

**DIVERSITÉ MICROBIOLOGIQUE  
DANS LA PRODUCTION DE  
DRAINAGE MINIER ACIDE À LA  
HALDE SUD DE LA MINE DOYON**

**MEND Report 1.14.2e**

**This work was done on behalf of MEND and sponsored by  
Cambior Incorporated,  
Lac Minerals, and  
the Province of Quebec and the  
Canada Centre for Mineral and Energy Technology (CANMET)  
through the CANADA/Quebec Mineral Development Agreement**

**March 1994**

**Revised: August 1997**

## AVANT PROPOS

Cette étude préliminaire des aspects microbiologiques de la production de drainage minier acide a été réalisée dans les laboratoires du Dr. Roger Guay à la Faculté de Médecine de l'Université Laval. Les travaux exécutés sont complémentaires à une étude commandée sur la modélisation de la production de drainage minier acide dans les haldes de stériles de la mine Doyon et confiée au groupe de recherche dirigé par M. Pierre Gélinas du Département de Géologie à la Faculté des Sciences et de Génie de l'Université Laval. Des éléments ont d'ailleurs été empruntés au rapport soumis le GREGI (91-19) en vue de compléter certaines de nos informations.

La plus grande partie du travail expérimental a été complétée pendant les années 1992 et 1993 par Mmes Emmanuelle Roy-Desjardins et Sylvie Dufresne, étudiantes graduées dans notre laboratoire. D'autres expériences sur la croissance des souches isolées ont été poursuivies jusqu'en janvier 1994.

Nous tenons à remercier sincèrement Monsieur André Paquet du Centre de Recherches Minérales du M.E.R. (Québec), Monsieur Jacques McMullen de la Compagnie Minerais Lac Ltée ainsi que le personnel de la Mine Doyon pour leur précieuse collaboration. Ce projet de recherche a été exécuté dans le cadre du Programme de Neutralisation des Eaux de Drainage dans l'Environnement Minier (NEDEM).

## TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
Avant Propos .....	(i)
Table des Matières .....	(ii)
Liste des Tableaux .....	(iii)
Liste des Figures .....	(iv)
Résumé .....	(vii)
Summary .....	(viii)
Problématique.....	2
1. Introduction .....	4
2. Matériel et Méthodes.....	6
2.1 Analyse microbiologique des rognures de forage.....	6
2.2 Évaluation des propriétés physiologiques des isolats .....	9
2.3 Analyse microbiologique des eaux souterraines.....	11
2.3.1 Microscopie électronique à balayage.....	13
2.3.2 Isolement des bactéries des eaux souterraines.....	13
2.3.3 Numération bactérienne.....	15
2.3.4 Détermination de l'activité microbiologique.....	15
2.3.5 Oxydation aérobie et respiration anaérobie des bactéries acidophiles.....	15
3. Résultats.....	16
3.1 Isolement et culture des microorganismes.....	16
3.2 Établissement des propriétés des isolats.....	18
3.3 Détermination de l'activité biologique dans les eaux souterraines de la halde sud .....	22
3.4 Caractéristiques microbiologiques des isolats .....	37
3.5 Influence des substrats énergétiques et de la température sur l'oxydation microbiologique de l'ion ferreux .....	37
3.6 Détermination des cinétiques d'oxydation et de réduction microbiologique du fer.....	56
4. Discussion et Recommandations .....	60
5. Références.....	64
6. Annexes.....	66

## LISTE DES TABLEAUX

		PAGE
Tableau 1:	Composition chimique de l'eau souterraine au puits #4 utilisée pour confectionner des milieux de culture.....	14
Tableau 2:	Profil thermique de la halde sud après instrumentation du puits d'observation #1 .....	17
Tableau 3:	Isolement et croissance des bactéries thermophiles modérées à partir des rognures de forage du puits #1 .....	23
Tableau 4:	Influence de la température de croissance sur la cinétique d'oxydation du fer par les isolats présents sur les rognures de forage du puits #1 .....	24
Tableau 5:	Résumé des observations lors de la récupération des pièges à bactéries .....	33
Tableau 6:	Observations microbiologiques (colonisation).....	34
Tableau 7:	Dénombrement cellulaire au terme de la croissance bactérienne sur différents substrats et à différentes températures.....	55

## LISTE DES FIGURES

		PAGE
Figure 1:	A- Sommet de la halde sud de la mine Doyon B- Schistes à séricite et pyrite altérée.....	3
Figure 2:	Localisation des forages et tranchées de la halde sud .....	7
Figure 3:	Installation du puits #1 à la halde sud.....	8
Figure 4:	Schéma des méthodologies d'isolement et de caractérisation des souches .....	10
Figure 5:	Dispositif expérimental conçu pour piéger les microorganismes dans les eaux souterraines .....	12
Figure 6:	Cinétique d'oxydation de l'ion ferreux par les bactéries isolées à différents niveaux lors du forage du puits #1, à une température de 25°C.....	19
Figure 7:	Cinétique d'oxydation de l'ion ferreux par les bactéries isolées à différents niveaux lors du forage du puits #1, à une température de 30°C.....	20
Figure 8:	Cinétique d'oxydation de l'ion ferreux par les bactéries isolées à différents niveaux lors du forage du puits #1, à une température de 35°C.....	21

Figure 9:	Colonisation microbienne des échantillons de pyrite, de chalcopryrite, de sphalérite et de soufre élémentaire immergés dans les puits d'observation forés sur la halde sud de la Mine Doyon. Micrographies en microscopie électronique à balayage	
	A- Pyrite, puits #1 .....	26
	B- Chalcopryrite, puits #1.....	26
	C- Sphalérite, puits #1 .....	27
	D- Soufre, puits #1.....	27
	E- Pyrite, puits #2.....	28
	F- Chalcopryrite, puits #2 .....	28
	G- Soufre, puits #2.....	29
	H- Soufre, puits #4.....	29
	I- Chalcopryrite, puits #4.....	30
	J- Sphalérite, puits #4 .....	30
	K- Pyrite, puits #4 .....	31
	L- Soufre, puits #6.....	31
	M- Chalcopryrite, puits #6.....	32
	N- Pyrite, puits #6 .....	32
Figure 10:	Influence de l'activité microbiologique sur le soufre élémentaire immergé dans le puits d'observation #4.....	36
Figure 11:	A- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de sulfate ferreux (puits #1).....	40
	B- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de soufre élémentaire (puits #1).....	41
	C- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de pyrite (puits #1).....	42
Figure 12:	A- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de sulfate ferreux (puits #2).....	43
	B- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de soufre élémentaire (puits #2).....	44
	C- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de pyrite (puits #2).....	45

Figure 13:	A- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de sulfate ferreux (puits #3).....	46
	B- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de soufre élémentaire (puits #3).....	47
	C- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de pyrite (puits #3).....	48
Figure 14:	A- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de sulfate ferreux (puits #4).....	49
	B- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de soufre élémentaire (puits #4).....	50
	C- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de pyrite (puits #4).....	51
Figure 15:	A- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de sulfate ferreux (puits #6).....	52
	B- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de soufre élémentaire (puits #6).....	53
	C- Cinétiques d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de pyrite (puits #6).....	54
Figure 16:	Cycles d'oxydation du $\text{Fe}^{2+}$ et de réduction du $\text{Fe}^{3+}$ respectivement au cours de la croissance aérobie sur le sulfate ferreux et de la respiration anaérobie de <i>T.ferrooxidans</i> ATCC 13661. ....	58
Figure 17:	Cycles d'oxydation du $\text{Fe}^{2+}$ et de réduction du $\text{Fe}^{3+}$ respectivement au cours de la croissance aérobie sur le sulfate ferreux et de la respiration anaérobie d'un isolat bactérien des eaux souterraines du puits #4. ....	59
Figure 18:	Représentation schématique d'un modèle de production microbiologique de drainage minier acide au sein de la halde sud de la Mine Doyon.....	62

## RÉSUMÉ

Le projet de recherche en titre s'est déroulé sur une période de deux années au cours desquelles diverses structures de la halde sud à la Mine Doyon ont été échantillonnées pour évaluer l'impact de la présence de microorganismes acidophiles et ferro-oxydants sur la production de drainage minier acide (DMA). La friabilité des schistes à séricite qui composent une partie significative des stériles provoque une libération extensive de la pyrite qu'ils contiennent et expose ainsi des minéraux réactifs à l'oxydation chimique et biologique.

Nous avons analysé des échantillons de rognures recueillies lors du forage d'un puits d'observation (#1), de nombreux échantillons d'eau prélevés de 5 de ces puits (#1, #2, #3, #4 et #6) et nous avons "piégé" des microorganismes directement dans les eaux souterraines en utilisant un dispositif que nous avons mis au point à cette fin. Les conclusions que nous tirons de l'analyse des résultats sont:

1- Des bactéries du type *Thiobacillus ferrooxidans* sont distribuées au sein de la halde et dans les eaux souterraines, dans les fossés et partout où des sulfures sont exposés; *Thiobacillus thiooxidans*, *T.thioparus* accompagnent les espèces ferro-oxydantes acidophiles là où la teneur en O<sub>2</sub> est adéquate. *Leptospirillum ferrooxidans*, aussi responsable de la génération de DMA, a été réperé dans un horizon tempéré où le gel n'a pas d'emprise. L'activité oxydatrice de ces bactéries est particulièrement importante dans des niches où la température se rapproche de leur température optimale de croissance, lorsque le pH se maintient entre 2,0 et 3,5 et lorsque que l'aération est soutenue dans ce milieu poreux. Il y a abondance de substrats énergétiques (Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>), d'eau (ruissellement et vapeur d'eau) et de carbone (CO<sub>2</sub>). Les bactéries bénéficient de plus d'un apport soutenu de Fe<sup>2+</sup> lors de l'oxydation de la pyrite par le Fe<sup>3+</sup>.

2- La température élevée qui règne au sein de la halde n'est pas de nature à interdire la croissance et l'activité biologique, ce paramètre permet de sélectionner les espèces thermophiles qui continuent le travail des mésophiles.

3- Pour la première fois, nous avons réussi à mettre en évidence qu'en absence complète d'oxygène, sous quelques 30 m de stériles, *T.ferrooxidans* ainsi que d'autres microorganismes non identifiés produisent activement de l'acide sulfurique lors de l'oxydation de soufre et de sulfures en utilisant les ions ferriques comme accepteurs des électrons.



## SUMMARY

The impact of the presence of acidophilic iron-oxidizing bacteria in south waste rock dump has been investigated over a period of two years at la Mine Doyon. During this period of time, samples were collected from various locations within the dump. The waste rocks are made for a significant part of sericite schists and their friability is such that pyrite grains are extensively exposed to chemical weathering and microbiological oxidation.

The sampling of the south dump was done during the drilling of bore hole #1 by removing drill cuttings over the whole height of the dump; water samples were collected from the different bore holes (#1, #2, #3, #4 and #6) by pumping, and microorganisms were "trapped" with especially designed devices in underground water. The results showed that:

1- *Thiobacillus ferrooxidans* type bacteria are widely distributed within the dump, in underground and seepage water, everywhere iron sulfides are exposed; *Thiobacillus thiooxidans* and *T.thioparus* are also present wherever oxygen supply is not limiting. *Leptospirillum ferrooxidans*, another iron-oxidizing bacterium, has been isolated from a "mild" non-freezing area in the dump. Iron oxidizing activity is particularly important in sections of the dump where bacterial growth temperature is optimal, where pH lies between 2,0 and 3,5 and where porosity permits aeration. Energy source ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ), water (running and intersitial) and carbon source ( $\text{CO}_2$ ) are abundant through the waste rocks.  $\text{Fe}^{2+}$  is continuously supplied to bacterial metabolic reactions during chemical oxidation of pyrite by  $\text{Fe}^{3+}$ .

2- The fairly high temperature inside the dump does not prevent bacterial colonization and activity, it provides a selective pressure for the thermophilic microorganisms to develop and carry over the oxidizing activity of the mesophilic bacteria.

3- We confirmed, for the first time in the field, that *T.ferrooxidans*, along with some other unidentified strains, is able to oxidize sulfur and sulfides to sulfuric acid in an anoxic environment under 30 m of rocks. This anaerobic biological respiration uses ferric ions as electron acceptors.

**DIVERSITÉ MICROBIOLOGIQUE  
DANS LA PRODUCTION DE DRAINAGE MINIER ACIDE  
À LA HALDE SUD DE LA MINE DOYON**

**Rapport final**

**par**

**Roger Guay, Ph.D.  
Département de Microbiologie  
Faculté de Médecine  
Université Laval**

**Contrat DSS N°: 23440-3-9231/01-SQ**

**Responsable scientifique CANMET: Mme Pamela Friedrich**

**Projet exécuté dans la cadre du Programme NEDEM**

**MARS 1994**

## PROBLÉMATIQUE

Parmi les solutions envisagées pour contrer l'oxydation chimique et biologique des sulfures métalliques des rejets et stériles miniers, il en est une qui vise à les recouvrir de matériaux imperméables (argiles et/ou membranes étanches) pour empêcher l'eau et l'oxygène d'atteindre les sulfures. Le cas des stériles miniers de la Mine Doyon est particulier puisqu'une très large partie du matériel est composé de schistes à séricite contenant 3 à 7% de pyrite. Ces roches, particulièrement friables, libèrent facilement la pyrite qu'elles contiennent et l'exposent ainsi à l'oxydation (Figure 1b).

Dans la perspective de la diminution et de l'éradication de la production d'eaux de drainage minier acides, les gestionnaires du Programme NEDEM ont commandé une étude de modélisation des haldes de stériles en vue de l'établissement de barrières sèches pour les recouvrir. Lors de l'exécution de ce mandat, des forages ont été réalisés sur la halde sud pour évaluer différents paramètres. C'est ainsi qu'on a mesuré des températures élevées (70°C) dans un trou de forage, ce qui tend à démontrer l'intense activité chimique qui semble régner au sein des stériles. Par ailleurs, ces températures relativement élevées ne sont pas de nature à interdire toute activité microbiologique d'oxydation de la pyrite, des sulfures et du soufre élémentaire puisque de nombreuses espèces bactériennes ont été isolées et caractérisées à partir d'environnements similaires; ce sont des bactéries acidophiles thermophiles modérées (40°C - 55°C) et thermophiles extrêmes (55°C - 90°C). Il semble de plus que certaines de ces souches soient capables de catalyser des réactions de biodégradation du soufre élémentaire même en anaérobiose.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'influence de la température et des conditions anoxiques sur l'activité de souches bactériennes acidophiles ferro-oxydantes et thio-oxydantes au sein de la halde sud de la mine Doyon.

**FIGURE 1**



**A- SOMMET DE LA HALDE SUD DE LA MINE DOYON.**



**B- SCHISTES À SÉRICITE ET PYRITE ALTÉRÉE.**

## 1.0 INTRODUCTION

La production du drainage minier acide est fort probablement un des problèmes les plus considérables associés à la fermeture des exploitations minières et à l'abandon de parcs à rejet et parcs à stériles sulfureux. On reconnaît maintenant qu'un des facteurs déterminants dans l'initiation et le maintien de l'oxydation des sulfures métalliques dans les environnements miniers est la manifestation de l'activité catalytique de plusieurs microorganismes (Guay et coll., 1977, 1989), (cf. Annexes I à IV).

*Thiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans* sont deux espèces bactériennes indigènes des environnements miniers québécois et ils sont avec d'autres groupes de microorganismes (actinomycètes, moisissures et levures) étroitement associés à la génération biologique d'acide sulfurique à partir de terrils et haldes de stériles miniers contenant des sulfures.

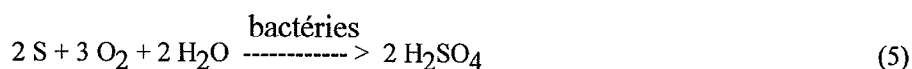
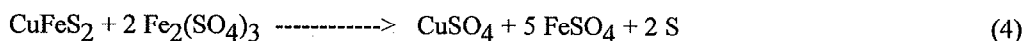
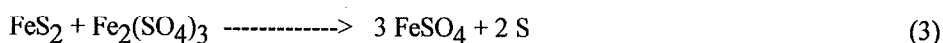
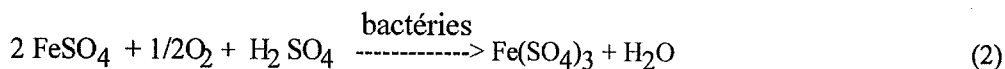
La bactérie *T. ferrooxidans* se présente sous la forme d'un bâtonnet de dimensions réduites, 0,5 µm x 1,0 µm. C'est un microorganisme à Gram-négatif, mobile et non sporulé.



Sa croissance à pH 2,2 est strictement autotrophe et aérobie. *T. ferrooxidans* tire du seul CO<sub>2</sub> atmosphérique tout son apport en matériel carboné et son énergie, de l'oxydation de l'ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>), du soufre élémentaire et de la portion soufre des sulfures métalliques (S<sup>2-</sup>). La physiologie énergétique de la bactérie peut être schématisée par l'équation suivante:



où M représente un métal bivalent comme le cobalt, le cuivre, le fer, le molybdène, le nickel ou le zinc. Cette oxydation peut être réalisée directement par la bactérie ou indirectement par un deuxième mécanisme: la lixiviation par les ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) générés par *T. ferrooxidans*. Les équations suivantes décrivent ces réactions:



L'activité métabolique et physiologique des différentes souches bactériennes apparentées à *T. ferrooxidans* est liée à l'apport suffisant d'éléments nutritifs, à la présence d'une source d'énergie et de carbone et à l'influence d'agents externes tels que la température, le pH, l'agitation et l'aération. Les propriétés physiques des substrats non solubles comme la densité de pulpe, la dimension et la surface des particules jouent un rôle important dans la lixiviation bactérienne des sulfures métalliques synthétiques et des minerais contenant des sulfures de métaux.

La température optimale de croissance et d'oxydation de l'ion ferreux se situe aux alentours de 30°C pour ce qui est des espèces mésophiles *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans*. De part et d'autre de ce maximum, l'activité microbienne sera ralentie et pratiquement nulle à des températures de moins de 5°C et de plus de 40 °C. Par ailleurs, de part et d'autre de cet intervalle tempéré, on retrouve des espèces thermophiles moyennes et extrêmes telles que *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (40 - 60 °C) et *Sulfolobus* sp. (50 - 75 °C).

Au même titre que la température, le pH affecte considérablement la croissance des bactéries. On considère habituellement une valeur de 2,2 comme pH optimal pour l'oxydation de l'ion ferreux et des sulfures métalliques. *T. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* et les autres espèces acidophiles tolèrent des valeurs de pH compris entre 1,0 et 4,5 dans des milieux minéraux dont le potentiel d'oxydo-réduction (Eh) varie entre + 200 et + 550 mv.

Un apport important d'oxygène est indispensable pour ces bactéries aérobies strictes quoique récemment, certains auteurs ont fait état de la respiration anaérobie de *T. ferrooxidans* (Pronk et coll., 1991).

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

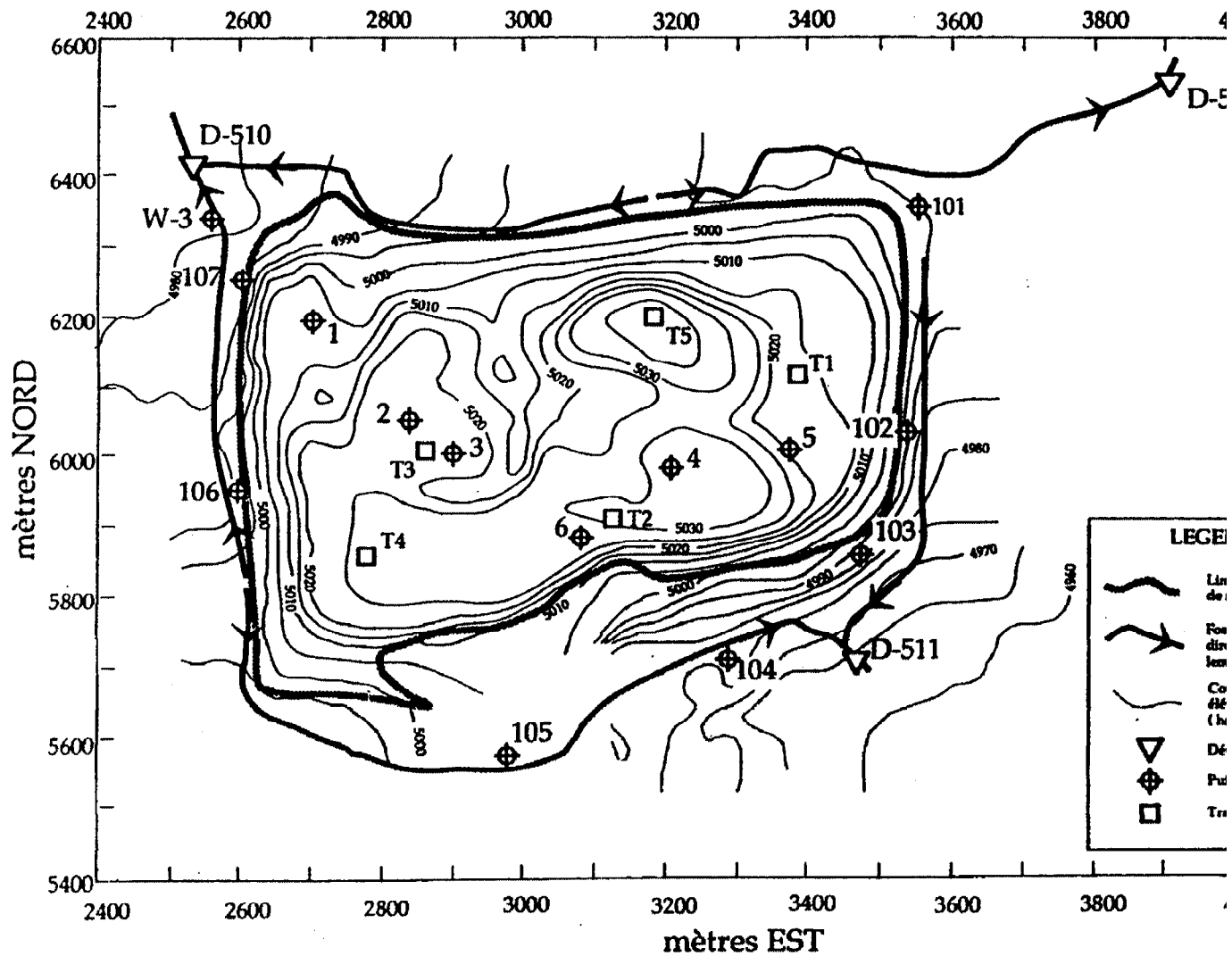
L'étude entreprise en a été divisée en plusieurs parties: premièrement, l'analyse microbiologique d'échantillons de rognures obtenus lors du forage du puits d'observation #1 sur la halde sud; deuxièmement, l'analyse microbiologique des eaux souterraines prélevées des puits #1, #2, #4 et #6 et troisièmement, la détermination de l'influence de divers paramètres physico-chimiques sur l'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  et la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  par des souches identifiées et des isolats provenant du site de la Mine Doyon.

L'emplacement des 6 puits d'observation forés au sommet de la halde sud de la mine Doyon est présenté à la Figure 2.

### 2.1 ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ROGNURES DE FORAGE

Le 11 avril 1991, le puits d'observation #1 était foré sur la halde sud. Un total de 21 échantillons de rognures ont été prélevés sur toute la longueur du forage à des intervalles de 1,52m jusqu'à une profondeur finale de 30.5 m. Le profil stratigraphique du forage #1; préparé par l'équipe de recherche GREGI est présenté à la Figure 3. Ces échantillons minéraux ont été placés dans des bouteilles de polyéthylène de 500 ml préalablement remplies à la moitié de leur capacité d'une solution nutritive de culture 9K (Silverman et Lundgren, 1959) à pH 2,0. Les bouteilles ont été maintenues à 2°C jusqu'à leur acheminement au laboratoire et entreposées à cette température jusqu'à leur analyse.

L'isolement des microorganismes acidophiles a été réalisé après ensemencement d'un milieu de culture 9K avec 2,0 g de rognures de forage et 3 ml de la solution dans laquelle ces échantillons avaient été conservés. Les flacons Erlenmeyer contenant un volume de 100 ml de milieu de culture d'enrichissement ont été incubés à 25°C pendant une période initiale de 10 jours dans un incubateur et soumis à une agitation giratoire correspondant à 175 rpm.

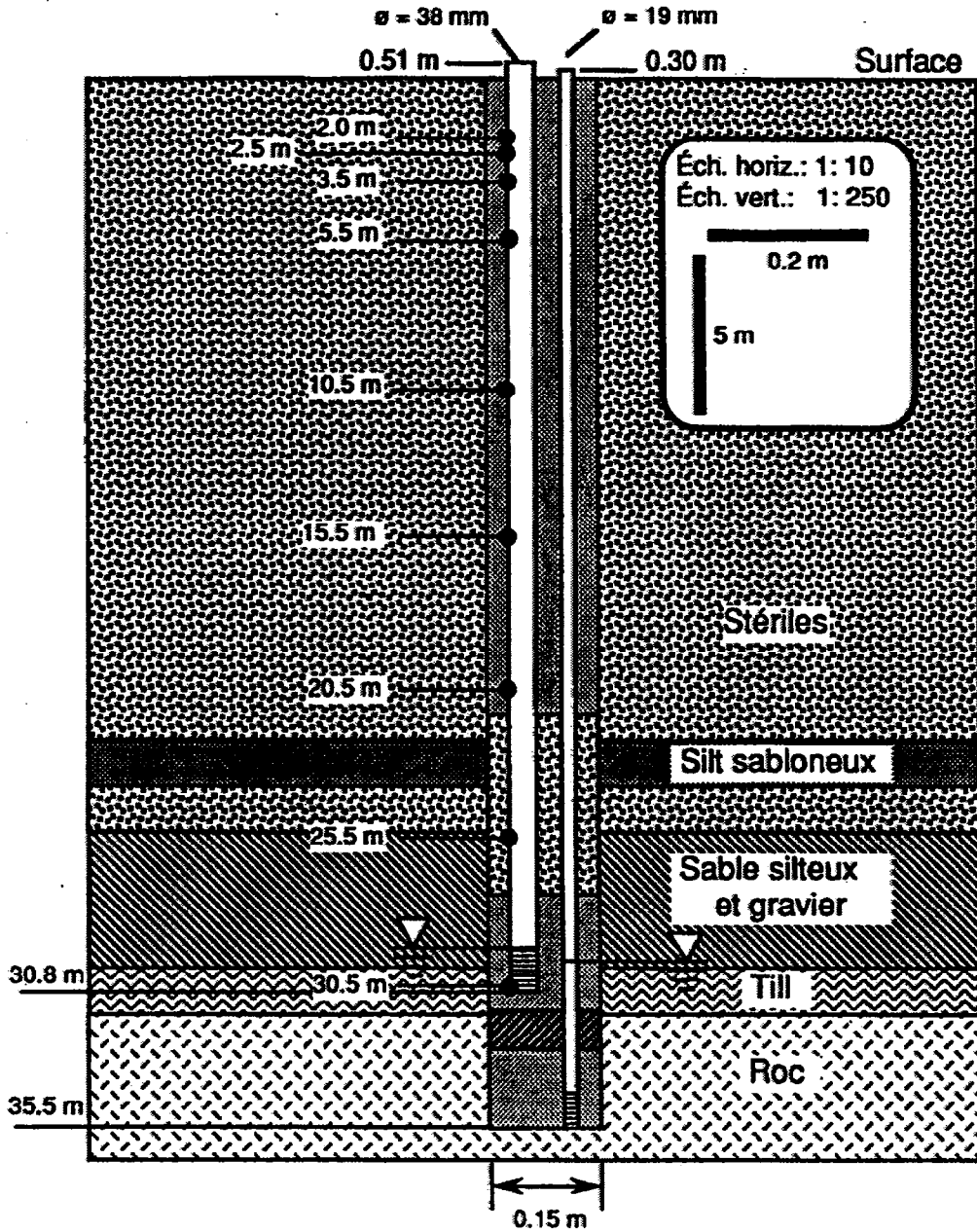


Localisation des forages et tranchées de la halde sud  
 (Topographie actuelle), tiré du rapport GREGI 91-19



FIGURE 3

Installation du puits #1 - halde sud



Note: niveaux piézométriques après l'installation du puits (11/4/91)

\* Tiré du rapport GREGI 91-19

Périodiquement, des observations visuelles et microscopiques ont été réalisées afin de confirmer la présence de microorganismes et pour vérifier leur activité oxydatrice vis à vis le sulfate ferreux utilisé comme substrat dans le milieu de culture. Aux mêmes intervalles, des aliquotes du milieu de culture ont aussi été prélevées pour déterminer la concentration d'ions ferreux en utilisant une méthode de dosage volumétrique (MacDonald et Clark, 1970).

La positivité de la croissance bactérienne confirmait l'isolement initial des souches acidophiles ferrooxidantes et elle a été suivie de vérifications microscopiques en contraste de phase pour en déterminer l'identification sommaire à l'aide de critères morphologiques.

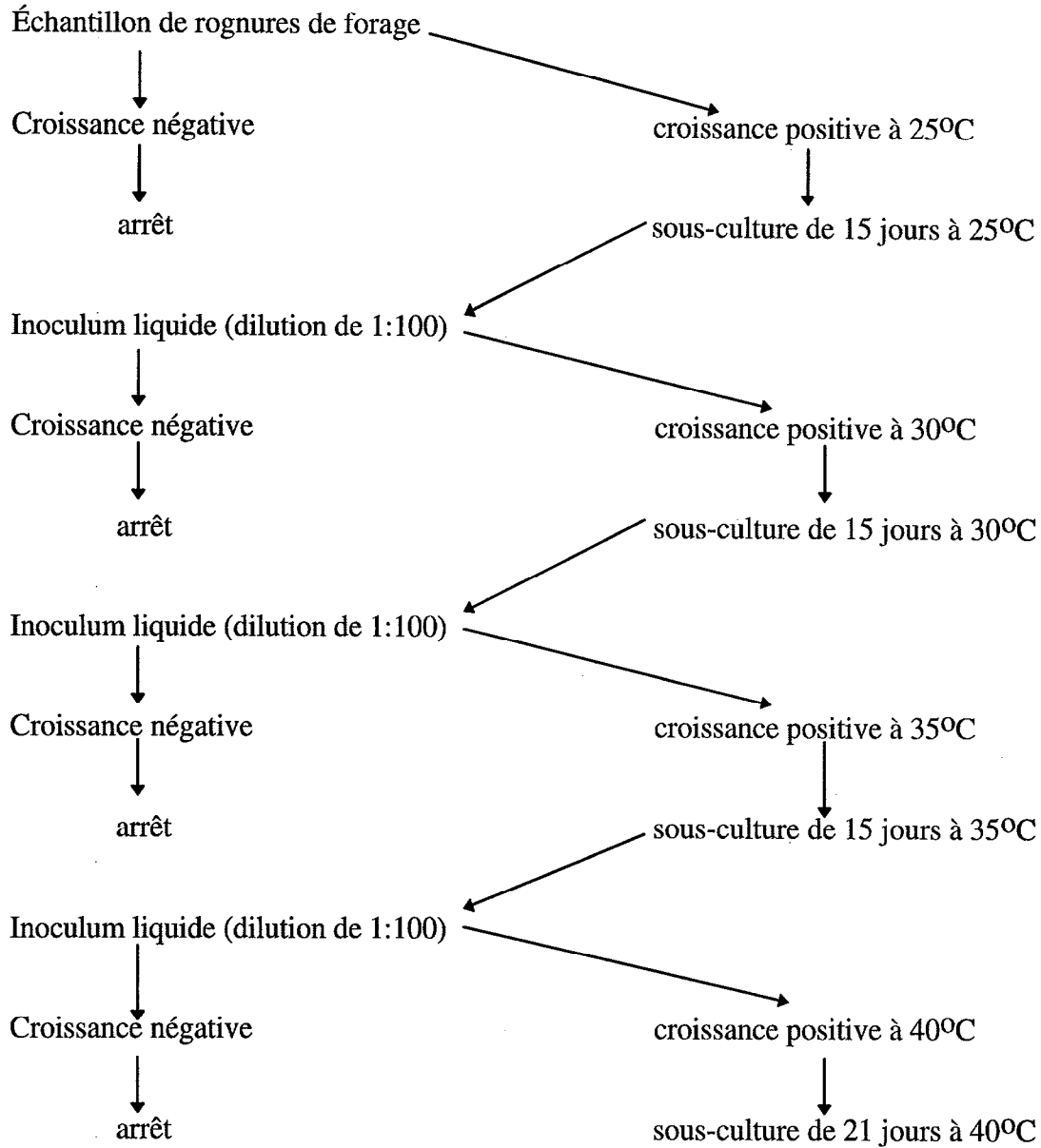
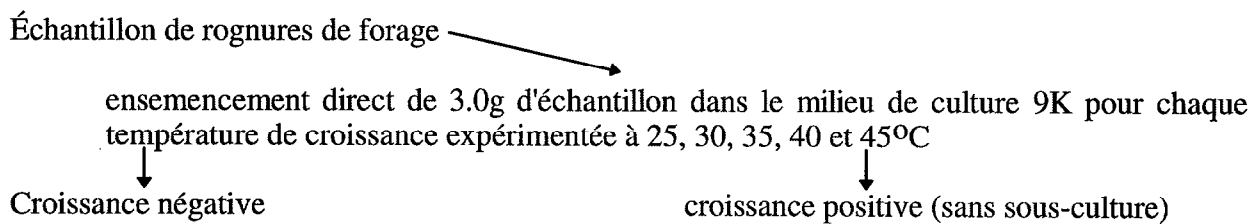
## **2.2 ÉVALUATION DES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES ISOLATS**

Tel que précisé au niveau des objectifs poursuivis, nous avons utilisé deux méthodologies pour vérifier le comportement des souches isolées vis à vis des températures croissantes et pour évaluer le caractère thermophile de certains isolats.

La première méthode a consisté à cultiver les souches isolées à 25°C au cours d'une première étape. Cette première culture, positive, a par la suite servi à préparer l'inoculum pour une deuxième culture dont la température d'incubation a été élevée de 5°C par rapport à la culture précédente et portée à 30°C. La croissance des bactéries a été effectuée pendant une période fixée arbitrairement à 15 jours. Au fur et à mesure de la positivité de la croissance, cette procédure a été répétée jusqu'à l'atteinte d'une température de croissance de 45°C; température ambiante qui avait été mesurée et présentée au Tableau 1 à une profondeur de 10,5 m dans le puits d'observation #1. La Figure 4 présente d'une manière schématisée la procédure utilisée.

**FIGURE 4.**

Schéma des méthodologies d'isolement et de caractérisation des souches

**1ère Approche:****2ième approche:**

Dans une deuxième approche, les échantillons de rognures provenant du forage du puits #1 ont été ensemencés dans un milieu de culture dans des proportions mentionnées plus haut et incubées directement à des températures de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C et 45°C pendant des périodes de 15 jours.

### **2.3 ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES EAUX SOUTERRAINES**

La procédure que nous avons employée a servi un double objectif: d'abord recueillir des échantillons d'eaux souterraines pour y déceler des microorganismes et tenter d'en faire l'isolement et la culture, et ensuite, évaluer la préférence, s'il en était, des microorganismes indigènes pour des substrats particuliers.

A cette fin, des pièges à bactéries ont été mis en place dans les puits d'observation #1, #2, #4 et #6 à des profondeurs respectives de 30,5 m, 42,5 m, 39,3 m et 34,1 m.

Ces pièges ont été conçus d'une manière telle qu'ils permettaient la circulation de l'eau à travers les minéraux qu'ils contenaient et que, lorsque ramenés à la surface de la halde, on pouvait en retirer des échantillons d'eau souterraine, tel qu'illustré à la Figure 5. Des morceaux de pyrite provenant de la mine Bousquet, de chalcoppyrite et de sphalérite, fournis gracieusement par le Musée minéralogique de l'Université Laval, et des pastilles de soufre élémentaire obtenues par fusion, ont été placés séparément dans un train de tubes perforés introduit dans chaque puits d'observation. Les dispositifs expérimentaux ont été laissés en place pendant une période de 40 jours au terme desquels ils ont été retirés des puits.

Un ou deux morceaux des minéraux ont été rapidement retirés des dispositifs pour éviter toute évaporation et déshydratation des spécimens. Ils ont ensuite été rincés légèrement avec de l'eau distillée stérile et placés immédiatement dans une solution tamponnée de glutaraldéhyde à 2% et à pH 7.0.

**FIGURE 5**



Dispositif expérimental conçu pour piéger les microorganismes dans les eaux souterraines.

Les autres morceaux des sulfures métalliques et de soufre ayant séjourné dans les puits de même que de l'eau souterraine ont été déposés dans des contenants stériles et immédiatement placés sur de la glace et acheminés comme tels au laboratoire.

L'aspect des "pièges à bactéries" de même que d'autres observations pertinentes à l'expérimentation ont été notées lorsque ces derniers ont été retirés des puits.

### **2.3.1 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE**

Les échantillons minéraux retirés des tube perforés ont séjourné 24 heures dans une solution de glutaraldéhyde 2% (V/V) préparée dans un tampon phosphate salin (PBS) 0.01M, pH 7.0. L'excès de glutaraldéhyde a été éliminé par trois lavages au tampon PBS. Les spécimens de minéraux ont par la suite été traités avec une solution de tétr oxyde d'osmium 1% (V/V) dans le tampon PBS pendant 2 heures et lavés à 5 reprises avec le même tampon. Les échantillons ont été déshydratés dans un gradient d'éthanol (30, 50, 70, 90, 95, 99, 99, 99%) et séchés au point critique avant d'être montés sur des supports d'aluminium en utilisant de la peinture d'argent. Les spécimens ont été recouverts d'une couche d'or-palladium de 400-500 Å et examinés sous un angle de 30° dans un microscope électronique à balayage JEOL (JSM-T330A).

### **2.3.2 ISOLEMENT DES BACTÉRIES DES EAUX SOUTERRAINES**

Des aliquotes de 5.0 ml provenant des "pièges à bactéries" ont servi d'inoculum dans un milieu de culture 9 K, lui-même incubé à 30°C pendant deux semaines. La croissance bactérienne a été évaluée par l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques et par l'observation microscopique des cultures. L'identification présomptive des isolats a été effectuée à partir de cultures pures de bactéries acidophiles ferro-oxydantes obtenues après trois passages (croissance positive) sur milieu solide FeTSB dont la composition était la suivante, par litre: 10,0 g FeSO<sub>4</sub>; 1,8 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,7 g MgSO<sub>4</sub>; 0,35 g Tryptic Soy Broth; 0,05 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 8,0 g d'agarose. Le pH du milieu était ajusté à 2,50 avec de l'acide sulfurique et l'incubation se poursuivait à 30°C pendant deux semaines.

Un volume de 2 litres d'eau souterraine prélevée du puits #4 au moyen d'une pompe Watera a été centrifugée à 25 000 x g et stérilisée par filtration par passage à travers un filtre millipore d'une porosité de 0.22 µm. Certains éléments nutritifs ont été additionnés à ce milieu dont la composition est présentée au Tableau 1 et dont le pH avait été ajusté à 2,25 et qui a étéensemencé avec un échantillon d'eau non stérilisée provenant du même puits. L'incubation du milieuensemencé et d'un milieu stérile (témoin) a été réalisée à 27°C dans une chambre aérobie pendant une période de deux semaines afin d'évaluer la croissance potentielle de microorganismes à partir de ce milieu fortement minéralisé.

TABLEAU 1. Composition chimique de l'eau souterraine au puits #4 utilisée pour confectionner des milieux de culture

Paramètre	Résultat
pH*	3,36
Eh*	+283 mv
Conductivité*	24 700 mmho
Densité*	1,066
Acidité	48 400 mg/L
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	47 763 mg/L
Fe total	12 996 mg/L
Ca	475 mg/L
Mg	2 885 mg/L
Mn	177 mg/L
Al	3 167 mg/L
Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>	~100

\* valeurs mesurées

Toutes les autres caractéristiques ont été calculées à partir de courbes de corrélation.

### 2.3.3 NUMÉRATION BACTÉRIENNE

Lorsque nécessaire, la détermination du nombre de bactéries dans un échantillon donné a été effectuée en utilisant une procédure modifiée du MPN (Most Probable Number) (cf. Rapport GREGI 1994-12) selon laquelle, l'oxydation d'une très faible quantité de  $\text{Fe}^{2+}$  est employée comme indicateur de croissance ou de l'activité microbiologique des thiobacilles ferro-oxydants. Ces dénombrements ont été surtout utilisés pour quantifier la croissance aérobie de *T.ferrooxidans* sur le soufre élémentaire ou sur la pyrite.

### 2.3.4 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ MICROBIOLOGIQUE

L'activité métabolique des thiobacilles sur divers substrats sulfurés a été mesurée par l'acidification des milieux de culture ou par la détermination des concentrations résiduelles de  $\text{Fe}^{2+}$  par dosage volumétrique.

### 2.3.5 OXYDATION AÉROBIE ET RESPIRATION ANAÉROBIE DES THIOBACILLES

Un certain nombre d'expériences ont été conduites pour évaluer en laboratoire l'activité métabolique de *T.ferrooxidans* et d'isolats provenant d'eaux souterraines du puits #4 en présence et en absence d'oxygène, afin de simuler des conditions de terrain sous 30 m de stériles miniers. A cette fin, des flacons Erlenmeyer contenant 100 ml d'un milieu de culture constitué d'eau souterraine (puits #4) stérilisée par filtration, à laquelle on a additionné du sulfate ferreux à une concentration finale de 11,5 g/L et du sulfate d'ammonium à raison de 3,0 g/L, ont étéensemencés avec une culture pure de *T.ferrooxidans* ATCC 13661 ou avec une culture active de microorganismes isolés d'un échantillon d'eau du puits #4. Des flacons témoins nonensemencés ont été incubés en même temps que les flaconsensemencés en présence d'oxygène et à 30°C sous agitation constante jusqu'à ce que tout le fer ferreux ait été oxydé sous la forme ferrique.

Lorsque le  $\text{Fe}^{2+}$  a été oxydé complètement en  $\text{Fe}^{3+}$  dans les fiolesensemencées, 0,5 g de soufre élémentaire stérile ou 0,5 g de pyrite stérilisée à l'autoclave ont été introduits de manière aseptique dans les flacons qui ont été placés sous incubation stationnaire dans une enceinte anaérobie (atmosphère composée de 10%  $\text{H}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$  et 80%  $\text{N}_2$ ). La température d'incubation a été maintenue à 27°C. Périodiquement, des échantillons du milieu de culture étaient prélevés aseptiquement, récupérés à travers un sas et analysés (pH,  $\text{Fe}^{2+}$ , numération bactérienne). Afin de vérifier les capacités physiologiques des microorganismes, le cycle d'oxydation/réduction du



fer a été répété à deux reprises (oxydation/réduction/oxydation/réduction/oxydation).

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1 ISOLEMENT ET CULTURE DES MICROORGANISMES

Les 21 échantillons de rognures de forage du puits d'observation # 1 sont contaminés par des souches bactériennes acidophiles ferroxydantes. L'isolement et la croissance de ce type de microorganismes ont été positifs lorsque réalisés à une température de 25°C dans un milieu de culture 9k. Une période minimale de 5 jours a été nécessaire pour l'observation de l'activité oxydatrice des isolats vis à vis le sulfate ferreux utilisé comme substrat à un pH initial de 2,3. Ces résultats signifient que dans le voisinage immédiat du forage, la pyrite présente dans les stériles miniers peut permettre la survie et l'activité bactérienne. La distribution des isolats semble relativement uniforme puisque nous n'avons pas observé de différence significative quant à l'apparition des premières manifestations de la croissance bactérienne.

La première observation de la croissance a été visuelle (coloration du milieu de culture passant du vert à l'orangé) et confirmée par l'observation des microorganismes au microscope à contraste de phase. Lors du déroulement de cette série d'expériences, trois types morphologiques ont été observés: des bâtonnets, non sporulés et mobiles et d'environ 1,0 µm x 0,5 µm dont la morphologie était identique à celle de *T. ferrooxidans*; des bactéries spiralées similaires à l'espèce *Leptospirillum ferrooxidans* et des bacilles trapus dont les dimensions de 1,0 à 3,0 µm x 1,0 µm étaient plus considérables que les *T. ferrooxidans*.

Ce dernier type morphologique n'a pas été formellement identifié mais il présente des caractéristiques semblables à celles de la souche *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, bien que nous n'ayons pas observé de formes sporulées.

TABLEAU 2. Profil thermique de la halde sud enregistré après instrumentation du puits d'observation # 1.

Profondeur (m)	Température* (°C)
0.3	1
0.5	3
1.0	6
2.0	11
2.5	14
3.5	23
5.5	37
10.5	44
15.5	42
20.5	33
25.5	25
30.5	18**

\* Les températures ont été enregistrées après une période de stabilisation de 48 heures suivant le forage du puits.

\*\* Température de l'eau souterraine.

Ces bactéries acidophiles avaient toutes la propriété d'oxyder les ions ferreux en ions ferriques en milieu acide. *T. ferrooxidans* a été isolé des échantillons sur toute la hauteur du forage alors que *L. ferrooxidans* n'a été observé dans la zone comprise entre 6,1 m. et 12,2 m. L'espèce bactérienne présentant des caractéristiques morphologiques distinctes des *Thiobacillus* n'a été repérée qu'à l'horizon 6,1 m.

La méthode d'échantillonnage utilisée a permis de préserver la viabilité des microorganismes présents à la surface des minéraux prélevés même si les températures enregistrées en surface et au sein de la halde sud variaient de 0°C à 45°C. Les températures apparaissant au Tableau 2 nous ont été transmises peu après l'instrumentation du puits d'observation #1, soit 48 heures suivant le forage et nous ont servi d'autant de points de repère pour inventorier les souches isolées des différents horizons.

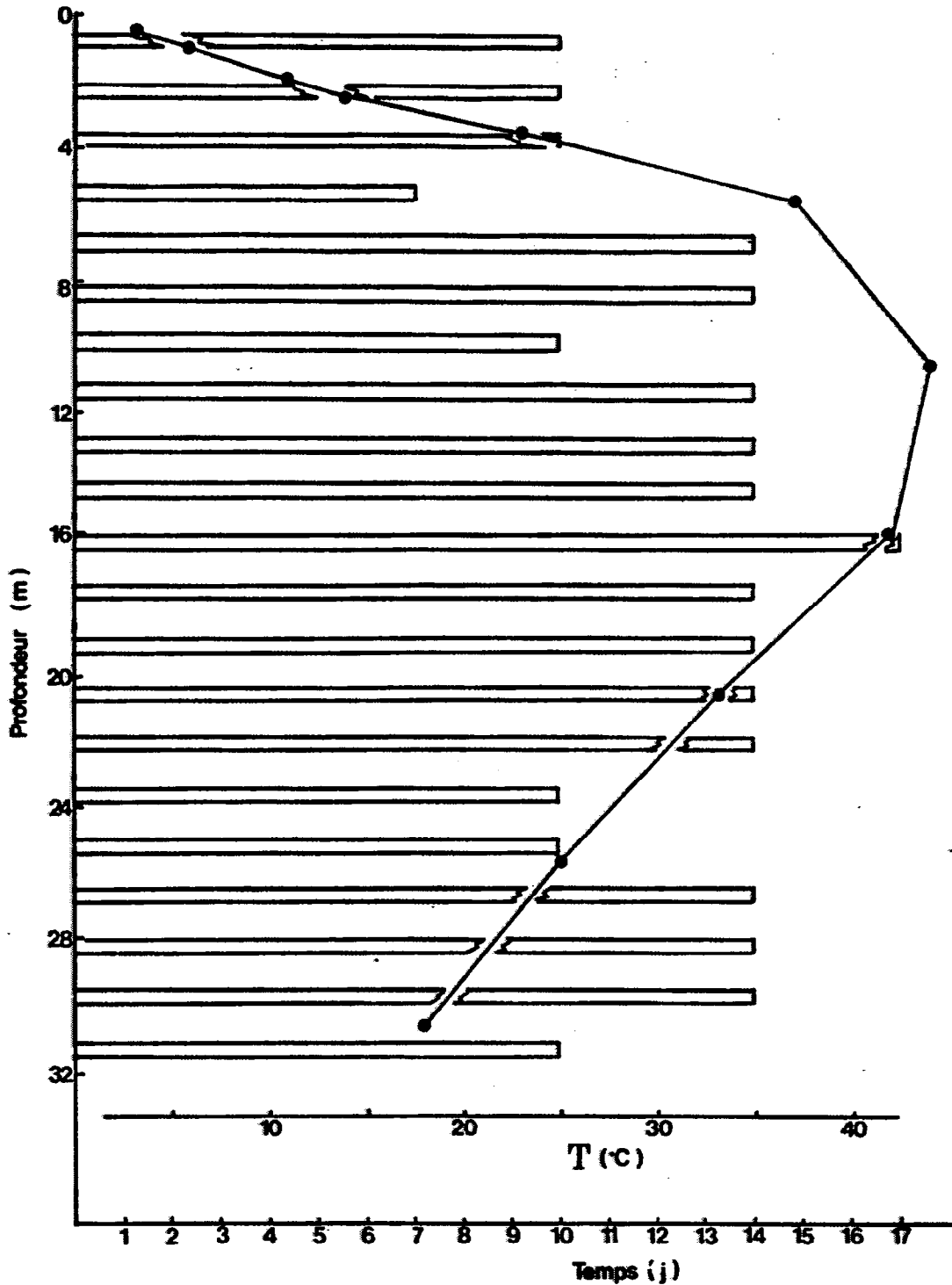
La caractérisation minéralogique des rognures de forage à partir desquelles les bactéries ont été isolées est présentée à l'annexe V du présent rapport.

### **3.2 ÉTABLISSEMENT DES PROPRIÉTÉS DE CROISSANCE DES ISOLATS**

La première approche utilisée pour évaluer le caractère mésophile ou thermophile des bactéries isolées des rognures de forage en ce qui a trait à la température a consisté à élever successivement la température du milieu de culture après chaque sous-culture positive tel qu'illustré à la Figure 4. Cette méthode avait pour avantage croyions-nous, de permettre la survie des bactéries thermophiles potentiellement présentes dans les rognures de forage et même leur croissance sub-optimale. Les résultats obtenus sont présentés aux Figures 6, 7 et 8 et ont été fort différents de ceux que nous avions escomptés puisque nous n'avons pas observé de croissance positive à une température supérieure à 35°C.

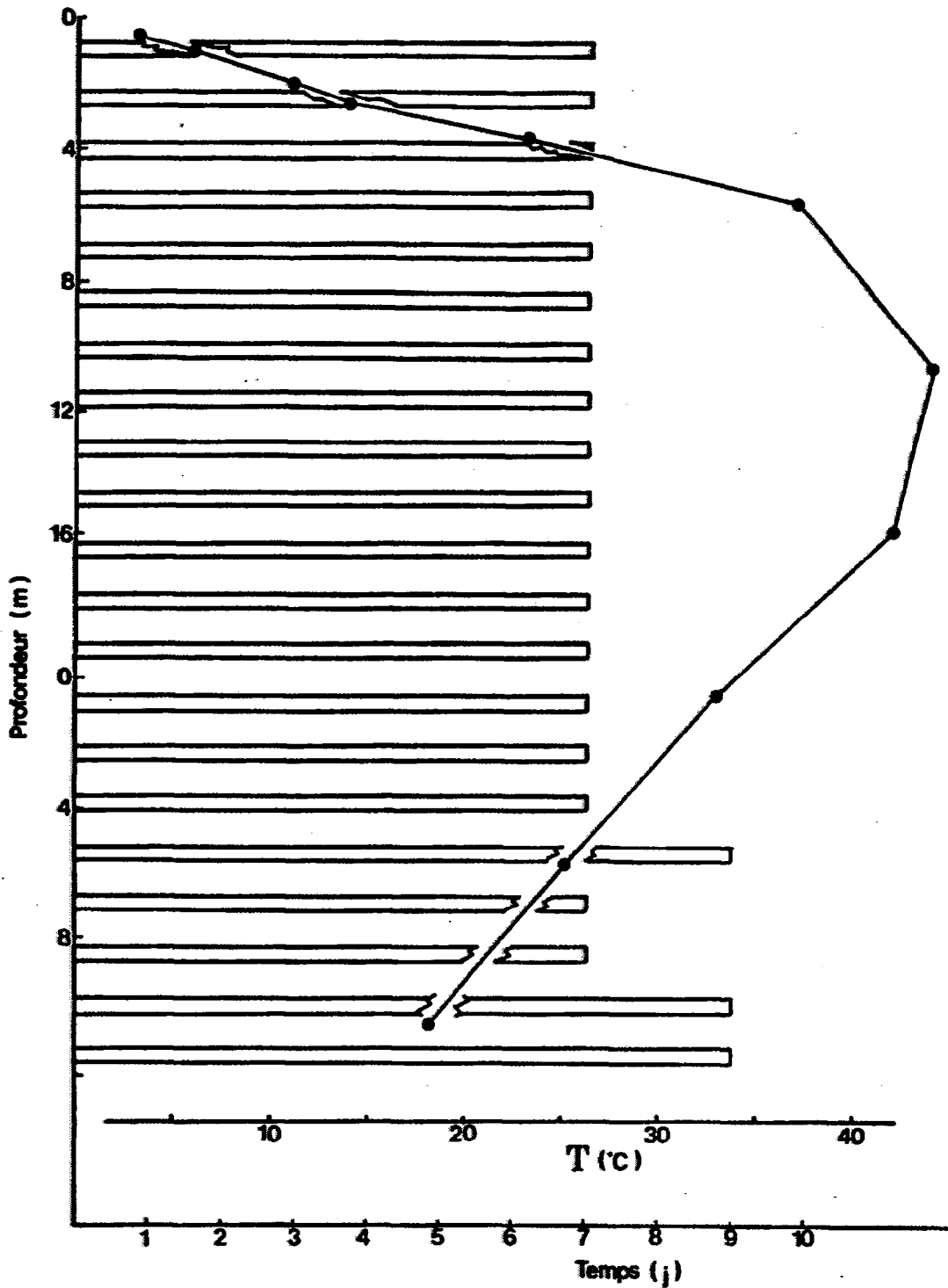
La raison la plus logique pour expliquer l'absence apparente de bactéries thermophiles modérées tient au fait des dilutions employées lors de l'inoculation des milieux de culture stériles avec une aliquote de la sous-culture précédente. Les souches thermophiles ne représentaient vraisemblablement qu'une faible proportion de la population microbienne globale et l'addition de trois dilutions successives 1:100 a conduit à une dilution finale de  $1 \times 10^6$  du nombre potentiel de thermophiles présents sur chaque échantillon ce qui a rendu très improbable l'isolement de ce type de microorganismes.

FIGURE 6



Cinétique d'oxydation de l'ion ferreux par les bactéries isolées à différents niveaux lors du forage du puits #1.  
(temps requis pour l'oxydation du fer ferreux à 25°C).

FIGURE 7

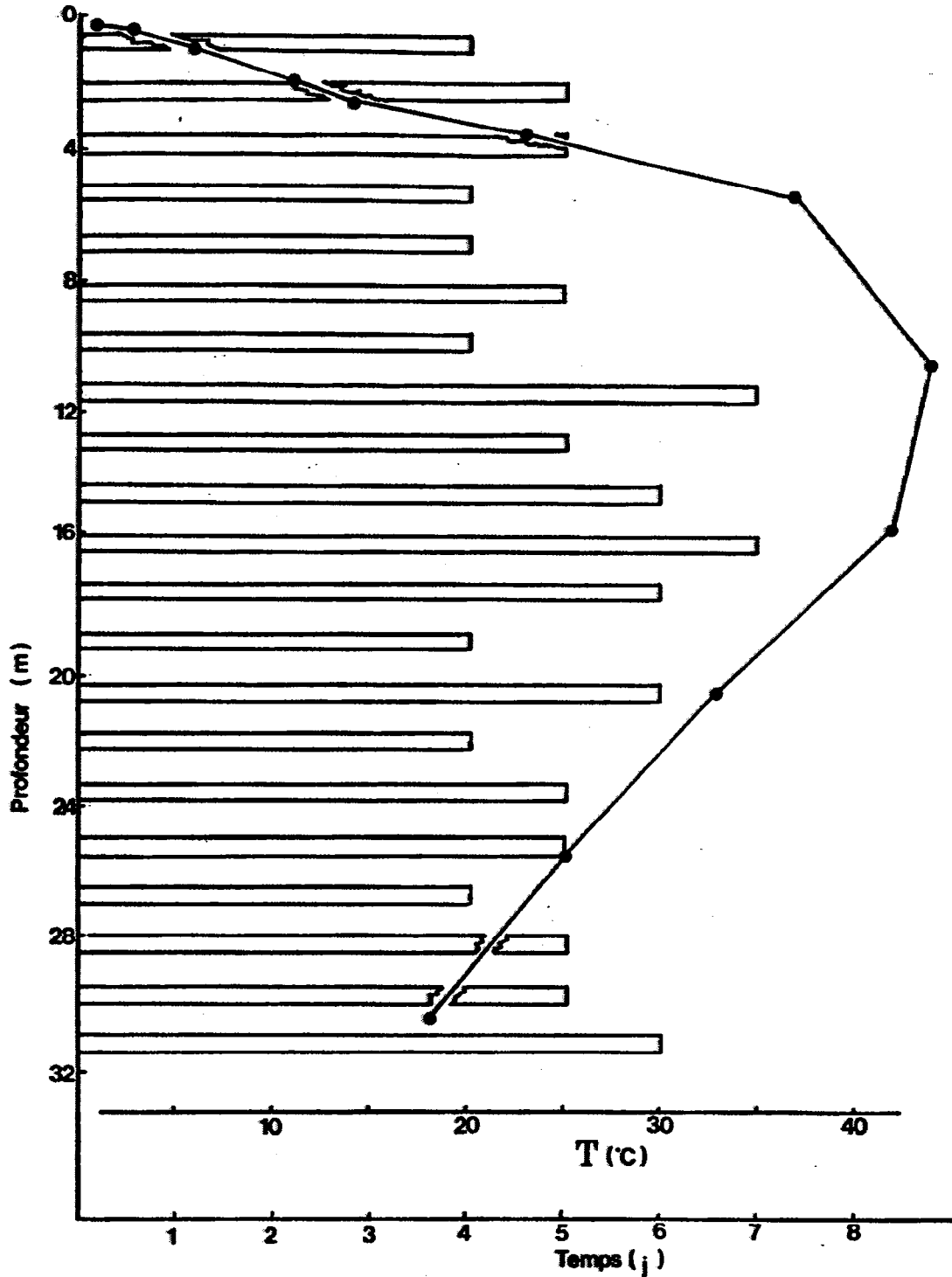


Cinétique d'oxydation de l'ion ferreux par les bactéries isolées à différents niveaux lors du forage du puits #1.

(temps requis pour l'oxydation du fer ferreux à 30°C).

o-----o: profil thermique du puits #1.

FIGURE 8



Cinétique d'oxydation de l'ion ferreux par les bactéries isolées à différents niveaux lors du forage du puits #1.

(temps requis pour l'oxydation du fer ferreux à 35°C).

o----o: profil thermique du puits #1.

La deuxième méthode utilisée a permis d'isoler des souches bactériennes pouvant croître à 40°C et 45°C démontrant du même coup l'existence et l'activité de ces espèces que nous n'avons pas pu identifier dans le cadre d'une étude préliminaire. Le Tableau 3 présente les résultats obtenus, pour ce qui est de la positivité de la croissance, nous avons déterminé la concentration des ions ferreux à différents intervalles et nous l'avons reliée à une croissance. Les temps les plus courts indiquant la plus forte activité bactérienne. Des contrôles stériles (non inoculés) ont servi de témoins négatifs.

Ces résultats démontrent clairement que les microorganismes isolés à partir des rognures ont la propriété d'oxyder le fer ferreux à des températures aussi élevées que 45°C et ceci en dépit du caractère mésophile de *T. ferrooxidans* et des nombreuses observations réalisées lors d'autres travaux de recherche qui ont conclu que la viabilité et l'activité oxydatrice bactérienne étaient pratiquement nulles à des températures supérieures à 40°C. Nous avons de plus démontré que les souches bactériennes croissant à plus de 40°C semblaient confinées à des horizons stratigraphiques et thermiques correspondant à ces températures au sein de la halde sud.

Le Tableau 4 présente les données cinétiques de l'oxydation microbiologique du sulfate ferreux utilisé comme substrat énergétique dans des milieux de culture en fonction de la provenance des isolats (profil stratigraphique) et en fonction de la température de croissance.

Il est important de noter que l'activité oxydatrice bactérienne est relativement bien distribuée sur toute la hauteur de la colonne stratigraphique.

### **3.3 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DANS LES EAUX SOUTERRAINES DE LA HALDE SUD**

Quatre types de minéraux, pyrite, sphalérite, chalcopyrite et soufre élémentaire, ont été immergés dans les eaux souterraines de la halde sud via les puits d'observation #1, #2, #4 et #6 qui ont été instrumentés avec un dispositif expérimental permettant de capter les microorganismes présents dans les eaux et de remonter à la surface des échantillons d'eau prélevés au fond des puits.

Ces "pièges à bactéries" ont été mis en place dans les puits, séjournant dans les eaux souterraines, pendant une période totale de 40 jours.

TABLEAU 3. Isolement et croissance des bactéries thermophiles modérées à partir des rognures de forage du puits #1.

Température de croissance (°C)	Profondeur (m)	Délai pour l'oxydation complète de 9,000ppmFe <sup>2+</sup> (jours)
40	6.1	7
40	7.6	10
40	12.2	13
40	13.7	20
40	18.3	20
40	21.3	>20
40	22.9	17
	témoin non inoculé	>40 jours
45	1.5	>20
45	4.6	>20
45	6.1	13
45	9.1	13
45	10.7	10
45	12.2	17
45	16.8	20
45	18.3	>20
45	19.8	>20
45	21.3	>20



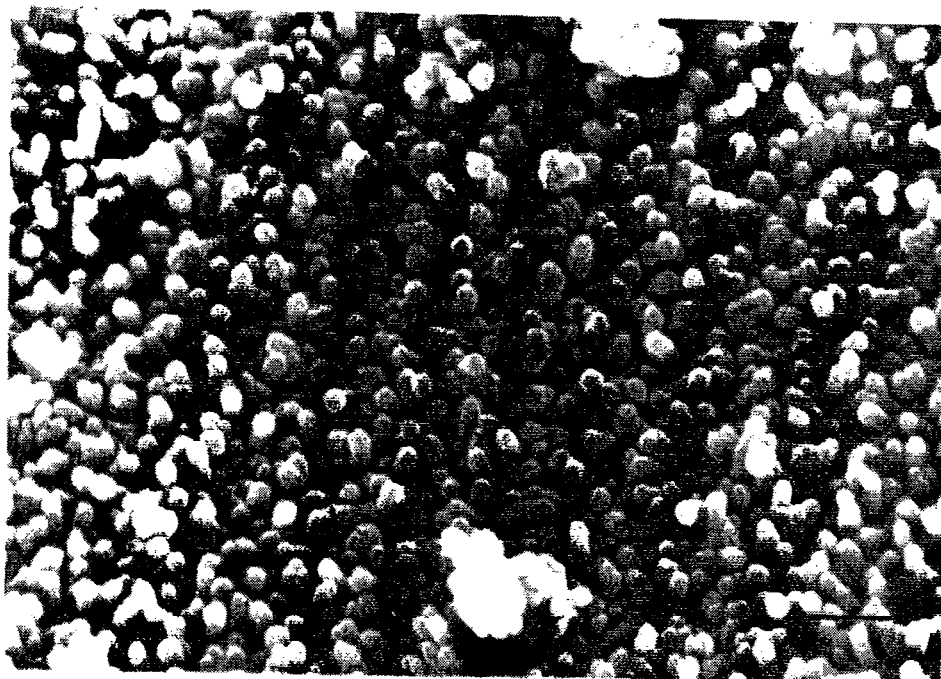
TABLEAU 4. Influence de la température de croissance sur la cinétique d'oxydation du fer par les isolats présents sur les rognures de forage.

Profondeur (m)	Vitesse d'oxydation du fer ferreux (mg/l/jour)		
	25°C	30°C	35°C
1.5	990	1290	2250
3.0	900	1290	1800
4.6	900	1290	
6.1	900	1290	2250
7.6	643	1290	2250
9.1	643	1290	1800
10.7	900	1290	2250
12.2	643	1290	1290
13.7	643	1290	1800
15.2	643	1290	1500
16.8	529	1290	1290
18.3	643	1290	1500
19.8	643	1290	2250
21.3	643	1290	1500
22.9	643	1290	2250
24.4	900	1290	1800
25.9	900	1000	1800
27.4	643	1290	2250
28.9	643	1290	1800
30.5	643	1000	1800

Une partie des échantillons de minéraux a été prélevée et placée dès leur sortie à la surface dans une solution tamponnée de glutaraldehyde et analysée à leur arrivée dans nos laboratoires. Le Tableau 5 présente un résumé des observations portant sur l'aspect physique des échantillons et repertoriées à leur sortie des puits. Une partie des liquides présents dans les trappes a été utilisée pour l'isolement de souches bactériennes des eaux souterraines et par conséquent, n'a pas été fixée à la glutaraldehyde.

Un exemplaire de tous les minéraux immergés a été examiné en microscopie électronique à balayage (MEB) pour y déceler la présence de bactéries adsorbées en surface. Les microphotographies sont présentées à la Figure 9 et le Tableau 6 regroupe les particularités observées à l'examen méthodique des micrographies. D'une manière générale, tous les puits instrumentés ont révélé la présence de bactéries acidophiles dans les eaux souterraines. Le caractère ferro-oxydant des souches n'a été vraiment observé que dans le puits # 1. Des quatre substrats utilisés pour capter les bactéries présentes, le soufre élémentaire a été celui qui a "attiré" le plus grand nombre de candidates dans les quatre puits même si les caractéristiques physico-chimiques des eaux souterraines étaient fort différentes les unes des autres (cf. Rapport GREGI 91-19).

**FIGURE 9**

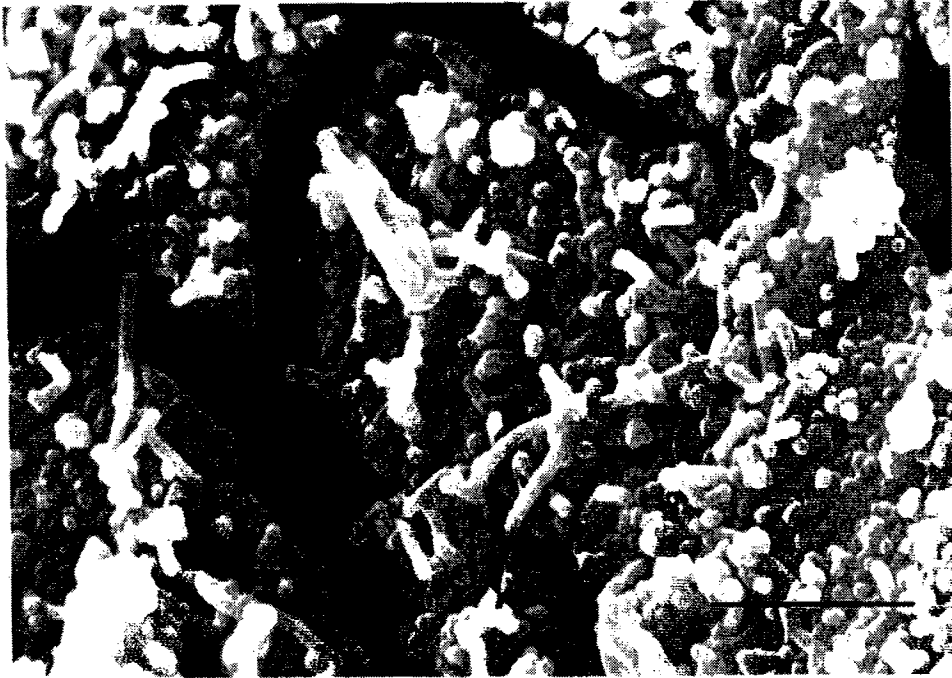


A- Pyrite ( $\text{FeS}_2$ ), puits #1  
x 10,000, échelle: 1  $\mu\text{M}$



B- Chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), puits #1  
x 2,000, échelle: 10  $\mu\text{M}$

**FIGURE 9 (SUITE)**

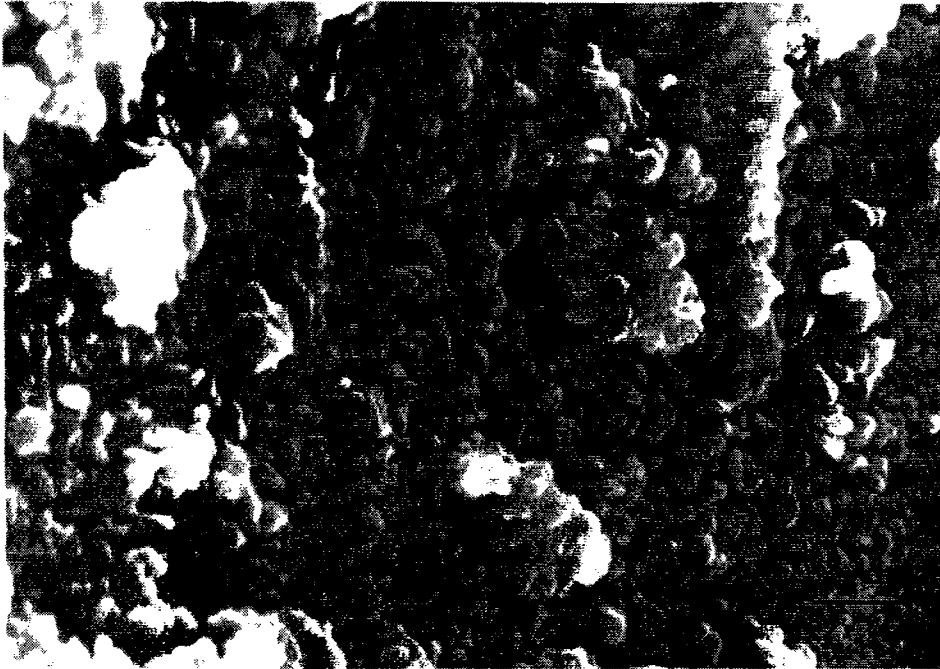


C- Sphalérite ( $ZnS$ ), puits #1  
x 5,000, échelle: 5  $\mu M$

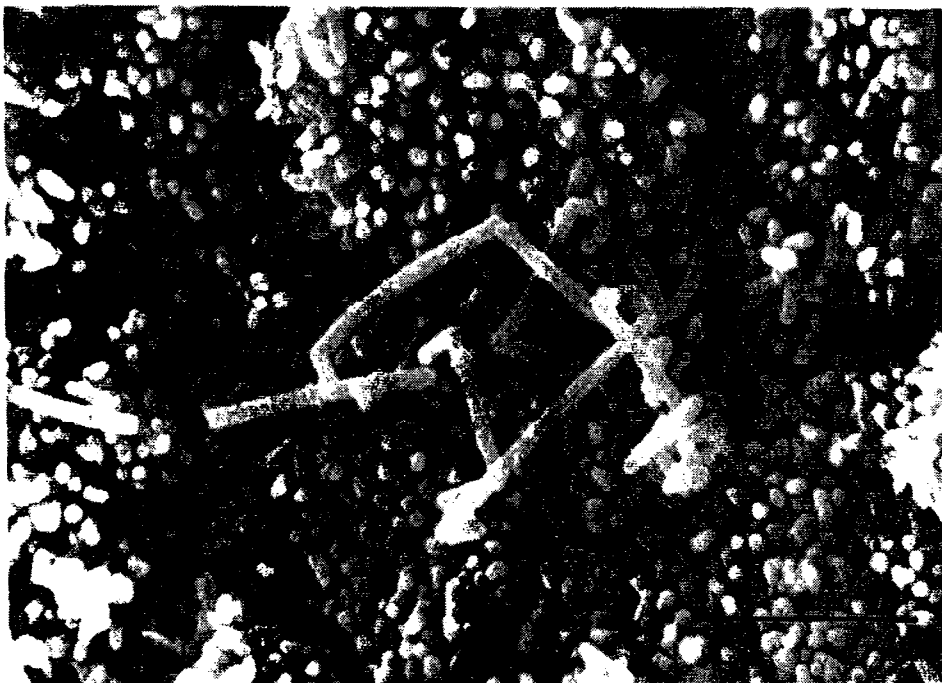


D- Soufre ( $S^{\circ}$ ), puits #1  
x 5,000, échelle: 5  $\mu M$

**FIGURE 9 (SUITE)**

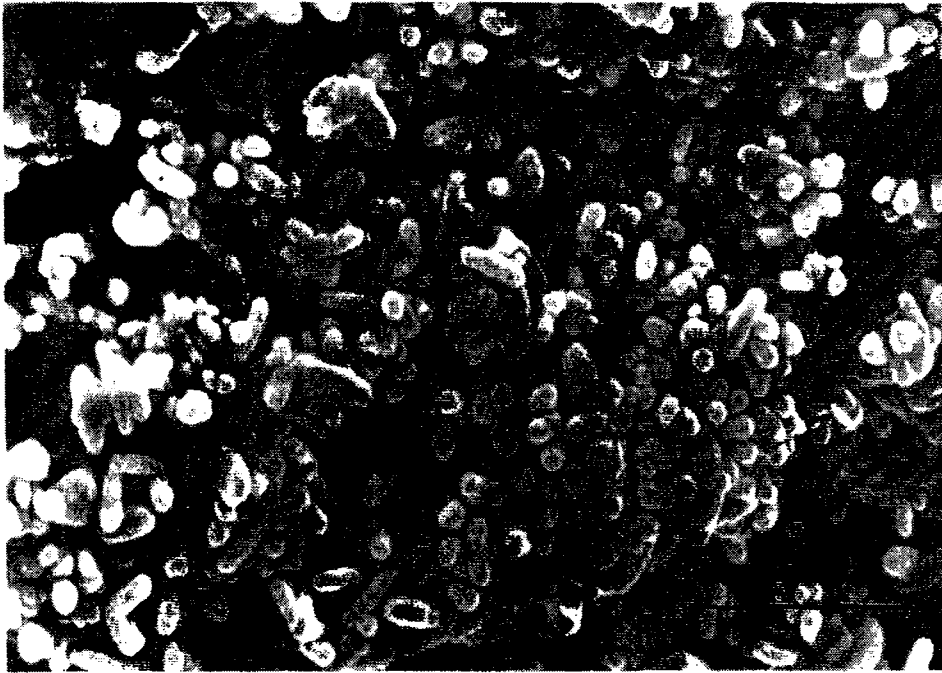


E- Pyrite ( $\text{FeS}_2$ ), puits #2  
x 10,000, échelle: 1  $\mu\text{M}$

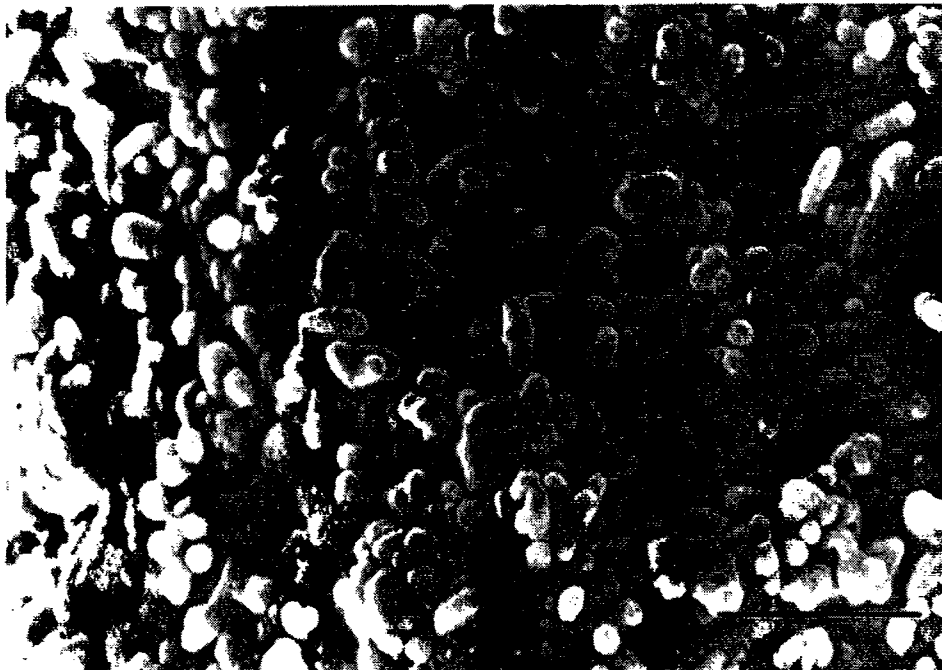


F- Chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), puits #2  
x 5,000, échelle: 5  $\mu\text{M}$

**FIGURE 9 (SUITE)**

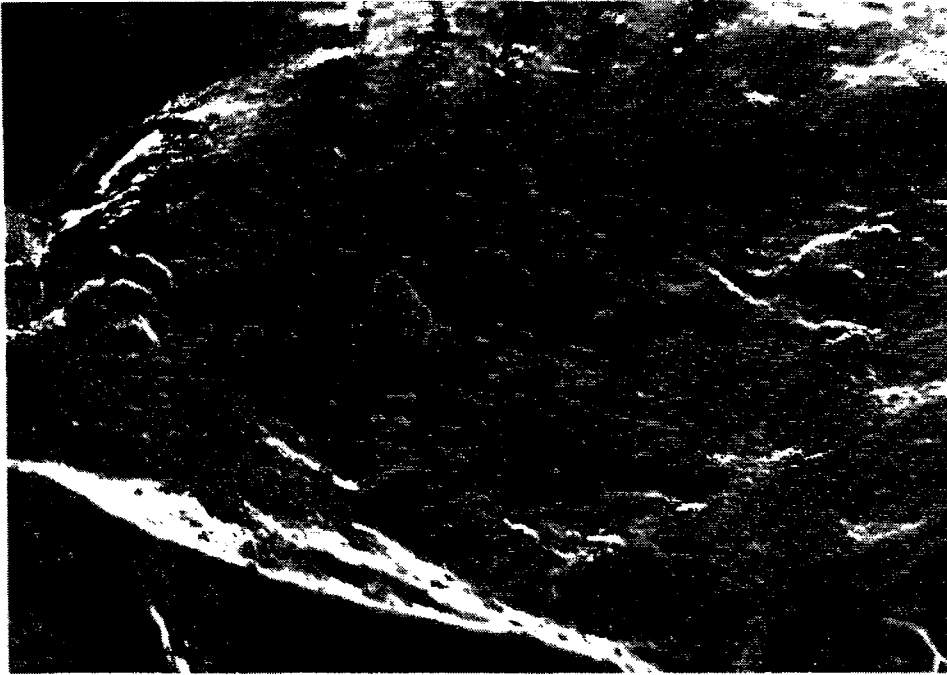


G- Soufre ( $S^{\circ}$ ), puits #2  
x 5,000, échelle: 5  $\mu$ M

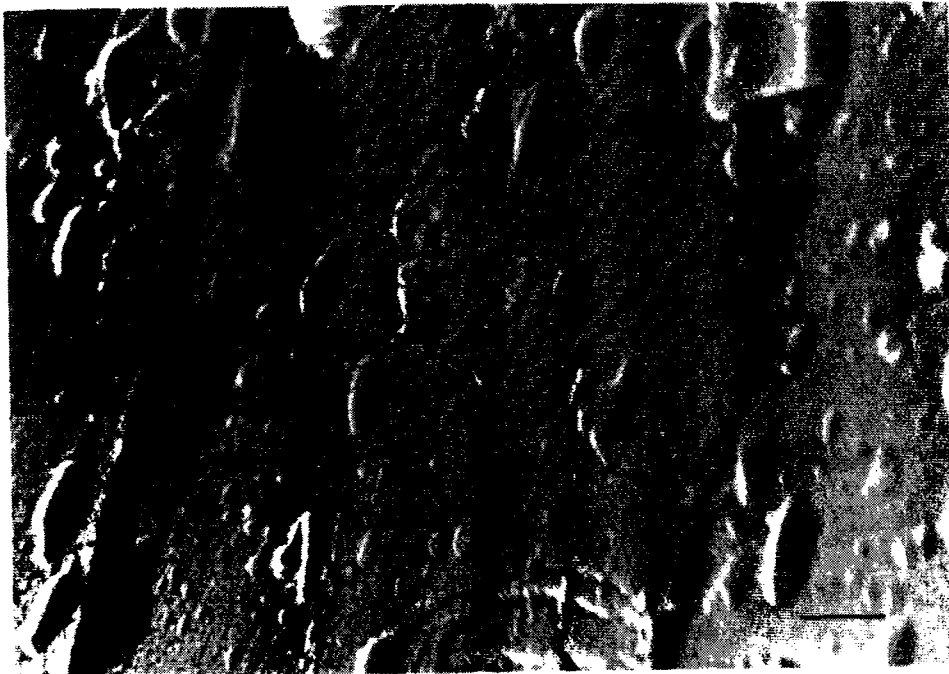


H- Soufre ( $S^{\circ}$ ), puits #4  
x 5,000, échelle: 5  $\mu$ M

**FIGURE 9 (SUITE)**

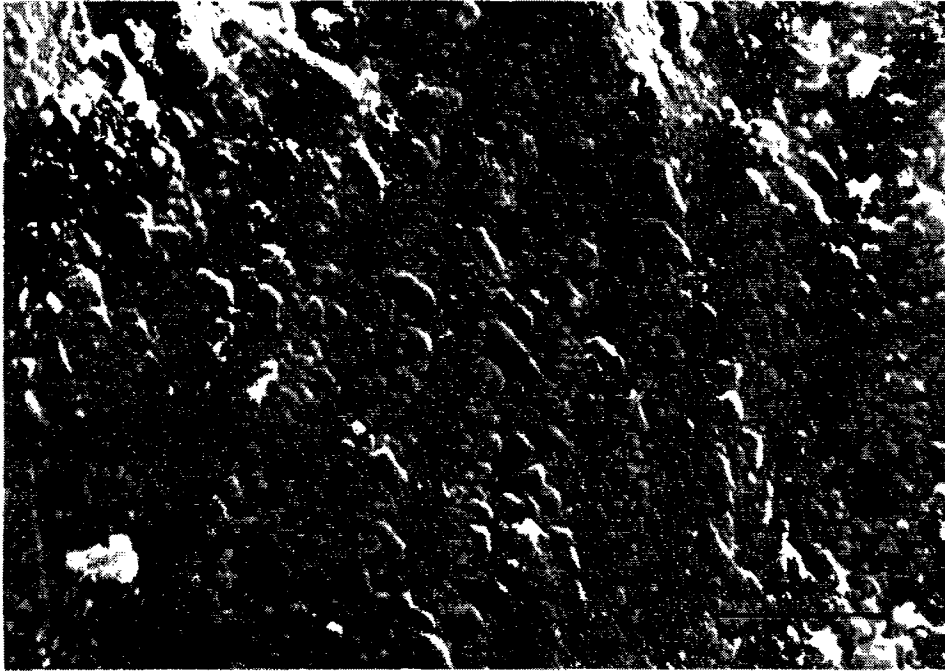


I- Chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), puits #4  
x 2,000, échelle: 10  $\mu\text{M}$

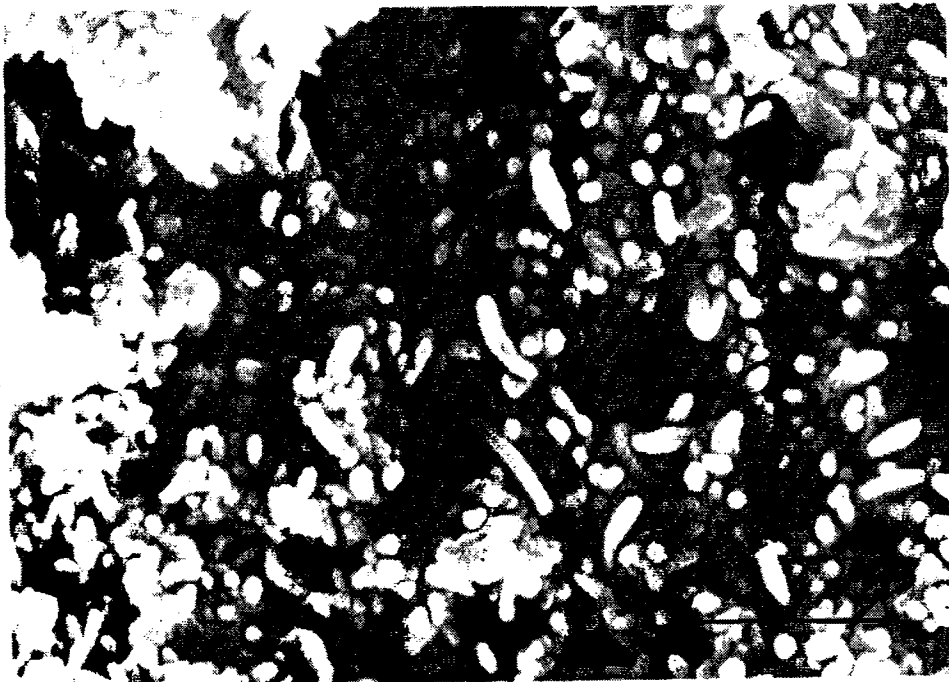


J- Sphalérite ( $\text{ZnS}$ ), puits #4  
x 10,000, échelle: 1  $\mu\text{M}$

**FIGURE 9 (SUITE)**



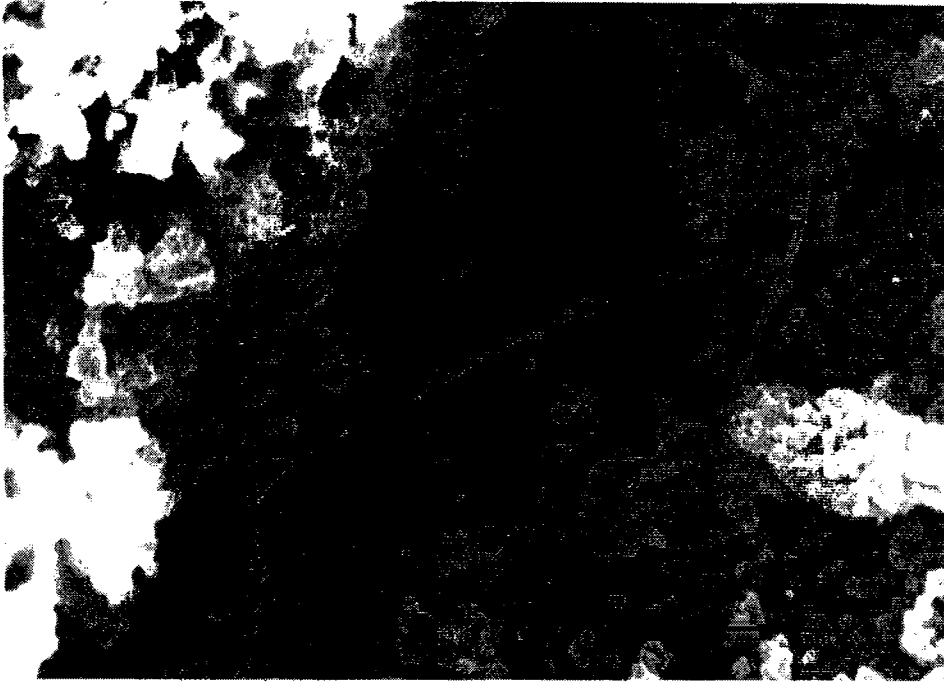
K- Pyrite ( $\text{FeS}_2$ ), puits #4  
x 2,000, échelle: 10  $\mu\text{M}$



L- Soufre ( $\text{S}^0$ ), puits #6  
x 2,000, échelle: 10  $\mu\text{M}$



**FIGURE 9 (SUITE)**



M- Chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), puits #6  
x 3,500, échelle: 5  $\mu\text{M}$



N- Pyrite ( $\text{FeS}_2$ ), puits #6  
x 5,000, échelle: 5  $\mu\text{M}$

TABLEAU 5. Résumé des observations lors de la récupération des pièges à bactéries

PUITS	Observations
1	Les 4 pièges à bactéries étaient complètement immergés dans environ 60cm d'eau. On a noté un très fort dépôt de jarosite ou de sulfate ferrique sur toutes les surfaces exposées.
2	Trois des quatre trappes ( $\text{CuFeS}_2$ , $\text{FeS}_2$ et S) étaient immergées dans environ 35 cm d'eau. Aucun dépôt ferrique ne couvrait les surfaces, seul un dépôt meublé de boue grisâtre était présent dans les tubes, laissant les minéraux relativement propres.
4	Les quatre pièges étaient complètement immergés dans au moins 48cm d'eau. La plupart des tubes portaient des traces du dépôt d'un matériel noirâtre non identifié. Les pastilles de soufre, étaient particulièrement couverte de ce précipité noir. On a noté l'absence de sels ferriques.
6	Trois trappes sur 4 ( $\text{CuFeS}_2$ , $\text{FeS}_2$ , S) étaient recouvertes d'eau (35cm). Les tubes étaient propres, sans précipité, mais assez chauds au toucher.

TABLEAU 6. Observations microbiologiques (colonisation)

Puits	Pyrite (FeS <sub>2</sub> )	Chalcopyrite (CuFeS <sub>2</sub> )	Sphalérite (ZnS)	Soufre (S <sup>0</sup> )
1	++++	+	++++	++++
2	+	++++	-	++++
4	+	+	?	++++
6	?	+	-	++++

++++ Colonisation très importante

+ Colonisation faible

? Colonisation incertaine

- Échantillon non immergé

Contrairement à ce que plusieurs chercheurs ont avancé sur l'uniformité relative des espèces bactériennes présentes dans ce type d'environnement hostile, nous avons observé plusieurs types morphologiques différents. Tout d'abord, *T. ferrooxidans* qu'on repère dans des niches aérobies, mésophiles (0 - 35°C) et acides; il semble que cette espèce ferro-oxydante soit dispersée dans toute la halde sud, en surface et dans les eaux souterraines. Ce microorganisme a de plus la propriété de catalyser l'oxydation du soufre élémentaire en utilisant les ions ferriques comme accepteurs d'électrons en absence d'oxygène (Pronk et coll., 1991) et en présence d'oxygène, le soufre étant oxydé en sulfate (Sugio et coll., 1992). *T. ferrooxidans* partage avec *Leptospirillum ferrooxidans* la propriété d'oxyder la pyrite en milieu acide; les leptospires ont d'ailleurs été repérés dans les rognures de forage du puits # 1. Qui plus est, la réduction du fer ferrique par des microorganismes hétérotrophes a aussi été démontrée (Johnson et McGinness, 1991).

La morphologie des microorganismes isolés de la halde sud varie encore plus lorsqu'on observe les bactéries à la surface des minéraux immergés dans les eaux souterraines. On repère des bactéries dont la forme et les dimensions sont typiques des thiobacilles sur la pyrite, la chalcopryrite et le soufre dans le puits # 1, le soufre du puits # 2 et 4, la chalcopryrite et la sphalérite et la pyrite du puits # 4. Des bactéries en forme de bâtonnets allongés (2 à 5 µm) ont été observées sur les échantillons de sphalérite du puits # 1, sur la chalcopryrite du puits # 2 et # 6. Les pastilles de soufre du puits # 6 ont été colonisées par des bactéries en forme de bâtonnets dont les dimensions sont relativement variables.

Nous sommes donc très loin de l'uniformité microbiologique dans l'environnement particulier que représente la halde sud à la mine Doyon.

Même si le présent rapport de travail ne porte pas sur les réactions chimiques au sein de la halde, il n'en demeure pas moins que les quatre puits d'observation instrumentés présentaient des aspects nettement différents. Alors que dans le puits # 1 on retrouvait des conditions très oxydantes, il semble que les eaux souterraines prélevées au puits #4 présentaient des conditions plus réductrices. Les pastilles de soufre élémentaire immergées dans ce dernier puits ont toutes présenté un aspect similaire; un recouvrement partiel d'un précipité semi-cristallin noir (Figure 10). La nature de ce précipité n'a pas pu être identifiée mais lorsque la pellicule noire à la surface du soufre était lavée à l'eau distillée, elle prenait assez rapidement (< 2 heures) une teinte orangée, rappelant l'oxydation chimique des sulfures de fer. Il semble donc que des conditions réductrices existent sous la halde sud puisque nous avons repéré ce que nous croyons être des sulfures de fer reprécipités à

**FIGURE 10**



Influence de l'activité microbiologique sur le soufre élémentaire immergé dans le puits d'observation #4.

- A) Échantillon témoin non immergé
- B) Échantillon immergé dans le puits #4

### 3.4 CARACTÉRISTIQUES MICROBIOLOGIQUES DES ISOLATS

Plusieurs types morphologiques ont été isolés des eaux souterraines sous la halde sud de la Mine Doyon. Des bactéries typiques *T.ferrooxidans* (voir Annexe II), des variants morphologiques de cette bactérie (bactéries plus allongées et plus trapues que *T.ferrooxidans* ), des espèces acidophiles présentant des caractéristiques inhabituelles mais qui, après de nombreuses sous-cultures sur milieu liquide (9K + FeSO<sub>4</sub>), ont vu leur morphologie modifiée pour se rapprocher des cellules typiques des thiobacilles. Cette propriété de variabilité morphologique semblait commune à presque tous les isolats provenant des eaux souterraines. Par contre, les cultures positives de *T.ferrooxidans* en condition anaérobie n'ont pas permis d'observer ces variations en laboratoire après qu'elles eurent été réintroduites en aérobiose.

### 3.5 INFLUENCE DE SUBSTRATS ÉNERGÉTIQUES ET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'OXYDATION MICROBIOLOGIQUE DE L'ION FERREUX

Ces séries d'expériences avaient pour but d'évaluer le potentiel d'oxydation des bactéries indigènes au site vis à vis le Fe<sup>2+</sup> lorsque mises en présence de sulfate ferreux, de soufre élémentaire et de pyrite, des substrats énergétiques qu'on peut éventuellement rencontrer dans la halde. L'expérimentation s'est poursuivie à trois températures représentatives de celles qui prévalent sous l'amoncellement de stériles à la halde sud. Au terme de l'évaluation de l'oxydation du Fe<sup>2+</sup>, des aliquotes furent prélevées des flacons à culture pour déterminer le nombre de cellules bactériennes actives. Les Figures 11, 12, 13, 14 et 15 présentent respectivement les résultats obtenus pour les puits #1, #2, #3, #4 et #6; chaque figure montrant en parallèle des essais inoculés et des témoins stériles.

Dans la presque totalité des cas, les cinétiques d'oxydation microbiologique du Fe<sup>2+</sup> sont plus rapides à 32°C qu'à 37°C et qu'à 42°C sauf en ce qui a trait à l'oxydation de la pyrite dans l'eau souterraine prélevée du puits #3 où l'oxydation est aussi rapide à 32°C qu'à 42°C. Ces disparités sont probablement le signe de la diversité microbiologiques qui existe au fond des puits et aussi elles sont fonction des conditions physico-chimiques très variables d'un puits à l'autre et même au sein d'un même puits pendant des périodes différentes. Ainsi, l'aspect de l'eau souterraine prélevée du puits #6 en 1991 était fort différente de celle que nous avons prélevé en

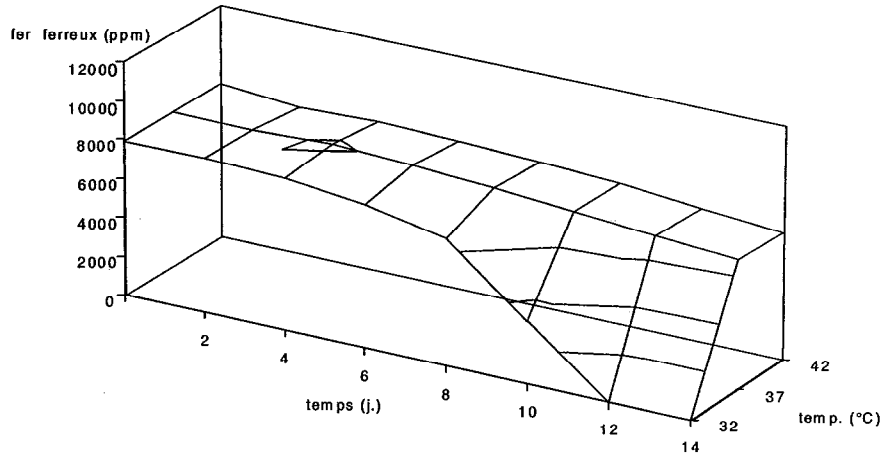
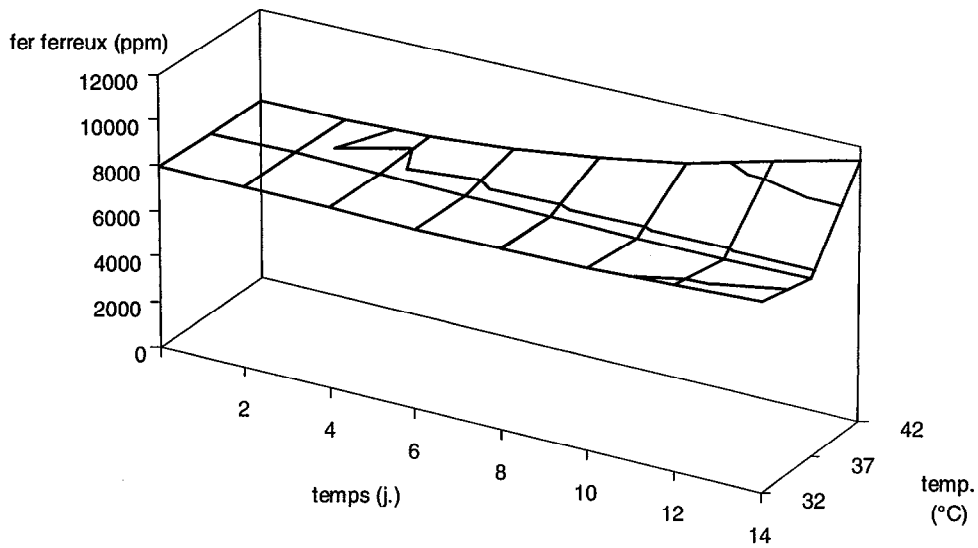
1992 et 1993 où nous avons noté des concentrations élevées d'ions ferriques. Ces perturbations dans les eaux souterraines sont probablement le résultat de modifications apportées par le prélèvement de matériaux sur la halde sud et par des régimes hydriques variés. Quoiqu'il en soit, nous avons démontré que l'activité microbiologique était intense à la fois sur des substrats où seul le fer pouvait être oxydé ( $\text{FeSO}_4$ ), le soufre élémentaire et la pyrite où la portion  $\text{S}^0$  ou  $\text{S}^{2-}$  fournissaient la source énergétique aux bactéries. Nous avons pu constater de plus qu'une certaine activité réductrice chimique et même biologique vis à vis le fer pouvait se produire dans les milieux de culture utilisés (ensemencés ou stériles).

Nous avons mesuré la concentration de cellules bactériennes ferro-oxydantes après deux semaines de croissance aux conditions citées plus haut (Tableau 7) et d'une manière similaire à l'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$ , la numération bactérienne a presque toujours été plus élevée à  $32^\circ\text{C}$  qu'à  $37^\circ\text{C}$  ou à  $42^\circ\text{C}$ ; la pyrite est le substrat sur lequel on retrouve le plus grand nombre de cellules viables lorsque la température de croissance est à  $32^\circ\text{C}$ . Par contre, à  $37^\circ\text{C}$ , c'est le soufre qui permet l'obtention du plus grand rendement cellulaire comparativement au  $\text{FeSO}_4$  ou à la pyrite.

**FIGURES 11, 12, 13, 14 et 15**

Ces figures décrivent l'oxydation microbologique du fer ferreux à différentes températures et en présence de substrats énergétiques différents par des microorganismes indigènes au site. Dans chaque série d'expériences (pour chacun des puits), l'inoculum utilisé était constitué d'un volume d'eau souterraine prélevé de chaque puits et ajouté à quatre volumes d'une solution stérilisée de sels de base (milieu 9K sans sulfate ferreux). Chaque figure regroupe une série d'essais inoculés et une série d'essais non inoculés (témoin stérile).

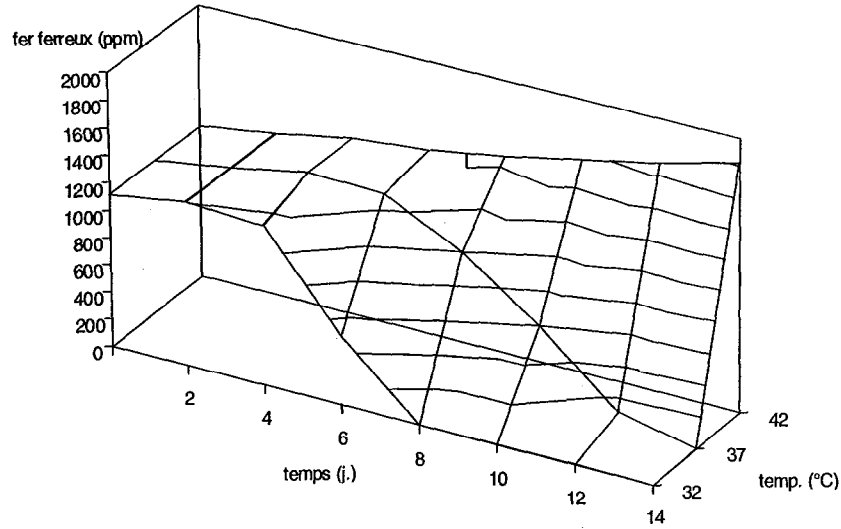


**Figure 11A****essai inoculé****témoïn stérile**

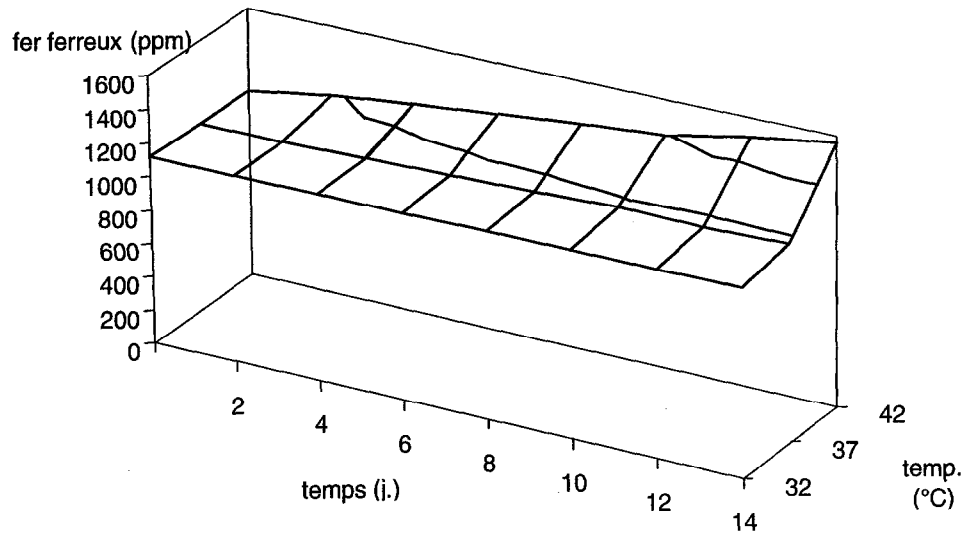
Cinétique d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **sulfate ferreux**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #1** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

Figure 11B

essai inoculé



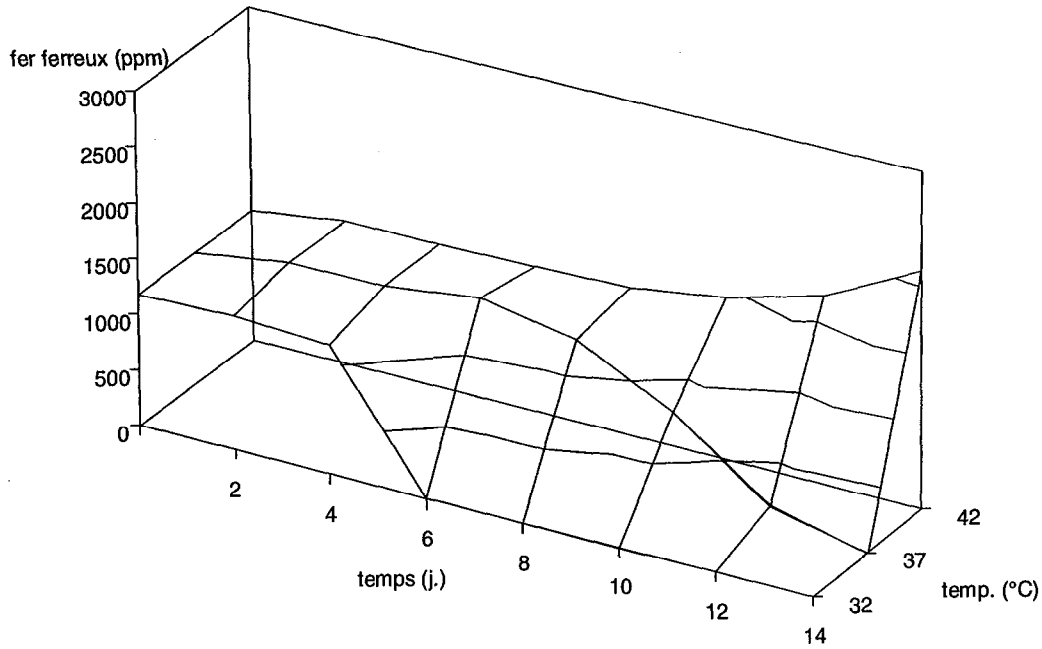
témoin stérile



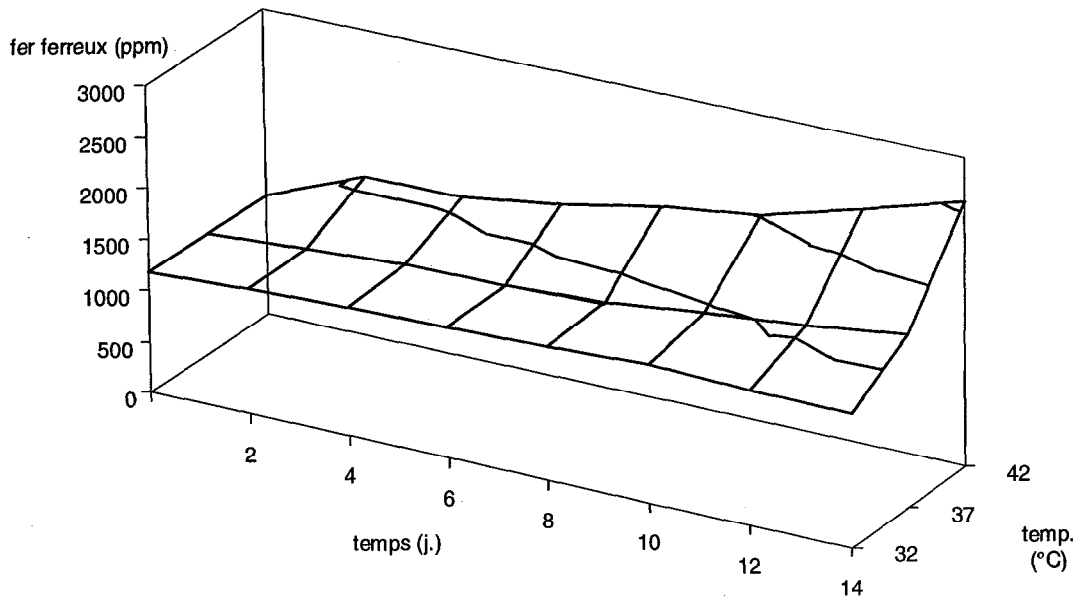
Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **soufre élémentaire**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #1** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

Figure 11C

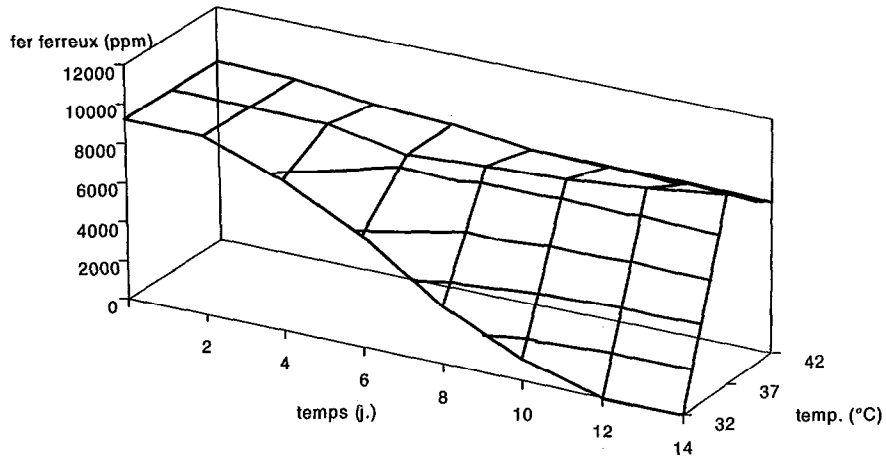
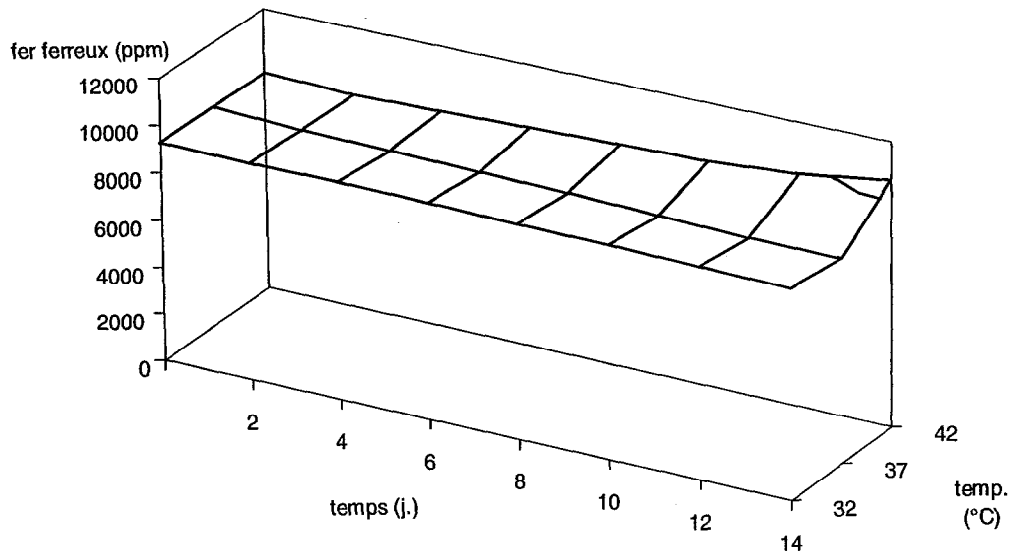
essai inoculé



témoin stérile



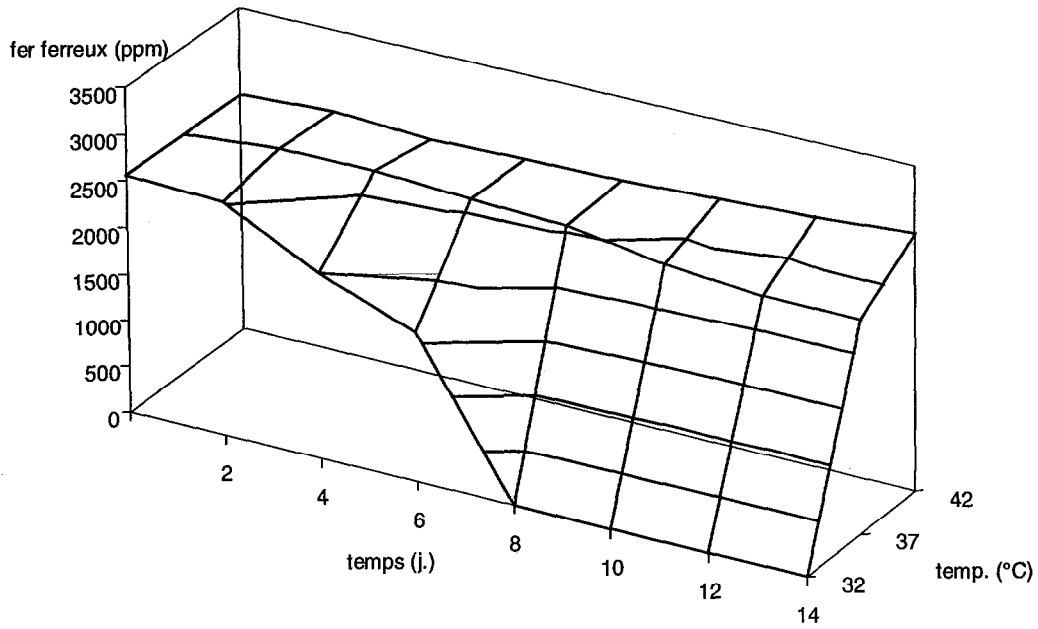
Cinétique d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **pyrite**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #1** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

**Figure 12A****essai inoculé****témoin stérile**

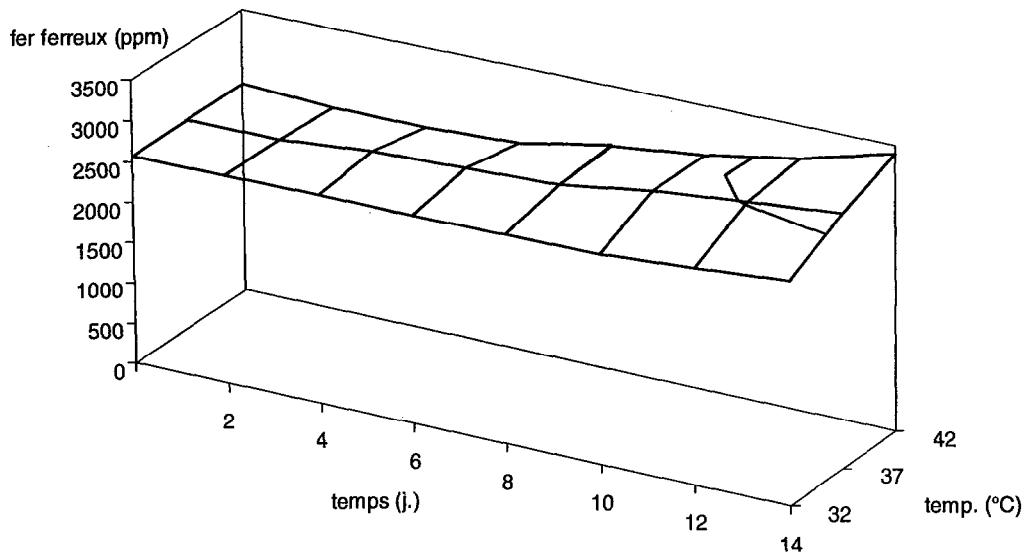
Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **sulfate ferreux**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #2** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

Figure 12B

essai inoculé

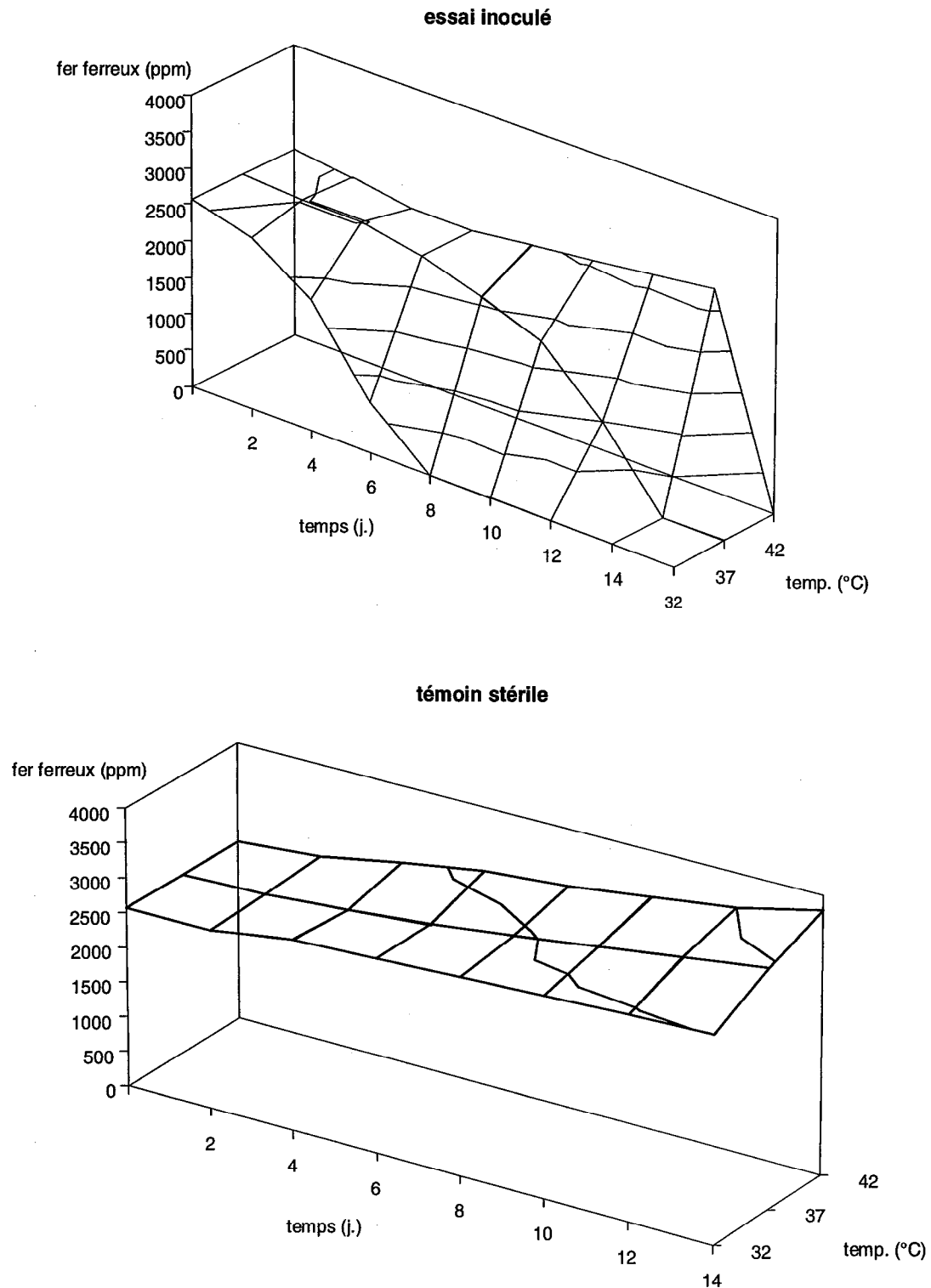


témoin stérile



Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **soufre élémentaire**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #2** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

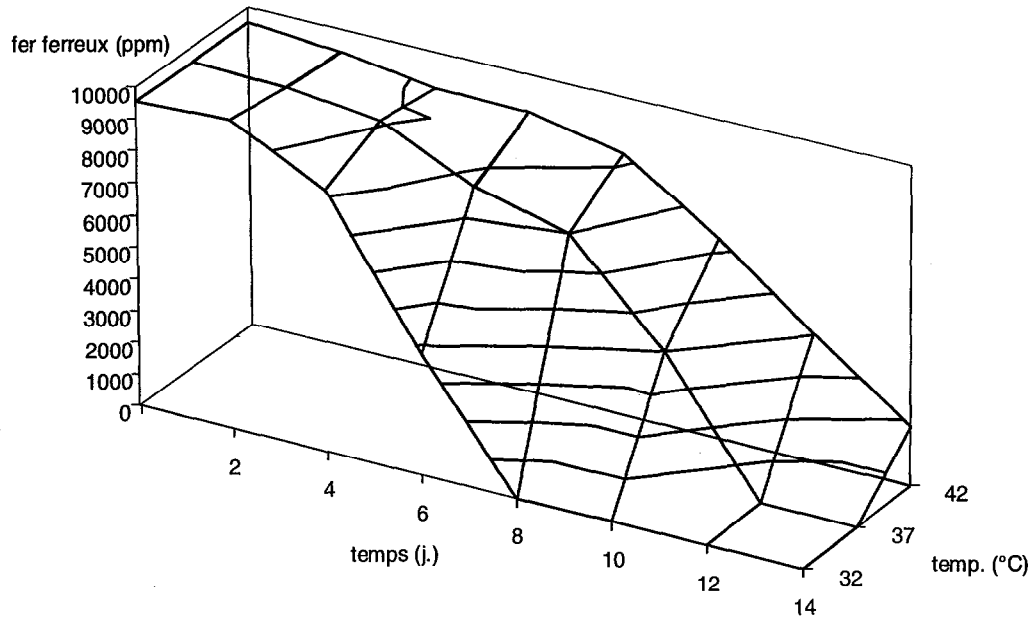
Figure 12C



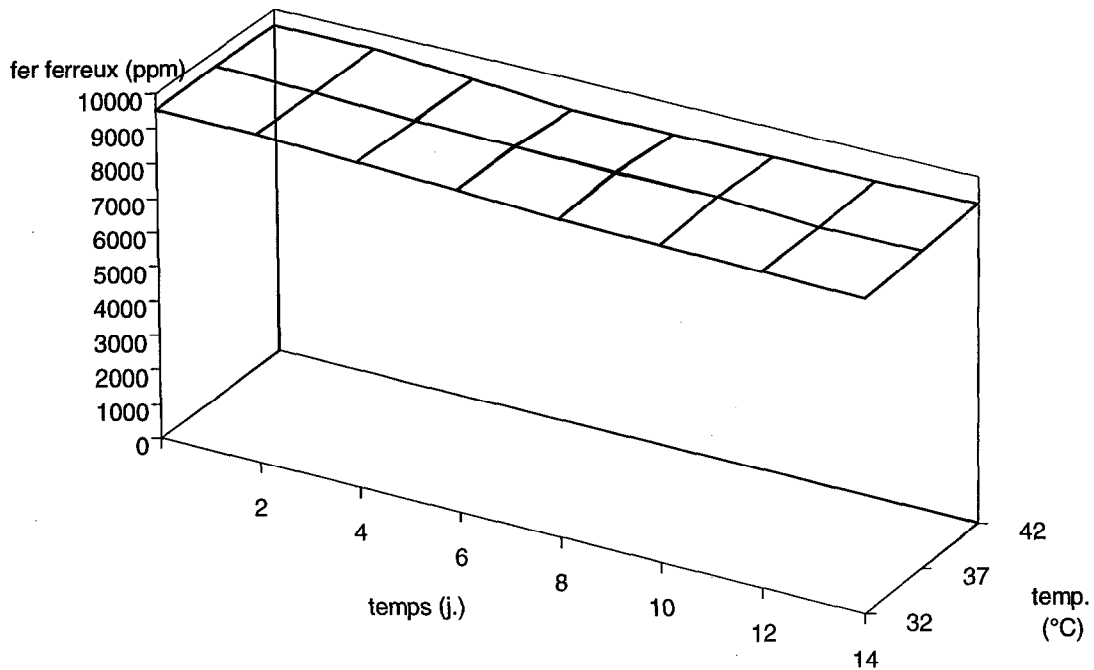
Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **pyrite**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #2** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

Figure 13A

essai inoculé

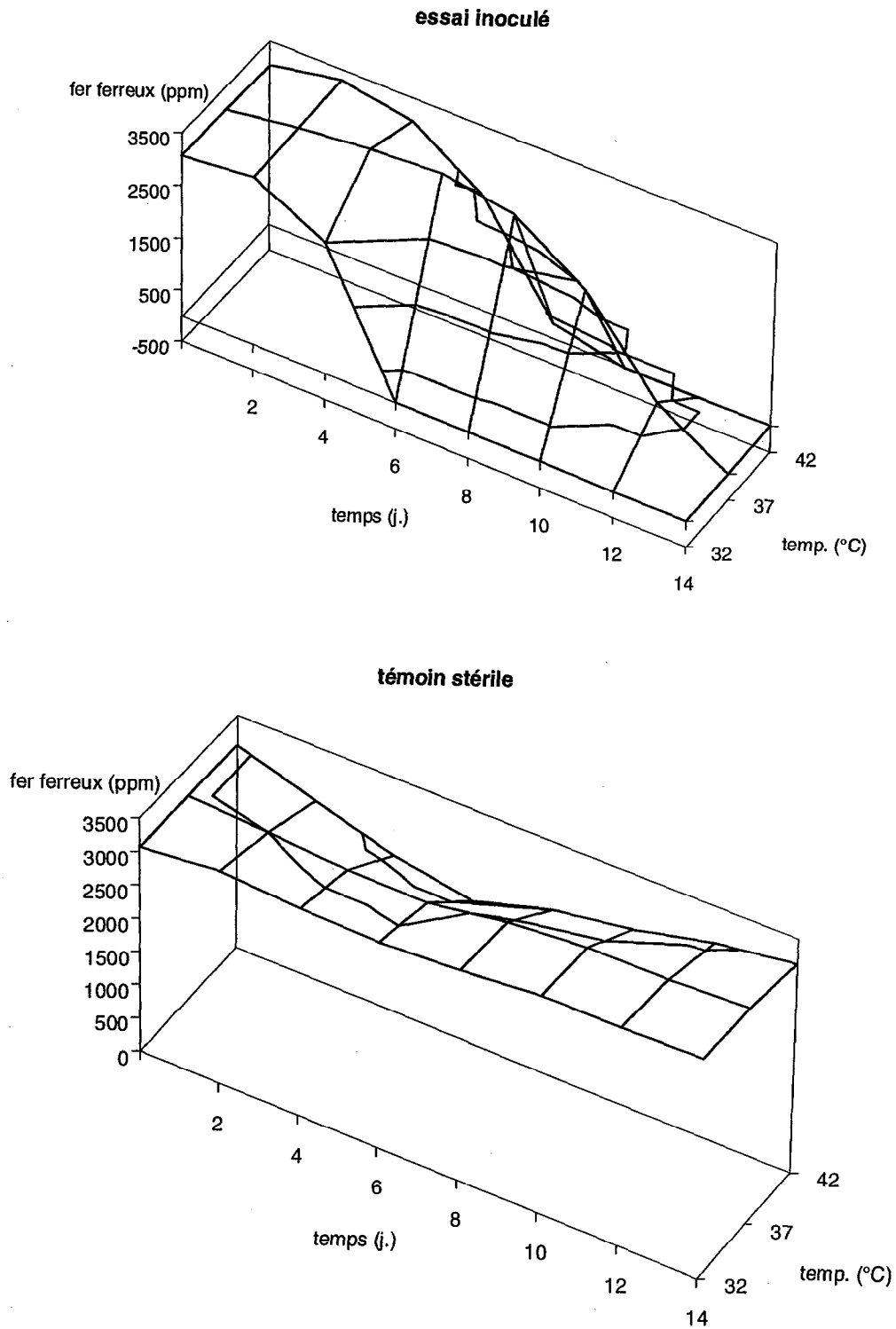


témoin stérile



Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **sulfate ferreux**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #3** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

Figure 13B

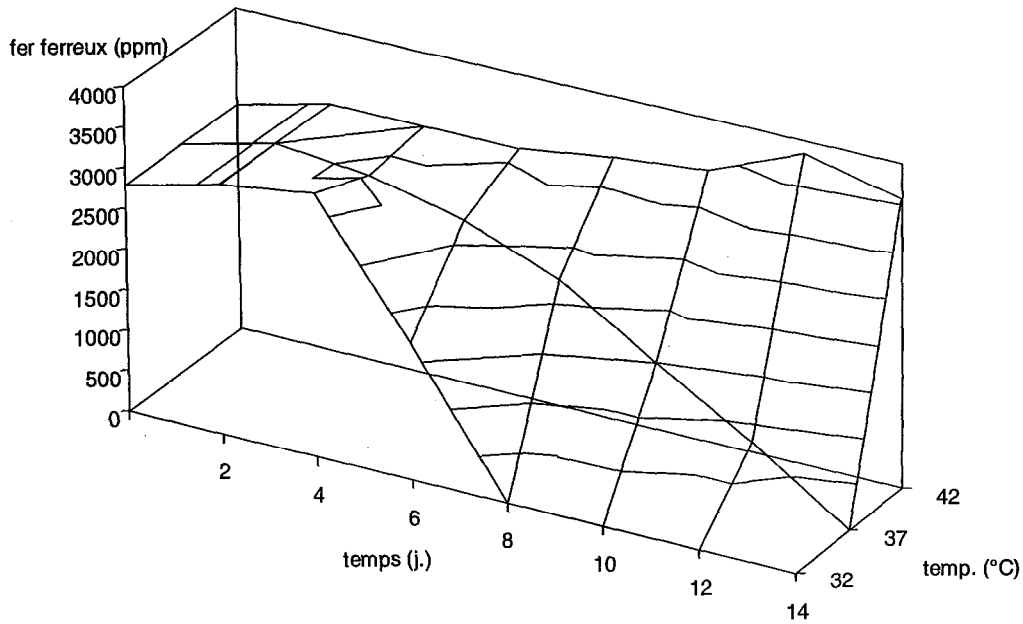


Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **soufre élémentaire**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #3** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

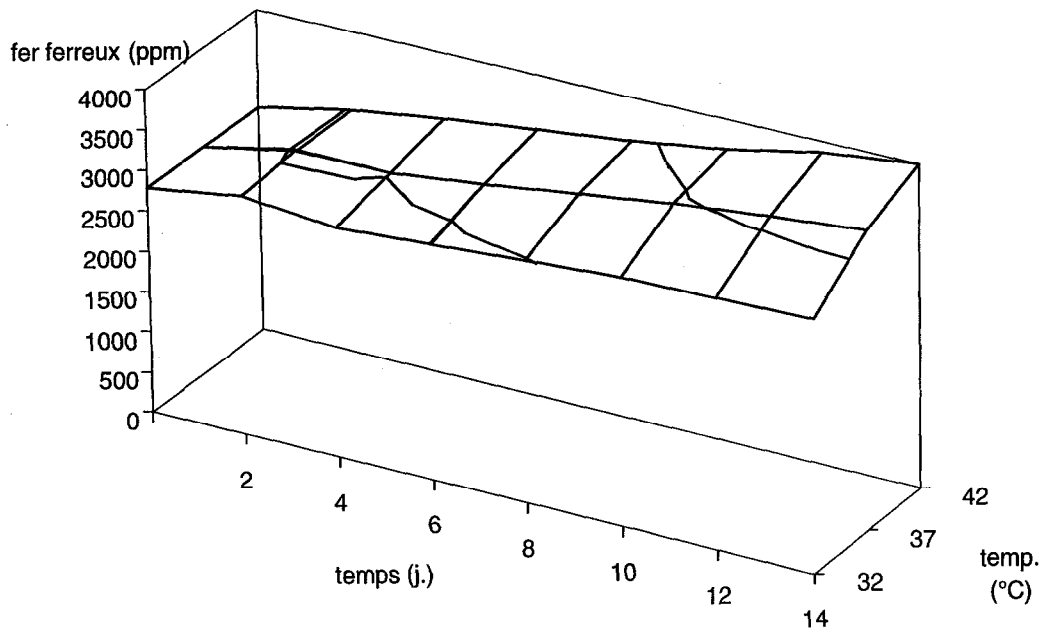


Figure 13C

essai inoculé

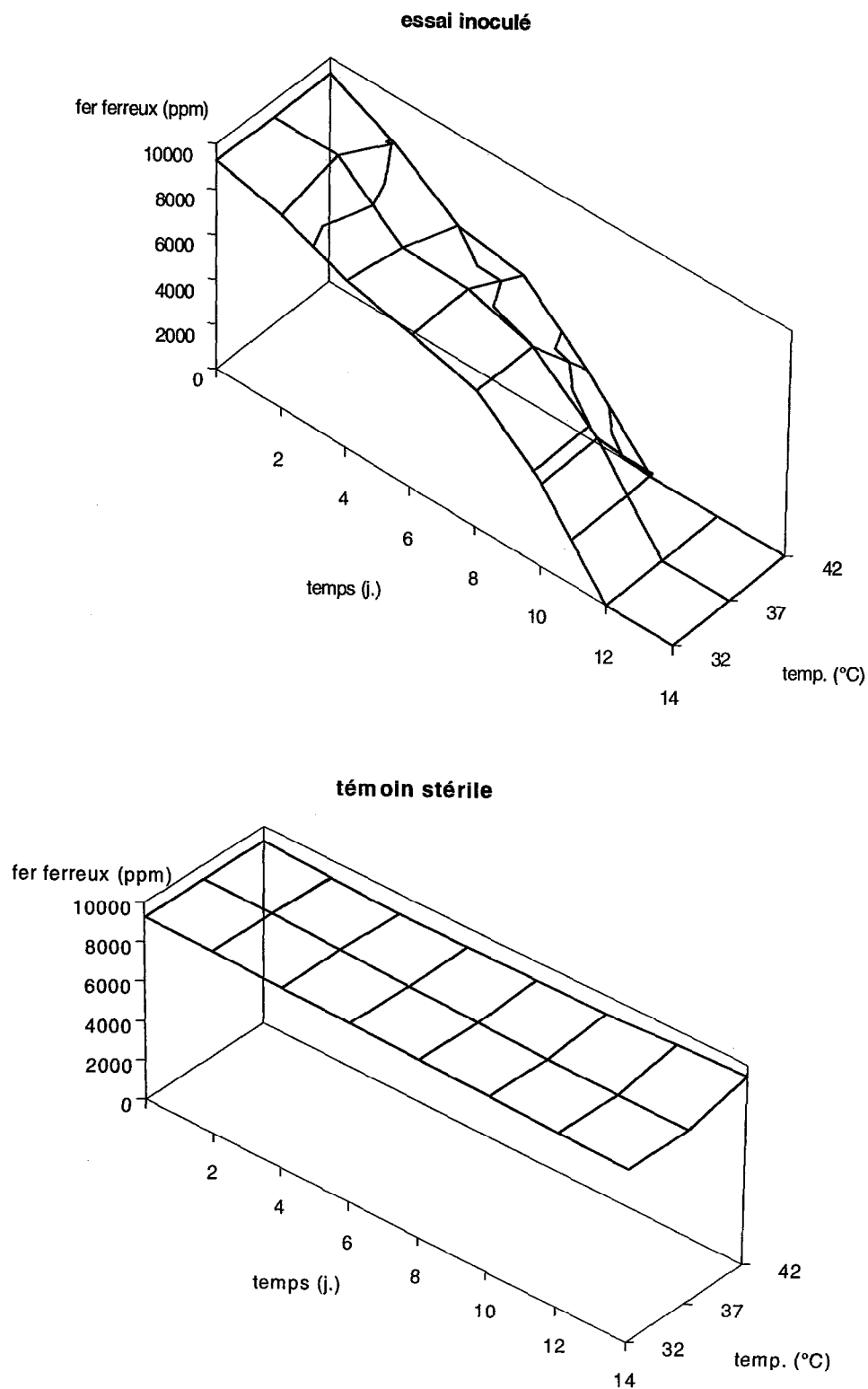


témoin stérile



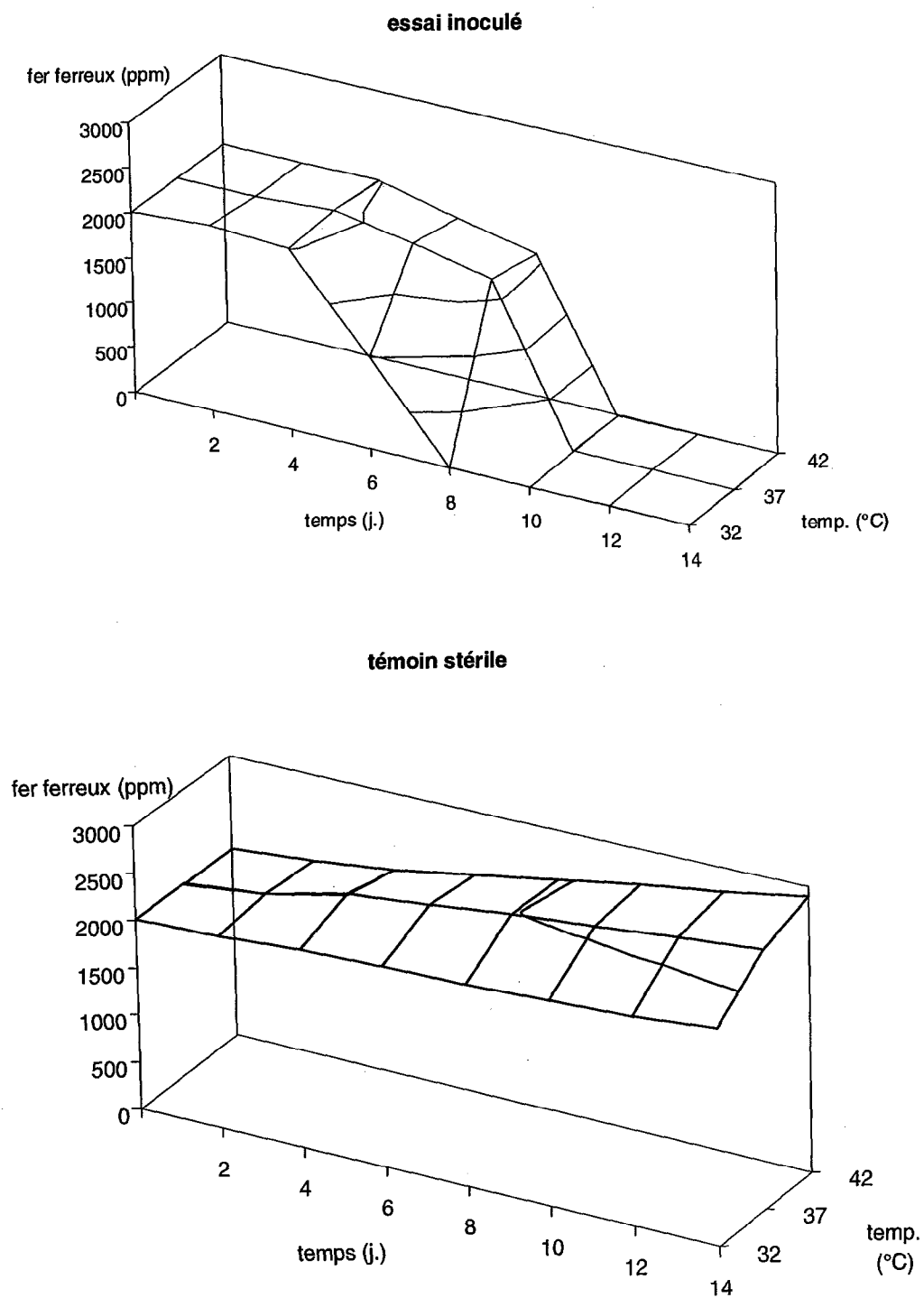
Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **pyrite**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #3** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

Figure 14A



Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **sulfate ferreux**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #4** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50

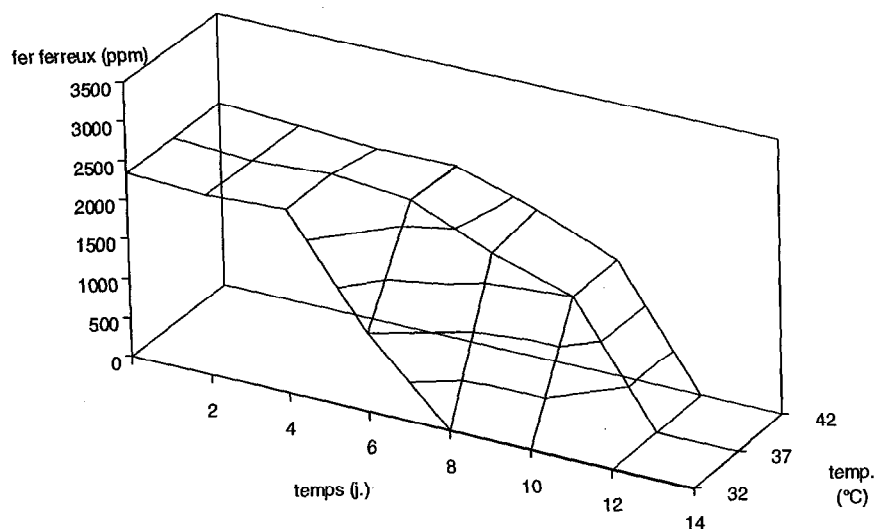
Figure 14B



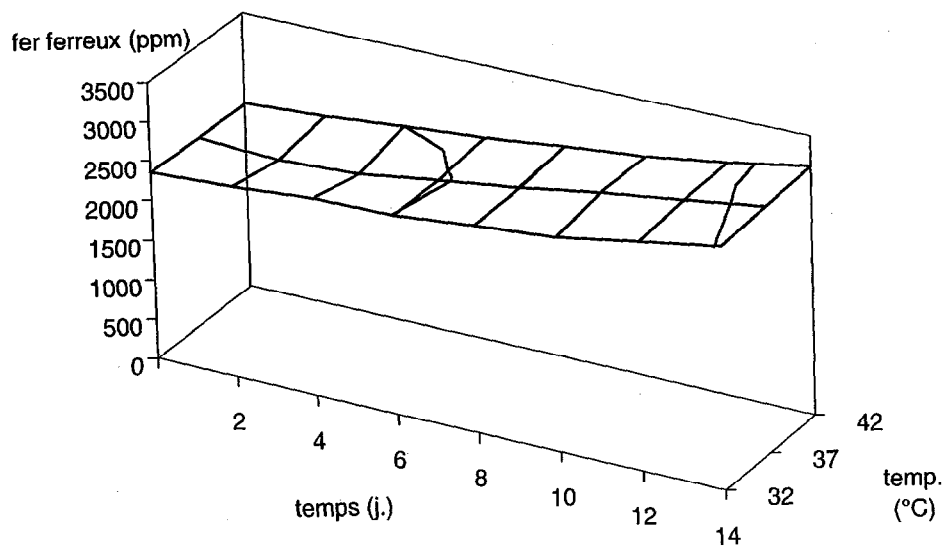
Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **soufre élémentaire**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #4** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50

Figure 14C

essai inoculé



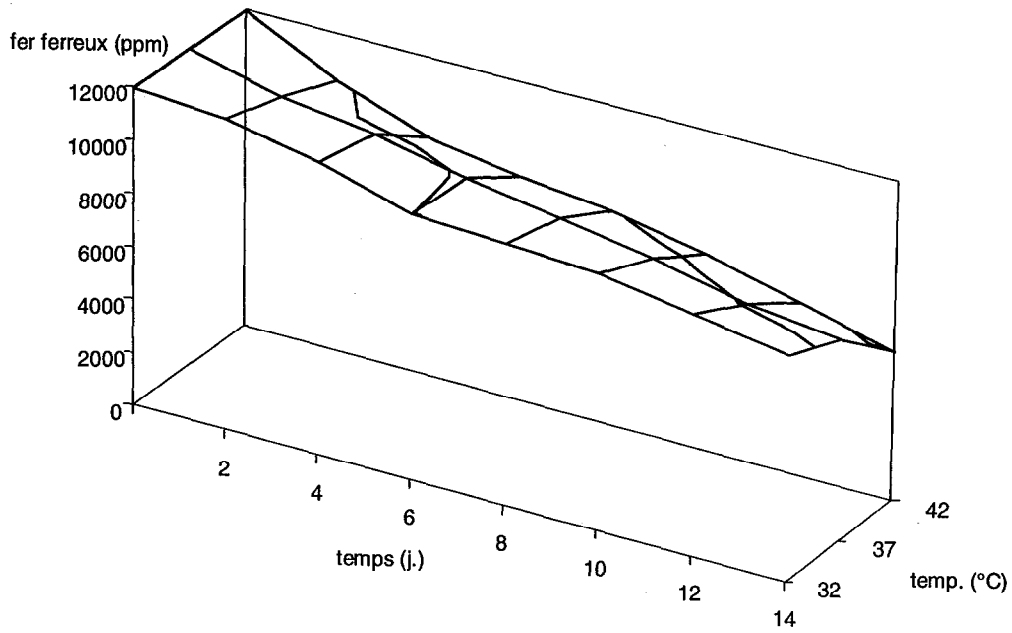
témoin stérile



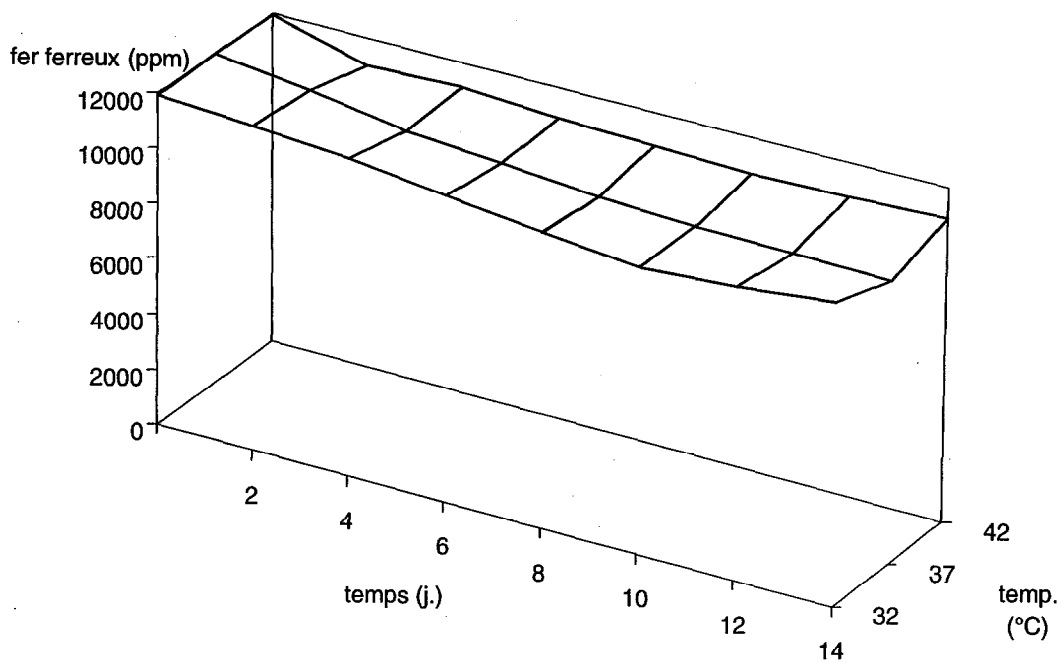
Cinétique d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **pyrite**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #4** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50

Figure 15A

essai inoculé



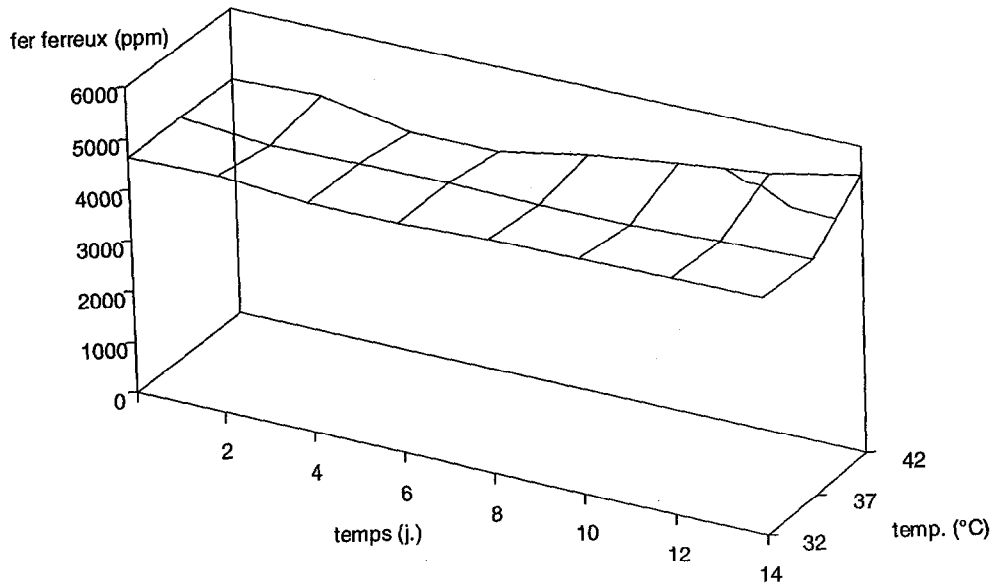
témoin stérile



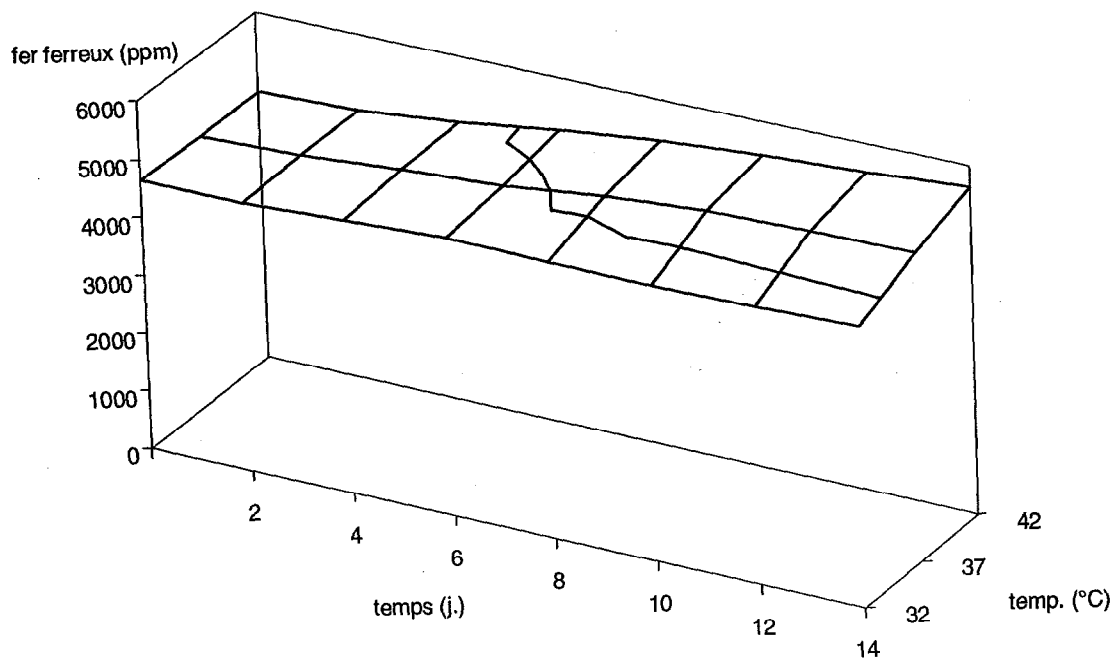
Cinétique d'oxydation microbologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **sulfate ferreux**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #6** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50

Figure 15B

essai inoculé



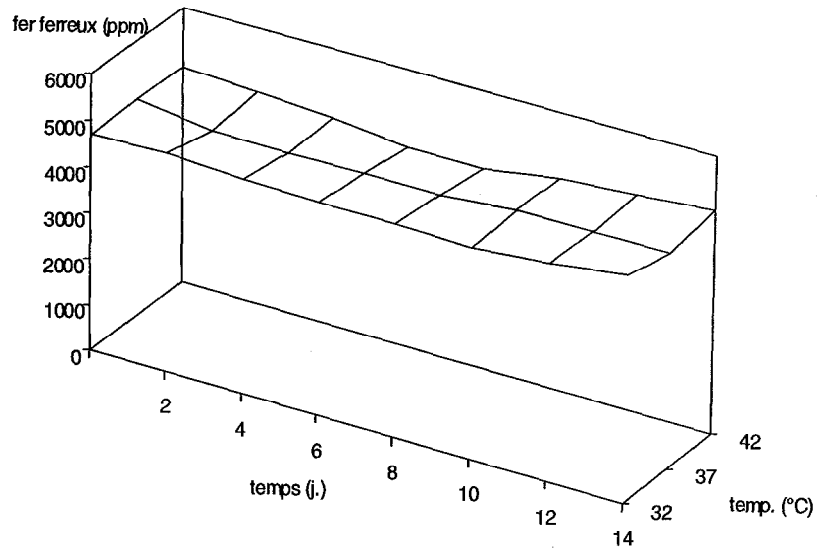
témoin stérile



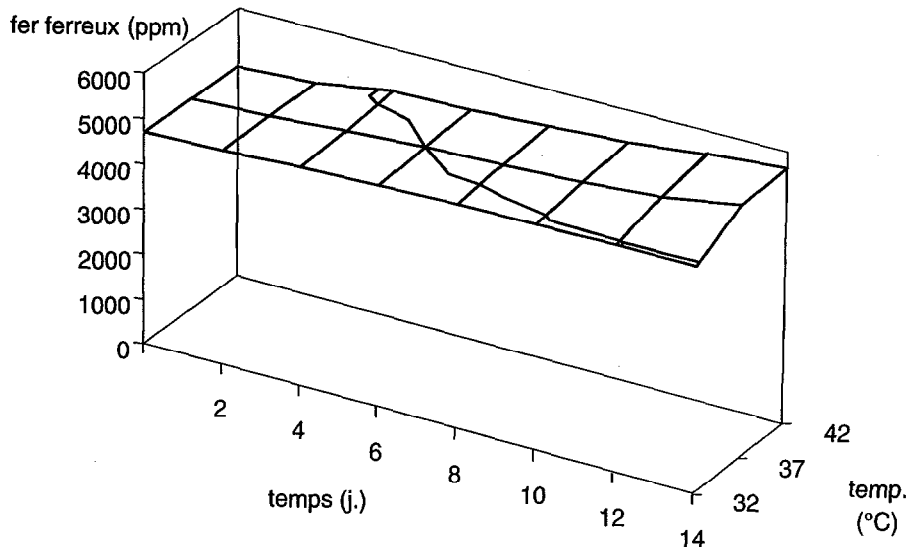
Cinétique d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **soufre élémentaire**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #6** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50

Figure 15C

essai inoculé



témoin stérile



Cinétique d'oxydation microbiologique de l'ion ferreux à différentes températures en présence de **pyrite**, dans un milieu constitué, d'eau souterraine du **puits #6** additionnée d'éléments nutritifs et ajusté à pH 2,50.

TABLEAU 7. Dénombrement cellulaire au terme de mesure de la croissance bactérienne sur différents substrats et à différentes temp

Puits	Substrat	Numération bactérienne (cellules /ml)		
		Température (°C)		
		32	37	42
1	FeSO <sub>4</sub>	4,2 X 10 <sup>5</sup>	ND	ND
	S°	3,1 X 10 <sup>5</sup>	6,7 X 10 <sup>5</sup>	1,3
	FeS <sub>2</sub>	2,0 X 10 <sup>6</sup>	3,7 X 10 <sup>3</sup>	7,2
2	FeSO <sub>4</sub>	2,1 X 10 <sup>5</sup>	ND	ND
	S°	1,2 X 10 <sup>4</sup>	8,3	4
	FeS <sub>2</sub>	2,3 X 10 <sup>5</sup>	7,0 X 10 <sup>3</sup>	ND
3	FeSO <sub>4</sub>	9,0 X 10 <sup>5</sup>	4,2 X 10 <sup>3</sup>	ND
	S°	3,1 X 10 <sup>5</sup>	1,3 X 10 <sup>2</sup>	6
	FeS <sub>2</sub>	3,6 X 10 <sup>6</sup>	5,8 X 10 <sup>5</sup>	3,1 X 10 <sup>3</sup>
4	FeSO <sub>4</sub>	7,0 X 10 <sup>5</sup>	8,2 X 10 <sup>2</sup>	3,7 X 10 <sup>1</sup>
	S°	2,7 X 10 <sup>5</sup>	1,0 X 10 <sup>2</sup>	9,0 X 10 <sup>-1</sup>
	FeS <sub>2</sub>	8,4 X 10 <sup>5</sup>	8,2 X 10 <sup>2</sup>	1,3 X 10 <sup>1</sup>
6	FeSO <sub>4</sub>	ND	ND	ND
	S°	ND	ND	ND
	FeS <sub>2</sub>	ND	ND	NO

ND : Non déterminé

\* : Milieux de culture constitués d'échantillons d'eau prélevés des cinq puits et additionnés d'éléments nutritifs



### 3.6 DÉTERMINATION DES CINÉTIQUES D'OXYDATION ET DE RÉDUCTION MICROBIOLOGIQUE DU FER

Compte tenu de conditions particulières qui prévalaient dans les eaux souterraines près du puits #4 (Tableau 1), des réactions de réduction et de reprécipitation probable de sulfures de fer (Figure 10) et de la présence abondante de microorganismes (Figure 9H), nous nous sommes attardés à étudier plus étroitement les capacités physiologiques de *T.ferrooxidans* dans cet environnement anoxique (0,05% de concentration à saturation en oxygène) et relativement tempéré (32°C). Les résultats obtenus lors de la croissance de *T.ferrooxidans* ATCC 13661 et des isolats bactériens provenant du puits #4 sur un milieu de culture constitué de 4 volumes du milieu 9K auquel était additionné un volume d'eau souterraine stérilisée sont présentés aux Figures 16 et 17. Le graphique de la Figure 16 montre clairement que la souche de *T.ferrooxidans* ATCC 13661 oxyde rapidement, en moins de 3 jours, le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  à 30°C sous agitation constante en **présence d'oxygène**; lorsque les flacons contenant cette culture sont par la suite placés dans un hotte anaérobie en culture stationnaire, les bactéries oxydent le soufre élémentaire en réduisant le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  en **absence complète d'oxygène** à 27°C.

Le substrat énergétique des bactéries, constitué de soufre élémentaire ou de  $\text{FeS}_2$ , a été ajouté de manière aseptique aux flacons avant leur incubation en anaérobiose. Le pH a été noté au début de l'expérimentation à 3,36 (Tableau 1) et à différentes reprises par la suite au cours des essais. Des tests de dénombrement ont aussi été réalisés au début et à la fin de l'expérience pour s'assurer de la croissance positive des microorganismes. A titre indicatif, nous avons poursuivi ce cycle d'oxydation et de réduction au moins une deuxième fois et nous avons noté une chute significative du pH lors de ces essais qui est passé de 3,36 à 1,40, une diminution de deux unités; ce qui démontre que des bactéries reconnues aérobies strictes, sont capables d'oxyder des substrats soufrés ( $\text{S}^0$  et  $\text{S}^{2-}$ ) en anaérobiose en utilisant les ions ferriques comme accepteurs des électrons arrachés au soufre.

Cette expérimentation réussie avec des bactéries identifiées (ATCC) a été reprise en utilisant des bactéries acidophiles ferro-oxydantes isolées des eaux souterraines recueillies du puits #4 selon la même procédure expérimentale. La Figure 17 montre les courbes d'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  et de réduction microbiologique du  $\text{Fe}^{3+}$  en fonction du temps et au cours de deux cycles

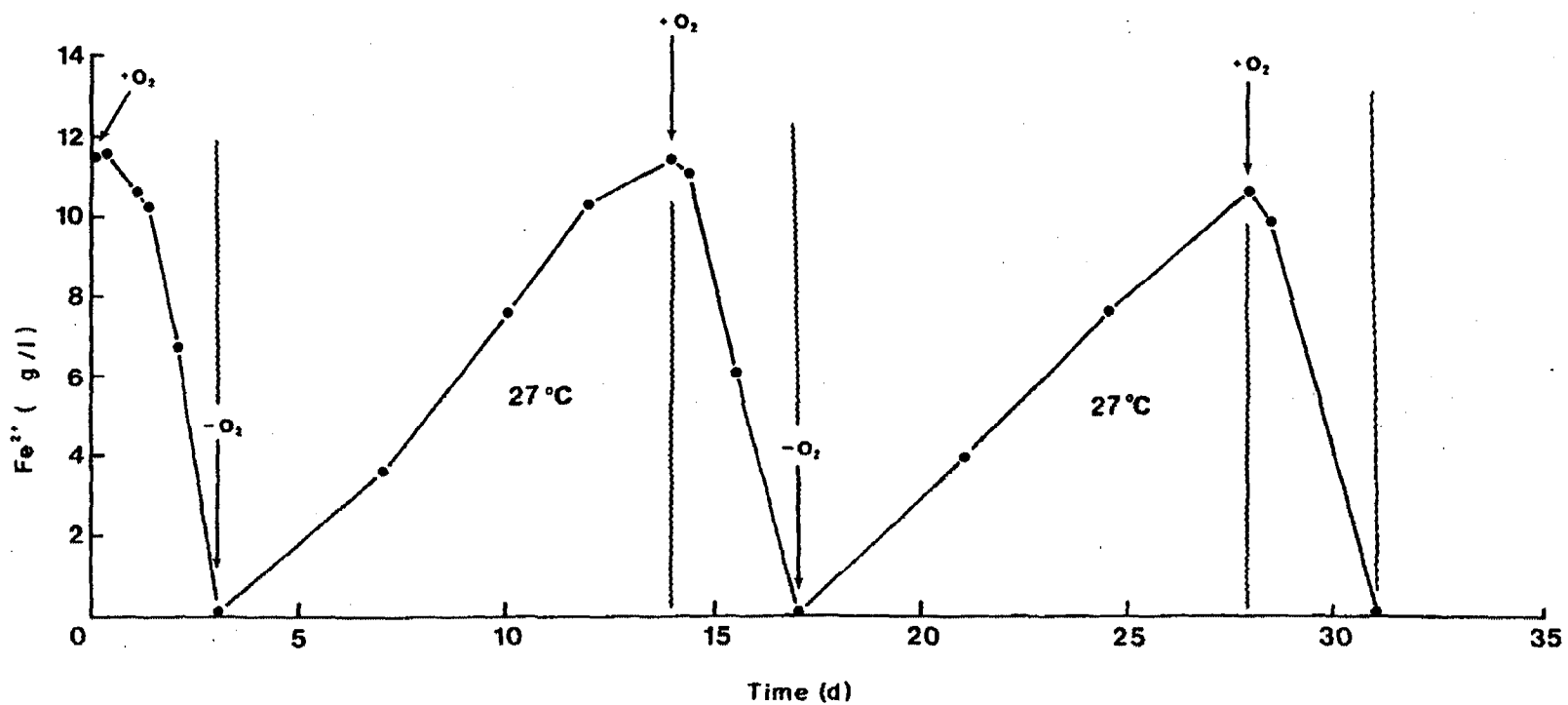
complets.

Les cinétiques d'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  en aérobiose ont été respectivement de 280 mg/L/h et de 240 mg/L/h pour *T.ferrooxidans* ATCC 13661 et pour les bactéries indigènes au site alors qu'elles se situaient respectivement à 85 mg/L/h et 55 mg/L/h pour la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  par la souche de collection et les bactéries indigènes. Les essais tentés en utilisant la pyrite comme "substrat soufré" ont donné des résultats variables, peu représentatifs, et les cinétiques que nous avons pu déterminer approximativement se situaient autour des 25 mg/L/h pour les deux types de bactéries. Par ailleurs, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de soufre élémentaire comme intermédiaire chimique produit par la réaction d'oxydation de la pyrite par les ions ferriques.

Nous avons évalué l'accroissement des populations bactériennes à approximativement 10% de leurs nombres initiaux respectifs, ce qui ne permet pas de conclure qu'il y a eu croissance effective lors de l'incubation en anaérobiose malgré la catalyse efficace des réactions d'oxydation aérobie du  $\text{Fe}^{2+}$ , de la réduction anaérobie du  $\text{Fe}^{3+}$  et la production concomittante d'acide sulfurique. Des essais stériles ont été réalisés en même temps et dans les mêmes conditions que l'expérimentation avec les milieuxensemencés et les résultats obtenus font état de l'absence de réactions d'oxydation et de réduction du fer.

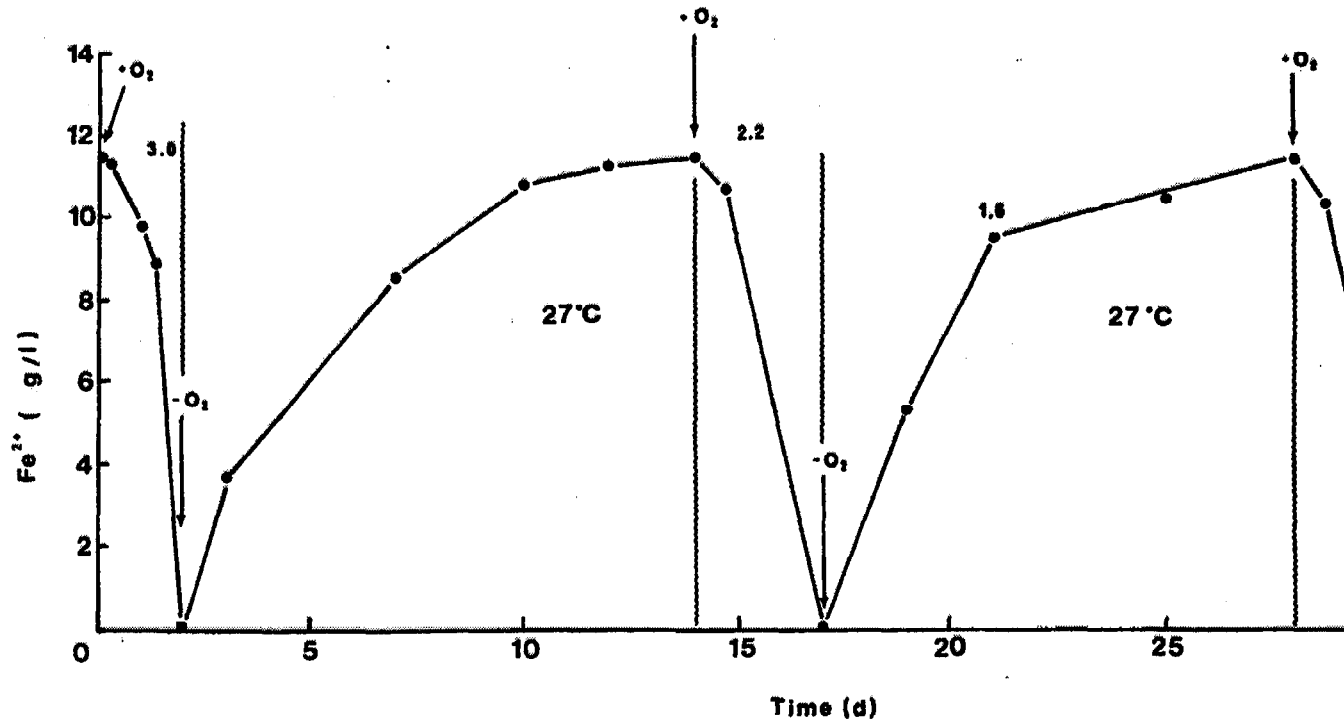
FIGURE 16

Cycles d'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  et de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  respectivement au cours de la croissance aérobie sur le sulfate ferreux et de la respiration anaérobie de *T.ferrooxidans* ATCC 13661.



**FIGURE 17**

**Cycles d'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  et de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  respectivement au cours de la croissance aérobie sur le sulf la respiration anaérobie d'un isolat bactérien des eaux souterraines du puits #4.**



#### 4. DISCUSSION ET RECOMMANDATION

Sur la base des résultats expérimentaux obtenus de l'analyse microbiologique des rognures de forage du puits d'observation # 1 et à l'analyse des microphotographies en microscopie électronique à balayage des minéraux immergés dans les eaux souterraines de la halde sud dans les puits # 1, 2 4 et 6, nous sommes en mesure de proposer un modèle dynamique des réactions chimiques et microbiologiques d'oxydation de la pyrite et du soufre élémentaire au sein de la halde Sud.

La Figure 18 présente une représentation schématique d'un modèle que nous proposons. On y distinguerait 4 zones,

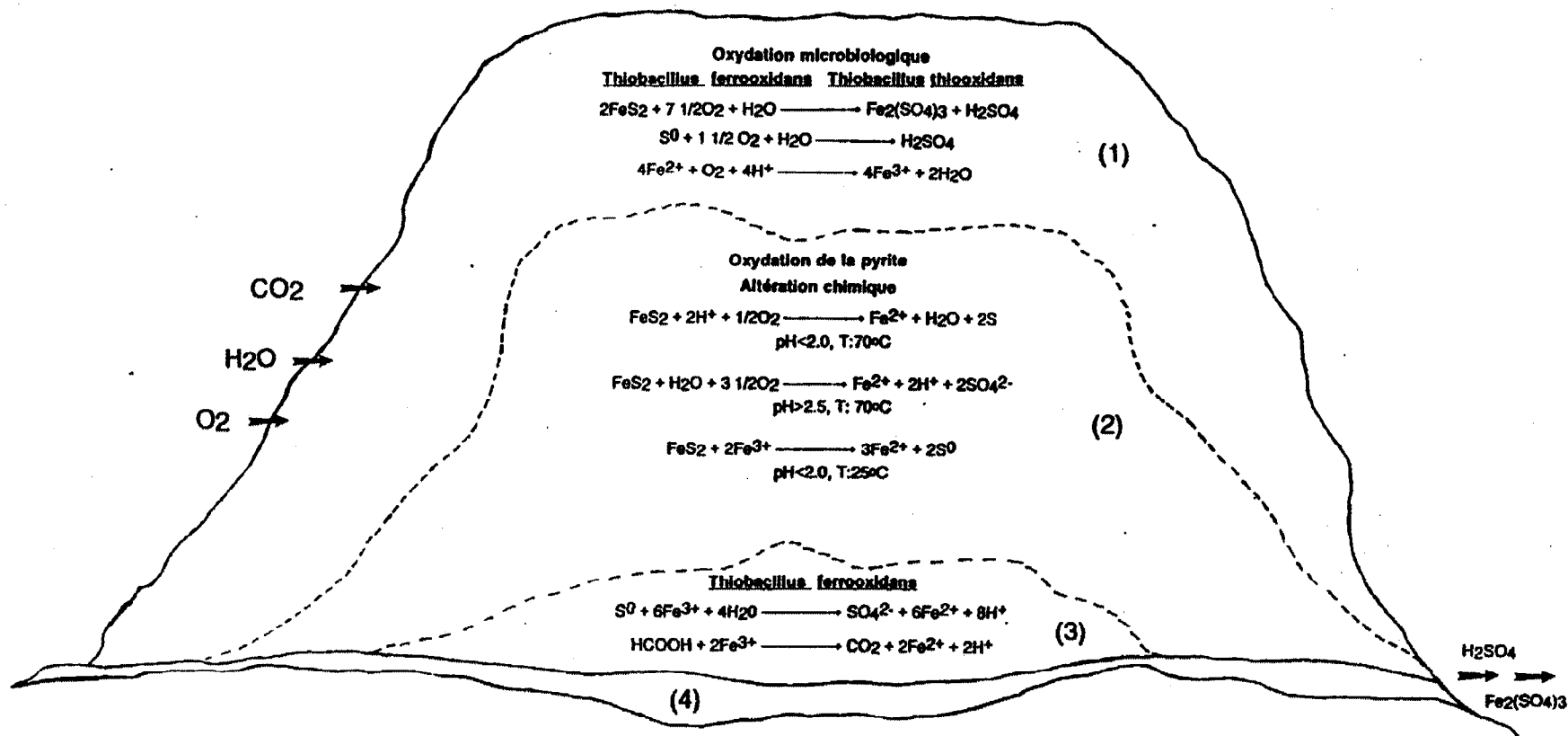
- zone 1: zone aérée de la halde à stériles où l'oxydation microbiologique de la pyrite et du soufre élémentaire produit lors de l'oxydation chimique de la pyrite par les ions ferriques, est la plus active; on y retrouverait des espèces comme *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, *L. ferrooxidans* et possiblement d'autres espèces acidifiantes et acidophiles non identifiées. L'activité microbiologique intense observée à partir des rognures de forage du puits # 1 confirme cette hypothèse puisque le forage a été effectué à dessein dans une zone où "un effet cheminée" avait déjà été observé par d'autres chercheurs (cf. Rapport GREGI 91-19).
- zone 2: région où la disponibilité de l'oxygène serait de plus en plus faible et là où la température ambiante atteindrait des valeurs relativement élevées jusqu'à 65°C (cf. rapport GREGI 91-19). Les réactions chimiques d'oxydation de la pyrite par l'oxygène et les ions ferriques y seraient prépondérantes par rapport aux réactions d'oxydation microbiologiques. Par ailleurs, nous croyons que la production chimique de soufre élémentaire serait significative dans cette section de la halde. Même si cette zone présente des conditions très limitantes en termes de températures élevées (30°C - 65°C), l'oxydation microbiologique de la pyrite est possible jusqu'à des températures optimales de 70°C. Elle pourrait y être réalisée par des souches de *Sulfolobus acidocaldarius* et de *Acidianus brierleyi* dont les pH optima de croissance sont respectivement de 2,0 et 4,0. Nous n'avons malheureusement pas été en mesure d'isoler ces espèces lors de l'exécution du présent travail.

zone 3: zone anoxique où la tension partielle d'oxygène est faible et où la température ambiante est relativement stable autour de 25°C - 35°C. L'activité microbiologique dans cette région de la halde est probablement élevée et repose vraisemblablement sur l'oxydation du soufre élémentaire couplée à la réduction des ions ferriques en milieu acide. Ces réactions métaboliques ont d'ailleurs été caractérisées auparavant (Pronk et coll., 1991; Suzuki et coll., 1990; Brock et Gustafson, 1976 et Sugio et coll., 1992).

zone 4: eaux souterraines où l'oxygène dissous est amené aux microorganismes en concentration très restreinte, mais où les ions ferriques sont très abondants. L'activité microbiologique que nous y avons observée reflète, croyons-nous, les réactions métaboliques ayant pour point commun l'oxydation du soufre et des sulfures puisque parmi les minéraux qui ont été immergés dans les eaux des 4 puits, seul le soufre élémentaire y a été très abondamment colonisé.

L'activité oxydatrice bactérienne sur la pyrite requiert de l'oxygène et de l'eau. L'oxygène n'est disponible que sous la forme dissoute dans l'eau et sa solubilité est fonction de la température et de sa pression partielle. Il a été démontré qu'une partie significative de l'oxygène des sulfates provient de l'eau H<sub>2</sub>O (étude isotopique). C'est donc dans la partie haute de la halde et dans les cheminées naturelles au sein de la masse rocheuse qu'on retrouvera *T. ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans* et d'autres espèces bactériennes acidifiantes et acidophiles dont les propriétés de croissance sont similaires à celles de *T. ferrooxidans*. Le puits d'observation # 1 a été foré dans une zone où il existe un "effet cheminée" particulièrement important (cf. Rapport GREGI 91-19). Les observations que nous y avons faites sur toute la hauteur de la colonne stratigraphique et dans les eaux souterraines confirment très justement cet avancé. L'activité oxydatrice bactérienne y est très intense et la variété de microorganismes présents est un indice très sûr des capacités métaboliques du monde microbien qui colonise cet environnement.

**FIGURE 18:** Représentation schématique d'un modèle de production microbologique de drainage minier acide au sein de la halde sud de la Mine Doyon.



- 1) Zone d'oxydation microbologique aérobie de la pyrite et du soufre (0°C - 35°C)
- 2) Zone d'oxydation chimique microaérophile de la pyrite (25°C - 65°C)
- 3) Zone de respiration microbienne anaérobie et d'oxydation anoxique du soufre (20°C - 45°C)
- 4) Eaux souterraines à forte activité microbologique (15°C - 45°C)

Les conclusions que nous pouvons tirer des résultats expérimentaux obtenus à date vont dans la direction suivante:

- 1- La température élevée au sein de la halde de stériles et au niveau des eaux souterraines n'entrave pas l'activité microbiologique d'oxydation comme telle. Une température de plus de 40°C affecte la croissance de *T. ferrooxidans* et de *L. ferrooxidans* et partant l'oxydation du fer ferreux mais semble laisser intacte l'activité oxydatrice des autres espèces qui ont la propriété d'oxyder les composés soufrés et le soufre élémentaire. Nous avons pu repérer au moins à deux reprises ce que nous croyons être des *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* dont la température de croissance varie de 20 à 60°C.
- 2- La disponibilité de l'oxygène est un facteur limitant de l'activité oxydatrice des bactéries vis-à-vis la pyrite et le fait de recouvrir les haldes de stériles d'un matériau imperméable restreindra d'une manière significative l'apport d'oxygène.  
Par ailleurs, nous avons démontré expérimentalement que l'activité thio-oxydante des bactéries comme *T.ferrooxidans* et des isolats bactériens provenant du site peut se poursuivre en absence totale d'oxygène, l'accepteur d'électrons étant l'ion ferrique; il y a donc lieu d'exercer beaucoup de prudence avant de songer à établir une barrière sèche autour et sur les haldes. Nous croyons que l'oxydation chimique de la pyrite par les solutions ferriques acides amènera suffisamment de soufre élémentaire et des sulfures pour maintenir l'activité bactérienne. Des indices sérieux semblent nous le confirmer: les conditions physico-chimiques du puits d'observation # 4 où les bactéries croissent très bien sur le soufre élémentaire.
- 3- L'apport d'eau est quasi constant et il est essentiel au maintien des réactions chimiques et microbiologiques au sein des haldes.



## 5. RÉFÉRENCES

Brock, T.D. et J. Gustafson. 1976. Ferric iron reduction by sulfur-and iron- oxidizing bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, 32: 567-571.

Groupe de Recherche en Géologie de l'Ingénieur. 1991. Évaluation du drainage minier acide et des barrières sèches pour les haldes de stériles: Étude du site de la Mine Doyon. Rapport GREGI 91-19 et Annexes A, B, C et D. Département de Géologie, Université Laval, Ste-Foy, Qc. Canada.

Groupe de Recherche en Géologie de l'Ingénieur. 1994. Monitoring and Modeling of Acid Mine Drainage From Waste Rocks Dumps: La Mine Doyon Case Study. Rapport GREGI 1994-12 et Annexes A et B. Département de Géologie, Université Laval, Ste-Foy, Qc. Canada.

Guay, R., J. Ghosh et A.E. Torma. 1989. Kinetics of microbiological production of ferric ion for heap and dump leaching. In: *Biotechnology in Mineral and Metal Processing*. B.J. Scheiner, F.M. Doyle and Siki Kawatra, Eds., Society of Mining Engineers, Inc. Littleton, Co.: 95-106.

Guay, R., M. Silver et A.E. Torma, 1977. Ferrous ion oxidation and uranium extraction by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 727-740.

Johnson, D.B. et S. McGinness. 1991. Ferric iron reduction by aciophilic heterotrophic bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, 57: 207-211.

MacDonald, D.G. et R.H. Clark, 1970. The oxidation of aqueous ferrous sulfate by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Chem. Eng.*, 48: 669-676.

Pronk, J.T., K. Liem, P.Bos et J.G. Kvenen. 1991. Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 57: 2063-2068.

Silverman, M.P. et D.G. Lundgren. 1959. Studies on the chemoautotroph iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.*, 77: 642-647.

Sugio, T., K.J. White, E. Shute, D. Choate et R.C.B. Lake II. 1992. Existence of a hydrogen sulfide: ferric ion oxydo-reductase in iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, 58: 431-433.

Suzuki, I., L. Travis, T. Takeushi, T.D. Yuthasastrakosol et J.K. Oh. 1990. Ferrous iron and sulfur oxidation and ferric iron reduction activities of *Thiobacillus ferroxidans* are affected by growth on ferrous iron, sulfur, or a sulfide ore. *Appl. Environm. Microbiol.*, 56: 1620-1626.

## **6. ANNEXES**

Annexes I à IV: Caractéristiques morphologiques et physiologiques des bactéries impliquées dans la production du drainage minier acide.

Annexe V: Description des coupures de forage du puits #1 sur la halde sud de la Mine Doyon.

**ANNEXE 1***ACIDIPHILUM CRYPTUM***MORPHOLOGIE:**

Bactéries à GRAM négatif

Non sporulées, mobiles (2 flagelles)

En forme de bâtonnets

Dimensions: 0,3 - 0,4 µm x 0,6 - 0,8 µm

**PHYSIOLOGIE:**

Bactéries aérobies

Acidophiles, pH: 2,0 - 6,0

Hétérotrophes, milieu TS-Glucose

Mésophiles, T°C: 20 - 45°C

Référence: Rossi, G. 1991. Biohydrometallurgy. McGraw-Hill Book Co., GmdH, Hamburg.

## ANNEXE II

### *THIOBACILLUS FERROOXIDANS* et variants

#### MORPHOLOGIE:

Bactéries à GRAM négatif

Non sporulées, mobiles (un flagelle polaire)

En forme de bâtonnets (isolées, en courtes chaînes)

Dimensions: 0,5 - 0,8  $\mu\text{m}$  x 1,0 - 1,5  $\mu\text{m}$

#### PHYSIOLOGIE:

Bactéries aérobies strictes

Acidophiles, pH: 0,5 - 3,5

Chimio-autotrophes:  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{S}^0$ , ( $\text{Cu}^{2+}$ ?)

Mésophiles,  $T^0$ : 15 - 35°C (optimum: 30°C)



Référence: Guay, R., A.E. Torma and M.S. Silver. 1975. Oxydation de l'ion ferreux et mise en solution de l'uranium d'un minéral par *Thiobacillus ferrooxidans*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 126B: 209-219.

## ANNEXE III

### *LEPTOSPIRILLUM FERROOXIDANS*

#### MORPHOLOGIE:

Bactéries à GRAM négatif

Non sporulées, mobiles (un flagelle polaire)

En forme de spirilles

Dimensions: 0,4 - 0,6  $\mu\text{m}$  x 0,6 - 1,0  $\mu\text{m}$

#### PHYSIOLOGIE:

Bactéries aérobies

Acidophiles, pH: 1,5 - 4,5 (optimum 3,0)

Chimio-autotrophes:  $\text{Fe}^{2+}$

Mésophiles,  $T^{\circ}$ : 20 - 40 $^{\circ}\text{C}$  (optimum: 28 $^{\circ}\text{C}$ )



Référence: Pivovarova, T.A., G.E. Markosyan and G.I. Karavaiko. 1981. Morphogenesis and fine structure of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Mikrobiologiya*, 50: 482-486.

## ANNEXE IV

*SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS**SULFOLOBUS SOLFATARICUS**SULFOLOBUS AMBIVALENS*

Bactéries lobées (formes irrégulières)

Thermophiles extrêmes, 70 - 85°C (optimum: 75°C)

Acidophiles, pH 2,0 - 7,0 (optimum: 2,0)

Autotrophes, Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>, S<sup>0</sup>

*ACIDIANUS BRIERLEYI*

Bactéries pléomorphes

Thermophiles extrêmes, 70 - 85°C

*SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS*

Bactéries à GRAM positif, pléomorphes, sporulées

Aérobies stricts acidophiles, (pH: 1,9 - 3,0) thermophiles modérés (20 - 60°C), autotrophes facultatifs

- Référence: Rossi, G. 1991. Biohydrometallurgy. McGraw-Hill Book Co., GmdH, Hamburg.
- Harrison, A.P. 1984. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. Ann. Rev. Microbiol., 38: 265-292.
- Golovacheva, R.S. and G.I. Karavaiko. 1978. A new genus of thermophilic spore-forming bacteria, *Sulfobacillus*. Mikrobiologiya 47: 815-822.

**Projet Doyon**  
**Forages - Halde Sud - Janvier 1991**

*Description des coupures de forage* **ANNEXE V**

<i>Numéro De Forage</i>	<i>Numéro d'Échantillon</i>	<i>Profondeur (m)</i>	<i>Description</i>
1	1	1.5	Schiste à séricite. Gris. Pyrite abondante dans la fraction fine et à la surface des fragments. Pas d'évidence d'altération importante.
1	2	3.0	Schiste à séricite. Gris. Quelques fragments de quartz. Pyrite abondante dans la fraction fine et à la surface des fragments. Pas d'évidence d'altération importante.
1	3	5.0	Schiste à séricite. Rouille. Pyrite ternie abondante dans la fraction fine. Pyrite légèrement altérée à la surface des fragments. Croutes d'hydrox. de fer sur de nombreux fragments.
1	4	6.1	Schiste à séricite. Gris jaunâtre. Présence probable de jarosite. Très peu de gros fragments. Pyrite abondante dans la fraction fine, légèrement altérée. Gypse visible. Pyrite déchaussée à la surface de la majorité des fragments. Nombreux trous sur les fragments remplis d'hydrox. de fer de probablement de jarosite. Gypse présent, parfois abondant dans les plans de schistosité des fragments, près des grains de pyrite.
1	5	7.6	Schiste à séricite. Gris jaunâtre. Pyrite abondante dans la fraction fine, peu altérée. Pyrite présente à la surface des fragments. Pas de produits de réaction visible.
1	6	9.1	Schiste à séricite. Gris verdâtre. Nombreux fragments de roches intermédiaires. Pyrite présente dans la fraction fine et à la surface des fragments. Peu d'altération.
1	7	10.7	Schiste à séricite gris verdâtre avec de nombreux fragments de roches intermédiaires. Pyrite ternie abondante dans la fraction fine et à la surface des fragments (parfois déchaussée).
1	8	12.2	Roche intermédiaire à mafique. Vert. Nombreux fragments. Pyrite abondante, légèrement ternie, dans la fraction fine et à la surface des fragments.



# Projet Doyon

## Forages - Halde Sud - Janvier 1991

### Description des coupures de forage

Numéro De Forage	Numéro d'Échantillon	Profondeur (m)	Description
1	9	13.7	Roche intermédiaire à mafique. Vert jaunâtre. L'échantillon semble contenir une forte proportion de sable. Pyrite présente dans la fraction sableuse et à la surface des fragments. Pas d'évidence d'altération.
1	10	15.2	Roche mafique. Vert foncé légèrement jaunâtre. Très peu de particules fines. Pyrite abondante à la surface des fragments, parfois légèrement altérée.
1	11	16.8	Sable fin très pyriteux contenant quelques fragments arrondis. Matériel ressemblant beaucoup à des résidus de traitement (tailings).
1	12	18.3	Roche intermédiaire à mafique avec une fraction importante d'un sable fin de couleur rouille. Pyrite présente sur les fragments qui sont souvent recouverts d'hydrox. de fer.
1	13	19.8	Fragments divers (schiste et roches interm.) dans une matrice sablonneuse de couleur rouille. Pyrite présente dans la fraction fine. Pyrite visible à la surface des fragments, parfois déchaussée.
1	14	21.3	Identique à 13.
1	15	22.8	Mort-terrain. Silt argileux.
Forage à l'eau			
1	16	24.4	Matériel mixte. Schiste à séricite avec roche intermédiaire à acide. Pyrite abondante à la surface des fragments. Présence d'un peu d'hydrox. de fer.
FIN DES STÉRILES			
1	17	25.9	Mort-terrain. Gravier lithique.