

LIXIVIATION DES RÉSIDUS MINIERES PAR *ASPERGILLUS NIGER* ET *PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM*

R. Galvez-Cloutier¹, A. Ouattara¹ et C. N. Mulligan²

¹ Département de génie civil, Université Laval, Québec, Québec, Canada

² Département de génie du bâtiment et des génies civil et de l'environnement, Montréal, Québec, Canada

ABSTRACT

In order to improve the economic feasibility of fungi leaching process, experiments were conducted to identify an agricultural or food waste, which would replace the sucrose used in laboratory tests, as carbon source for organic acids production by *Aspergillus niger* and *Penicillium simplicissimum*. A sample of mining residues containing high concentration of sulfur (268 g/kg), Fe (266 g/kg), Pb (5g/kg) and Zn (11 g/kg) was used for the study. Various organic residues such as carrot and potato peels, whey permeate were used as substrates. Results showed that whey permeate was an excellent carbon source for organic acids production for metal leaching. Organic acids produced by *Aspergillus niger* by whey permeate fermentation gave the best metal leaching results with a residues pulp density of 5% : Cu (15%), Fe (5%), Mn (77%), Ni (26%), Pb (4%) and Zn (12%). These extractions rates are very encouraging and are similar to those obtained with the sucrose. Results showed also that various factors such as substrat initial concentration, organics acids nature and concentration and mining residue geochemistry, controlled the efficiency of the metal extraction.

RÉSUMÉ

Dans le but d'améliorer la rentabilité économique du procédé de lixiviation fongique, des travaux ont été réalisés afin d'identifier un résidu alimentaire ou agricole qui pourrait remplacer le sucrose utilisé au laboratoire comme source de substrat pour la production des acides organiques par *Aspergillus niger* et *Penicillium simplicissimum*. Différents résidus alimentaires ou agricoles tels que les pelures de carotte, les pelures de patate et le perméat de lactosérum ont été testés. Un échantillon de résidus miniers contenant une concentration élevée en soufre total de l'ordre de 268 g/kg et Fe (266 g/kg), Pb (5g/kg), Zn (11 g/kg), a été traité par lixiviation avec les métabolites produits par fermentation de ces résidus alimentaires par les champignons. Les résultats d'extraction des métaux les plus intéressants ont été obtenus avec le perméat de lactosérum fermenté par *A. niger*, pour une concentration en résidus miniers de 5% : Cu (15%), Fe (5%), Mn (77%), Ni (26%), Pb (4%) et Zn (12%). Ces pourcentages d'extraction sont encourageants et comparables à ceux obtenus avec le milieu de culture à base de sucrose et dépendent de différents facteurs dont la concentration initiale du substrat, la nature et la concentration des acides organiques ainsi que la distribution géochimique des métaux dans les résidus miniers.

1. Introduction

L'industrie minière canadienne rejette dans l'environnement de grandes quantités de résidus miniers et de stériles contenant des concentrations de métaux qui ne peuvent être extraites par les méthodes conventionnelles. Sous l'effet des aléas climatiques (i.e. la pluie, le vent et la température), les rejets qui contiennent les minéraux sulfurés génèrent la production de lixiviats acides contenant de fortes concentrations de métaux lourds (i.e. cadmium, plomb, cuivre). Ces lixiviats drainés par les eaux pluviales contaminent les cours d'eau et les terres agricoles environnantes ainsi que les eaux souterraines. Ce phénomène constitue le drainage minier acide (DMA). Le DMA menace à la fois la flore, la faune et la santé des êtres humains. Au Canada, il existe 12 500 tonnes de résidus miniers et 750 millions de tonnes de stériles susceptibles de produire du DMA (Feasby et Tremblay, 1995).

Le coût de réhabilitation des sites abandonnés, des sites actifs et futurs pourrait atteindre et dépasser 3 milliards de dollars durant les 20 prochaines années.

Différentes techniques de prévention comme les barrières sèches et l'inondation des résidus miniers frais sont utilisées pour prévenir le DMA. Quant aux techniques de lixiviation

existantes, elles sont utilisées pour extraire les métaux des résidus miniers et des minerais contenant de faibles concentrations de métaux, qui ne peuvent être traités par les méthodes traditionnelles (Wainwright, 1992). Pour répondre aux exigences environnementales qui sont de plus en plus sévères, d'autres techniques de lixiviation comme la lixiviation fongique sont explorées. Le procédé de lixiviation fongique est actuellement au stade de développement au laboratoire. Il est basé sur la capacité des champignons à produire des métabolites qui sont principalement des acides organiques tels que les acides citrique, gluconique, oxalique et malique. Ces acides permettent la solubilisation des minéraux par les processus de complexolyse, acidolyse, redoxolyse et bioaccumulation.

La lixiviation fongique a l'avantage de pouvoir s'appliquer sur toute sorte de résidus miniers (acide, basique ou neutre), contenant ou pas de sulfure, du fer ou des composés sulfurés réduits. Il utilise des espèces fongiques qui peuvent produire différentes natures de métabolites à partir d'une large variété de substrats (Burgstaller et Schinner, 1993). C'est aussi une technique de récupération des métaux qui respecte l'environnement, car elle utilise des substances naturelles pour la lixiviation des sols, qui sont très biodégradables et qui s'intègrent aux cycles du carbone dans le sol. Ceci est compatible avec

les processus d'autorégulation environnementaux. Les études déjà réalisées ont montré qu'elle permet une extraction intéressante des métaux de valeur commerciale (i.e. le cuivre, le nickel, l'aluminium et le zinc) (Bosshard et al., 1996, Mulligan et al., 1999b).

Cependant, le coût élevé des nutriments utilisés, principalement le sucre constitue un handicap économique pour cette technologie. Cet inconvénient pourrait être résolu en utilisant des résidus alimentaires ou agricoles comme source de substrat pour la production des acides organiques. La présente étude a pour but d'identifier une autre source de substrat qui pourrait être utilisé comme substitut au sucre pour la production des acides organiques qui serviront à l'extraction des métaux contenus dans des résidus miniers. Les objectifs spécifiques sont de sélectionner d'abord un résidu agricole ou alimentaire comme source de substrat et d'identifier par la suite les paramètres qui affectent la biosynthèse des acides organiques ainsi que la lixiviation des métaux par *Aspergillus niger* (*A. niger*) et *Penicillium simplicissimum* (*P. simplicissimum*).

2. Matériels et méthodes

2.1 Caractérisation des résidus alimentaires et agricoles utilisés

Des résidus alimentaires et agricoles suivants : pelures de carotte, de patate, de pomme et de canneberge, ainsi que des résidus de concentré de pomme, ont été recueillis auprès de certaines industries agroalimentaires au Québec. Le perméat de lactosérum, sous forme de poudre a été obtenu de l'unité de recherche STELA du département de science et technologie des aliments de l'université Laval. La teneur en eau, le contenu en sucre et en amidon, les oligo-éléments (N, P, K, Ca, Mg, Fe) ainsi que le carbone organique dissous (COD) et le carbone organique total (COD) ont été mesurés sur chacun de ces résidus alimentaires. Le Tableau 1 montre les résultats de ces analyses.

Tableau 1. Caractéristiques des résidus alimentaires et agricoles

Caractéristiques	Concentré de pomme	Pelures de Canneberge	Pelures de Patate	Pelures de Carottes	Pelures de Pomme	Perméat de lactosérum
matière sèche (%)	21	43	27	17	20	95
COT (%)	45	58	42	43	49	41
COD (mg/g)	44.9	13.2	5.0	8.0	6.6	210.1
Sucrose (mg/g sec)	29.9	25.9	11.7	72.3	15.9	
Amidon (mg/g sec)	41.6	38.5	434.5	111.2	24.6	*850
Substrat (g sec/100g (amidon + sucre))	1399	1553	224	545	2465	120

(*) Lactose

2.2 Production des acides organiques

2.2.1 Microorganismes

Deux genres de champignons ont été utilisés respectivement pour la fermentation des substrats. Il s'agissait de la souche 6275 ATCC d'*Aspergillus niger* et de la souche 48705 ATCC de *Penicillium simplicissimum*. Ces deux souches ont été commandées directement du centre ATCC (American Type Culture Center). La production de spores s'est faite par ensemencement sur du Potato Dextrose Agar (PDA) dans des plats de pétris placés dans un incubateur à 30°C pendant 6 à 7 jours. Le comptage des spores pour inoculation était fait au moyen d'un hémacymètre et d'un microscope.

2.2.2 Préparation des milieux de culture

Le milieu de culture à base de sucre qui a été utilisé comme référence pour la préparation des milieux de cultures avec les résidus alimentaires est similaire à celui de Bosshard et al. (1996), mais contient en plus du fer en trace. Ce milieu de culture a été préparé à partir du milieu

czapek auquel un excès de sucre a été ajouté pour obtenir une concentration de 100 g/L. Il a les caractéristiques suivantes : Sucre (100g/L) NaNO_3 (1.5g/L), KH_2PO_4 (0.5g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.025g/L), KCl (0.025g/L), FeSO_4 (0.005g/L), Extrait de levure (1.6g/L), eau distillée (1L). Le milieu de culture obtenu avec chaque résidu alimentaire a été préparé à partir de la quantité ou la masse sèche de ce résidu alimentaire qui permet d'avoir une concentration en sucres de 100 g/L (sucrose + amidon). Les quantités qui étaient requises pour les différents résidus alimentaires sont données au Tableau 1. Une fois les milieux de culture préparés, ils étaient stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 121 °C. Après stérilisation et refroidissement à la température ambiante (environ 25 °C), on inoculait dans chaque milieu de culture environ 2.2×10^7 spores d'*Aspergillus niger* ou de *Penicillium simplicissimum*, sous une hotte à flux laminaire. Les spores inoculées étaient fixées sur des pastilles prélevées directement des plats de pétris avec un emporte pièce N° 3. La quantité de 2.2×10^7 spores correspondait à peu près à l'équivalent du nombre de spores sur 4 pastilles pour *A. niger* et 6 pastilles pour *P. simplicissimum*, après ensemencement pendant 7 jours sur PDA dans un incubateur à 30°C.

Les milieux de cultures étaient de 100 mL et étaient préparés dans des flacons (Erlenmeyer) de 500 mL. Après inoculation des spores, tous les flacons étaient placés sur un agitateur mécanique de 110 RPM dans une chambre à 30°C. L'incubation pour la production des acides organiques durait 7 jours. Un flacon témoin, contenant uniquement le milieu de culture stérilisé et sans spores était également placé sur l'agitateur.

2.3 Caractérisation des résidus miniers

Des résidus miniers provenant d'une mine de zinc et de plomb du Nouveau Brunswick ont été utilisés et lixiviés avec les métabolites produits par *A. niger* et *P. simplicissimum*. Le tableau 2 donne la composition de ces résidus miniers. L'analyse au Rayon X a permis d'obtenir la composition minéralogique suivante : quartz (41%), ankérite (31.5%), pyrite (17%), shpalerite (15%), cuprite (5%), galène (2%) et autres.

Tableau 2. Composition des résidus miniers

Paramètres	Valeurs
Matière organique (%)	17.6
Teneur en eau (%)	20.5
Soufre total (mg/kg)	267 569
pH	7.7
Métaux totaux (mg/kg)	
Cu	1 074
Fe	265 624
Mn	1 245
Ni	20
Pb	4 965
Zn	11 226

2.4 Lixiviation des résidus miniers

Après 7 jours d'incubation, les surnageants des milieux de culture liquide étaient récupérés par centrifugation à 10 000 g à 4°C et/ou par filtration sur des filtres Wattman de 0.45 µm. On procédait ensuite à la lixiviation pendant 48 heures des résidus miniers dans des tubes de centrifugation de 50 mL avec les surnageants filtrés. La concentration en résidus miniers était de 5% (w/v). Les tubes étaient agités sur une plaque à 110 RPM. À la fin de la période de lixiviation, les lixiviats étaient récupérés par centrifugation à 3600 RPM pendant 5 minutes et analysés au spectrophotomètre d'absorption atomique pour doser leur contenu en métaux : Cu, Fe, Mn, Ni, Pb et Zn. Le potentiel d'extraction de chacun de ces métaux était ensuite déterminé par calcul du pourcentage d'extraction.

2.5 Méthodes analytiques

Pour ce qui concerne la caractérisation des résidus alimentaires ou agricoles, la teneur en eau a été obtenue par calcul de la différence de la masse avant et après lyophilisation. Le COD a été mesuré par dosage par oxydation avec du persulfate de potassium et analysé au

DC-180 Carbon Analyser à Agriculture Canada, Québec. Les analyses du carbone organique Total et de l'azote total ont été faites après combustion à 1250°C. Les oligo-éléments N, P, K, Ca, Mg ont été mesurés après digestion des résidus alimentaires en présence de H₂SO₄-H₂SeO₃-H₂O₂. La matière organique et le fer ont été déterminés après calcination des résidus alimentaires en présence de HCl à 275 °C puis 475 °C au laboratoire Daishowa à l'Envirotion à l'Université Laval. Quant au sucrose et à l'amidon, ils ont été déterminés au moyen du protocole de Gamache (1998) et par mesure de la densité optique à 340 mn.

Pour toutes les expériences, les acides organiques ont été produits en parallèle et dans les mêmes conditions avec des milieux à base de sucrose et des milieux à base de résidus alimentaires afin de pouvoir évaluer et comparer le potentiel de lixiviation associé à chaque source de substrat. Lors de la production des acides organiques, un prélèvement dans chaque milieu de culture était effectué chaque 2 ou 3 jours pour le suivi du pH et la production des acides organiques. L'identification et la quantification des acides organiques se faisaient par HPLC comportant une colonne Waters Novapak E18 (3.9 mm x 300mm de longueur), avec une phase mobile de 10 mN à débit de 0.5 ml/min (40°C) et un détecteur U. V. 441 à 210 nm. Tous les dosages des métaux dans les résidus miniers et les lixiviats se faisaient au spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) (Perkin Elmer Model 3110). Le dosage des métaux totaux dans les résidus miniers se faisait après digestion par HNO₃/H₂O₂ selon le protocole du centre Saint-Laurent (1993), et la distribution géochimique était déterminée selon le protocole de Tessier et al. (1979) modifiée par Galvez-Cloutier (1995). Tous les essais ont été faits en duplicata ou en triplicata avec des témoins pour chaque type d'analyse effectuée.

Le coefficient de variation a été calculé par le rapport de l'écart type sur la valeur moyenne. Selon MEFQ (1994), le coefficient de variation ou erreur relative, doit être inférieur à 30% pour la caractérisation chimique des sols contaminés. Les coefficients de variation obtenus pour l'ensemble des analyses effectuées dans la présente étude étaient inférieurs à 30% et étaient d'au plus 11% pour la plupart des métaux mesurés.

3. Résultats et discussion

3.1 Sélection d'un résidu agricole ou alimentaire comme source de substrat

La caractérisation des résidus alimentaires a permis de déterminer la quantité ou la masse requise de chaque résidu alimentaire pour obtenir un milieu de culture contenant 100 g/L de sucres. Cette quantité pour chaque résidu alimentaire est donnée au Tableau 1 du paragraphe 2.2.2. Ces résultats montrent que pour obtenir 100 g/L de sucres dans chaque milieu de culture, il fallait utiliser entre 225 et 2465 g sec de chaque résidu alimentaire, sauf pour le perméat de lactosérum. Cette quantité était élevée et

imposait de faire une fermentation en milieu solide pour la production des acides organiques.

Des travaux avec une variété de substrats solides telles que les pelures de pommes (Hang, 1988), ont démontré que la fermentation en milieu solide permettait la production de concentrations élevées de l'acide citrique qui est un des acides les plus utilisés pour la lixiviation des métaux. Cependant, ce type de fermentation ne permettait pas d'obtenir des données expérimentales adéquates telles que des données cinétiques, à cause de la difficulté de séparer la biomasse de mycélium du substrat résiduel (Carrizalez et al., 1981, Gumbira-Sa'id et al., 1993). De plus, lorsque le milieu de fermentation est solide, la récupération des acides organiques après l'incubation pour la lixiviation, devient complexe et peut générer des coûts additionnels d'opération. Par ailleurs, il est connu que *A. niger* produit de l'acide citrique à partir des sucres seulement sous des conditions de déficiences d'azote (Dawson et al., 1988). Nous avons calculé les rapports sucres (carbohydrates) : azote pour chaque résidu alimentaire analysé. Les valeurs obtenues montrent que la plupart de ces résidus ne favoriseraient pas la production de l'acide citrique, à cause de leur faible rapport carbohydrates : azote, variant entre 5 et 9. Même si ce rapport pour les pelures de patate (35 : 1) était plus élevé que celui des autres (à l'exception du perméat de lactosérum), les travaux de Lu et al. (1996) ont montré que la patate était un substrat pauvre pour la production de l'acide citrique et qu'elle stimulait plutôt la croissance de la biomasse. Pour donc ces différentes raisons données ci-dessus, le perméat de lactosérum qui avait un rapport carbohydrates : azote de (160 : 1) a été retenu comme substrat pour la production des acides organiques par *A. niger* et *P. simplicissimum*. Son potentiel de lixiviation des métaux des résidus miniers a été évalué par la suite.

3.2 Évolution du pH dans les milieux de culture

La figure 1 présente l'évolution du pH dans les cultures à base de sucrose et de perméat de lactosérum en présence de *A. niger* et *P. simplicissimum*. On note que l'évolution du pH est similaire dans les deux milieux de culture en présence de *A. niger*. Le pH des cultures décroît très rapidement. Déjà à 3 et 4 jours d'incubation il baisse jusqu'aux alentours de 2 et se stabilise. Par contre, en présence de *P. simplicissimum*, l'évolution du pH est différente dans les deux milieux de culture. Dans le milieu de culture à base de perméat de lactosérum, le pH a tendance à augmenter en début de culture. Il reste constant de 2 à 3 jours d'incubation et commence à décroître lentement. Il demeure au dessus de 6 même après plus de 10 jours de culture. Alors que dans le milieu de sucrose en présence de *P. simplicissimum*, le pH décroît lentement et se maintient autour de pH 3. La baisse de pH dans les cultures indique non seulement la production des acides mais aussi la croissance de la biomasse. Les travaux de lixiviation des métaux par *A. niger* de Bosshard et al. (1996) ont en fait démontré une bonne corrélation ($r = 0,96$) entre la croissance de la biomasse cellulaire sèche et la décroissance du pH de la culture. On observait effectivement dans les cultures avec *A. niger*, une croissance de la biomasse au fur et à mesure que le pH

décroissait rapidement. Avec *P. simplicissimum*, la présence de mycélium dans la culture a été surtout observée lorsque le pH décroissait. L'augmentation du pH en début de la fermentation du perméat de lactosérum par *P. simplicissimum*, pourrait indiquer sa difficulté à s'adapter sur ce substrat, ou une phase de croissance où *P. simplicissimum* sécrète des substances qui font augmenter le pH.

3.3 Les acides organiques produits par *A. niger* avec le sucrose

Les acides organiques produits à partir du milieu à base de sucrose étaient principalement de l'acide gluconique (52 340 mg/L) et de l'acide citrique (21 560 mg/L) en présence de *A. niger*. En présence de *P. simplicissimum*, la concentration de l'acide gluconique était de 2 310 mg/L et celle de l'acide citrique était de 5 880 mg/L. Les acides oxalique, malique, isocitrique et tartarique étaient produits en faibles quantités.

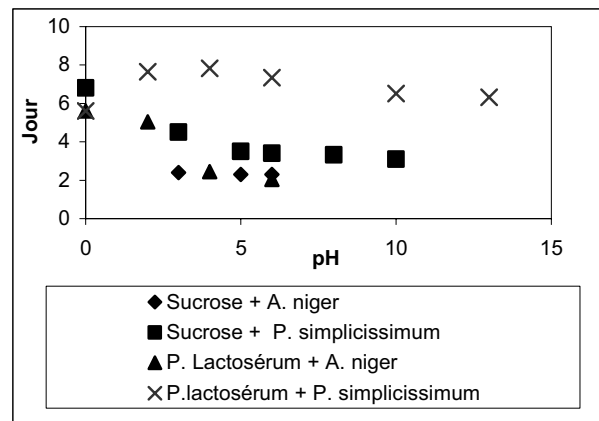


Figure 1 : Évolution du pH dans les cultures à base de sucrose et de perméat de lactosérum

L'acide citrique est un des principaux acides organiques produits par des champignons filamenteux comme *A. niger* et *P. simplicissimum* par fermentation submergée d'un milieu à base d'amidon ou de sucrose. Ici nous notons qu'il fait partie effectivement des deux principaux acides organiques produits. En plus, les concentrations d'acide citrique et d'acide gluconique, concordent bien avec le comportement du pH observé dans les cultures à base de sucrose. Plus le pH décroît, plus la quantité des acides organiques produits augmente. Cependant, la nature de l'acide organique qui est le plus abondant paraît dépendre du genre de champignon. Cela est en accord avec les résultats obtenus par Burgstaller et Schinner (1993). Selon les travaux de ces chercheurs, les acides organiques produits par *Aspergillus niger* varient selon le pH du milieu de culture; en général, lorsque le pH augmente, la production des acides suit l'ordre suivant : acide citrique > acide gluconique. Autrement dit, lorsque le pH baisse, on aurait : acide gluconique > acide citrique, ce qui est observé

dans nos cultures. Il faut toutefois préciser que la production des acides est aussi fonction d'autres facteurs tels que le substrat de croissance, le rapport carbohydrates : azote, l'humidité, et le temps (Lu et al., 1996; Mulligan et al., 1999b).

3.4 Lixiviation des métaux des résidus miniers

3.4.1 Extraction avec les métabolites produits par la fermentation du sucrose

Tableau 3 : Extraction des métaux

Métaux	% d'extraction	
	<i>A. niger</i>	<i>P. simplicissimum</i>
Cu	10	2
Fe	3	1
Mn	81	45
Ni	21	10
Pb	33	85
Zn	11	11

Les métabolites, principalement les acides organiques (acide gluconique et acide citrique) produits par *A. niger* par fermentation du sucrose ont permis l'extraction des métaux dans les proportions données au Tableau 3. Le manganèse a été le plus extrait, ensuite vient le nickel, le cuivre, le zinc, fer et le plomb. L'extraction importante du manganèse par rapport aux autres métaux est certainement associé au fait qu'en milieu acide (pH inférieur à 5.0), le manganèse est sous sa forme très mobile et donc facilement extractible.

On note qu'avec *P. simplicissimum* les résultats sont par contre moins intéressants pour la plupart des métaux. Le plomb a été le plus extrait, ensuite vient le manganèse, le zinc, le cuivre et le fer. Les faibles pourcentages d'extraction obtenus avec les métabolites de *P. simplicissimum* pourraient être expliqués surtout par les concentrations relativement faibles des acides citrique et gluconique produits par *P. simplicissimum* (2 310 mg/L comparativement à 52 340 mg/L par *A. niger*) et de l'acide citrique (5 880 mg/L comparativement à 21 560 mg/L par *A. niger*).

La solubilisation des métaux résulte, en fait, de différents mécanismes dont l'acidification et la formation de complexes organo-métalliques avec les acides organiques produits. L'acide citrique est un des acides les plus utilisés pour la lixiviation des métaux. Il a, en particulier, une contribution importante dans la solubilisation des métaux, du fait de son acidité relativement forte et de la grande stabilité de ses complexes (Wasay et al., 1998). Son efficacité est principalement due à son acidité assez élevée ($pK_1 = 3,13$) (Fischer et al., 1998) et à la présence de trois groupes fonctionnels (2 COOH et 1 OH) qui favorisent la formation de complexes très stables. Il possède également un pouvoir complexant beaucoup plus fort que les autres acides organiques (i.e. citrique > tartarique > d'autres

anions d'acides organiques) (Wasay et al., 1998). Ainsi, plus, la concentration en acide citrique est élevée dans la solution extractive, plus l'extraction des métaux est favorisée. Ici, la concentration en acide citrique produite par *A. niger* (21 560 mg/L) est plus élevée que celle produite par *P. simplicissimum* (5 880 mg/L). Bosshard et al. (1996) ont aussi observé que lorsque l'acide citrique produit par les champignons, décroît de 10 fois en passant de 110 à 11 mM, l'efficacité de la lixiviation était réduite à moins de 2% pour chaque métal extrait. La concentration des acides organiques a donc un effet sur l'efficacité de la lixiviation. Cela a été aussi rapporté par Mulligan et al. (1999), ainsi que (Burgstaller et Schinner (1993).

Le degré d'extraction des métaux est influencé non seulement par la concentration des acides organiques, mais aussi par leur distribution géochimique (Fischer et al., 1998; Wasay et al., 1998), ainsi que par la présence des métaux concurrents. Par ailleurs, plusieurs autres facteurs contribuent à augmenter ou diminuer le potentiel de solubilisation des agents complexants. La valeur du pH est un facteur prépondérant et la présence des métaux concurrents (i.e. Ca, Mg, Fe et Al) (Veeken et Hamelers, 1999).

3.4.2 Extraction des métaux avec les métabolites produits par la fermentation du perméat de lactosérum

La discussion des résultats de ces essais a été basée sur les paramètres comme le pH et le potentiel d'extraction qui ont été mesurés. Les résultats de la lixiviation pendant 48 heures des résidus miniers avec les surnageants des milieux de cultures à base de perméat de lactosérum sont donnés à la Figure 2. Ces figures comportent également les résultats d'extraction obtenus avec le sucrose.

Les différents pourcentages d'extraction des métaux : Cu (15%), Fe (5%), Mn (77%), Ni (26%) et Zn (12%), obtenus avec les métabolites produits par *A. niger* par fermentation du perméat de lactosérum sont comparables à ceux obtenus par la fermentation du sucrose, sauf le plomb Pb (4%) dont le pourcentage d'extraction est plus bas. Le fait d'avoir pour la plupart des métaux des pourcentages d'extraction similaires à ceux obtenus avec les métabolites de *A. niger* par la fermentation du sucrose, indique que les métabolites de *A. niger* par fermentation du perméat de lactosérum contiendraient certainement de l'acide citrique dans des proportions identiques. Mais toutefois, il est connu que la nature et la quantité des acides organiques produits sont fortement influencées par la composition du milieu de culture et donc par la nature du substrat utilisé.

Quant aux pourcentages d'extraction obtenus avec les métabolites produits par *P. simplicissimum*, ils sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus par la fermentation du sucrose. De plus, le fer et le plomb ne sont quasiment pas extraits. De tels résultats étaient prévisibles avec la lente décroissance du pH lors de la fermentation du perméat de lactosérum par *P. simplicissimum*, indiquant une production faible d'acides organiques. Par contre, la décroissance rapide du pH en présence de *A. niger*

indiquait une production importante des acides organiques responsables de l'extraction des métaux.

Ces résultats révèlent qu'il est plus intéressant d'utiliser les métabolites produits par *A. niger* par la fermentation du

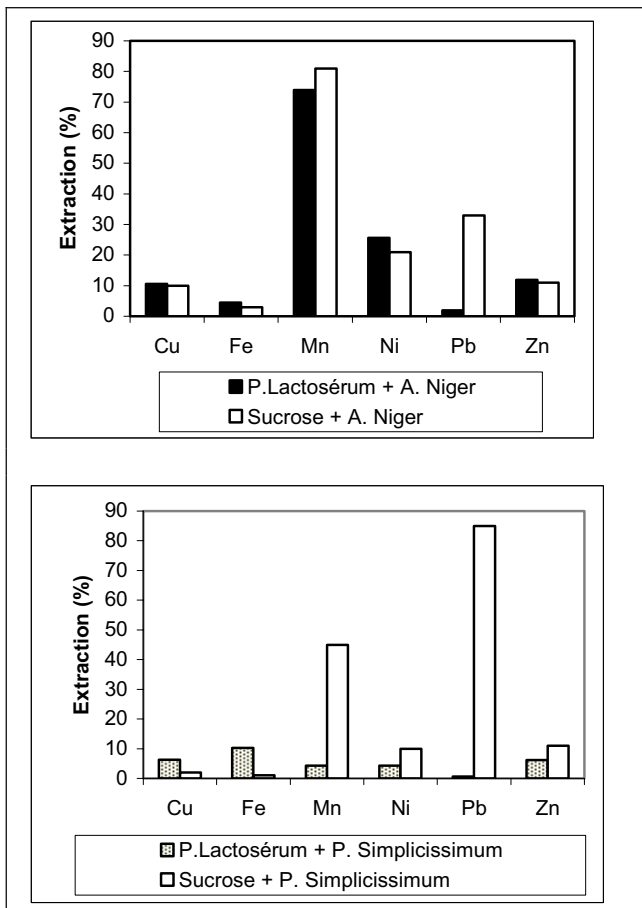


Figure 2 : Extraction des métaux avec les métabolites produits par fermentation du *P. lactosérum*.

perméat de lactosérum plutôt que ceux produits par *P. simplicissimum*, pour la lixiviation des résidus miniers du Nouveau Brunswick.

Dans le but d'améliorer ou d'optimiser l'extraction des différents métaux, d'autres essais ont été effectués pour évaluer l'influence sur l'extraction des métaux de certains paramètres comme la durée d'incubation, la concentration en perméat de lactosérum dans le milieu de culture et la distribution géochimique des métaux. Le potentiel d'extraction des métaux (en terme de pourcentage) a été considéré comme paramètre d'optimisation. Les paragraphes suivants donnent les résultats de ces essais.

3.4.3 Effet de la durée d'incubation des cultures sur l'extraction des métaux

Deux milieux de culture à base de perméat de lactosérum ont été préparés selon les conditions décrites au paragraphe 2.2.2. Ces milieux ont été inoculés avec *A. niger* et incubés, l'un sur 7 jours et l'autre sur 14 jours à 30°C. À la fin de chaque période d'incubation, les surnageants des cultures ont été récupérés par filtration sur filtre Wattman et utilisés pour l'extraction des métaux des résidus miniers du Nouveau Brunswick. La figure 3 donne les pourcentages d'extraction des métaux obtenus après 48 heures de lixiviation.

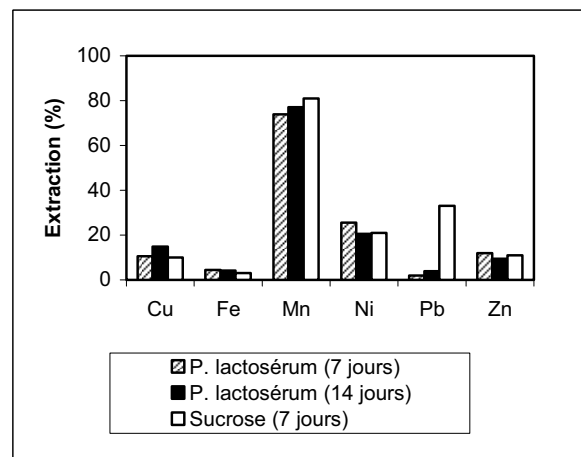


Figure 3 : Effet de la durée d'incubation des cultures sur l'extraction des métaux

Les résultats d'extraction donnés à la Figure 3 montrent que maintenir l'incubation de la culture jusqu'à 14 jours, affecte peu l'extraction des métaux. Les pourcentages d'extraction du Cu, Mn et Pb augmentent légèrement. Ceux du Ni, Zn baissent au contraire, il n'y a aucun changement au niveau du fer. Ceci pourrait signifier que la production des acides organiques à partir du perméat de lactosérum sur une période d'incubation de 7 jours serait suffisante pour permettre une extraction intéressante des métaux. Il faut noter qu'à 6 jours d'incubation déjà, le pH des cultures variait très peu et se stabilisait les jours suivants. Il n'y avait donc plus de production d'acides organiques, le substrat disponible était possiblement épuisé.

Des travaux préliminaires (non publiés) que nous avons effectués avec le sucrose ont montré que même si le pH était bas, moins de 7 jours de culture était insuffisant, car une partie importante du sucrose n'était pas encore hydrolysé et que la concentration en acides organiques dans les cultures était par conséquent faible pour permettre une bonne extraction des métaux. Suit à ces résultats, on retiendra donc que 7 jours de fermentation du perméat de lactosérum par *A. niger*, sont suffisants pour obtenir des métabolites qui permettent une extraction intéressante des métaux des résidus miniers.

3.4.4 Effet de la concentration du milieu de culture en perméat de lactosérum

Trois milieux de culture de 100 mL ont été préparés à base de 6g, 12g et 24g de perméat de lactosérum respectivement. 2.2×10^7 spores d' *A.niger* ont été inoculées dans chacun de ces milieux. Après 7 jours d'incubation, les surnageants ont été récupérés et utilisés pour la lixiviation des métaux des résidus miniers. La figure 4 montre les pourcentages d'extraction des métaux obtenus par lixiviation des résidus miniers du Nouveau Brunswick.

La comparaison des différents pourcentages d'extraction des métaux obtenus selon la concentration initiale de perméat de lactosérum dans le milieu de culture montre que lorsqu'on augmente ou qu'on diminue la concentration du perméat de lactosérum dans le milieu de culture, en la multipliant par deux ou en la divisant par deux, on n'améliore pas l'extraction des métaux, au contraire elle baisse. Ceci signifierait que les conditions d'excès ou d'insuffisance de substrat ne sont pas favorables à l'extraction des métaux.

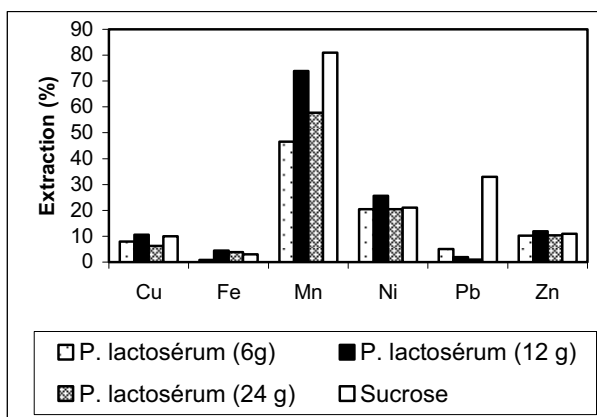


Figure 4 : Effet de la concentration en P. Lactosérum sur l'extraction des métaux

La baisse du potentiel d'extraction dans le cas d'excès de substrat pourrait être attribuée à certains facteurs tel que l'effet d'inhibition des ions métalliques comme le Fe^{2+} , sur la production d'acide citrique. En augmentant la concentration en substrat dans le milieu de culture, on augmente aussi la concentration en Fe^{2+} . Il est connu que la concentration de fer nécessaire pour une biosynthèse maximale de l'acide citrique varie avec la souche utilisée, allant ensemble avec la nature et le degré de raffinement du substrat. Le fer en quantité en trace est essentiel pour les 1ères étapes de la fermentation comme il sert comme facteur de croissance (Noyes, 1969). Cependant la production de l'acide citrique est fortement affectée et même entièrement inhibée avec un excès de fer (Kapoor et al., 1982). Même, une concentration en Fe^{2+} , aussi basse que 1 mg/L pourrait inhiber la production d'acide citrique par *A. niger* en fermentation submergée (Berry et al., 1977). La baisse du potentiel d'extraction pourrait être aussi associée à la réduction du

contenu initial en humidité du milieu de culture. En fait, Lu et al.1996, ont observé dans leur étude sur la production d'acide citrique par fermentation du Kumara, qu'après 6 jours de fermentation la production de biomasse et de citrate étaient maximum avec un contenu en humidité initiale de 65% (w/w) ou plus. Hang, (1988) a rapporté également ce même résultat en utilisant un substrat de pelure de pomme. Ici, en augmentant la concentration en perméat de lactosérum, on réduit indirectement le contenu initial en humidité. Ce qui aurait réduit légèrement la production du citrate. Par ailleurs, on pourrait aussi mettre en cause l'excès de sucres, qui aurait entraîné la saturation rapide des enzymes responsables de la production des acides organiques. Ce qui aurait réduit la production de ces acides organiques.

Les résultats montrent ainsi qu'une concentration de 12 g de perméat de lactosérum/100 mL d'eau distillée, constitue la concentration optimale à fermenter par *A. niger* pour obtenir une extraction intéressante des métaux. Autrement dit, ce sont les conditions de production de l'acide citrique avec du sucrose, appliquées à la fermentation du perméat de lactosérum qui favorisent l'extraction des métaux. Ceci fait ressortir une fois encore l'importance du rôle de l'acide citrique qui est l'acide organique le plus utilisé dans l'extraction des métaux (Ficher et al., 1998; Wasay et al., 1998; Veeken et Hamelers, 1999).

3.4.5 Effet de la distribution géochimique des métaux sur leur extraction

Selon Yong et al. (1993), la spéciation des métaux est exprimée généralement, en raison des fractions suivantes : 1) la fraction échangeable (i.e. minéraux argileux, matériel organique et matériel amorphe), 2) la fraction liée aux carbonates (i.e. carbonates naturels), 3) la fraction associée à la matière amorphe (i.e. oxydes de Fe, Al et Mn faiblement cristallisés), 4) la fraction liée à la matière organique (i.e. groupes fonctionnels), 5) la fraction résiduelle (i.e. feuillets de minéraux de silicates). Pour évaluer l'influence de la distribution géochimique des métaux sur le potentiel d'extraction des métaux, on a déterminé la distribution géochimique de chacun des métaux : Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, avant et après la lixiviation des résidus miniers, par la méthode d'extraction séquentielle sélective (ESS) de Tessier et al. (1979) modifiée par Galvez-Cloutier (1995). Ici nous présenterons les résultats concernant le nickel et le manganèse.

Les figures 5 et 6 montrent la distribution géochimique du manganèse et du nickel avant et après lixiviation des résidus miniers avec les métabolites produits par *A. niger* par fermentation du perméat de lactosérum.

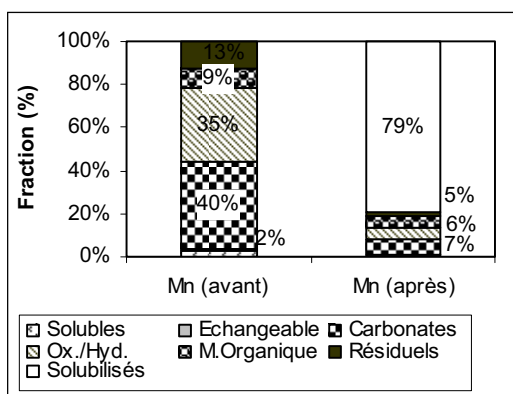


Figure 5 : Distribution géochimique du nickel avant et après lixiviation.

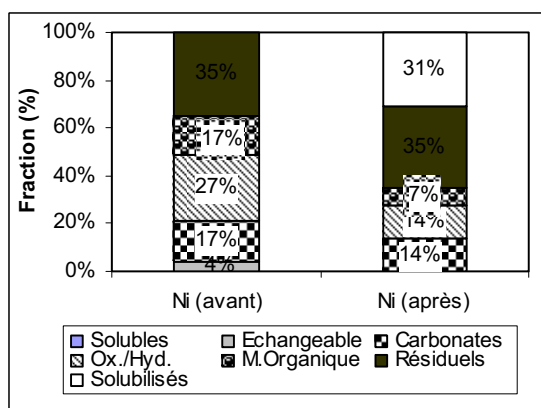


Figure 6 : Distribution géochimique du manganèse avant et après lixiviation.

On note que le nickel était retenu principalement dans les fractions résiduelles (35%) et d'oxyde/hydroxydes (27%). Dans les autres fractions on avait dans les carbonates (17%), dans la matière organique (17%) et dans les échangeables (4%). Après lixiviation aucune partie du nickel retenu dans les résiduelles n'a été solubilisée. Le nickel solubilisé provenait de la matière organique (13%), des oxydes/hydroxydes (10%) et des carbonates (3%). Ce qui donne une solubilisation totale de 31% y compris les fractions solubles et échangeables. Quant au manganèse, il était retenu dans toutes les fractions et principalement dans les carbonates (40%) et les oxyde/hydroxydes (35%). La partie du manganèse solubilisée après lixiviation provenait essentiellement des carbonates (33%) et des oxydes/hydroxydes (29%), 10% provenaient des résiduelles et 4% de la matière organique. Ce qui donne une solubilisation totale de 79% y compris les fractions solubles et échangeables.

Le fait que le nickel retenu dans les résiduelles ne soit pas extrait n'est pas surprenant, car les études antérieures ont

montré que la disponibilité des métaux détermine fortement leur taux d'extraction. Les métaux fortement retenus dans le sol, comme ceux retenus dans la fraction résiduelle, sont difficilement extractibles. Leur dissolution peut nécessiter beaucoup plus d'acides organiques. C'est plutôt l'extraction du manganèse de la fraction résiduelle qui est surprenante. C'est un résultat inattendu, qui fait ressortir le potentiel d'extraction associé aux métabolites produits par *A. niger* par fermentation du perméat de lactosérum. Par ailleurs, la facilité d'extraction du manganèse associé aux amorphes et carbonates s'expliquerait par le pH de la solution extractive qui était inférieur à 2. En fait, le manganèse est un élément qui s'oxyde et précipite rapidement sous forme de divers oxydes ou hydroxydes ou de carbonates. D'une part, grâce à leurs petites dimensions et leur surface spécifique très grande, les oxydes/hydroxydes de manganèse ont une grande réactivité chimique dans les sols et jouent un rôle majeur dans les réactions solide-solution. Il est connu que c'est seulement en milieu acide (pH inférieur à 5,0) que le manganèse est sous sa forme très mobile (Baize, 1997). D'autre part, selon Dubé (1997), la dissolution des carbonates a lieu autour du pH=4. À pH < 2, la solution extractive favorise donc l'extraction du manganèse associé à la fois aux carbonates et aux oxydes/hydroxydes, auquel s'ajoutent les fractions solubles et échangeables, ainsi qu'une partie du manganèse liée à la fraction résiduelle et à la matière organique. Un deuxième lavage aurait permis certainement l'extraction de tout le manganèse.

4. Conclusion

Les différents résultats de lixiviation des résidus miniers obtenus permettent de conclure que le perméat de lactosérum est un résidu alimentaire qui pourrait être utilisé comme une source de substrat en remplacement du sucrose dans le procédé de lixiviation fongique. Les métabolites produits par *A. niger* par sa fermentation permettent une extraction intéressante des métaux de valeurs tels que le Cu, le Zn et le Ni. Les résultats d'extraction sont comparables à ceux obtenus avec les acides organiques produits par la fermentation du sucrose par *A. niger*. L'utilisation de ce résidu alimentaire est avantageuse, en ce sens qu'elle respecte l'environnement et devrait améliorer la rentabilité économique de la lixiviation fongique. Sa compréhension et son optimisation favoriseraient l'extraction des métaux des résidus miniers à des concentrations commercialement attractives.

5. Remerciements

Nous remercions M. Richard Bélanger du département de phytologie, de l'université Laval ainsi que toute son équipe au centre de recherche en horticulture (Environtron) pour l'utilisation de leur laboratoire et équipements, la Compagnie minière Noranda, pour les échantillons de résidus miniers et finalement le CRSNG pour le financement de ce projet.

6. Références

- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France), INRA, Paris, 1997, 409 pages.
- Berry, D. R., Chmiel, A. et Obaidi, Z., 1977. Citric production by *Aspergillus niger*. In Genetics and Physiology of *Aspergillus*, ed. J. E. Smith et J. A. Pateman. Academic Press, London, pp. 405-26.
- Bosshard, P.P., Bachofen, R. et Brandl, H., 1996. Metal leaching of Fly Ash from Municipal Waste Incineration by *Aspergillus niger*. Environmental Science Technology, vol. 30, pp. 3066-3070.
- Burgstaller et Schinner (1993). Leaching of metals with fungi. Journal of Biotechnology, vol. 27, pp. 91-116.
- Carrizalez, V., Rodriguez, H. et Sardina, I., 1981. Determination of the specific growth of mold on semi-solid cultures. Biotechnol. Bioengng, 23, 321-33.
- Centre Saint Laurent (CSL) (1993). Methods manual for sediment characterization. Plan d'action Saint Laurent.
- Dawson, M.W., Maddox, I.S., Boag, I. F. et Brooks, J. D., 1988 Application of fed-batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger* : the effects of dilution rate and dissolved oxygen tension. Biotechnol. Bioengng, 32, 220-6.
- Dubé, J.S., 1997. Application d'un protocole analytique à l'évaluation de la distribution géochimique des métaux lourds dans les sols contaminés. Mémoire de maîtrise. Université Laval.
- Fischer, K., Bipp, H., Riemschneider, P., Hang, Y.D., 1988. Microbial production of citric acid in fixed-bed column bioreactor. *Biotechnol. Letts*, 10, 421-6.
- Feasby G. A. et Tremblay G. A. 1995. New technologies to reduce environmental liability from acid mine generating mine wastes. Proc. Sudbury 95 – Mining and the environment. 6443 Ottawa: CANMET.
- Galvez-Cloutier, R., 1995. Study of heavy metals accumulation mechanisms in the Lachine Canal sediments. Thèse de doctorat. McGill University, Montréal.
- Gamache, T., 1998. Protocole d'analyse du sucre et de l'amidon, site internet : www.Agrobiotheque.ca
- Gumbira-Sa'id, E., Greenfield, P. F., Mitchell, D. A. et Doelle, H. W., 1993. Operational parameters for packed beds in solid-state cultivation. Biotechnol. Adv., 11, 599-610.
- Kapoor, K. K., Chaudhury, K. et Tauro, P., Citric acid. In Prescott and Dunn's Industrial Microbiology, ed. G. Reed. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA. 1982, pp. 709-46.
- Lu, M.Y., Maddox, I.S. et Brooks, J.D., 1995. Citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-substrate fermentation. Bioresource Technology, vol. 54, pp. 235-239.
- Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec (MEFQ) (1994). Dix ans de restauration des terrains contaminés. Bilan de 1983 à 1993. Les Publications du Québec, Sainte-Foy.
- Mulligan, C.N., Galvez-Cloutier, R. et Renaud, N., 1999b. Biological leaching of copper mine residues by *Aspergillus niger*. In Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS' 99 held in San Lorenzo de El Escorial, Madrid, Spain, June 20-23, 1999.
- Noyes, R., 1969. Citric Acid Production Processes. Noyes Development Corporation, Parkridge, New Jersey, USA, 1969. The production of citric acid. *Proc. Biochem.*, 29, 29-37.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C. et Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Analytical Chemistry, vol. 51, no. 7, pp. 844-850.
- Veeken et Hamelers, 1999. Removal of heavy metals from sewage sludge by extraction with organic acids. Water Science Technology, vol. 40, n. 1, pp. 129-136.
- Wainwright, M. 1992. An Introduction to Fungal Biotechnology . John Wiley & Sons. 202 pp.
- Wasay et al., 1998. Organic acids to remediate a clay loam polluted by heavy metals. Canadian Agricultural Engineering, vol. 40, no. 1, pp. 9-15.
- Yong, R. N., Galvez-Cloutier, R., Phadungchewit, Y., 1993. Selective sequential extraction analysis of heavy metal retention in soil. Canadian Geotechnical Journal, vol. 30, pp. 834-847.