rosseel, P.M., Heyndrickx, B., Baute, L., 1990. Oral antimony intoxications in man. *Critical Care Medicine* 18, 324.
- Le Pape, P., Battaglia-Brunet, F., Parmentier, M., Jouliau, C., Gassaud, C., Fernandez-Rojo, L., Guigner, J.-M., Ikogou, M., Stetten, L., Olivi, L., Casiot, C., Morin, G., 2017. Complete removal of arsenic and zinc from a heavily contaminated acid mine drainage via an indigenous SRB consortium. *Journal of Hazardous Materials* 321, 764–772. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.09.060
- Lear, G., Niyogi, D., Harding, J., Dong, Y., Lewis, G., 2009. Biofilm Bacterial Community Structure in Streams Affected by Acid Mine Drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3455–3460. doi:10.1128/AEM.00274-09
- Lee, Y.-J., Romanek, C.S., Wiegel, J., 2009. *Desulfosporosinus youngiae* sp. nov., a spore-forming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2743–2746. doi:10.1099/ijs.0.007336-0
- Leff, L.G., Ghosh, S., Johnston, C., Roberto, A., 2015. Microbial Remediation of Acid Mine Drainage, in: *Microbiology for Minerals, Metals, Materials and the Environment*. pp. 453–475. doi:10.1201/b18124-19
- Legendre, P., Gallagher, E.D., 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129, 271–280. doi:10.1007/s004420100716
- Lehr, C.R., Kashyap, D.R., McDermott, T.R., 2007. New Insights into Microbial Oxidation of Antimony and Arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2386–2389. doi:10.1128/AEM.02789-06
- Lens, P.N.L., Kuenen, J.G., 2001. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Sci Technol* 44, 57–66. doi:10.2166/wst.2001.0464
- Leuz, A.K., Johnson, C., 2005. Oxidation of Sb(III) to Sb(V) by O₂ and H₂O₂ in aqueous solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 1165–1172. doi:10.1016/j.gca.2004.08.019
- Leuz, A.K., Mönch, H., Johnson, C.A., 2006a. Sorption of Sb(III) and Sb(V) to Goethite: Influence on Sb(III) Oxidation and Mobilization. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7277–7282. doi:10.1021/es061284b
- Leuz, A.K., Hug, S.J., Wehrli, B., Johnson, C.A., 2006b. Iron-Mediated Oxidation of Antimony(III) by Oxygen and Hydrogen Peroxide Compared to Arsenic(III) Oxidation. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2565–2571. doi:10.1021/es052059h
- Lewin, G.R., Carlos, C., Chevrette, M.G., Horn, H.A., McDonald, B.R., Stankey, R.J., Fox, B.G., Currie, C.R., 2016. Evolution and Ecology of *Actinobacteria* and Their Bioenergy Applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 235–254. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095748

- Li, J., Wang, Q., Zhang, S., Qin, D., Wang, G., 2013. Phylogenetic and genome analyses of antimony-oxidizing bacteria isolated from antimony mined soil. *International Biodeterioration & Biodegradation, Geomicrobial Ecotoxicology* 76, 76–80. doi:10.1016/j.ibiod.2012.06.009
- Li, J., Wang, Q., Li, M., Yang, B., Shi, M., Guo, W., McDermott, T.R., Rensing, C., Wang, G., 2015. Proteomics and Genetics for Identification of a Bacterial Antimonite Oxidase in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5980–5989. doi:10.1021/es506318b
- Li, J., Wang, Q., Oremland, R.S., Kulp, T.R., Rensing, C., Wang, G., 2016. Microbial Antimony Biogeochemistry: Enzymes, Regulation, and Related Metabolic Pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5482–5495. doi:10.1128/AEM.01375-16
- Li, J., Yang, B., Shi, M., Yuan, K., Guo, W., Li, M., Wang, G., 2017a. Effects upon metabolic pathways and energy production by Sb(III) and As(III)/Sb(III)-oxidase gene *aioA* in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *PLOS ONE* 12, e0172823. doi:10.1371/journal.pone.0172823
- Li, J., Yang, B., Shi, M., Yuan, K., Guo, W., Wang, Q., Wang, G., 2017b. Abiotic and biotic factors responsible for antimonite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *Scientific Reports* 7, 43225. doi:10.1038/srep43225
- Li, J., Yu, H., Wu, X., Shen, L., Liu, Y., Qiu, G., Zeng, W., Yu, R., 2018. Novel Hyper Antimony-Oxidizing Bacteria Isolated from Contaminated Mine Soils in China. *Geomicrobiology Journal* 35, 713–720. doi:10.1080/01490451.2018.1454556
- Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of The Total Environment* 468–469, 908–932. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.018
- Lialikova, N.N., 1974. *Stibiobacter senarmontii*--a new microorganism oxidizing antimony. *Mikrobiologiya* 43, 941–948.
- Lin, C., Lu, W., Wu, Y., 2005. Agricultural soils irrigated with acidic mine water: Acidity, heavy metals, and crop contamination. *Australian Journal of Soil Research - AUST J SOIL RES* 43. doi:10.1071/SR04148
- Lin, T.-S., Nriagu, J., 1998. Revised Hydrolysis Constants for Thallium(I) and Thallium(III) and the Environmental Implications. *Journal of the Air & Waste Management Association* 48, 151–156. doi:10.1080/10473289.1998.10463658
- Lin, T.-S., Nriagu, J., 1999. Thallium Speciation in the Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3394–3397. doi:10.1021/es981096o
- Lindsay, M.B.J., Moncur, M.C., Bain, J.G., Jambor, J.L., Ptacek, C.J., Blowes, D.W., 2015. Geochemical and mineralogical aspects of sulfide mine tailings. *Applied Geochemistry, Environmental Geochemistry of Modern Mining* 57, 157–177. doi:10.1016/j.apgeochem.2015.01.009
- Liu, F., Zhang, G., Liu, S., Fu, Z., Chen, J., Ma, C., 2018. Bioremoval of arsenic and antimony from wastewater by a mixed culture of sulfate-reducing bacteria using lactate and ethanol as carbon sources. *International Biodeterioration & Biodegradation* 126, 152–159. doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.011
- Liu, J., Lippold, H., Wang, J., Lippmann-Pipke, J., Chen, Y., 2011. Sorption of thallium(I) onto geological materials: Influence of pH and humic matter. *Chemosphere* 82, 866–871. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.089
- Liu, J., Yin, M., Zhang, W., Tsang, D.C.W., Wei, X., Zhou, Y., Xiao, T., Wang, J., Dong, X., Sun, Y., Chen, Y., Li, H., Hou, L., 2019. Response of microbial communities and interactions to thallium in contaminated sediments near a pyrite mining area. *Environ. Pollut.* 248, 916–928. doi:10.1016/j.envpol.2019.02.089
- Lizama, K., Fletcher, T., Sun, G., 2011. Removal processes for arsenic in constructed wetlands. *Chemosphere* 84, 1032–43. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.04.022
- Lizama-Allende, K., McCarthy, D.T., Fletcher, T.D., 2014. The influence of media type on removal of arsenic, iron and boron from acidic wastewater in horizontal flow wetland microcosms planted with *Phragmites australis*. *Chemical Engineering Journal* 246, 217–228. doi:10.1016/j.cej.2014.02.035
- Lizama-Allende, K., Jaque, I., Ayala, J., Montes-Atenas, G., Leiva, E., 2018. Arsenic Removal Using Horizontal Subsurface Flow Constructed Wetlands: A Sustainable Alternative for Arsenic-Rich Acidic Waters. *Water* 10, 1447. doi:10.3390/w10101447
- Lloyd, J.R., Gault, A.G., Héry, M., MacRae, J.D., 2011. Microbial Transformations of Arsenic in the Subsurface. *Microbial Metal and Metalloid Metabolism* 77–90. doi:10.1128/9781555817190.ch5
- Logan, M.V., Reardon, K.F., Figueroa, L.A., McLain, J.E.T., Ahmann, D.M., 2005. Microbial community activities during establishment, performance, and decline of bench-scale passive treatment systems for mine drainage. *Water Research* 39, 4537–4551. doi:10.1016/j.watres.2005.08.013

- López-Gutiérrez, J.C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catroux, G., Philippot, L., 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 57, 399–407. doi:10.1016/j.mimet.2004.02.009
- Lottermoser, B., 2003. Mine Water, in: Lottermoser, B. (Ed.), *Mine Wastes: Characterization, Treatment and Environmental Impacts*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 83–141. doi:10.1007/978-3-662-05133-7_3
- Lottermoser, B., 2010. *Mine Wastes: Characterization, Treatment and Environmental Impacts*, 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lowe, S.E., Jain, M.K., Zeikus, J.G., 1993. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiol Rev* 57, 451–509.
- Lowson, R.T., 1982. Aqueous oxidation of pyrite by molecular oxygen. *Chem. Rev.* 82, 461–497. doi:10.1021/cr00051a001
- Loy, A., Duller, S., Baranyi, C., Mussmann, M., Ott, J., Sharon, I., Béjà, O., Le Paslier, D., Dahl, C., Wagner, M., 2009. Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes. *Environ. Microbiol.* 11, 289–299. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01760.x
- Lu, X., Zhang, Y., Liu, C., Wu, M., Wang, H., 2018. Characterization of the antimonite- and arsenite-oxidizing bacterium *Bosea* sp. AS-1 and its potential application in arsenic removal. *J. Hazard. Mater.* 359, 527–534. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.07.112
- Luo, Q., Tsukamoto, T.K., Zamzow, K.L., Miller, G.C., 2008. Arsenic, Selenium, and Sulfate Removal using an Ethanol-Enhanced Sulfate-Reducing Bioreactor. *Mine Water Environ* 27, 100–108. doi:10.1007/s10230-008-0032-x
- Lyautey, E., Jackson, C.R., Cayrou, J., Rols, J.-L., Garabétian, F., 2005. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microb. Ecol.* 50, 589–601. doi:10.1007/s00248-005-5032-9
- Lyew, D., Sheppard, J.D., 1997. Effects of physical parameters of a gravel bed on the activity of sulphate-reducing bacteria in the presence of acid mine drainage. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 70, 223–230. doi:10.1002/(SICI)1097-4660(199711)70:3<223::AID-JCTB762>3.0.CO;2-L
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. van, Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577. doi:10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002
- Macías, F., Caraballo, M.A., Nieto, J.M., Rötting, T.S., Ayora, C., 2012. Natural pretreatment and passive remediation of highly polluted acid mine drainage. *J. Environ. Manage.* 104, 93–100. doi:10.1016/j.jenvman.2012.03.027
- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. doi:10.1093/bioinformatics/btr507
- Magot, M., Caumette, P., Desperrier, J.M., Matheron, R., Dauga, C., Grimont, F., Carreau, L., 1992. *Desulfovibrio longus* sp. nov., a Sulfate-Reducing Bacterium Isolated from an Oil-Producing Well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42, 398–402. doi:10.1099/00207713-42-3-398
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593. doi:10.7717/peerj.593
- Maki, T., Hasegawa, H., Watarai, H., Ueda, K., 2004. Classification for dimethylarsenate-decomposing bacteria using a restrict fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Anal Sci* 20, 61–68. doi:10.2116/analsci.20.61
- Malasarn, D., Keeffe, J.R., Newman, D.K., 2008. Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J. Bacteriol.* 190, 135–142. doi:10.1128/JB.01110-07
- Manaka, M., Yanase, N., Sato, T., Fukushi, K., 2007. Natural attenuation of antimony in mine drainage water. *Geochemical Journal* 41, 17–27. doi:10.2343/geochemj.41.17
- Manlius, N., Battaglia-Brunet, F., Michel, C., 2009. Pollution des eaux par l'arsenic et acceptabilité des procédés de biotraitement. BRGM/RP-57640-FR, 173 p.
- Martin, L.A., Wissocq, A., Benedetti, M.F., Latrille, C., 2018. Thallium (Tl) sorption onto illite and smectite: Implications for Tl mobility in the environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 230, 1–16. doi:10.1016/j.gca.2018.03.016
- Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick, W.H., 1991. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1414–1419. doi:10.1021/es00020a008
- Mathieu-Daudé, F., Welsh, J., Vogt, T., McClelland, M., 1996. DNA rehybridization during PCR: the “Cot effect” and its consequences. *Nucleic Acids Res.* 24, 2080–2086. doi:10.1093/nar/24.11.2080
- Mattes, A., Evans, L., Gould, W., Duncan, W., Glasauer, S., 2011. The long term operation of a biologically based treatment system that removes As, S and Zn from industrial (smelter operation) landfill seepage. *Applied Geochemistry - APPL GEOCHEM* 26, 1886–1896. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.06.012

- Mayeux, B., Fardeau, M.-L., Bartoli-Joseph, M., Casalot, L., Vinsot, A., Labat, M., 2013. *Desulfosporosinus burensis* sp. nov., a spore-forming, mesophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep clay environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 593–598. doi:10.1099/ijs.0.035238-0
- McCarthy, T.S., Humphries, M.S., 2013. Contamination of the water supply to the town of Carolina, Mpumalanga, January 2012. 1 109, 10–10. doi:10.1590/sajs.2013/20120112
- Méndez-García, C., Mesa, V., Sprenger, R.R., Richter, M., Diez, M.S., Solano, J., Bargiela, R., Golyshina, O.V., Manteca, Á., Ramos, J.L., Gallego, J.R., Llorente, I., Martins dos Santos, V.A.P., Jensen, O.N., Peláez, A.I., Sánchez, J., Ferrer, M., 2014. Microbial stratification in low pH oxic and suboxic macroscopic growths along an acid mine drainage. *ISME J* 8, 1259–1274. doi:10.1038/ismej.2013.242
- Méndez-García, C., Peláez, A.I., Mesa, V., Sánchez, J., Golyshina, O.V., Ferrer, M., 2015. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Front Microbiol* 6, 475. doi:10.3389/fmicb.2015.00475
- Meruane, G., Salhe, C., Wiertz, J., Vargas, T., 2002. Novel electrochemical–enzymatic model which quantifies the effect of the solution Eh on the kinetics of ferrous iron oxidation with *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 80, 280–288. doi:10.1002/bit.10371
- Modis, K., Adam, K., Panagopoulos, K., Kontopoulos, A., 1998. Development and validation of a geostatistical model for prediction of acid mine drainage in underground sulphide mines.
- Moeng, K., 2018. Community perceptions on the health risks of acid mine drainage: the environmental justice struggles of communities near mining fields. *Environ Dev Sustain.* doi:10.1007/s10668-018-0149-4
- Mokashi, S.A., Paknikar, K.M., 2002. Arsenic (III) oxidizing *Microbacterium lacticum* and its use in the treatment of arsenic contaminated groundwater. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 258–262.
- Moodley, I., Sheridan, C.M., Kappelmeyer, U., Akcil, A., 2018. Environmentally sustainable acid mine drainage remediation: Research developments with a focus on waste/by-products. *Minerals Engineering* 126, 207–220. doi:10.1016/j.mineng.2017.08.008
- Morales, T.A., Dopson, M., Athar, R., Herbert, R.B., 2005. Analysis of bacterial diversity in acidic pond water and compost after treatment of artificial acid mine drainage for metal removal. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 543–551. doi:10.1002/bit.20421
- Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Elbaz-Poulichet, F., Leblanc, M., Ildefonse, P., Calas, G., 2003. Bacterial Formation of Tooeleite and Mixed Arsenic(III) or Arsenic(V)–Iron(III) Gels in the Carnoulès Acid Mine Drainage, France. A XANES, XRD, and SEM Study. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1705–1712. doi:10.1021/es025688p
- Moses, C.O., Kirk Nordstrom, D., Herman, J.S., Mills, A.L., 1987. Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51, 1561–1571. doi:10.1016/0016-7037(87)90337-1
- Mueller, R.F., 2001. Microbially Mediated Thallium Immobilization in Bench Scale Systems. *Mine Water and the Environment* 20, 17–29. doi:10.1007/s10230-001-8076-1
- Mueller, R.S., Dill, B.D., Pan, C., Belnap, C.P., Thomas, B.C., VerBerkmoes, N.C., Hettich, R.L., Banfield, J.F., 2011. Proteome changes in the initial bacterial colonist during ecological succession in an acid mine drainage biofilm community. *Environmental Microbiology* 13, 2279–2292. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02486.x
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Phung, L.T., Silver, S., 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 311–325. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00617.x
- Müller, A.L., Kjeldsen, K.U., Rattei, T., Pester, M., Loy, A., 2015. Phylogenetic and environmental diversity of *DsrAB*-type dissimilatory (bi)sulfite reductases. *ISME J* 9, 1152–1165. doi:10.1038/ismej.2014.208
- Muller, D., Lièvreumont, D., Simeonova, D.D., Hubert, J.-C., Lett, M.-C., 2003. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant *beta-proteobacterium*. *J. Bacteriol.* 185, 135–141. doi:10.1128/jb.185.1.135-141.2003
- Multani, R.S., Feldmann, T., Demopoulos, G.P., 2016. Antimony in the metallurgical industry: A review of its chemistry and environmental stabilization options. *Hydrometallurgy* 164, 141–153. doi:10.1016/j.hydromet.2016.06.014
- Muyzer, G., Stams, A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 441–454. doi:10.1038/nrmicro1892
- Ñancuqueo, I., Johnson, D.B., 2012. Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. *Microbial Biotechnology* 5, 34–44. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00285.x
- Ñancuqueo, I., Johnson, D.B., 2014. Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low pH sulfidogenic bioreactors. *Hydrometallurgy* 150, 222–226. doi:10.1016/j.hydromet.2014.04.025
- Ñancuqueo, I., Rowe, O.F., Hedrich, S., Johnson, D.B., 2016. Solid and liquid media for isolating and cultivating acidophilic and acid-tolerant sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 363. doi:10.1093/femsle/fnw083
- Neculita, C.-M., Zagury, G.J., Bussièrre, B., 2007. Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs. *J. Environ. Qual.* 36, 1–16. doi:10.2134/jeq2006.0066

- Nemati, M., Harrison, S.T.L., Hansford, G.S., Webb, C., 1998. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. *Biochemical Engineering Journal* 1, 171–190. doi:10.1016/S1369-703X(98)00006-0
- Ness, I., Janin, A., Stewart, K., 2014. Passive Treatment of Mine Impacted Water in Cold Climates: A Review. Yukon Research Centre, Yukon College, pp. 56.
- Nguyen, V.K., Lee, J.-U., 2014. Isolation and Characterization of Antimony-Reducing Bacteria from Sediments Collected in the Vicinity of an Antimony Factory. *Geomicrobiology Journal* 31, 855–861. doi:10.1080/01490451.2014.901440
- Nguyen, V.K., Lee, J.-U., 2015. Antimony-Oxidizing Bacteria Isolated from Antimony-Contaminated Sediment – A Phylogenetic Study. *Geomicrobiology Journal* 32, 50–58. doi:10.1080/01490451.2014.925009
- Nguyen, V.K., Choi, W., Yu, J., Lee, T., 2017. Microbial oxidation of antimonite and arsenite by bacteria isolated from antimony-contaminated soils. *International Journal of Hydrogen Energy, Special Issue on The Asia Biohydrogen and Biorefinery Symposium (ABBS 2016)*, 5-8 October 2016, Jeju Island, South Korea 42, 27832–27842. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.08.056
- Nguyen, V.K., Choi, W., Park, Y., Yu, J., Lee, T., 2018. Characterization of diversified Sb(V)-reducing bacterial communities by various organic or inorganic electron donors. *Bioresour. Technol.* 250, 239–246. doi:10.1016/j.biortech.2017.11.044
- Nikolov, L., Karamanev, D., 1992. Kinetics of the Ferrous Iron Oxidation by Resuspended Cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology Progress* 8, 252–255. doi:10.1021/bp00015a011
- Niyogi, D., Mcknight, D., Lewis, W., 1999. Influences of water and substrate quality for periphyton in a montane stream affected by acid mine drainage. *Limnology and Oceanography - LIMNOL OCEANOGR* 44, 804–809. doi:10.4319/lo.1999.44.3_part_2.0804
- Nordstrom, D.K., Alpers, C.N., 1999. The geochemistry of acid mine waters 133–160.
- Norris, P. R., 1990. Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. In *Microbial Mineral Recovery* (Ehrlich & Brierley Eds). New York: pp. 3-27.
- Norris, P.R., Ingledew, W.J. 1992. Acidophilic bacteria: adaptations and applications. In: Herbert RA and Sharp RJ (eds) *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*, (pp 121–131). Royal Society for Chemistry, Cambridge
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134–139. doi:10.1038/333134a0
- Nriagu, J.O. (Ed.), 1998. *Thallium in the environment*, Wiley series in advances in environmental science and technology. Wiley, New York.
- Obiri, S., Mattah, P.A.D., Mattah, M.M., Armah, F.A., Osaе, S., Adu-kumi, S., Yeboah, P.O., 2016. Assessing the Environmental and Socio-Economic Impacts of Artisanal Gold Mining on the Livelihoods of Communities in the Tarkwa Nsuaem Municipality in Ghana. *Int J Environ Res Public Health* 13, 160. doi:10.3390/ijerph13020160
- Okereke, A., Stevens, S.E., 1991. Kinetics of Iron Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 57, 1052–1056.
- Olsen, N.J., Mountain, B.W., Seward, T.M., 2018. Antimony(III) sulfide complexes in aqueous solutions at 30°C: A solubility and XAS study. *Chemical Geology* 476, 233–247. doi:10.1016/j.chemgeo.2017.11.020
- Oremland, R.S., Hoefft, S.E., Santini, J.M., Bano, N., Hollibaugh, R.A., Hollibaugh, J.T., 2002. Anaerobic Oxidation of Arsenite in Mono Lake Water and by a Facultative, Arsenite-Oxidizing Chemoautotroph, Strain MLHE-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4795–4802. doi:10.1128/AEM.68.10.4795-4802.2002
- Oremland, R.S., Stolz, J.F., 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300, 939–944. doi:10.1126/science.1081903
- Özkaya, B., Kaksonen, A.H., Sahinkaya, E., Puhakka, J.A., 2019. Fluidized bed bioreactor for multiple environmental engineering solutions. *Water Research* 150, 452–465. doi:10.1016/j.watres.2018.11.061
- Paikaray, S., 2015. Arsenic Geochemistry of Acid Mine Drainage. *Mine Water Environ* 34, 181–196. doi:10.1007/s10230-014-0286-4
- Palmer, K., Ronkanen, A.-K., Kløve, B., 2015. Efficient removal of arsenic, antimony and nickel from mine wastewaters in Northern treatment peatlands and potential risks in their long-term use. *Ecological Engineering* 75, 350–364. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.11.045
- Panda, S., Mishra, S., Akcil, A., 2016. Bioremediation of Acidic Mine Effluents and the Role of Sulfidogenic Biosystems: A Mini-Review. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration* 1. doi:10.1007/s41207-016-0008-3
- Pankratov, T.A., Dedysh, S.N., 2010. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov., acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from Sphagnum peat bogs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2951–2959. doi:10.1099/ijs.0.021824-0

- Pat-Espadas, A.M., Loredó Portales, R., Amabilis-Sosa, L.E., Gómez, G., Vidal, G., 2018. Review of Constructed Wetlands for Acid Mine Drainage Treatment. *Water* 10, 1685. doi:10.3390/w10111685
- Peacock, C.L., Moon, E.M., 2012. Oxidative scavenging of thallium by birnessite: Explanation for thallium enrichment and stable isotope fractionation in marine ferromanganese precipitates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 84, 297–313. doi:10.1016/j.gca.2012.01.036
- Peccoud, J., Jacob, C., 1996. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys. J.* 71, 101–108. doi:10.1016/S0006-3495(96)79205-6
- Pereira, I.A.C., Ramos, A.R., Grein, F., Marques, M.C., da Silva, S.M., Venceslau, S.S., 2011. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. *Front Microbiol* 2, 69. doi:10.3389/fmicb.2011.00069
- Pereyra, L.P., Hiibel, S.R., Pruden, A., Reardon, K.F., 2008. Comparison of microbial community composition and activity in sulfate-reducing batch systems remediating mine drainage. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 702–713. doi:10.1002/bit.21930
- Pereyra, L.P., Hiibel, S.R., Riquelme, M.V.P., Reardon, K.F., Pruden, A., 2010. Detection and Quantification of Functional Genes of Cellulose- Degrading, Fermentative, and Sulfate-Reducing Bacteria and Methanogenic Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2192–2202. doi:10.1128/AEM.01285-09
- Peter, A.L.J., Viraraghavan, T., 2005. Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environ Int* 31, 493–501. doi:10.1016/j.envint.2004.09.003
- Pettine, M., Campanella, L., Millero, F.J., 1999. Arsenite oxidation by H₂O₂ in aqueous solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, 2727–2735. doi:10.1016/S0016-7037(99)00212-4
- Planer-Friedrich, B., Scheinost, A.C., 2011. Formation and Structural Characterization of Thioantimony Species and Their Natural Occurrence in Geothermal Waters. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6855–6863. doi:10.1021/es201003k
- Polack, R., Chen, Y.-W., Belzile, N., 2009. Behaviour of Sb(V) in the presence of dissolved sulfide under controlled anoxic aqueous conditions. *Chemical Geology* 262, 179–185. doi:10.1016/j.chemgeo.2009.01.008
- Potkonjak, V., Pavlovich, M., 1983. Antimoniosis: a particular form of pneumoconiosis. I. Etiology, clinical and X-ray findings. *Int Arch Occup Environ Health* 51, 199–207.
- Prévost-Bouré, N.C., Christen, R., Dequiedt, S., Mougé, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L., 2011. Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR. *PLOS ONE* 6, e24166. doi:10.1371/journal.pone.0024166
- Pruden, A., Messner, N., Pereyra, L., Hanson, R.E., Hiibel, S.R., Reardon, K.F., 2007. The effect of inoculum on the performance of sulfate-reducing columns treating heavy metal contaminated water. *Water Research* 41, 904–914. doi:10.1016/j.watres.2006.11.025
- Qi, P., Pichler, T., 2017. Competitive adsorption of As(III), As(V), Sb(III) and Sb(V) onto ferrihydrite in multi-component systems: Implications for mobility and distribution. *Journal of Hazardous Materials* 330, 142–148. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.02.016
- Qin, J., Rosen, B.P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S., Rensing, C., 2006. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2075–2080. doi:10.1073/pnas.0506836103
- Qiu, R., Zhao, B., Liu, J., Huang, X., Li, Q., Brewer, E., Wang, S., Shi, N., 2009. Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. *J. Hazard. Mater.* 164, 1310–1315. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.039
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D., Bonnefoy, V., 2009. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC genomics* 10, 394. doi:10.1186/1471-2164-10-394
- Quatrini, R., Johnson, D.B., 2019. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Trends in Microbiology* 27, 282–283. doi:10.1016/j.tim.2018.11.009
- Quéméneur, M., Heinrich-Salmeron, A., Muller, D., Lièvreumont, D., Jauzein, M., Bertin, P.N., Garrido, F., Joulain, C., 2008. Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4567–4573. doi:10.1128/AEM.02851-07
- Rabus, R., Hansen, T.A., Widdel, F., 2006. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*. Springer New York, New York, NY, pp. 659–768. doi:10.1007/0-387-30742-7_22
- Rabus, R., Venceslau, S.S., Wöhlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J.D., Pereira, I.A.C., 2015. Chapter Two - A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing

- Prokaryotes, in: Poole, R.K. (Ed.), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 55–321. doi:10.1016/bs.ampbs.2015.05.002
- Rakotonimaro, T.V., 2017. *Prétraitement et traitement passif du drainage minier acide ferrifère* (phd). Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, Rouyn-Noranda.
- Ralph, L., Twiss, M.R., 2002. Comparative Toxicity of Thallium(I), Thallium(III), and Cadmium(II) to the Unicellular Alga *Chlorella* Isolated from Lake Erie. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 261–268. doi:10.1007/s001280247
- Rangel, W. de M., de Oliveira Longatti, S.M., Ferreira, P.A.A., Bonaldi, D.S., Guimarães, A.A., Thijs, S., Weyens, N., Vangronsveld, J., Moreira, F.M.S., 2017. *Leguminosae* native nodulating bacteria from a gold mine As-contaminated soil: Multi-resistance to trace elements, and possible role in plant growth and mineral nutrition. *Int J Phytoremediation* 19, 925–936. doi:10.1080/15226514.2017.1303812
- Rasool, A., Xiao, T., 2018. Response of microbial communities to elevated thallium contamination in river sediments. *Geomicrobiology Journal*. doi:10.1080/01490451.2018.1481159
- Ratzke, C., Gore, J., 2018. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLoS Biol.* 16, e2004248. doi:10.1371/journal.pbio.2004248
- Rawlings, D.E., Tributsch, H., Hansford, G.S., 1999. 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. doi:10.1099/13500872-145-1-5
- Reisinger, R.W., Gusek, J.J., Richmond, T.C. 2000. Pilot-scale passive treatment test of contaminated waters at the historic Ferris-Haggarty mine, Wyoming. In: *Proc. of the 5th Int. Conf. on Acid Rock Drainage (ICARD)*, Denver, CO, pp. 1071–1077
- Resongles, E., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Freyrier, R., Bruneel, O., Piot, C., Delpoux, S., Volant, A., Desoeuvre, A., 2013. Fate of Sb(V) and Sb(III) species along a gradient of pH and oxygen concentration in the Carnoulès mine waters (Southern France). *Environ Sci Process Impacts* 15, 1536–1544. doi:10.1039/c3em00215b
- Rhine, E.D., Phelps, C.D., Young, L.Y., 2006. Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environ. Microbiol.* 8, 899–908. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00977.x
- Ritchie, A.I.M., 1994. The waste-rock environment. Ottawa: pp.133-161. In *Short Course Handbook on Environmental Geochemistry of Sulfide Mine Waste.*, (Jambor & Blowes Eds).
- Rochette, E.A., Bostick, B.C., Li, G., Fendorf, S., 2000. Kinetics of Arsenate Reduction by Dissolved Sulfide. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4714–4720. doi:10.1021/es000963y
- Rodriguez-Freire, L., Moore, S.E., Sierra-Alvarez, R., Root, R.A., Chorover, J., Field, J.A., 2016. Arsenic remediation by formation of arsenic sulfide minerals in a continuous anaerobic bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 113, 522–530. doi:10.1002/bit.25825
- Rodríguez-Mercado, J.J., Altamirano-Lozano, M.A., 2013. Genetic toxicology of thallium: a review. *Drug and Chemical Toxicology* 36, 369–383. doi:10.3109/01480545.2012.710633
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. doi:10.7717/peerj.2584
- Rojas, J.C., Vandecasteele, C., 2007. Influence of mining activities in the North of Potosi, Bolivia on the water quality of the Chayanta River, and its consequences. *Environ Monit Assess* 132, 321–330. doi:10.1007/s10661-006-9536-7
- Roper, A.J., Williams, P.A., Filella, M., 2012. Secondary antimony minerals: Phases that control the dispersion of antimony in the supergene zone. *Geochemistry, Antimony* 72, 9–14. doi:10.1016/j.chemer.2012.01.005
- Rosen, B.P., Liu, Z., 2009. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environment International, Arsenic geochemistry, transport mechanism in the soil-plant system, human and animal health issues* 35, 512–515. doi:10.1016/j.envint.2008.07.023
- Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Appl Environ Microbiol* 75, 1589–1596. doi:10.1128/AEM.02775-08
- Rowe, O.F., Johnson, D.B., 2008. Comparison of ferric iron generation by different species of acidophilic bacteria immobilized in packed-bed reactors. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 68–77. doi:10.1016/j.syapm.2007.09.001
- Rozanova, E.P., Nazina, T., Galushko, A., 1988. Isolation of a new genus of sulfate-reducing bacteria and description of a new species of this genus, *Desulfomicrobium apsheronum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology* 57, 514–520.
- Rusch, A., Islam, S., Savalia, P., Amend, J.P., 2015. *Burkholderia insulsa* sp. nov., a facultatively chemolithotrophic bacterium isolated from an arsenic-rich shallow marine hydrothermal system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 189–194. doi:10.1099/ijs.0.064477-0

- Rutherford, J.E., Mellow, R.J., 1994. The effects of an abandoned roast yard on the fish and macroinvertebrate communities of surrounding beaver ponds. *Hydrobiologia* 294, 219–228. doi:10.1007/BF00021295
- Rutkowski, T., 2013. Passive treatment of mining influenced wastewater at the standard mine superfund site, Crested Butte, Colorado, USA. Proceedings of the Mine Water Solutions in Extreme Environments, Lima, Peru, April 15–17.
- Sahinkaya, E., Yurtsever, A., Toker, Y., Elcik, H., Cakmaci, M., Kaksonen, A.H., 2015. Biotreatment of As-containing simulated acid mine drainage using laboratory scale sulfate reducing upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Minerals Engineering, Biohydrometallurgy* 75, 133–139. doi:10.1016/j.mineng.2014.08.012
- Sakaguchi, T., Arakaki, A., Matsunaga, T., 2002. *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 215–221. doi:10.1099/00207713-52-1-215
- Saltikov, C.W. 2011. Regulation of arsenic metabolic pathways in prokaryotes. In: Stolz J, Oremland RS (eds). *Microbial Metal and Metalloid Metabolism*. Washington, DC: American Society of Microbiology, 195–210.
- Saltikov, C.W., Newman, D.K., 2003. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10983–10988. doi:10.1073/pnas.1834303100
- Sánchez-Andrea, I., Rodríguez, N., Amils, R., Sanz, J.L., 2011. Microbial Diversity in Anaerobic Sediments at Río Tinto, a Naturally Acidic Environment with a High Heavy Metal Content. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6085–6093. doi:10.1128/AEM.00654-11
- Sánchez-Andrea, I., Sanz, J.L., Bijmans, M.F.M., Stams, A.J.M., 2014. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials, Research Frontiers in Chalcogen Cycle Based Environmental Technologies* 269, 98–109. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.12.032
- Sánchez-Andrea, I., Stams, A.J.M., Hedrich, S., Nancucheo, I., Johnson, D.B., 2015. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. *Extremophiles* 19, 39–47. doi:10.1007/s00792-014-0701-6
- Santegoeds, C.M., Ferdelman, T.G., Muyzer, G., Beer, D. de, 1998. Structural and Functional Dynamics of Sulfate-Reducing Populations in Bacterial Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3731–3739.
- Santini, J.M., vanden Hoven, R.N., 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* 186, 1614–1619. doi:10.1128/jb.186.6.1614-1619.2004
- Santos Jallath, J.E., Romero, F.M., Iturbe Argüelles, R., Cervantes Macedo, A., Goslinga Arenas, J., 2018. Acid drainage neutralization and trace metals removal by a two-step system with carbonated rocks, Estado de Mexico, Mexico. *Environ Earth Sci* 77, 86. doi:10.1007/s12665-018-7248-2
- Schedlbauer, O.F., Heumann, K.G., 1999. Development of an Isotope Dilution Mass Spectrometric Method for Dimethylthallium Speciation and First Evidence of Its Existence in the Ocean. *Anal. Chem.* 71, 5459–5464. doi:10.1021/ac991042c
- Schedlbauer, O.F., Heumann, K.G., 2000. Biomethylation of thallium by bacteria and first determination of biogenic dimethylthallium in the ocean. *Applied Organometallic Chemistry* 14, 330–340. doi:10.1002/(SICI)1099-0739(200006)14:6<330::AID-AOC994>3.0.CO;2-Y
- Schippers, A., Breuker, A., Blazejak, A., Bosecker, K., Kock, D., Wright, T.L., 2010. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy, 18th International Biohydrometallurgy Symposium, IBS2009, Bariloche-Argentina, 13-17 September 2009* 104, 342–350. doi:10.1016/j.hydromet.2010.01.012
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
- Schmidt, H., Eickhorst, T., Tippkötter, R., 2012. Evaluation of tyramide solutions for an improved detection and enumeration of single microbial cells in soil by CARD-FISH. *J. Microbiol. Methods* 91, 399–405. doi:10.1016/j.mimet.2012.09.021
- Sheng, Y., Bibby, K., Grettenberger, C., Kaley, B., Macalady, J.L., Wang, G., Burgos, W.D., 2016. Geochemical and Temporal Influences on the Enrichment of Acidophilic Iron-Oxidizing Bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol* 82, 3611–3621. doi:10.1128/AEM.00917-16
- Sheoran, A.S., Sheoran, V., Choudhary, R.P., 2010. Bioremediation of acid-rock drainage by sulphate-reducing prokaryotes: A review. *Minerals Engineering* 23, 1073–1100. doi:10.1016/j.mineng.2010.07.001
- Sheoran, A.S., Sheoran, V., 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. *Minerals Engineering* 19, 105–116. doi:10.1016/j.mineng.2005.08.006

- Shi, Z., Cao, Z., Qin, D., Zhu, W., Wang, Q., Li, M., Wang, G., 2013. Correlation models between environmental factors and bacterial resistance to antimony and copper. *PLoS ONE* 8, e78533. doi:10.1371/journal.pone.0078533
- Shoty, W., Chen, B., Krachler, M., 2005. Lithogenic, oceanic and anthropogenic sources of atmospheric Sb to a maritime blanket bog, Myrarnar, Faroe Islands. *J Environ Monit* 7, 1148–1154. doi:10.1039/b509928p
- Silver, S., Phung, L.T., 2005. Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 599–608. doi:10.1128/AEM.71.2.599-608.2005
- Singer, P.C., Stumm, W., 1970. Acidic mine drainage: the rate-determining step. *Science* 167, 1121–1123. doi:10.1126/science.167.3921.1121
- Skousen, J., Ziemkiewicz, P., 2005. Performance of 116 passive treatment systems for acid mine drainage. 22nd American Society of Mining and Reclamation Annual National Conference 2005 2. doi:10.21000/JASMR05011100
- Skousen, J., Zipper, C.E., Rose, A., Ziemkiewicz, P.F., Nairn, R., McDonald, L.M., Kleinmann, R.L., 2017. Review of Passive Systems for Acid Mine Drainage Treatment. *Mine Water Environ* 36, 133–153. doi:10.1007/s10230-016-0417-1
- Skousen, J.G., Sexstone, A., Ziemkiewicz, P.F., 2000. Acid Mine Drainage Control and Treatment. *Reclamation of Drastically Disturbed Lands agronomy monograph*, 131–168. doi:10.2134/agronmonogr41.c6
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 17, 517–568. doi:10.1016/S0883-2927(02)00018-5
- Srichandan, H., Mohapatra, R.K., Parhi, P.K., Mishra, S., 2019. Bioleaching approach for extraction of metal values from secondary solid wastes: A critical review. *Hydrometallurgy* 189, 105122. doi:10.1016/j.hydromet.2019.105122
- Stackebrandt, E., Cummins, C.S., Johnson, J.L., 2006. Family *Propionibacteriaceae*: The Genus *Propionibacterium*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer New York, New York, NY, pp. 400–418. doi:10.1007/0-387-30743-5_19
- Stolz, J.F., Oremland, R.S., 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol Rev* 23, 615–627. doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00416.x
- Stolz, J.F., Basu, P., Santini, J.M., Oremland, R.S., 2006. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 107–130. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142053
- Stopnisek, N., Bodenhausen, N., Frey, B., Fierer, N., Eberl, L., Weisskopf, L., 2014. Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil *Burkholderia* populations. *Environ. Microbiol.* 16, 1503–1512. doi:10.1111/1462-2920.12211
- Stottmeister, U., Buddhawong, S., Kusch, P., Wiessner, A., Mattusch, J., 2006. Constructed wetlands and their performance for treatment of water contaminated with arsenic and heavy metals, in: Twardowska, I., Allen, H.E., Häggblom, M.M., Stefaniak, S. (Eds.), *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*, NATO Science Series. Springer Netherlands, pp. 417–432.
- Stumm, W., Morgan, J.J., 1981. *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. Wiley.
- Sullivan, M.R., Gray, N.F., 1992. Evaluation of the fisheries potential of the Avoca catchment.
- Sun, H., Yan, S.C., Cheng, W.S., 2000. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione implication for its mode of action. *Eur. J. Biochem.* 267, 5450–5457. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01605.x
- Sun, J., Zou, X., Ning, Z., Sun, M., Peng, J., Xiao, T., 2012. Culturable microbial groups and thallium-tolerant fungi in soils with high thallium contamination. *Sci. Total Environ.* 441, 258–264. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.09.053
- Sun, J., Zou, X., Xiao, T., Jia, Y., Ning, Z., Sun, M., Liu, Y., Jiang, T., 2015. Biosorption and bioaccumulation of thallium by thallium-tolerant fungal isolates. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 16742–16748. doi:10.1007/s11356-015-4859-y
- Sun, W., Xiao, E., Dong, Y., Tang, S., Krumins, V., Ning, Z., Sun, M., Zhao, Y., Wu, S., Xiao, T., 2016a. Profiling microbial community in a watershed heavily contaminated by an active antimony (Sb) mine in Southwest China. *Sci. Total Environ.* 550, 297–308. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.090
- Sun, W., Xiao, E., Kalin, M., Krumins, V., Dong, Y., Ning, Z., Liu, T., Sun, M., Zhao, Y., Wu, S., Mao, J., Xiao, T., 2016b. Remediation of antimony-rich mine waters: Assessment of antimony removal and shifts in the microbial community of an onsite field-scale bioreactor. *Environ. Pollut.* 215, 213–222. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.008
- Sun, X., Li, B., Han, F., Xiao, E., Xiao, T., Sun, W., 2019. Impacts of Arsenic and Antimony Co-Contamination on Sedimentary Microbial Communities in Rivers with Different Pollution Gradients. *Microb Ecol.* doi:10.1007/s00248-019-01327-5

- Suratman, S., 2016. Gold recovery of refractory sulfide concentrates using direct cyanide leaching with nitrite as an oxidant. *Indonesian Mining Journal* 19, 153–165. doi:10.30556/imj.Vol19.No3.2016.541
- Suzuki, I., Lizama, H.M., Tackaberry, P.D., 1989. Competitive Inhibition of Ferrous Iron Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* by Increasing Concentrations of Cells. *Appl Environ Microbiol* 55, 1117–1121.
- Tardy, V., Casiot, C., Fernandez-Rojo, L., Resongles, E., Desoeuvre, A., Joulain, C., Battaglia-Brunet, F., Héry, M., 2018. Temperature and nutrients as drivers of microbially mediated arsenic oxidation and removal from acid mine drainage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2413–2424. doi:10.1007/s00253-017-8716-4
- Taylor, S.R., McLennan, S.M., 1985. The continental crust: Its composition and evolution.
- Tebbe, C.C., Dohrmann, A.B., Hemkemeyer, M., Näther, A., 2017. Microbial Community Profiling: SSCP and T-RFLP Techniques, in: McGenity, T.J., Timmis, K.N., Nogales, B. (Eds.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Microbial Quantitation, Community Profiling and Array Approaches*, Springer Protocols Handbooks. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 101–126. doi:10.1007/8623_2015_158
- Terry, L.R., Kulp, T.R., Wiatrowski, H., Miller, L.G., Oremland, R.S., 2015. Microbiological Oxidation of Antimony(III) with Oxygen or Nitrate by Bacteria Isolated from Contaminated Mine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 8478–8488. doi:10.1128/AEM.01970-15
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Auclair, J.-C., Bisson, M., Boucher, H., 1982. Évaluation de l'impact de rejets miniers sur des organismes biologiques. INRS-Eau, Québec.
- Thanabalasingam, P., Pickering, W.F., 1990. Specific sorption of antimony (III) by the hydrous oxides of Mn, Fe, and Al. *Water Air Soil Pollut* 49, 175–185. doi:10.1007/BF00279519
- Tischler, J. S., Wiacek, C., Janneck, E., and Schlömann, M. 2014. Bench-scale study of the effect of phosphate on an aerobic iron oxidation plant for mine water treatment. *Water Res.* 48, 345–353. doi: 10.1016/j
- Trumm, D., 2010. Selection of active and passive treatment systems for AMD—flow charts for New Zealand conditions. *New Zealand Journal of Geology and Geophysics* 53, 195–210. doi:10.1080/00288306.2010.500715
- Tsai, S.L., Singh, S., Chen, W., 2009. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Current Opinion in Biotechnology, Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology* 20, 659–667. doi:10.1016/j.copbio.2009.09.013
- Tsukamoto, T.K., Killion, H.A., Miller, G.C., 2004. Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Research* 38, 1405–1418. doi:10.1016/j.watres.2003.12.012
- Twining, B.S., Twiss, M.R., Fisher, N.S., 2003. Oxidation of Thallium by Freshwater Plankton Communities. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2720–2726. doi:10.1021/es026145i
- Tyler, G., Pålsson, A.-M.B., Bengtsson, G., Bååth, E., Tranvik, L., 1989. Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. *Water Air Soil Pollut* 47, 189–215. doi:10.1007/BF00279327
- US EPA. 2009. IRIS Toxicological Review of Thallium And Compounds (Final Report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/635/R-08/001F, 2009.
- US EPA. 2015. Reference Guide to Treatment Technologies for Mining-Influenced Water. www.epa.gov/remedytech/reference-guide-treatment-technologies-mining-influenced-water (accessed 9.17.19).
- US EPA. 1982. Office of the Federal Registration (OFR), Appen-dix A: Priority pollutants. Fed Reg 47:52309, .
- Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR. journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0024166 (accessed 8.28.19).
- Vanden Hoven, R.N., Santini, J.M., 2004. Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1656, 148–155. doi:10.1016/j.bbabi.2004.03.001
- Vandieken, V., Niemann, H., Engelen, B., Cypionka, H., 2017. *Marinisorobacter balticus* gen. nov., sp. nov., *Desulfosporosinus nitroreducens* sp. nov. and *Desulfosporosinus fructosivorans* sp. nov., new spore-forming bacteria isolated from subsurface sediments of the Baltic Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1887–1893. doi:10.1099/ijsem.0.001883
- van Dorst, J., Bissett, A., Palmer, A.S., Brown, M., Snape, I., Stark, J.S., Raymond, B., McKinlay, J., Ji, M., Winsley, T., Ferrari, B.C., 2014. Community fingerprinting in a sequencing world. *FEMS Microbiol Ecol* 89, 316–330. doi:10.1111/1574-6941.12308
- Vasquez, Y.F., Escobar, M.C.M., Neculita, C.M., Arbeli, Z., Roldan, F., 2016a. Biochemical passive reactors for treatment of acid mine drainage: Effect of hydraulic retention time on changes in efficiency, composition of reactive mixture, and microbial activity. *Chemosphere* 153, 244–253. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.03.052

- Vasquez, Y.F., Escobar, M.C.M., Neculita, C.M., Arbeli, Z., Roldan, F., 2016b. Microbial Community Dynamics during the Biochemical Treatment of Acid Mine Drainage under three different Hydraulic Retention Times.
- Vasquez, Y., Escobar, M.C., Saenz, J.S., Quiceno-Vallejo, M.F., Neculita, C.M., Arbeli, Z., Roldan, F., 2018. Effect of hydraulic retention time on microbial community in biochemical passive reactors during treatment of acid mine drainage. *Bioresource Technology* 247, 624–632. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.144
- Velmurugan, P., Myung, H., Govarathanan, M., Yi, Y.-J., Seo, S.-K., Cho, K.-M., Lovanh, N., Oh, B.-T., 2015. Production and characterization of bacterial cellulose by *Leifsonia* sp. CBNU-EW3 isolated from the earthworm, *Eisenia fetida*. *Biotechnol Bioproc E* 20, 410–416. doi:10.1007/s12257-014-0793-y
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D., 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 495–548. doi:10.1128/MMBR.00005-07
- Vink, B.W., 1993. The behaviour of thallium in the (sub) surface environment in terms of Eh and pH. *Chemical Geology* 109, 119–123. doi:10.1016/0009-2541(93)90065-Q
- Voegelin, A., Pfenninger, N., Petrikis, J., Majzlan, J., Plötze, M., Senn, A.-C., Mangold, S., Steininger, R., Göttlicher, J., 2015. Thallium Speciation and Extractability in a Thallium- and Arsenic-Rich Soil Developed from Mineralized Carbonate Rock. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5390–5398. doi:10.1021/acs.est.5b00629
- Volant, A., 2012. Étude des communautés microbiennes (bactéries, archaea et eucaryotes) et de leurs variations spatiotemporelles dans la mine de Carnoulès fortement contaminée en arsenic (thesis). Montpellier 2.
- Volant, A., Bruneel, O., Desoeuvre, A., Héry, M., Casiot, C., Bru, N., Delpoux, S., Fahy, A., Javerliat, F., Bouchez, O., Duran, R., Bertin, P.N., Elbaz-Poulichet, F., Lauga, B., 2014. Diversity and spatiotemporal dynamics of bacterial communities: physicochemical and other drivers along an acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 247–263. doi:10.1111/1574-6941.12394
- Volant, A., Héry, M., Desoeuvre, A., Casiot, C., Morin, G., Bertin, P.N., Bruneel, O., 2016. Spatial Distribution of Eukaryotic Communities Using High-Throughput Sequencing Along a Pollution Gradient in the Arsenic-Rich Creek Sediments of Carnoulès Mine, France. *Microb Ecol* 72, 608–620. doi:10.1007/s00248-016-0826-5
- Vymazal, J., Kröpfelová, L., 2008. *Wastewater Treatment in Constructed Wetlands with Horizontal Sub-Surface Flow*. Springer Science & Business Media.
- Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., Stahl, D.A., 1998. Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *Journal of Bacteriology* 180, 2975–2982.
- Wakao, N., Mishina, M., Sakurai, Y., Shiota, H., 1984. Bacterial pyrite oxidation iii. Adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* cells on solid surfaces and its effect on iron release from pyrite. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 63–77. doi:10.2323/jgam.30.63
- Wallace, S., Parkin, G., Cross, C., 2001. Cold climate wetlands: design and performance. *Water Sci. Technol.* 44, 259–265.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143. doi:10.1002/cyto.990140205
- Wang, D., Zhu, F., Wang, Q., Rensing, C., Yu, P., Gong, J., Wang, G., 2016. Disrupting ROS-protection mechanism allows hydrogen peroxide to accumulate and oxidize Sb(III) to Sb(V) in *Pseudomonas stutzeri* TS44. *BMC Microbiol.* 16, 279. doi:10.1186/s12866-016-0902-5
- Wang, H., Chen, F., Mu, S., Zhang, D., Pan, X., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2013. Removal of antimony (Sb(V)) from Sb mine drainage: Biological sulfate reduction and sulfide oxidation–precipitation. *Bioresource Technology* 146, 799–802. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.002
- Wang, L., Ye, L., Yu, Y., Jing, C., 2018. Antimony Redox Biotransformation in the Subsurface: Effect of Indigenous Sb(V) Respiring Microbiota. *Environ. Sci. Technol.* 52, 1200–1207. doi:10.1021/acs.est.7b04624
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
- Wang, Q., Warelow, T.P., Kang, Y.-S., Romano, C., Osborne, T.H., Lehr, C.R., Bothner, B., McDermott, T.R., Santini, J.M., Wang, G., 2015. Arsenite Oxidase Also Functions as an Antimonite Oxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1959–1965. doi:10.1128/AEM.02981-14
- Wang, X., He, M., Xi, J., Lu, X., 2011. Antimony distribution and mobility in rivers around the world’s largest antimony mine of Xikuangshan, Hunan Province, China. *Microchemical Journal, Antimony: Emerging Global Contaminant in the Environment* 97, 4–11. doi:10.1016/j.microc.2010.05.011

- Wang, Y., Qian, P.-Y., 2009. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLOS ONE* 4, e7401. doi:10.1371/journal.pone.0007401
- Warnken, J., Ohlsson, R., Welsh, D.T., Teasdale, P.R., Chelsky, A., Bennett, W.W., 2017. Antimony and arsenic exhibit contrasting spatial distributions in the sediment and vegetation of a contaminated wetland. *Chemosphere* 180, 388–395. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.142
- Watanabe, T., Kojima, H., Fukui, M., 2015. *Sulfuriferula multivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from a freshwater lake, reclassification of “*Thiobacillus plumbophilus*” as *Sulfuriferula plumbophilus* sp. nov., and description of *Sulfuricellaceae* fam. nov. and *Sulfuricellales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1504–1508. doi:10.1099/ijs.0.000129
- Wehmeier, S., Feldmann, J., 2005. Investigation into antimony mobility in sewage sludge fermentation. *J. Environ. Monit.* 7, 1194–1199. doi:10.1039/B509538G
- Weiner, E.R., 2010. *Applications of Environmental Chemistry: A Practical Guide for Environmental Professionals*. CRC Press.
- Weisgerber, G., Pernicka, E., 1995. *Ore Mining in Prehistoric Europe: An Overview* | SpringerLink. link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-015-1292-3_12 (accessed 9.6.19).
- Weiss, J.V., Rentz, J.A., Plaia, T., Neubauer, S.C., Merrill-Floyd, M., Lilburn, T., Bradburne, C., Megonigal, J.P., Emerson, D., 2007. Characterization of Neutrophilic Fe(II)-Oxidizing Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Wetland Plants and Description of *Ferritrophicum radicolica* gen. nov. sp. nov., and *Sideroxydans paludicola* sp. nov. *Geomicrobiology Journal* 24, 559–570. doi:10.1080/01490450701670152
- Weyens, N., Beckers, B., Schellingen, K., Ceulemans, R., Croes, S., Janssen, J., Haenen, S., Witters, N., Vangronsveld, J., 2013. Plant-associated bacteria and their role in the success or failure of metal phytoextraction projects: first observations of a field-related experiment. *Microb Biotechnol* 6, 288–299. doi:10.1111/1751-7915.12038
- Whitehead, P.G., Hall, G., Neal, C., Prior, H., 2005. Chemical behaviour of the Wheal Jane bioremediation system. *Science of The Total Environment, Bioremediation of Acid Mine Drainage: The Wheal Jane Mine Wetlands Project* 338, 41–51. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.09.004
- Widdel, F., 1988. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria, p. 468-586. In A.B.J. Zehnder (ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley and Sons, New York
- Wieder, R.K., Lang, G.E., 1982. Modification of acid mine drainage in a freshwater wetland. In: *Proceedings of the symposium on wetlands of the unglaciated Appalachian region*. West Virginia University, Morgantown, WV, pp 43–53
- Williams, M., 2001. Arsenic in mine waters: an international study. *Environmental Geology* 40, 267–278. doi:10.1007/s002540000162
- Wilmes, P., Remis, J.P., Hwang, M., Auer, M., Thelen, M.P., Banfield, J.F., 2009. Natural acidophilic biofilm communities reflect distinct organismal and functional organization. *The ISME Journal* 3, 266–270. doi:10.1038/ismej.2008.90
- Wodara, C., Kostka, S., Egert, M., Kelly, D.P., Friedrich, C.G., 1994. Identification and sequence analysis of the *soxB* gene essential for sulfur oxidation of *Paracoccus denitrificans* GB17. *J. Bacteriol.* 176, 6188–6191. doi:10.1128/jb.176.20.6188-6191.1994
- Woodcock, S., T Sloan, W., 2017. Biofilm community succession: A neutral perspective. *Microbiology (Reading, England)* 163. doi:10.1099/mic.0.000472
- Wortman, A.T., Voelz, H., Lantz, R.C., Bissonnette, G.K., 1986. Effect of acid mine water on *Escherichia coli*: Structural Damage. *Current Microbiology* 14, 1–5. doi:10.1007/BF01568093
- Wu, D., Sun, S.-P., He, M., Wu, Z., Xiao, J., Chen, X.D., Wu, W.D., 2018. As(V) and Sb(V) co-adsorption onto ferrihydrite: synergistic effect of Sb(V) on As(V) under competitive conditions. *Environ Sci Pollut Res* 25, 14585–14594. doi:10.1007/s11356-018-1488-2
- Wu, F., Fu, Z., Liu, B., Mo, C., Chen, B., Corns, W., Liao, H., 2011. Health risk associated with dietary co-exposure to high levels of antimony and arsenic in the world’s largest antimony mine area. *Sci. Total Environ.* 409, 3344–3351. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.033
- Wu, S., Kuschik, P., Brix, H., Vymazal, J., Dong, R., 2014. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review. *Water Research* 57, 40–55. doi:10.1016/j.watres.2014.03.020
- Wysocki, R., Chéry, C.C., Wawrzycka, D., Van Hulle, M., Cornelis, R., Thevelein, J.M., Tamás, M.J., 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 40, 1391–1401. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02485.x

- Xingyu, L., Zou, G., Wang, X., Zou, L., Wen, J., Ruan, R., Wang, D., 2013. A novel low pH sulfidogenic bioreactor using activated sludge as carbon source to treat acid mine drainage (AMD) and recovery metal sulfides: Pilot scale study. *Minerals Engineering, Biohydrometallurgy* 48, 51–55. doi:10.1016/j.mineng.2012.11.004
- Xiong, Y., 2007. Hydrothermal thallium mineralization up to 300 °C: A thermodynamic approach. *Ore Geology Reviews* 32, 291–313. doi:10.1016/j.oregeorev.2006.10.003
- Xiong, Y., 2009. The aqueous geochemistry of thallium: Speciation and solubility of thallium in low temperature systems. *Environmental Chemistry - ENVIRON CHEM* 6. doi:10.1071/EN08086
- Yamamura, S., Amachi, S., 2014. Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118, 1–9. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.12.011
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H., 2003. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* – a reply to Farrand et al. (2003). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1689–1695. doi:10.1099/ijs.0.02762-0
- Zagury, G.J., Neculita, C., Bussi ere, B., 2007. Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors: shortreview, applications, and research needs., In: *OttawaGeo2007/OttawaG eo2007*, pp. 1439–1446. ed.
- Zaluski, M.H., Trudnowski J.M., Harrington-Baker, M.A., Bless, D.R. 2003. Post-mortem findings on the performance of engineered SRB field-bioreactors for acid mine drainage control. In: *Proceedings of the 6th ICARD, Cairns, Australia*, pp 845–853
- Zargar, K., Hoefft, S., Oremland, R., Saltikov, C.W., 2010. Identification of a Novel Arsenite Oxidase Gene, *arsA*, in the Haloalkaliphilic, Arsenite-Oxidizing Bacterium *Alkalilimnicola ehrlichii* Strain MLHE-1. *Journal of Bacteriology* 192, 3755–3762. doi:10.1128/JB.00244-10
- Zargar, K., Conrad, A., Bernick, D.L., Lowe, T.M., Stolz, V., Hoefft, S., Oremland, R.S., Stolz, J., Saltikov, C.W., 2012. ArxA, a new clade of arsenite oxidase within the DMSO reductase family of molybdenum oxidoreductases. *Environ. Microbiol.* 14, 1635–1645. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02722.x
- Zecchin, S., Colombo, M., Cavalca, L., 2019. Exposure to different arsenic species drives the establishment of iron- and sulfur-oxidizing bacteria on rice root iron plaques. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 117. doi:10.1007/s11274-019-2690-1
- Zhang, G., Ouyang, X., Li, H., Fu, Z., Chen, J., 2016. Bioremoval of antimony from contaminated waters by a mixed batch culture of sulfate-reducing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 115, 148–155. doi:10.1016/j.ibiod.2016.08.007
- Zhang, H., Li, M., Pang, B., Wu, Y., Sun, Y., Chen, D., Chen, Y., 2017a. Bioremoval of Tl (I) by PVA-Immobilized Sulfate-Reducing Bacteria. *Pol. J. Environ. Stud.* 26, 1865–1873. doi:10.15244/pjoes/68956
- Zhang, H., Li, M., Yang, Z., Sun, Y., Yan, J., Chen, D., Chen, Y., 2017b. Isolation of a non-traditional sulfate reducing-bacteria *Citrobacter freundii* sp. and bioremoval of thallium and sulfate. *Ecological Engineering* 102, 397–403. doi:10.1016/j.ecoleng.2017.02.049
- Zhang, H., Hu, X., 2019. Bioadsorption and microbe-mediated reduction of Sb(V) by a marine bacterium in the presence of sulfite/thiosulfate and the mechanism study. *Chemical Engineering Journal* 359, 755–764. doi:10.1016/j.cej.2018.11.168
- Zhou, T., Fan, Y., Yuan, F., Cooke, D., Zhang, X., Li, L., 2008. A preliminary investigation and evaluation of the thallium environmental impacts of the unmined Xiangquan thallium-only deposit in Hexian, China. *Environ Geol* 54, 131–145. doi:10.1007/s00254-007-0800-0
- Ziegler, S., Dolch, K., Geiger, K., Krause, S., Asskamp, M., Eusterhues, K., Kriews, M., Wilhelms-Dick, D., Goettlicher, J., Majzlan, J., Gescher, J., 2013. Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria. *ISME J* 7, 1725–1737. doi:10.1038/ismej.2013.64
- Zipper, C., Skousen, J., Jage, C., 2014. Passive Treatment of Acid-Mine Drainage. *Acid Mine Drainage, Rock Drainage, and Acid Sulfate Soils: Causes, Assessment, Prediction, Prevention, and Remediation.* doi:10.1002/9781118749197.ch30
- Zverlov, V., Klein, M., L ucker, S., Friedrich, M.W., Kellermann, J., Stahl, D.A., Loy, A., Wagner, M., 2005. Lateral Gene Transfer of Dissimilatory (Bi)Sulfite Reductase Revisited. *Journal of Bacteriology* 187, 2203–2208. doi:10.1128/JB.187.6.2203-2208.2005

Annexes

1. Publications

- *En premier auteur*

Laroche, E., Casiot, C., Fernandez-Rojo, L., Desoeuvre, A., Tardy, V., Bruneel, O., Battaglia-Brunet, F., Jouliau, C., Héry, M., 2018. Dynamics of Bacterial Communities Mediating the Treatment of an As-Rich Acid Mine Drainage in a Field Pilot. *Front Microbiol* 9, 3169. [doi:10.3389/fmicb.2018.03169](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03169)

- *Collaboration dans d'autres publications*

Bruneel, O., Héry, M., Laroche, E., Dahmani, I., Fernandez-Rojo, L., Casiot, C., 2017. Microbial transformations of Arsenic: From metabolism to bioremediation. In: *Metal-Microbe interactions and bioremediation: Principle and applications for toxic metals*, Ed. Surajit Das and Hirak R. Dash, Taylor & Francis, CRC Press Book.

Fernandez-Rojo, L., Héry, M., Le Pape, P., Braungardt, C., Desoeuvre, A., Torres, E., Tardy, V., Resongles, E., Laroche, E., Delpoux, S., Jouliau, C., Battaglia-Brunet, F., Boisson, J., Grapin, G., Morin, G., Casiot, C., 2017. Biological attenuation of arsenic and iron in a continuous flow bioreactor treating acid mine drainage (AMD). *Water Res.* 123, 594–606. [doi:10.1016/j.watres.2017.06.059](https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.059)

Fernandez-Rojo, L., Casiot, C., Tardy, V., Laroche, E., Le Pape, P., Morin, G., Jouliau, C., Battaglia-Brunet, F., Braungardt, C., Desoeuvre, A., Delpoux, S., Boisson, J., Héry, M., 2018. Hydraulic retention time affects bacterial community structure in an As-rich acid mine drainage (AMD) biotreatment process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 9803–9813. [doi:10.1007/s00253-018-9290-0](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9290-0)

Fernandez-Rojo, L., Casiot, C., Laroche, E., Tardy, V., Bruneel, O., Delpoux, S., Desoeuvre, A., Grapin, G., Savignac, J., Boisson, J., Morin, G., Battaglia-Brunet, F., Jouliau, C., Héry, M., 2019. A field-pilot for passive bioremediation of As-rich acid mine drainage. *Journal of Environmental Management* 232, 910–918. [doi:10.1016/j.jenvman.2018.11.116](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.116)

2. Communications orales

- *Conférences internationales*

Laroche, E., Jouliau, C., Casiot, C., Héry, M., Gassaud, C., Charron, M., Delpoux, C., Battaglia-Brunet, F., 2019. Bio-precipitation of arsenic and antimony from acid mine water in a sulfate-reducing bioreactor. *Goldschmidt*, 18-23 Août 2019, Barcelone, Espagne.

Laroche, E., Casiot, C., Fernandez-Rojo, L., Tardy, V., Desoeuvre, A., Grapin, G., Savignac, J., Boisson, J., Battaglia-Brunet, F., Jouliau, C., Héry, M. 2017. Dynamics of bacterial communities in a field-scale pilot treating As-rich acid mine drainage. *Ecotoxicology*, 21-24 Novembre 2017, Lyon, France.

- *Conférences nationales*

Laroche, E., Casiot, C., Fernandez-Rojo, L., Tardy, V., Desoeuvre, A., Grapin, G., Savignac, J., Boisson, J., Battaglia-Brunet, F., Jouliau, C., Héry, M. 2018. Dynamique spatio-temporelle des communautés bactériennes d'un bioréacteur traitant un drainage minier acide riche en arsenic *in situ*. *Journées Recherche-Industrie*, 30-31 Mai 2018, Narbonne, France.

Résumé

Les déchets sulfurés issus de l'extraction des minerais métalliques génèrent des drainages miniers acides (DMA), contenant des éléments toxiques tels que l'arsenic (As), l'antimoine (Sb) et le thallium (Tl). Des procédés de remédiation utilisant des communautés microbiennes ont été développés afin d'éliminer ces polluants des DMA, mais les processus biologiques en jeu dans ces traitements doivent encore être maîtrisés pour garantir leur efficacité. Les verrous scientifiques, objets de la thèse, résident dans (1) la méconnaissance des transformations microbiennes, directe et indirectes, de Sb et Tl, et, (2) pour l'As, la faible compréhension des relations qui existent entre la dynamique des communautés microbiennes, leur potentiel fonctionnel, la physico-chimie des eaux et l'efficacité des traitements appliqués aux DMA. Une approche pluridisciplinaire, principalement basée sur des outils d'écologie microbienne et de physico-chimie, a permis de caractériser la diversité des communautés microbiennes capables de transformer directement ou indirectement As et Sb, à différentes échelles expérimentales : réacteur batch, dispositif à flux continu de laboratoire et pilote de terrain. Un consortium microbien capable de tolérer jusqu'à 100 mM d'antimonite et de l'oxyder en conditions acides ($\text{pH} < 4$), équivalentes à celles des DMA, a été obtenu à partir d'un sol contaminé au Sb. Un bioréacteur colonne de laboratoire, alimenté en continu avec un DMA réel et inoculé avec un consortium bactérien sulfato-réducteur issu de ce DMA, a permis l'élimination de la quasi-totalité de l'As, du Sb et du Tl présents dans l'eau. Enfin, la dynamique des communautés bactériennes au sein d'un dispositif aérobie de traitement d'un DMA riche en As installé sur site a été décrite. Ces communautés sont dominées par des bactéries Fe-oxydantes, et les modifications spatiales et temporelles de leur structure apparaissent associées aux variations de la physico-chimie de l'eau (concentration en oxygène dissous, température, pH, potentiel rédox, concentrations en sulfate, arsenic et fer(II)). Les connaissances acquises au cours de cette thèse pourront servir de base à la conception d'éco-technologies passives et peu coûteuses applicables à la gestion et la remédiation d'anciens sites miniers.

Mots clés : Ecologie microbienne, Drainage minier acide, Bioremédiation, Bio-transformations, Arsenic, Polluants émergents

Abstract

Sulfide wastes from the extraction of metal ores generate acidic mine drainage (AMD), containing toxic elements such as arsenic (As), antimony (Sb) and thallium (Tl). Remediation processes using microbial communities have been developed to remove these pollutants from AMD, but the biological processes involved in these treatments still need to be controlled to ensure their effectiveness. The scientific obstacles, which are the subject of the thesis, lie in (1) a lack of knowledge on direct and indirect microbial transformations of Sb and Tl, and (2) for As, a weak understanding of relationships that exist between dynamics of microbial communities, their functional potential, water physico-chemistry and efficiency of treatments applied to AMD. A multidisciplinary approach, mainly based on microbial ecology and physico-chemistry tools, allowed to characterize the diversity of microbial communities capable of directly or indirectly transforming As and Sb at increasing experimental scales: batch reactor, laboratory continuously fed systems, and pilot on site. A microbial consortium able of tolerating up to 100 mM of antimonite and oxidizing it under acidic conditions ($\text{pH} < 4$), equivalent to those of AMD, was obtained in a batch system in the laboratory from contaminated soil at Sb. A laboratory column bioreactor, fed continuously with a real AMD and inoculated with a bacterial sulfate-reducing consortium enriched from this AMD, allowed the elimination of almost all the As, Sb and Tl present in the water. Finally, the dynamics of the bacterial communities was described under real conditions in an aerobic pilot for the treatment of an AMD rich in As and installed on site. These communities were dominated by Fe-oxidizing bacteria, and their spatial and temporal structure modifications appeared to be associated to variations of water physico-chemistry (dissolved oxygen, temperature, pH, redox potential, sulfate, arsenic and iron(II) concentrations). The knowledge acquired during this thesis may serve as a basis for the design of passive and inexpensive eco-technologies applicable to the management and remediation of former mining sites.

Keywords: Microbial ecology, Acid mine drainage, Bioremediation, Bio-transformations, Arsenic, Emerging contaminants