THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme ADELINE PO

le mardi 27 juin 2023

Titre :

Etude d'un procédé de biolixiviation mécaniquement assistée de la chalcopyrite

---

École doctorale :

Mécanique, Énergétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (LGC)

Directeurs de Thèse :

M. LAURENT CASSAYRE

M. FLORENT BOURGEOIS

Rapporteurs :

M. EDOUARD ASSELIN, UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA VANCOUVER

M. STOYAN GAYDARDZHIEV, UNIVERSITE DE LIEGE

Membres du jury :

M. FRANÇOIS GUYOT, UNIVERSITE SORBONNE, Président

M. ERIC OLMOS, UNIVERSITÉ LORRAINE, Membre

M. FLORENT BOURGEOIS, TOULOUSE INP, Membre

M. LAURENT CASSAYRE, TOULOUSE INP, Membre

MME ANNE-GWÉNAËLLE GUEZENNEC, BRGM, Membre

MME CARINE JULCOUR, TOULOUSE INP, Invitée

MME CATHERINE JOULIAN, BRGM, Membre

Remerciements

J’aimerais consacrer ces quelques lignes aux personnes qui m’ont aidé, encouragé, et grâce à qui j’ai pu arriver au bout de cette thèse malgré les difficultés rencontrées.

Tout d’abord, je tiens à remercier Laurent CASSAYRE et Anne-Gwénaëlle GUEZENNEC pour m’avoir donné l’opportunité de réaliser cette thèse, au cours de laquelle j’ai beaucoup appris en termes de compétences et connaissances, mais aussi sur moi-même. Je souhaite également leur dire merci pour leurs conseils toujours pertinents et instructifs, ainsi que tout le temps qu’ils ont consacré à l’encadrement de ma thèse.

J’aimerais également remercier l’ensemble des personnes ayant travaillé sur le projet BIOMECALIX en commençant par Agathe HUBAU, qui m’a beaucoup aidé tout au long de ma thèse que ce soit sur des aspects pratiques ou scientifiques. Merci de t’être autant investie. Je tiens aussi à remercier Catherine JOULIAN pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, me conseiller et m’orienter pour les analyses à faire côté bio. Merci à Florent BOURGEOIS pour ses remarques assurément constructives et instructives et en particulier de m’avoir prêté main-forte pour l’étude statistique réalisée pendant la phase de rédaction. Je souhaite également remercier Carine JULCOUR qui a toujours montré son intérêt pour mes travaux et Amine DAKKOUNE pour son partage de connaissances et de compétences, en particulier lorsqu’on a reproduit le montage expérimental au BRGM pour les essais avec attrition. Les discussions autours de nos travaux respectifs avec toute l’équipe BIOMECALIX étaient passionnantes et très enrichissantes pour moi. Un grand merci également à tous les stagiaires Mounia ASSARRA, Guylian LAURENT, Léna CHARBONIER et Kathlyn AGRA-FERREIRA dont le travail m’a été d’une aide précieuse pendant la phase expérimentale la plus intense de ma thèse. Je remercie chaleureusement Caroline MICHEL, qui m’a permis d’avoir des résultats intéressants et nouveaux par rapport à ce qui est usuellement fait en biolixiviation au BRGM, Douglas PINO HERRERA pour son soutien et ses conseils scientifiques ou sur la thèse en général, et Solène TOUZE pour ses encouragements, ses bonnes idées pratiques et d’être toujours prête à venir en aide (merci d’avoir gérer les problèmes techniques pendant ma soutenance).

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin à mes travaux de thèse, que ce soit en me faisant découvrir la biolix ou une multitude de techniques d’analyse (Hafida, Pascal, Dominique, Nicolas), en m’aidant avec les montages (surtout quand je suis trop petite) et les suivis (en particulier ceux des weekends) (Jérémy, Mickaël B., Camille, Marion, Clément, Douglas, Samir, Jérôme J., Yannick), pour la préparation des échantillons (Jérôme B., Mickaël B., Pascal, Marion) ou pour les analyses (Marine, Stéphane, Mohamed, Benoit, Hafida, Mickaël C., Pascal, Maxime). Merci également à Raphaël pour sa réactivité à chaque fois que je voulais analyser mes échantillons mais qu’il y avait besoin d’une maintenance du ganulomètre laser. Un remerciement particulier à Ekrem qui m’a aidé à dupliquer le dispositif expérimental du LGC au BRGM en l’adaptant à mes besoins et à ma taille (merci pour le petit escabeau fait maison qui m’a parfois aussi servi de tabouret ou de support). Merci aussi pour ta réactivité lorsque j’avais des soucis techniques avec le montage.

Je souhaiterais remercier les membres du jury Edouard ASSELIN, Stoyan GAYDARDZHIEV, François GUYOT, Eric OLMOS d’avoir accepté d’évaluer mes travaux de thèse et pour les discussions très constructives et enrichissantes.

Je remercie l’Agence Nationale de la Recherche (ANR) pour avoir financé cette thèse dans le cadre du projet BIOMECALIX. Cette thèse a également bénéficié d'une aide de l’État gérée par l’ANR au titre du programme d’Investissements d’Avenir portant la référence ANR-18-EURE-0021.

Merci également au LGC et au BRGM de m’avoir accueillie et à Boliden pour m’avoir fait don de la matière première que j’ai utilisé tout au long de ma thèse.

Merci également aux collègues de DMP pour leur accueil et les moments chaleureux pendant ces dernières années, malgré le passage de la pandémie.

Merci à Almaza, Safae, Chainez, Charles, Sahar, Juan, Clément, Samir, Guylian, Mounia, Sagin, Maxime, Sofia, Arnaud, Rachel, Léna, Navid, Adil, Djouhar, Raphaël, et tous les autres doctorants, stagiaires et post-doctorants que j’ai pu côtoyer et avec qui j’ai passé de très bons moments, voir même parfois partagé les galères au labo.

Enfin, je souhaite remercier ma famille et mes amis qui m’ont toujours soutenu et cru en moi.

Un grand merci à tous ceux grâce à qui cette aventure s’est terminée en réussite !

Table des matières

Table des matières ..... **i**

Abréviations ..... **v**

Introduction générale **1**

Chapitre I - Etat de l'art **7**

1. Introduction 9

2. Qu'est-ce que la biolixiviation ? 11

2.1. Principes de la biolixiviation oxydante 11

2.2. Microorganismes en biolixiviation 13

2.2.1. Principe de fonctionnement des microorganismes 13

2.2.2. Types de microorganismes 14

2.2.3. Mécanismes de lixiviation par les microorganismes 16

2.2.4. Evolution et adaptation des consortia microbiens en biolixiviation 17

2.3. Application de la biolixiviation aux procédés d'extraction de métaux 18

2.3.1. Biolixiviation en tas 19

2.3.2. Biolixiviation en réacteur agité 20

3. (Bio)lixiviation et passivation de la chalcopyrite 22

3.1. Aspects chimiques de la (bio)lixiviation de la chalcopyrite 23

3.2. Mécanismes de dissolution et problématique de la passivation 24

3.2.1. Formation de sulfures de cuivre et de soufre élémentaire 25

3.2.2. Formation de jarosite 27

3.2.3. Bilan 28

3.2.4. Solutions contre la passivation de la chalcopyrite en biolixiviation 29

4. L'attrition lixiviante : une solution à la passivation de la chalcopyrite en biolixiviation ? 30

4.1. Traitements mécaniques 30

4.2. Principe et intérêt de l'attrition lixiviante 34

5. Conclusion du chapitre 38

6. Références 39

Chapitre II - Matériel et Méthodes **47**

1. Préparation des échantillons de chalcopyrite 49

1.1. Concentré de chalcopyrite 49

1.2. Préparation de la matière 49

1.3. Préparation des lots 50

2. Culture bactérienne (production de l'inoculum) 51

2.1. Consortium bactérien et milieu nutritif 51

2.2. Culture de l'inoculum 52
2.2.1. Minerai de culture 52
2.2.2. Dispositif et protocole de culture de l'inoculum 53
2.2.3. Méthodologie pour l'étude de la répétabilité de l'inoculum 53
3. Dispositif et protocoles expérimentaux de (bio)lixiviation de chalcopyrite 55
3.1. Biolixiviation conventionnelle 55
3.1.1. Dispositif expérimental 55
3.1.2. Protocole expérimental et conditions opératoires 56
3.2. Biolixiviation attritive 57
3.2.1. Dispositif expérimental 57
3.2.2. Protocole expérimental et conditions opératoires 58
3.2.3. Tests de viabilité 60
4. Analyses physico-chimiques 60
4.1. Analyse des échantillons liquides 60
4.2. Analyse des échantillons solides 61
4.2.1. Analyses chimiques 62
4.2.2. Mesure de la composition minérale 62
4.2.3. Mesure de la taille des particules 62
4.2.4. Mesure de la surface spécifique 63
4.3. Bilan de matière, protons produit 63
5. Analyses biologiques 64
5.1. Mesure de biomasse 64
5.1.1. Méthode de comptage en cellule de Thoma (microscopie optique) 65
5.1.2. Méthode de comptage par marquage DAPI (microscopie à fluorescence) 65
5.1.3. Mesure de la biomasse par des techniques biomoléculaires 66
5.1.4. Méthodologie : mesure de la biomasse au cours des opérations de biolixiviation 68
5.2. Analyse de la diversité des communautés bactériennes 71
6. Conclusion du chapitre 73
7. Références 74
Chapitre III - Caractérisation de la matière et préparation de l'inoculum 77
1. Caractérisation de la matière 79
1.1. Caractérisation du concentré de chalcopyrite brut 79
1.2. Caractérisation des fractions 20-100 µm et < 20 µm 82
2. Préparation de l'inoculum des essais de biolixiviation de chalcopyrite 84
2.1. Suivi d'une culture de l'inoculum et interprétation des mesures 84
2.1.1. Suivi physico-chimique et biologique 84

2.1.2. Composition de l'inoculum 88
2.1.3. Récapitulatif des caractéristiques principales de l'inoculum 88
2.2. Etude de répétabilité de l'inoculum 88
2.2.1. Répétabilité de l'inoculum : étude des caractéristiques principales 89
2.2.2. Répétabilité de l'inoculum : diversité bactérienne 94
2.2.3. Conclusions 96
3. Conclusion du chapitre 97
4. Références 98
Chapitre IV - Effet de la taille des particules et de la régulation du pH sur la biolixiviation de la chalcopyrite en réacteur conventionnel 99
1. Influence de la taille des particules sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite 101
1.1. Oxydation de la chalcopyrite en fonction de la taille des particules 102
1.1.1. Dissolution des sulfures (chalcopyrite et pyrite) 102
1.1.2. Caractérisations des résidus solides 106
1.1.2.1. Distribution de taille des particules 106
1.1.2.2. Analyses DRX des résidus 107
1.1.2.3. Caractérisation des phases jarosites 109
1.1.2.4. Soufre élémentaire 111
1.1.3. Conclusions 112
1.2. Effet de la taille des particules sur les communautés bactériennes 112
1.2.1. Impact de la taille des particules sur la croissance bactérienne 112
1.2.2. Impact de la taille des particules sur la diversité bactérienne 114
1.2.3. Impact de la taille des particules sur l'activité bactérienne 116
1.2.3.1. Oxydation de fer ferreux 116
1.2.3.2. Oxydation du soufre 120
1.3. Discussion 123
1.4. Conclusion 127
2. Effet d'une régulation du pH à 1,3 sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite 127
2.1. Effet de la régulation du pH sur l'oxydation de la chalcopyrite 128
2.2. Influence de la régulation du pH sur les communautés bactériennes 131
2.2.1. Influence de la régulation du pH sur la croissance et la diversité bactérienne 131
2.2.2. Influence de la régulation du pH sur l'activité bactérienne 133
2.3. Discussion 135
3. Conclusion du chapitre 137
4. Références 139

Chapitre V - Biolixiviation attritive 143
1. Impact du média broyant sur la dissolution de la chalcopyrite 146
1.1. Analyses granulométriques 146
1.2. Attrition lixiviante en conditions abiotiques 147
1.3. Biolixiviation attritive : influence de l'attrition sur le rendement de dissolution 149
1.3.1. Biolixiviation attritive à 5% (m/m) de solide et 250 g de billes 149
1.3.2. Effet de la taille des particules vs. effet de l'attrition 151
1.3.3. Influence du taux de solide 152
1.4. Influence des microorganismes 154
2. Analyses et interprétation des essais de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante 155
2.1. Evolution du potentiel redox 155
2.2. Croissance, diversité et activité bactérienne 159
2.2.1. Evolution de la biomasse 159
2.2.2. Evolution de la communauté bactérienne 161
2.3. Consommation d'acide 162
2.4. Conclusion 164
3. Impact des contraintes mécaniques et hydrodynamique sur les bactéries 164
3.1. Biolixiviation attritive : Tests de viabilité 165
3.1.1. Evolution de la biomasse et diversité bactérienne 165
3.1.2. Evolution du potentiel redox et du pH 166
3.2. Repiquage d'un essai de biolixiviation attritive 168
3.2.1. Rendement et cinétique d'oxydation de la chalcopyrite 168
3.2.2. Croissance, diversité et activité bactérienne 170
3.2.3. Discussion 173
4. Conclusion du chapitre 175
5. Références 177
Conclusion générale et perspectives 179
Annexes 187
Résumé 200
Abstract 201

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ATP : Adénosine triphosphate

BET : Méthode de mesure de la surface spécifique selon la théorie de Brunauer, Emmett et Teller

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

dNTP : désoxynucléosides triphosphates

DRX : Diffraction des Rayons X

CV : Coefficient de variation

Eh vs. SHE : Potentiel redox par rapport à l'Electrode standard à hydrogène

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

H_3O-jarosite : Hydronium jarosite

HMP : Héxamétaphosphate de Sodium

ILS : Intermediate Leach Solution

K-jarosite : Potassium-jarosite

LGC : Laboratoire de Génie Chimique

MP-AES : Spectrométrie d'Emission Atomique par Plasma Micro-ondes

NH_4-jarosite : Ammonium-jarosite

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PLS : Pregnant Leach Solution

qPCR : PCR quantitative

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

ROL : Rapid Oxidative Leach

SAA : Spectrométrie d'Absorption Atomique

T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

tRF : Terminal Restriction Fragment

Introduction générale

La demande mondiale en métaux ne cesse de croître, tandis que les minerais s'appauvrissent et deviennent plus difficiles à traiter. Il est donc nécessaire de chercher de nouvelles technologies, ou d'améliorer celles existant, afin de produire des métaux de manière plus performante et économique. Dans ce contexte, les procédés hydrométallurgiques (opérés en milieu aqueux après la dissolution des concentrés de minerais) constituent une alternative aux procédés pyrométallurgiques (opérés à haute température pour produire du métal liquide), avec des avantages potentiels en termes de consommation d'énergie, d'impacts environnementaux, de coûts, de flexibilité, et d'adaptabilité pour le traitement de matériaux complexes ou avec de faibles teneurs en métaux.

Dans le cas de la production de cuivre à partir de ressources minérales primaires, la pyrométallurgie reste toutefois la voie la plus utilisée. Une des raisons est le caractère réfractaire à la lixiviation de la chalcopyrite ($CuFeS_2$), principale ressource primaire de cuivre sur Terre. La lixiviation constitue la première étape unitaire des procédés hydrométallurgiques et consiste à mettre en solution les métaux d'intérêt contenus dans le minerai. Elle peut être réalisée par voie purement chimique (à l'aide d'un ou plusieurs agents lixiviants) ou biologique, on parlera alors de « biolixiviation ». Comparé à la lixiviation chimique, la biolixiviation présente un avantage économique et environnemental grâce notamment à la régénération des réactifs par des microorganismes dans des conditions souvent moins contraignantes (à pression atmosphérique, températures inférieures à 100 °C et pH entre 1 et 2).

L'origine du caractère réfractaire de la chalcopyrite reste aujourd'hui sujet à débat. L'option de la formation d'une couche de passivation à la surface des particules de chalcopyrite, entravant la dissolution du minéral par limitation de la surface réactive, reste la plus couramment mentionnée. Du fait du caractère électrochimique de la réaction de dissolution, qui nécessite l'oxydation des sulfures S(-II) en soufre S° voire en sulfates S(+VI), des phénomènes de passivation de type électronique sont également invoqués.

$$CuFeS_{2(s)} + 4Fe^{3+}_{(aq)} = Cu^{2+}_{(aq)} + 5Fe^{2+}_{(aq)} + 2S°_{(s)} \quad [1]$$

Equation de dissolution de la chalcopyrite par l'oxydant Fe^{3+}

Une des solutions étudiées pour remédier au(x) phénomène(s) de passivation repose sur le traitement mécanique de la chalcopyrite permettant d'une part l'augmentation de la surface réactive en réduisant la taille des particules (broyage) et d'autre part une amélioration de la réactivité du minéral par activation mécanique (modification de la structure cristalline par exemple). Ce traitement est généralement mené en amont de la lixiviation (procédé Albion par exemple).

Le présent travail s'inscrit dans le projet BIOMECALIX (2018-2023), dont l'objectif est d'évaluer les potentialités d'un nouveau concept de lixiviation hybride nommé « biolixiviation attritive ». Il a été réalisé en partenariat entre le BRGM à Orléans (Bureau de Recherches Géologiques et Minières) et le LGC (Laboratoire de Génie Chimique) de Toulouse.

Dans l'objectif de l'amélioration des rendements, d'une meilleure utilisation des ressources et de la réduction des effluents, le projet BIOMECALIX vise à étudier un procédé combinant les avantages de la biolixiviation (température et acidité modérées, production in situ du réactif oxydant par des microorganismes) et de l'attrition lixiviante consistant en l'abrasion des couches de passivation grâce à un media broyant agité. La Figure 1 synthétise l'approche développée dans ce projet.

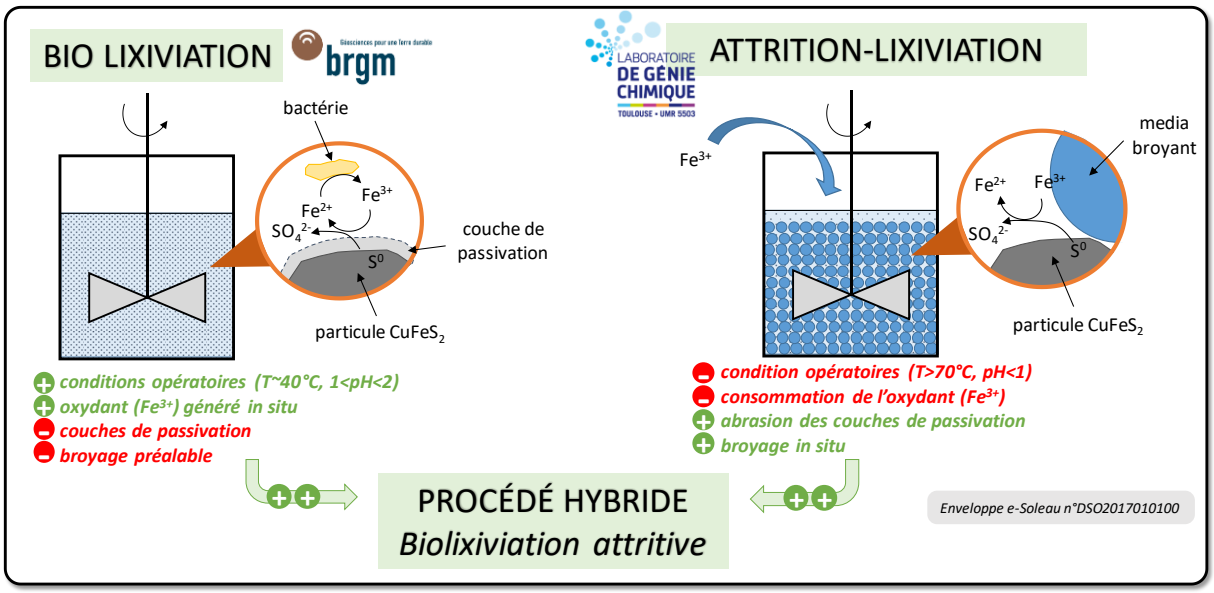


Figure 1 : Schéma de principe du procédé hybride de « biolixiviation attritive »

Plus spécifiquement, les objectifs de cette thèse ont été focalisés sur les aspects liés à la biolixiviation, en vue notamment de déterminer l'impact des contraintes hydrodynamiques et mécaniques sur la croissance et l'activité bactérienne et de comprendre les effets du couplage entre les deux modes de lixiviation (rendement, cinétique, nature des solides résiduels).

En biolixiviation, les conditions initiales peuvent influencer l'évolution des paramètres au cours du temps (pH, potentiel redox, concentrations en métaux, etc.). Il est donc important de pouvoir bien définir ces conditions afin de comprendre les différents phénomènes ayant lieu au sein du système. Les matériaux utilisés (chalcopyrite et inoculum bactérien) ont donc été caractérisés, et une méthodologie a été mise au point afin d'avoir à disposition un inoculum répétable pour les divers travaux de la thèse. Cette méthodologie repose sur le repiquage des cultures des microorganismes et permet de maintenir un inoculum dont les caractéristiques sont similaires d'un repiquage à l'autre.

Dans un second temps, afin de différencier l'effet de l'attrition sur la lixiviation de la chalcopyrite des effets liés aux conditions opératoires appliquées (régulation du pH) ou des phénomènes concomitants (production de particules fines), ces derniers ont été étudiés séparément. Ces études ont été réalisées dans des conditions de biolixiviation en réacteur agité aéré sans média broyant. La dissolution de la chalcopyrite a été évaluée en parallèle de la croissance, de l'activité, de la diversité et de la localisation des bactéries.

Enfin, le procédé de biolixiviation attritive a été étudié et comparé au procédé de biolixiviation conventionnelle en réacteur agité. Les essais de biolixiviation attritive ont été réalisés en présence de billes de verre de taille millimétrique utilisées en tant que média broyant, dans un réacteur muni d'un système d'agitation spécialement conçus pour ces essais. Cette étude visait à mieux comprendre les phénomènes chimiques et biologiques, ainsi que l'impact de l'attrition sur les microorganismes dans un tel procédé.

Le manuscrit est constitué de cinq chapitres. Le **chapitre I** décrit l'état de l'art relatif à la biolixiviation de la chalcopyrite : il reprend les mécanismes généraux de la biolixiviation oxydante et de l'oxydation de la chalcopyrite, ainsi que les principaux résultats des études relatives à la passivation de ce minéral, et présente certaines solutions étudiées pour y remédier. Le **chapitre II** présente ensuite les aspects méthodologiques mis en œuvre, incluant les dispositifs expérimentaux et techniques d'analyses. Puis, les résultats de la caractérisation des matériaux de chalcopyrite et la méthodologie de préparation de

l'inoculum sont exposés dans le **chapitre III**. L'impact de la taille des particules et de la régulation du pH sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite (sur la dissolution et la passivation du minéral, et sur la communauté bactérienne) a ensuite été étudié au **chapitre IV**. Cette étude permet notamment de distinguer l'effet de la taille des particules et de la régulation du pH de celui de l'attrition abordé au **chapitre V**, consacré à l'étude du procédé de biolixiviation attritive. Dans ce dernier chapitre, on s'intéresse notamment aux phénomènes chimiques, physiques et biologiques ayant lieu au sein d'un système où les contraintes mécaniques et hydrodynamiques sont importantes. La conclusion de ce manuscrit évoquera également les perspectives de ce travail.

Chapitre I - Etat de l’art

1. Introduction

L'extraction des métaux à partir de ressources variées (minerais, déchets à recycler) se fait principalement par des opérations de pyrométallurgie (à haute température, permettant la production directe de métal à l'état liquide) ou d'hydrométallurgie (dissolution dans une phase aqueuse puis extraction et réduction du métal d'intérêt).

La pyrométallurgie reste encore aujourd'hui la voie la plus couramment utilisée, en particulier pour l'extraction de cuivre (environ 80 % de la production mondiale de cuivre en 2021) (ICSG, 2022). Toutefois, elle présente plusieurs inconvénients (Zhao et al., 2019) : grande consommation d'énergie, coûts d'investissements et coûts opératoires élevés, émissions massives de CO_2 et de SO_2 dans le cas de traitement de sulfures (Baláž, 2003), production de poussières et de déchets solides (Tešinský et al., 2017). Des mesures doivent également être prises pour éviter le rejet de polluants dans l'atmosphère, comme le SO_2 (dans le cas de la production du cuivre par voie pyrométallurgique, des installations ont été mises en place pour capter plus de 90% du SO_2 émis (Kuenen et al., 2019)). La voie hydrométallurgique constitue une alternative intéressante en vue de simplifier les opérations, de diminuer les coûts d'investissement et d'exploitation, ainsi que l'impact environnemental global et potentiellement les dépenses énergétiques (Rawlings et Johnson, 1998 et Rizet et Charpentier, 2000). La baisse des réserves en minerai riches en métaux (« high-grade ») accroit également l'intérêt pour les procédés hydrométallurgiques (par exemple, la teneur moyenne des minerais de cuivre exploités était de 1,34 % en 1990 contre 0,78 % en 2008 (France Chimie et La société chimique de France, 2019)). En effet, le traitement de minerais faiblement concentrés en métaux (« low-grade ») n'est pas économiquement viable par les méthodes pyrométallurgiques mais possible par voie hydrométallurgique. Les procédés hydrométallurgiques peuvent également être utilisés pour traiter des minerais complexes, des déchets industriels et urbains (déchets miniers, poussières, boues des stations d'épuration, cartes électroniques, …) (Mahmoud et al., 2017, Hubau et al., 2020a, Hubau et al., 2020b), mais également des concentrés de cuivre contenant des impuretés susceptibles de détériorer le procédé pyrométallurgique (Zhao et al., 2019).

En aval des étapes d'extraction et de traitement des minerais, la lixiviation représente la première opération unitaire des procédés hydrométallurgiques. Celle-ci vise à la dissolution des minéraux pour la mise en solution des métaux qu'ils contiennent, ou la dissolution de la gangue pour la libération des phases d'intérêts sous forme solide. La solution issue de l'étape de lixiviation (« Pregnant Leach Solution » (PLS)) est ensuite purifiée et concentrée selon différentes techniques (extraction liquide/liquide, précipitation, extraction liquide/solide, etc.), avant de récupérer le métal d'intérêt sous forme solide ou de sels (Schlesinger et al., 2011, Justel et al., 2019 et Ma et al., 2022). La Figure 2 illustre l'enchaînement de ces étapes.

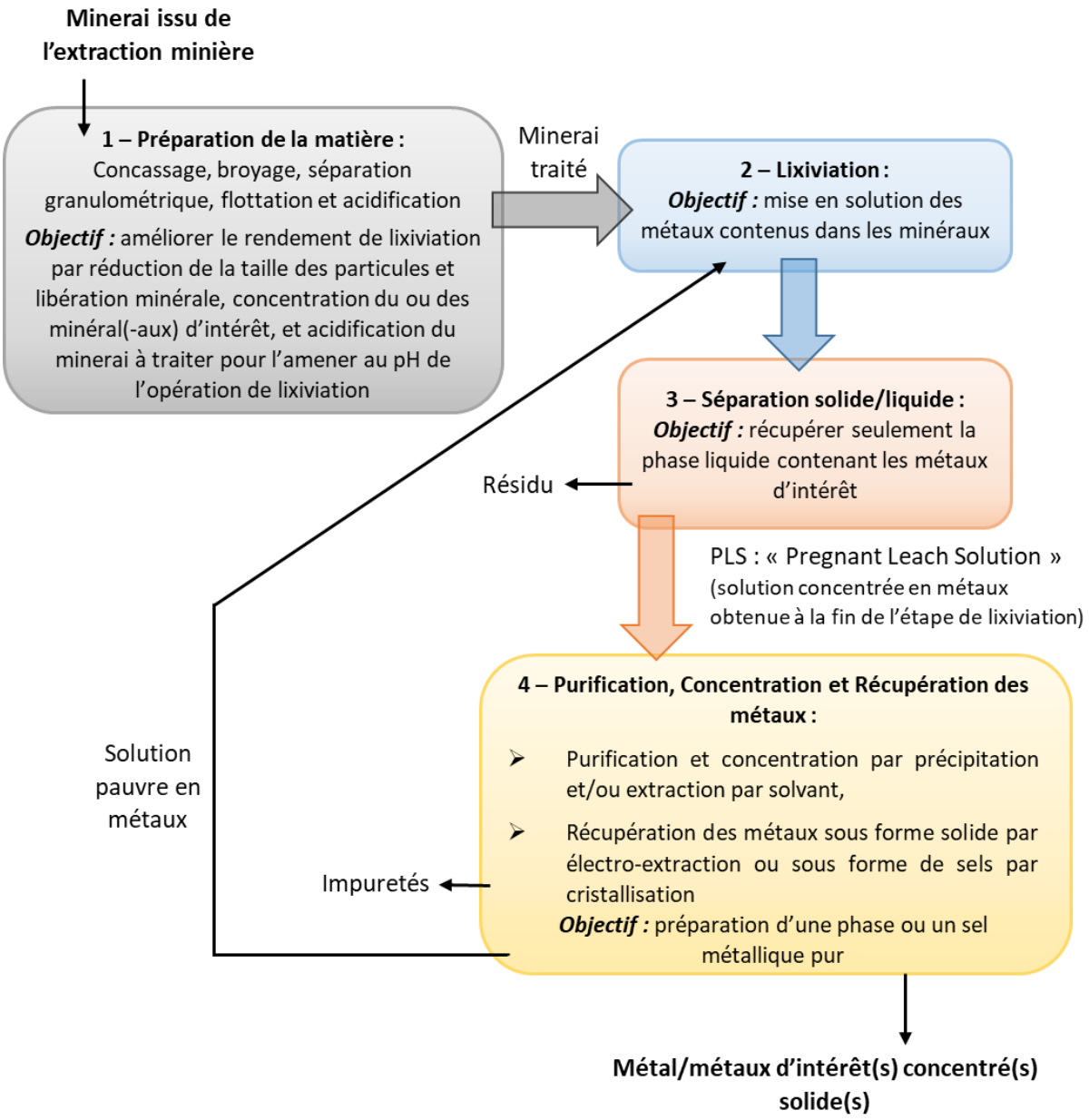


Figure 2 – Principales étapes des procédés hydrométallurgiques pour l'extraction et la production d'un métal solide ou d'un sel métallique pur à partir d'un minerai.

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont focalisés sur le traitement par voie hydrométallurgique d'un minerai de chalcopyrite, qui constitue la principale ressource primaire de cuivre (Li et al., 2013), mais dont l'étape de lixiviation reste une difficulté majeure dans la chaîne de production du métal.

En effet, la lixiviation de la chalcopyrite opérée par voie purement chimique à pression atmosphérique est connue pour avoir une cinétique lente et un rendement faible, excluant une mise en œuvre à l'échelle industrielle (Chaiko et al., 2015). La lixiviation chimique de ce minéral peut être accélérée sous haute pression et à des températures pouvant aller jusqu'à 230 °C, couplée à un broyage fin, voir ultra-fin (McDonald et Muir, 2007). Ces conditions opératoires représentent un coût important (broyage intensif et besoin en équipements adaptés pour des applications à hautes pressions et hautes températures), ce qui favorise le traitement de la chalcopyrite par voie pyrométallurgique (Debernadi et al., 2013). Des alternatives consistant d'une part à mettre en œuvre des procédés de biolixiviation et d'autre part à opérer dans des conditions à pression atmosphérique et à des températures

inférieures à 100°C pour lixivier la chalcopyrite font donc l'objet de recherches actives depuis des décennies.

Dans ce cadre, ce premier chapitre du manuscrit vise à introduire le concept de biolixiviation et son état de l'art, en se focalisant sur les mécanismes de dissolution de la chalcopyrite et les raisons de sa résistance à la lixiviation. La suite du chapitre sera focalisée sur les apports potentiels de traitements mécaniques du minerai pour accélérer la lixiviation. La fin du chapitre consistera à présenter les objectifs de la thèse et les questions de recherche.

2. Qu'est-ce que la biolixiviation ?

La biolixiviation est une technique d'extraction de métaux exploitant les propriétés de microorganismes (bactéries unicellulaires, archae unicellulaires, ou champignons microscopiques uni- ou pluricellulaires) afin de générer ou régénérer les réactifs des réactions de dissolution de minéraux métallifères. Pour des conditions opératoires identiques, l'assistance des bactéries vise à mettre en solution les métaux plus rapidement que lors d'une lixiviation purement chimique (Rawlings et Johnson, 1998), tout en limitant la consommation des agents lixiviants (typiquement le sulfate de Fe(III) dans le cas des minerais sulfurés). La biolixiviation est aujourd'hui utilisée dans des procédés industriels pour la production d'or (0,9% de la production mondiale en 2020 a utilisé le procédé de biolixiviation BIOX® (Roberto et Schippers, 2022)) et de cuivre (42% de la production de cuivre par voie hydrométallurgique en 2010 au Chili, premier producteur mondiale de cuivre (Roerto et Schippers, 2022)). D'autres métaux tels que le cobalt, le nickel et le zinc sont aussi en partie extraits à partir de minerais sulfurés par biolixiviation (Stanković et al., 2022).

Selon les propriétés des microorganismes, les agents lixiviants utilisés et les mécanismes impliqués peuvent être différents. Si l'agent lixiviant est un oxydant (fer ferrique (Fe^{3+}) par exemple), on parlera alors de biolixiviation oxydante. Cette dernière utilise des microorganismes acidophiles, autotrophes ou mixotrophes, mésophiles ou thermophiles (modéré) oxydant le fer et/ou le soufre. Elle est à ce jour la seule opération de biolixiviation à avoir atteint un niveau industriel. Parmi les autres agents lixiviants, il y a les acides organiques ou agents complexants, ainsi que les réducteurs. Les deux premiers types d'agents peuvent être produits par des microorganismes et permettent par exemple une meilleure solubilisation du nickel dans le cas de l'extraction de ce métal à partir de latérite. La biolixiviation impliquant des acides organiques, étudiée depuis plus de 50 ans, n'a jusqu'ici pas dépassé l'échelle du laboratoire. Enfin, la biolixiviation réductrice (l'agent lixiviant est un réducteur) est un procédé récent, dont la plupart des études sont encore à l'échelle du laboratoire (Santos et Schippers, 2022). Les microorganismes utilisés sont similaires à ceux utilisés en biolixiviation oxydante mais sont capables de réduire le fer dans des conditions anaérobies. La biolixiviation réductrice est notamment une technologie étudiée pour l'extraction du cobalt à partir de latérites limonitiques (Smith et al., 2017 et Santos et Schippers, 2022).

Dans le cadre de la thèse nous nous concentrerons sur la biolixiviation oxydante pour la mise en solution des métaux présents dans des minéraux sulfurés.

2.1. Principes de la biolixiviation oxydante

Le principe global de la lixiviation oxydante d'une phase sulfurée est l'oxydation de l'élément soufre au degré d'oxydation -II (sulfure) en soufre élémentaire (0), voire en sulfate (+VI), ce qui libère l'élément métallique (M) en solution, comme l'illustrent les réactions [2] (dans le cas d'un sulfure de métal M^{2+}) et [3].

$$MS + Ox \longrightarrow M^{2+} + S^0 + red \quad [2]$$

$$S^0 + Ox \longrightarrow SO_4^{2-} + red \quad [3]$$

Où Ox/Red désigne un couple redox dissous, typiquement les couples Fe^{3+}/Fe^{2+} ou O_2/H_2O.

Si la biolixiviation oxydante repose sur le même principe, elle implique d'une part le Fe^{3+} comme oxydant principal, et d'autre part des microorganismes, qui catalysent les réactions d'oxydation des produits de la dissolution des sulfures, à savoir le fer ferreux (Fe^{2+}) et les composés inorganiques réduits du soufre. Lorsque la chalcopyrite est soumise à un processus de biolixiviation, les principales réactions (bio)chimiques qui ont lieu sont les suivantes :

$$CuFeS_2 + 4Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 5Fe^{2+} + 2S \quad [4]$$

$$4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2 \longrightarrow 4Fe^{3+} + 2H_2O \quad [5]$$

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \longrightarrow 2SO_4^{2-} + 4H^+ \quad [6]$$

Où les réactions [5] et [6] sont catalysées par des microorganismes (bactéries, archées) dits respectivement ferro-oxydants et sulfo-oxydants. Ces derniers permettent de régénérer continuellement les réactifs nécessaires à la réaction de dissolution de la chalcopyrite et de limiter l'accumulation du soufre élémentaire dans le système.

La chalcopyrite peut aussi être oxydée par l'oxygène dissous dans le milieu aqueux (réaction [7]) (Hiroyoshi et al., 2001), mais la concentration en oxygène étant généralement faible, la dissolution de la chalcopyrite par l'oxygène est très lente et négligeable lorsque le milieu contient l'oxydant Fe^{3+} (Li et al., 2013 et Zhao et al, 2017).

$$CuFeS_2 + 4H^+ + O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + Fe^{2+} + 2S + 2H_2O \quad [7]$$

Il faut noter que les équations [4] et [7] sont des représentations simplifiées des réactions de dissolution de la chalcopyrite. En effet, l'oxydation du soufre du degré d'oxydation (-II) au degré d'oxydation (+IV) peut entraîner la formation d'espèces intermédiaires à différents degrés d'oxydation (Schippers, 2004), mais à l'exception du soufre élémentaire, ces espèces sont très instables et ne sont jamais détectées lorsque le milieu contient des microorganismes sulfo-oxydants.

Le Fe^{3+} joue un rôle majeur dans les processus de biolixiviation des minéraux sulfurés. La production de Fe^{3+} à partir de Fe^{2+} est très lente en conditions abiotiques et pH < 3 (Balci et al., 2007, et Mahmoud et al., 2017), mais sa cinétique s'accélère considérablement en présence de microorganismes ferro-oxydants. Ainsi, Kinnunen et Puhakka (2005) ont montré que pour un pH de 1,5 la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} est environ cinq fois supérieure en présence de bactéries ferro-oxydantes qu'en conditions abiotiques. Cette réaction consomme une quantité significative d'oxygène qui doit être continuellement dissout dans le milieu pour ne pas limiter la réaction (par exemple, à 55°C et pH 1,7, une vitesse de consommation en oxygène de 1,4 $mg.L^{-1}.min^{-1}$ peut être atteinte lors de l'oxydation biologique de 100 mM de Fe^{2+} (Deveci et al., 2003)).

Par ailleurs, l'oxydation du soufre par les bactéries produit des protons qui sont nécessaires à la réaction d'oxydation du Fe^{2+} et participent au maintien d'un pH acide nécessaire pour garder les ions Fe^{3+} en solution (les ions Fe^{3+} étant très peu solubles à pH neutre (Rawlings, 2005)).

2.2. Microorganismes en biolixiviation

L'utilisation de microorganismes dans un procédé de lixiviation implique d'opérer dans des conditions adaptées à leur croissance et à leur activité, et préservant la diversité microbienne au sein du système permettant l'oxydation du fer et du soufre. Nous nous intéressons dans cette partie à la nature et au fonctionnement de ces microorganismes.

2.2.1. Principe de fonctionnement des microorganismes

L'oxydation des intermédiaires soufrés et du Fe^{2+} implique le transport d'électrons entre les cellules microbiennes et le milieu à travers des échanges entre un donneur et un accepteur d'électrons. Les électrons sont partiellement utilisés par les microorganismes pour leur croissance et leur activité métabolique. Cela leur permet notamment de maintenir un pH neutre au sein des cellules malgré l'acidité du milieu (Rawlings, 2005). En effet, il existe un flux de protons qui traversent la membrane cellulaire en raison du gradient de pH entre le milieu extérieur et la cellule. Ce flux se fait directement par diffusion à travers la membrane ou par l'intermédiaire d'une protéine membranaire. Les protons sont ensuite utilisés pour réduire l'oxygène au sein de la cellule à partir des électrons apportés par le fer et le soufre (Guézennec, 2019). C'est ce mécanisme (appelé également « electron shuttle ») qui permet d'accélérer (ou « catalyser ») les réactions d'oxydation du Fe^{2+} et des espèces intermédiaires réduites du soufre. Le flux de protons permet également la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP), molécule fournissant l'énergie nécessaire à la majorité des réactions métaboliques chez les êtres vivants, via une enzyme transmembranaire (ATP synthase).

Par ailleurs, ce mécanisme met en avant l'importance de l'oxygène dans le maintien d'un pH intracellulaire neutre, nécessaire à la survie des microorganismes et qui entretien le gradient de pH impliqué dans la catalyse des réactions d'oxydation du Fe^{2+} et du soufre. D'après les travaux de Hatzikioseyian et Tsezos (2006), à 40°C et pH 1,5, au moins 90% et 75% des électrons produits respectivement par ces deux dernières réactions sont utilisés pour réduire l'oxygène. Le reste des électrons est utilisé pour la croissance des bactéries, souvent autotrophes, qui utilisent le CO_2 comme source de carbone.

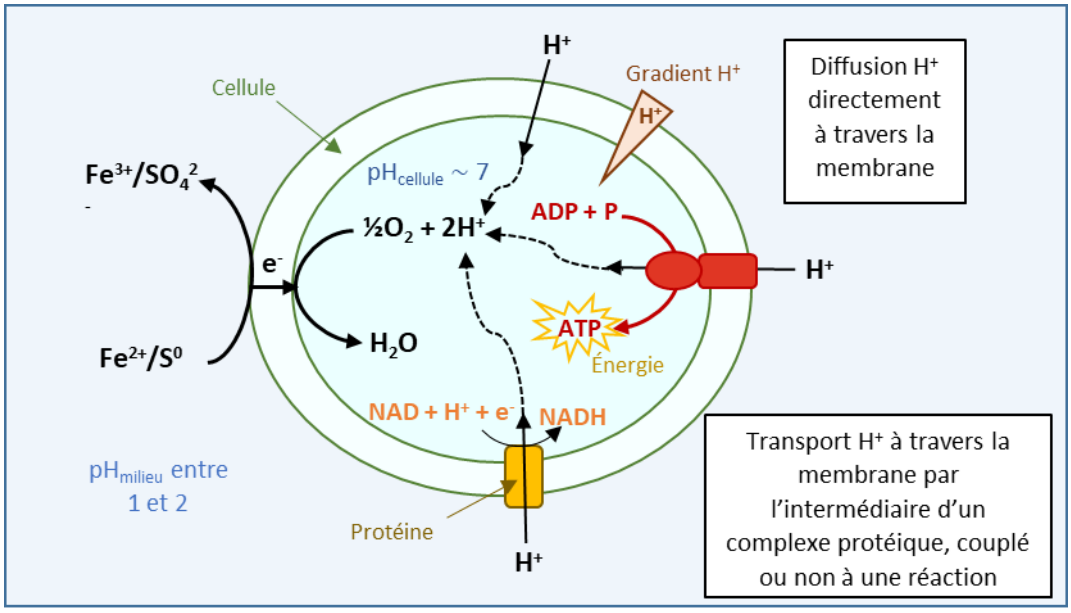


Figure 3 - Transports d'électrons et de protons entre le milieu aqueux et une cellule microbienne lors d'une opération de biolixiviation (adapté de Guézennec (2019)).

2.2.2. Types de microorganismes

Les microorganismes utilisés en biolixiviation oxydante sont présents naturellement dans les environnements des mines exploitant des gisements sulfurés (sur les minerais, dans les drainages miniers et dans les boues d'exploitation (Bryan et al., 2011)), mais également dans des environnements géothermiques acides, où la géochimie est définie par une majorité de minéraux soufrés et ferreux (Urbieta et al., 2015). Ces microorganismes sont dits extrêmophiles, c'est-à-dire qu'ils se développent dans des conditions « extrêmes », généralement non-favorables au développement de la plupart des organismes vivants. En effet, ils sont capables de se multiplier et d'être actifs aux faibles pH (jusqu'à un pH de 0,5 pour certains d'entre eux) grâce au mécanisme de transport d'électrons décrit ci-dessus ; on les qualifie de microorganismes « acidophiles ». Certains d'entre eux peuvent également tolérer des températures supérieures à 50°C et pouvant aller jusqu'à 90 °C ; on les qualifie alors de microorganismes « thermophiles » (voir Tableau 1). Certains microorganismes sont néanmoins plus adaptés à des températures comprises entre 20 °C et 40 °C, d'autres autour de 45 et 55 °C. Ils sont alors qualifiés de « mésophiles » et de « thermophiles modérés » respectivement.

De plus, les microorganismes de biolixiviation peuvent être autotrophes, hétérotrophes ou mixotrophes, selon qu'ils se développent en utilisant des nutriments inorganiques, organiques, ou les deux respectivement. L'autotrophie des microorganismes est un paramètre important pour leur utilisation dans les procédés de biolixivation, car elle permet d'éviter d'ajouter un substrat organique en tant que source de carbone (mélasse par exemple), et par conséquent d'éviter un coût supplémentaire à l'opération de biolixiviation. Le CO_2 contenu dans l'air, ou de l'air légèrement enrichi en CO_2, est souvent suffisant pour la croissance des bactéries comme *Acidithiobacillus ferrooxidans* ou de thermophiles modérés comme *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Rawlings, 2005). L'enrichissement en CO_2 peut être requis pour les opérations avec des thermophiles modérés car la solubilité du CO_2 diminue avec l'augmentation de la température à pression atmosphérique (Dodds et al., 1956). Lorsqu'un consortium de microorganismes, et non une culture pure, est utilisé et qu'il contient des autotrophes et des hétérotrophes, ces derniers peuvent se développer avec les déchets organiques produits par les autotrophes. Il n'est donc pas nécessaire d'ajouter de substrat carboné dans le procédé. Des études ont montré que l'association de microorganismes autotrophes et hétérotrophes (ou mixotrophes) pourrait même favoriser le bon déroulement de la biolixiviation en éliminant ces déchets, qui lorsqu'ils s'accumulent, peuvent devenir toxiques et inhiber l'activité des microorganismes (Rawlings, 2005).

Grâce à leurs différentes propriétés (autotrophie, hétérotrophie, capacité à oxyder le fer/le soufre), les microorganismes utilisés en consortium mènent à de meilleurs rendements comparés aux souches pures (Li et al., 2013), d'autant plus si ces microorganismes ont été adaptés aux conditions opératoires du procédé (Bryan et al., 2011 et Rubio et Frutos, 2002). Il est par ailleurs difficile d'opérer avec une souche pure en biolixiviation à l'échelle pilote et industrielle car cela nécessiterait la stérilisation du minerai et des équipements.

En biolixiviation, les microorganismes appartiennent majoritairement au domaine *Bacteria* mais quelques genres appartiennent au domaine *Archaea*. Le Tableau 1 donne des exemples d'espèces utilisées en biolixiviation.

Parmi les propriétés de ces microorganismes, les plus importantes sont (Rawlings, 2005) :

- Leur aptitude à se développer en fixant le CO_2 de l'atmosphère (autotrophie) (majorité des microorganismes utilisés en biolixiviation) ;
- Leur capacité à se développer à des pH acides (pH < 3 (Vera et al., 2013) (acidophile) ;

- Leur aptitude à se procurer l'énergie qui leur est nécessaire par oxydation des ions Fe^{2+} et/ou du soufre (Figure 3);
- Leur tolérance à de fortes concentrations en différents métaux : par exemple *A. Ferrooxidans* est capable de se développer dans une solution contenant : 30 $g.L^{-1}$ de Co^{2+}, 55 $g.L^{-1}$ de Cu^{2+}, 72 $g.L^{-1}$ de Ni^{2+}, 120 $g.L^{-1}$ de Zn^{2+}, 12 $g.L^{-1}$ de U_3O_8 et 160 gL^{-1} de Fe^{2+} (Rawlings, 2005) ; des espèces du genre *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus* et *Sulfobacillus* peuvent tolérer des concentrations en cuivre pouvant aller jusqu'à 40 $g.L^{-1}$ (Guézennec et al., 2014).
- Leur demande en nutriments est suffisamment modeste pour que seuls une aération, un apport en sulfures (avec du minerai sulfuré contenant du fer) (Rawlings, 2005) et de petites quantités d'engrais (azote, phosphate et potassium) suffisent à satisfaire leurs besoins (Guézennec, 2019).

Tableau 1 - Tableau récapitulatif d'espèces de microorganismes acidophiles utilisées en biolixiviation et leurs propriétés. T : température, pH_{opt} : pH optimal, pH_{min} : pH minimum, T_{max} : température maximale, T_{opt} : Température optimale, * : pH et températures auxquels se développent les microorganismes (Mahmoud et al., 2017, et Johnson et al., 2008)).

Espèces	Taxonomie	Propriétés			Oxyde le
Acidithiobacillus ferrooxidans (anciennement *Thiobacillus ferrooxidans*)	*Bacteria*	Mixotrophe	Acidophile pH* : 1,3 à 4,5 pH_{opt} : 1,8 à 2,5	Mésophile T* : 10°C à 37°C T_{opt} : 30°C à 35°C	Fer et soufre
Acidithiobacillus thiooxidans (anciennement *Thiobacillus thiooxidans*)	*Bacteria*	Autotrophe	Acidophile pH* : 0,5 à 5,5 pH_{opt} : 2,0 à 3,0	Mésophile T* : 10°C à 37°C T_{opt} : 28°C à 30°C	Soufre
'Fervidacidithiobacillus caldus' (anciennement *Acidithiobacillus caldus*)	*Bacteria*	Autotrophe	Acidophile pH* : 1,0 à 3,5 pH_{opt} : 2,0 à 2,5	Thermophile modéré T* : 32°C à 52°C T_{opt} = 45°C	Soufre
Leptospirillum ferrooxidans	*Bacteria*	Autotrophe	Acidophile pH* : 1,3 à 4,0 pH_{opt} : 1,5 à 3,0	Mésophile T_{opt} : 28°C à 30°C	Fer
Leptospirillum ferriphilum	*Bacteria*	Autotrophe	Acidophile pH_{opt} : 1,3 à 1,8	Mésophile T_{opt} : 30°C à 37°C	Fer
Sulfobacillus thermosulfidooxidans	*Bacteria*	Mixotrophe	Acidophile pH* : 1,5 à 5,5 pH_{opt} = 2,0	Thermophile modéré T* : 20°C à 60°C T_{opt} : 45°C à 48°C	Fer et soufre
Sulfobacillus benefaciens	*Bacteria*	Mixotrophe	Acidophile pH_{min} = 0,8 pH_{opt} = 1,5	Thermophile modéré T_{max} = 47°C T_{opt} = 38.5°C	Fer et soufre
Sulfolobus metallicus	*Archaea*	Autotrophe	Acidophile pH* : 1,0 à 4,5 pH_{opt} : 2,0 à 3,0	Thermophile T* : 50°C à 75°C T_{opt} = 65°C	Fer et soufre
Acidianus infernus	*Archaea*	Autotrophe	Acidophile pH* : 1,0 à 5,5 pH_{opt} = 2,0	Thermophile T* : 65°C à 96°C T_{opt} = 90°C	Fer et soufre

2.2.3. Mécanismes de lixiviation par les microorganismes

En biolixiviation, les microorganismes peuvent s'attacher à la surface du minéral (microorganismes sessiles) ou rester en solution (microorganismes planctoniques), donnant lieu à deux types de mécanismes : le mécanisme avec contact et le mécanisme sans contact.

Il a été observé qu'une grande partie des bactéries en biolixiviation s'attachent à la surface du minéral (Crundwell, 2003) : les bactéries sessiles pourraient jouer un rôle plus dominant que les cellules planctoniques (Li et al., 2013). Le **mécanisme de lixiviation « par contact »** suppose ainsi que les microorganismes sont localisés à la surface du minéral où se déroule notamment les réactions de dissolution introduites à la section 2.1. Ces microorganismes produisent des substances polymériques extracellulaires (EPS) qui leur permettent de s'attacher à la surface du solide et servent également de « zones avec un environnement contrôlé » pour l'oxydation des minéraux et des produits de réaction (Fe^{2+} et soufre) (Figure 4). Il est même possible que ces réactions soient plus rapides et plus efficaces dans ce micro-environnement d'EPS qu'en solution (Rawlings, 2005). Il a été montré que ces substances, sécrétées par les microorganismes en biolixiviation, notamment *A. Ferrooxidans,* étaient principalement constituées de polysaccharides, lipides, acides organiques et d'ions Fe^{3+} (probablement concentrés et sous forme complexée avec des acides organiques (Maluckov et al., 2017)). Par ailleurs, la proportion de ces constituants varie en fonction des espèces (Vera et al., 2013, Mahmoud et al., 2017).

Le **mécanisme « sans contact »** suppose quant à lui que les microorganismes en solution oxydent les ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+}, qui entreront ensuite en contact avec la surface du minéral pour l'oxyder (Figure 4). Ces microorganismes planctoniques peuvent également oxyder le soufre produit lors de l'oxydation des minéraux sulfurés. L'association des deux mécanismes est appelée **mécanisme « coopératif »** (Figure 4).

Par ailleurs, il est possible que la répartition des bactéries entre la phase liquide et la surface du solide soit liée à l'espèce bactérienne. Par exemple, Guézennec et al. (2017) ont filtré un échantillon de pulpe (milieu nutritif avec particules solides (minerai) et microorganismes) d'une opération de biolixiviation et ont extrait l'ADN des deux phases obtenues (filtrat et solides) séparément, afin de déterminer quels microorganismes étaient localisés dans la phase solide et liquide. Parmi les espèces présentes dans le consortium utilisé, '*F. caldus'* était plus abondant sous forme planctonique, contrairement à *L. ferriphilum* et *S. benefaciens* qui étaient principalement associées aux particules solides.

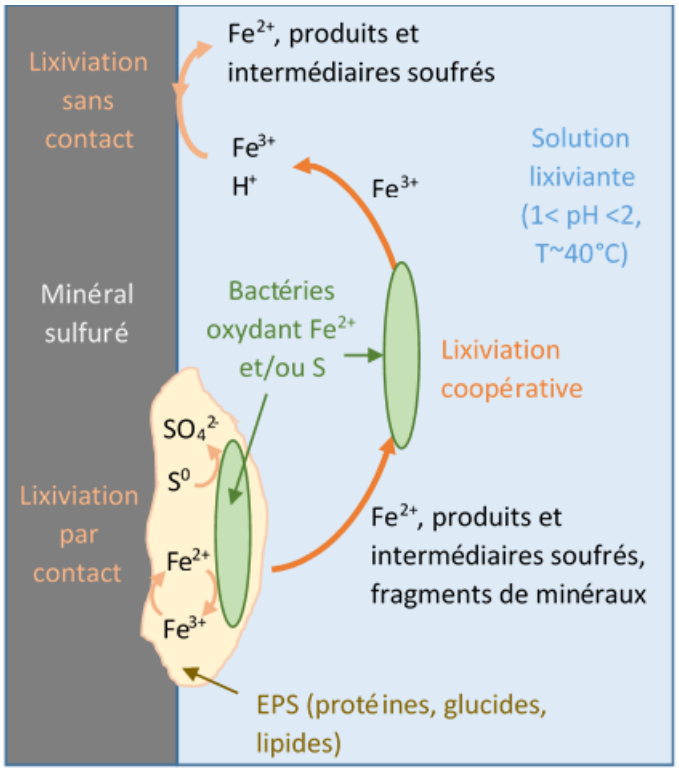


Figure 4 - Mécanismes de lixiviation par les microorganismes (adapté de Li et al. (2013))

2.2.4. Evolution et adaptation des consortia microbiens en biolixiviation

Selon les conditions opératoires choisies (nature du minerai sulfuré, type de procédé (réacteur agité, colonne à bulle par exemple), agitation, aération, concentration en solide, température, pH, etc.), il est courant que la composition du consortium microbien en fin d'opération de biolixiviation soit différente de celle de l'inoculum initial. Pour un ensemble de paramètres opératoires, les microorganismes les plus aptes à se développer sont ainsi sélectionnés au fur et à mesure des opérations de biolixiviation, sur le même principe que la sélection naturelle. De plus, lors de la biolixiviation, certains paramètres, tels que le pH et la concentration de fer en solution, sont susceptibles de varier et **la communauté microbienne d'un consortium est alors susceptible d'évoluer** au cours de l'opération.

D'Hugues et al. (2003) ont par exemple étudié l'influence que pouvait avoir la nature du substrat (concentrés de minéraux sulfurés) sur la diversité microbienne dans une culture de biolixiviation. Ils ont pour cela comparé des cultures ayant été inoculées initialement avec le même inoculum mais sur des substrats différents (pyrite, deux types d'arsénopyrites, chalcopyrite et sphalérite) et entretenus par repiquage (transfert d'une partie de la culture dans un milieu neuf) pendant plusieurs années. L'inoculum initial contenait les espèces *A. ferrooxidans* et *A. thiooxidans*. Par la suite, des microorganismes proches des espèces *L. ferrooxidans*, *S. montserratensis*, *S. themosulfidiooxidans* et '*F. caldus*', ont été détectés dans les cultures en plus des microorganismes proches des espèces de l'inoculum initial. Il est possible que ces nouvelles espèces se trouvaient à l'origine sur les différents substrats solides utilisés, et viennent ainsi enrichir la communauté bactérienne initiale.

Comme l'illustre la Figure 5, il est également possible que la prédominance d'une espèce dans un consortium de biolixiviation évolue au cours d'une opération. Dans une expérience de biolixiviation ayant pour but l'adaptation progressive des bactéries à un taux de solide plus élevé (de 3 à 10 % (m/v)), Hedrich et al. (2016) montre l'évolution de l'abondance de chaque espèce bactérienne. Au début de

l'expérience, les bactéries oxydant le soufre ('*F. caldus'* et *S. thermosulfidooxidans*) se développent davantage par rapport aux autres microorganismes. Puis, vers la fin de l'expérience, ce sont les bactéries oxydant le fer (*L. ferriphilum*) qui prédominent.

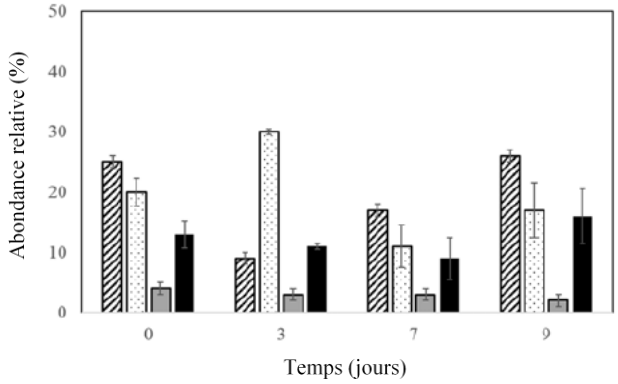


Figure 5 - Observation de la communauté microbienne par qPCR lors d'une expérience de biolixiviation, à la 5ème étape de l'expérience d'adaptation des bactéries à un taux de solide de 10 % (m/v) réalisée en triplicata. Barres hachées : *L. ferriphillum*, barres avec points : *'F. caldus'*, barres grises : *S. benefaciens*, barres noires : *S. thermosulfidooxidans*. Les données sont des moyennes des valeurs des triplicatas ± l'écart-type (issu de Hedrich et al. (2016)).

Les microorganismes en biolixiviation sont soumis à un environnement potentiellement rude pour leur développement (fortes concentrations en ions métalliques, force d'agitation et d'aération, concentration en solide). **L'adaptabilité des microorganismes** à ces contraintes représente donc une propriété importante pour l'obtention de rendements satisfaisants par biolixiviation.

D'après Xia et al. (2008), l'attachement des cellules microbiennes (en particulier *A. ferrooxidans*) à la surface du minerai, leur tolérance au cuivre, et donc probablement aux métaux en général, et leur résistance au cisaillement dépendent de leur adaptation à l'environnement de lixiviation. Cette adaptation peut se définir comme l'ajustement du métabolisme des microorganismes de sorte qu'ils puissent mieux se développer et être plus actifs dans le milieu, au fur et à mesure des opérations. Elle se traduit notamment par une augmentation de la vitesse de dissolution des minéraux sulfurés (Bryan et al., 2011, et Brierley et Brierley, 2013). Les résultats obtenus par Rubio et Frutos (2002) confirment cette idée : des rendements d'extractions de 98 % ont été atteints en 500 h avec une culture non-adaptée, contre 350 h avec une culture adaptée.

En conclusion, la présence, la nature et l'abondance des différentes espèces présentes au sein d'un consortium de biolixiviation peuvent évoluer au cours d'une opération ou d'une série d'opérations. Ceci peut compliquer la conduite des procédés de biolixiviation, mais ouvre également le champ des possibles pour améliorer leur performance dans des conditions particulières.

2.3. Application de la biolixiviation aux procédés d'extraction de métaux

A l'échelle industrielle, les procédés de biolixiviation sont aujourd'hui majoritairement utilisés pour l'extraction du cuivre et de l'or. Le cuivre est extrait à partir de minerais à faible teneur en cuivre, composés de minéraux secondaires et contenant éventuellement de l'arsenic (énargite (Cu_3AsS_4)), tandis que l'or est extrait de minerais réfractaires (Roberto et Schippers, 2022). Contrairement au cuivre, qui est mis en solution lors de l'étape de lixiviation (Figure 2), l'or reste insoluble et ce sont les minéraux de la gangue qui sont solubilisés pour libérer le métal précieux. On parle alors de

biooxydation, qui repose sur les mêmes mécanismes que la biolixiviation. La libération de l'or facilite alors l'étape de cyanuration, qui suit l'étape de lixiviation.

Le développement de ces applications à l'échelle industrielle et leur commercialisation prouvent leur robustesse et leur viabilité pour l'industrie minière. Par exemple, au Chili, premier producteur mondiale de cuivre avec 5,6 millions de tonnes de cuivre produit en 2021 (soit 28% de la production minière mondiale) (Gouvernement du Canada, 2019), la production de cuivre par biolixiviation a doublé entre 2002 et 2010, passant de 5% à plus de 10% (Demergasso et al., 2010). Il semble néanmoins que cette tendance a ralenti dans la dernière décennie, notamment du fait d'une diminution de la teneur en cuivre et en minéraux facilement oxydable dans le minerai, comme le rapportent Vera Véliz et al. (2022) et Roberto et Schippers (2022).

Par comparaison au procédé conventionnel par pyrométallurgie et à la lixiviation chimique, les avantages escomptés de la biolixiviation sont nombreux (Guézennec, 2019, et Zhao et al., 2019) :

- Des conditions opératoires plus « douces » (température aux alentours de 40 °C, pH entre 1 et 2, pression atmosphérique) ;
- La régénération des réactifs (Fe^{3+} et H^{+}) in-situ par l'activité métabolique des bactéries, évitant l'ajout de réactifs et réduisant le traitement d'effluents en aval ;
- Une demande en énergie plus faible (consommation d'électricité : environ 3900 kWh par tonne de cuivre produit pour la biolixiviation, contre environ 8700 kWh par tonne de cuivre produit pour la pyrométallurgie) (Zhao et al., 2019) ;
- Un impact environnemental plus faible (moindre impact sur la pollution de l'air, des eaux et du sol) ;
- Des coûts d'investissement et d'exploitation moins élevés (Pradhan et al., 2008) ;
- Une plus grande flexibilité permettant l'extraction sélective de métaux de bases et de métaux précieux d'intérêt ;
- L'adéquation avec le traitement de minerais à faible teneur (« low-grade »).

Deux configurations de procédé de biolixiviation ont été particulièrement développées et sont utilisées à l'échelle industrielle : la biolixiviation en tas, et la biolixiviation en réacteur agité. Cette dernière configuration est principalement utilisée pour l'extraction de l'or par biooxydation, tandis que la première est utilisée principalement pour l'extraction de cuivre, et plus marginalement pour le traitement de minerais de nickel et de zinc (Mahmmoud et al., 2017, et Brierley et Brierley, 2013).

2.3.1. Biolixiviation en tas

La biolixiviation en tas consiste à former avec le minerai à traiter, préalablement broyé, un tas sur une base imperméable. Le tas est ensuite irrigué avec de l'acide sulfurique pour conditionner le minerai, c'est-à-dire obtenir un environnement acide afin d'assurer l'activité et le développement des microorganismes acidophiles déjà présents à la surface du solide, et/ou ajoutés par inoculation (Brierley et Brierley, 2013). La solution d'acide sulfurique peut aussi être remplacée par le lixiviat issue de la biolixiviation d'un autre tas, appelé ILS (« Intermediate Leach Solution ») (voir Figure 6). Dans le tas, les minéraux sont dissous en parallèle de la multiplication des microorganismes qui produisent/régénèrent les réactifs nécessaires à l'oxydation des minéraux porteurs de métaux. La solution collectée en pied de tas (PLS), riche en métaux, est ensuite traitée selon les principes exposés à la Figure 2. Un système d'aération est parfois installé pour améliorer le transfert d'oxygène et permet un certain contrôle de la température à l'intérieur du tas selon sa hauteur, qui peut varier entre 2 et 10 m (Rawlings et Johnson, 1998 et Petersen et Dixon, 2002). L'effluent obtenu après traitement de la PLS, appelé « raffinat », est utilisé comme alimentation pour l'opération de biolixiviation suivante d'un tas ayant déjà subi une première lixiviation (voir Figure 6).

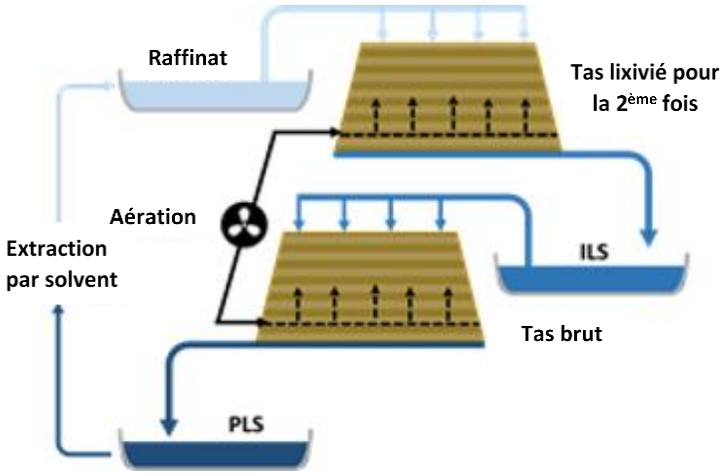


Figure 6 – Schéma simplifié d'un procédé de biolixiviation en tas. ILS : solution intermédiaire de lixiviation (« Intermediate Leach Solution »), PLS : solution obtenue en fin de biolixiviation (« Pregnant Leach Solution ») (issu de A. G. Guézennec (2019)). Le tas brut peut également être irrigué avec une solution diluée d'acide sulfurique (Brierley et Brierley, 2013).

Un des principaux inconvénients des procédés de biolixiviation en tas est la cinétique de dissolution, qui est assez lente (de l'ordre de plusieurs semaines voire plusieurs mois (Guézennec, 2019)). Par ailleurs, l'inhomogénéité des conditions de lixiviation à l'intérieur du tas (gradients de pH, effets d'écoulement de la solution de lixiviation selon des chemins préférentiels) mène à des conditions locales de lixiviation très différentes et difficiles à contrôler (Pradhan et al., 2008).

Un exemple de biolixiviation en tas à l'échelle industriel est l'installation construite à la mine de Terrafame en Finlande, un des plus grands gisements de nickel dans le monde. Cette installation a été créée pour traiter plusieurs tonnes de minerai de schiste noir contenant en moyenne 0,27 % de nickel, 0,14 % de cuivre, 0,02 % de cobalt, et environ 0,50 % de zinc (Arpalahti et Lundström, 2019 et Dehaine et al., 2020). Les tas de schiste sont inoculés avec un consortium de bactéries acidophiles, composés de microorganismes mésophiles et thermophiles. L'exothermicité de l'oxydation des minéraux, notamment de la pyrrhotite et de la pyrite, permet de maintenir une température suffisamment élevée (généralement aux alentours de 30 et 40 °C, et au maximum 90°C) dans le système même dans des conditions hivernales (Arpalahti et Lundström, 2018). Cela prouve que même dans des zones avec un climat froid, la biolixiviation en tas peut être opérée, à condition que suffisamment de minéraux rapidement oxydables soient présents dans le minerai à traiter. En 2020, la mine de Terrafame a produit 0,4%, 1,2% et 0,4% de la production mondiale de cobalt, de nickel et de zinc respectivement (Roberto et Schippers, 2022).

2.3.2. Biolixiviation en réacteur agité

La biolixiviation en réacteur agité est généralement opérée de façon continue et utilisée pour traiter des concentrés de minerais contenant des métaux à haute valeur ajoutée (Guézennec, 2019) comme l'or ou des métaux de base comme le cobalt et le nickel.

La biolixiviation en réacteur agité présente plusieurs avantages par rapport à la lixiviation en tas :

- Cinétique de biolixiviation beaucoup plus rapide (en général 4 à 6 jours en réacteur agité contre des semaines, voire des mois pour la biolixiviation en tas (Guézennec, 2019)) ;
- Rendements de mise en solution des métaux plus élevés.

Malgré sa robustesse et sa facilité de mise en place, le CAPEX et l'OPEX pour un procédé de biolixiviation en réacteur agité sont plus élevés que pour un procédé de biolixiviation en tas. Cela justifie son utilisation restreinte aux métaux et aux concentrés de métaux à haute valeur ajoutée (Mahmmoud et al., 2017).

Le procédé BIOX® est le procédé de biooxydation en réacteur agité le plus utilisé pour la production d'or à partir de concentrés d'or sulfurés. Depuis le démarrage de la première installation en 1986, des améliorations ont été apportées à ce procédé (meilleure aération et agitation) (Brierley et Brierley, 2013), et des couplages avec d'autres technologies permettent une meilleure gestion des ressources et des rejets (meilleure gestion de l'eau et des rejets avec le procédé ASTER™, et diminution de la consommation en cyanure avec le procédé MesoTHERM®). En 2020, l'or produit par le procédé BIOX® correspondait à 0,9% de la production mondiale (Roberto et Schippers, 2022).

Un autre exemple d'une installation de biolixiviation en réacteurs agités est celle construite en Ouganda sur l'ancienne mine de cuivre de Kasese, pour traiter un déchet concentré en pyrite (environ 80 %) et contenant du cobalt (environ 1,2 %). Le procédé a été développé par le BRGM et a permis de produire 110 t de cobalt par an (1,25 % de la production mondiale en 2010). Ce procédé de biolixiviation est constitué de trois séries de réacteurs en cascade : la première inclut trois réacteurs en parallèle pour assurer un temps de rétention suffisant à la croissance bactérienne, tandis que les deux étapes suivantes permettent d'améliorer le rendement. Ce rendement de mise en solution du cobalt était généralement supérieur à 80% (Mahmmoud et al., 2017).

Comparée à la biolixiviation en tas, la matière à traiter doit être plus finement broyée. Par exemple, pour le procédé de biolixiviation en tas de la mine de Zijinshan, la taille des particules est inférieure à 40 mm, alors qu'en réacteur agité, il est préférable d'avoir des particules solides de taille inférieure à 100 µm (Brierley et Brierley, 2013, et Mahmmoud et al., 2017). Une fois broyé, le minerai est introduit dans un premier réacteur contenant aussi des nutriments inorganiques (ammonium et phosphates) nécessaires aux métabolismes des microorganismes. Ces derniers sont ajoutés au milieu, généralement sous forme d'engrais, ou sont déjà présents en quantité suffisante dans le minerai. La pulpe traverse une série de réacteurs aérés dont le pH et la température sont régulés, pour assurer une croissance et une activité microbienne optimales (généralement entre 40 °C et 50 °C pour les microorganismes utilisés en biolixiviation (Guézennec, 2019)). Cette régulation de température est particulièrement importante du fait de l'exothermicité de la réaction de dissolution des minéraux sulfurés. L'aération dans le réacteur est assurée par un aérateur et un agitateur, qui permet également de maintenir les particules solides en suspension.

L'alimentation en oxygène des bioréacteurs est un des enjeux majeurs des procédés de biolixiviation. Comme il a été montré dans les sections 2.1 et 2.2.1, l'oxygène est un substrat clé dans les processus d'oxydation via les microorganismes et doit être apporté en continu et en quantité suffisante dans le milieu pour assurer les mécanismes de transport d'électrons à l'échelle de la cellule (voir Figure 3). La consommation d'oxygène dans un procédé de biolixiviation dépend de la demande en oxygène des réactions d'oxydation biologiques du fer et du soufre (vis-à-vis de la stœchiométrie et de la vitesse des réactions) et de la nature et la quantité des sulfures à oxyder (concentration en sulfures dans le solide et taux de solide dans le milieu). En effet, selon la nature des minéraux sulfurés, la demande en oxygène des réactions d'oxydation biologiques varie de 1,8 à 2,4 kg d'oxygène par kg de sulfure oxydé. Par exemple, il faut 0,7 kg d'oxygène pour oxyder complètement 1 kg de chalcopyrite alors que l'oxydation d'1 kg de pyrite nécessite 1 kg d'oxygène.

L'oxygène est généralement introduit en injectant de l'air dans le milieu. Le débit d'injection et le système permettant de disperser le gaz dans la pulpe (injecteur et mobile d'agitation) doivent être

choisis soigneusement afin que le transfert de l'oxygène de la phase gaz à la phase liquide soit au moins aussi rapide que la consommation d'oxygène par les réactions d'oxydation biologiques (Boon et Heijnen, 1998 et Mahmoud et al., 2017). En général, dans les installations de biolixiviation industrielles, le débit d'air par unité de volume de réacteur varie entre 0,05 et 0,1 min^{-1} (van Aswegen et al., 2007). Il est souvent plus élevé dans les bioréacteurs de petite taille utilisés à l'échelle laboratoire en raison de vitesses de transfert gaz-liquide plus faibles. Outre l'oxygène, l'air injecté dans les bioréacteurs apporte également une partie du CO_2 nécessaire aux métabolismes biologiques des microorganismes autotrophes (voir section 2.2.2 de ce chapitre). En règle générale, cet apport de CO_2 est insuffisant et doit être complété par une autre source de CO_2 (carbonates ou ajout de CO_2 gazeux). Cependant, la demande en CO_2 dans les processus de biolixiviation reste encore très mal connue (Guézennec et al., 2018).

Le second paramètre-clé est la concentration en solide. De nombreuses études ont montré que la vitesse de dissolution des sulfures dans les procédés de biolixiviation diminue lorsque la concentration en solide dépasse un certain seuil. Ce seuil varie en fonction des conditions opératoires imposées et de la nature du solide (concentration et nature des sulfures) (Bailey et Hansford, 1994). Le premier facteur qui explique ce phénomène est la disponibilité en O_2 (Bailey et Hansford, 1993). Comme il a été expliqué ci-dessus, la consommation d'oxygène augmente avec la concentration solide ; lorsque la consommation excède la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gaz à la phase liquide, on observe une diminution de la vitesse de dissolution des sulfures. La viscosité relative de la pulpe joue également un rôle : elle reste constante avec l'augmentation du taux de solide jusqu'à une valeur critique à partir de laquelle elle augmente de façon drastique. Cette concentration critique dépend de la taille des particules et de la nature du solide. Cette augmentation de viscosité affecte le coefficient volumique de transfert d'oxygène (k_La) négativement, ce qui a pour conséquence la diminution du transfert massique entre les phases gazeuse et liquide (Bailey et Hansford, 1993, et Bailey et Hansford, 1994).

Par ailleurs, l'augmentation du taux de solide s'accompagne d'une augmentation de la vitesse d'agitation ce qui peut affecter négativement l'activité microbienne (Chéron et al., 2020). En effet, la turbulence générée par une trop forte agitation peut inhiber la croissance et le métabolisme des microorganismes via un phénomène appelé « turbohypubiosis » (Bailey et Hansford, 1993). Cela se traduit en partie par une diminution de la production d'ATP, d'ARN et de la consommation d'oxygène par les microorganismes. Ce stress est également marqué par une production plus élevée d'histamine, indicateur de stress cellulaire, dans les cellules. Lorsque le taux de cisaillement est trop élevé, cela peut conduire à la destruction des cellules microbiennes. Il est important de préciser que la résistance au taux de cisaillement dépend du type de microorganismes. Ainsi les microorganismes thermophiles du type *Sulfolobus*, qui sont des archées, sont plus sensibles au cisaillement que les bactéries modérément thermophiles. Les archées n'ont pas de paroi cellulaire rigide ce qui pourrait expliquer leur moindre résistance au stress mécanique (Nemati et al., 2000). En règle générale, la concentration solide n'excède pas 12,5% dans les bioréacteurs mettant en jeu des archées et 20% avec des bactéries.

3. (Bio)lixiviation et passivation de la chalcopyrite

Comme mentionné au début de ce chapitre, la chalcopyrite représente la principale ressource primaire de cuivre et est à ce titre un minéral d'intérêt majeur pour la production de cuivre. Cependant, son traitement par voie hydrométallurgique reste limité à cause de la difficulté de l'étape de lixiviation. La chalcopyrite fait en effet partie des sulfures de cuivre « primaires » connus pour être réfractaires et difficiles à lixivier à température ambiante et pression atmosphérique. C'est aussi le cas de la covellite (CuS) par exemple.

La troisième partie de ce chapitre est ainsi consacrée spécifiquement à la (bio)lixiviation de la chalcopyrite et aux solutions évoquées dans la littérature pour remédier à ce problème qui, du fait des forts enjeux scientifiques et économiques, a donné lieu à de très nombreux travaux.

3.1. Aspects chimiques de la (bio)lixiviation de la chalcopyrite

Comme cela a été évoqué au paragraphe 2.1 pour le cas général des minerais sulfurés, la chalcopyrite est oxydée par le Fe^{3+}, mais peut également l'être par l'oxygène dissous. Les réactions globales d'oxydation de la chalcopyrite en milieu acide sulfurique par ces deux réactifs, décrites par les équations [4] et [7], sont rappelées ci-dessous (Hiroyoshi et al., 2001 et Córdoba, 2008a) :

$$CuFeS_2 + 4Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 5Fe^{2+} + 2S \quad [4]$$

$$CuFeS_2 + 4H^+ + O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + Fe^{2+} + 2S + 2H_2O \quad [7]$$

Comme l'illustre le diagramme de Pourbaix du système Cu-Fe-S-H_2O présenté à la Figure 7, la lixiviation oxydante de la chalcopyrite implique la possibilité de former de nombreuses phases solides de sulfures, telles que la bornite (Cu_5FeS_4), la covellite (CuS) ou la chalcocite (Cu_2S) pour les porteurs de cuivre, mais également le soufre élémentaire ou les sulfures de fer(II). Les domaines de stabilité de ces phases sont en effet situés entre celui de la chalcopyrite et celui de la solution aqueuse contenant les ions Cu^{2+} (Córdoba et al., 2008b, Touchard, 2021).

Par ailleurs, ce diagramme ne fait pas apparaître les domaines de stabilité des phases solides de Fe(III) et notamment la famille des composés de jarosite, dont la réaction de formation est :

$$3Fe^{3+} + 2SO_4^{2-} + 6H_2O + M^+ \longrightarrow MFe_3(SO_4)_2(OH)_6 + 6H^+ \quad [8]$$

(avec M = K^+, Na^+, NH_4^+, ou H_3O^+)

Ces phases sont très peu solubles pour des pH supérieurs à 2, et la K-jarosite, formée avec l'ion K^+, est la plus stable. Elles jouent un rôle important dans la gestion du procédé de lixiviation, qui sera discuté dans la partie suivante.

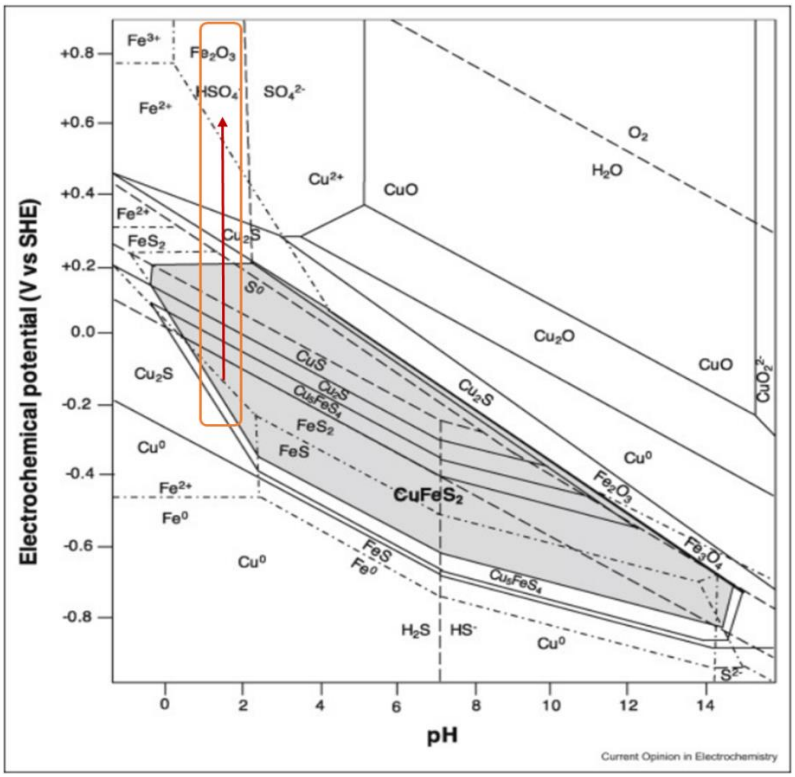


Figure 7 - Diagramme de Pourbaix pour le système Cu-Fe-S–H_2O à 25 °C, 1 atm, [Cu] = 0,01 M et [Fe] = 0,1 M (modifié de Peters, 1976 et Daehn et Allanore, 2020). L'encadré orange correspond à la zone de pH et de potentiel généralement rencontré en biolixiviation, et la flèche rouge montre les domaines de stabilité des phases intermédiaires entre ceux de la chalcopyrite et du domaine aqueux contenant l'ion Cu^{2+} lors de la lixiviation oxydante.

3.2. Mécanismes de dissolution et problématique de la passivation

Les liens entre les mécanismes de dissolution de la chalcopyrite et son caractère réfractaire à la lixiviation ne font encore aujourd'hui pas consensus, même si la formation d'une couche de passivation à la surface est communément évoquée. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence la présence de produits solides à la surface des particules de chalcopyrite à l'issue d'opérations de lixiviation (voir Figure 8) (McMillan et al., 1982, Córdoba et al., 2008a, Nazari et Asselin, 2009 et Li et al., 2013). Il peut s'agir de soufre élémentaire, de sulfures de cuivre ou de jarosite. Ces composés sont souvent évoqués en tant que composants de la couche de passivation. En plus de réduire la surface réactive de la chalcopyrite, la présence d'une telle couche impacterait la diffusion des ions impliqués dans l'oxydation du minéral et permettrait d'expliquer le ralentissement voire l'arrêt de cette réaction.

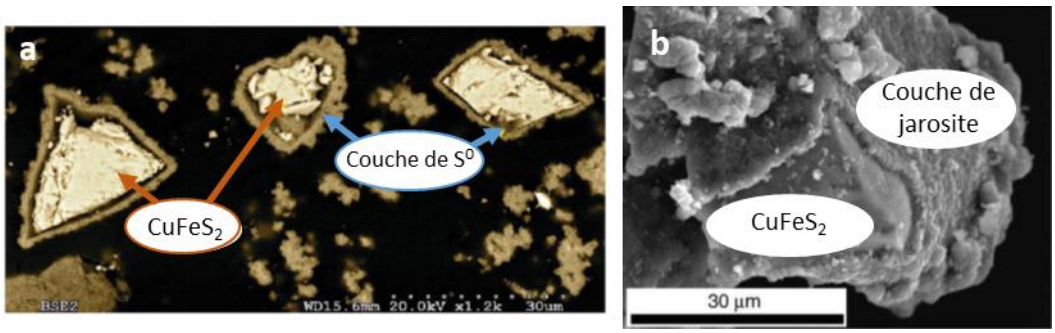


Figure 8 – Micrographies MEB (a) de la morphologie de la chalcopyrite lixiviée dans une solution de $Fe_2(SO_4)_3$ et (b) d'un résidu de lixiviation réalisé avec un potentiel initial de 600 mV (repris de Nazari et Asselin (2009) et de Córdoba et al. (2008a) respectivement).

S'il n'est pas contestable que de nombreuses phases solides intermédiaires se forment au cours de la lixiviation comme cela est détaillé dans les sections suivantes, le fait que ces phases forment une couche suffisamment dense et isolante pour bloquer la réaction reste sujet à débat (O'Connor et Eksteen, 2020). Une approche alternative implique les propriétés électroniques de la chalcopyrite qui, en tant que semi-conducteur, présente une bande interdite qui peut entraver le transfert d'électrons et l'oxydation, d'autant plus que la plage d'énergie de cette bande interdite coïncide avec le potentiel redox du couple Fe^{3+}/Fe^{2+} (O'Connor et Eksteen, 2020). Une étude expérimentale récente de Ren et al. (2022) propose une explication qui combine les deux phénomènes. Le mécanisme proposé implique la formation d'une couche externe de type covellite due à la dissolution préférentielle du fer, avec des propriétés électroniques de type p. Cela peut produire une jonction p-n sur la chalcopyrite (type n) qui entrave les processus électrochimiques ultérieurs. Ce mécanisme complexe et encore mal élucidé, qui entraîne une dissolution lente des concentrés de chalcopyrite dans les milieux oxydants acides, sera appelé « passivation » dans le reste du manuscrit.

Les mécanismes de lixiviation de la chalcopyrite ont fait, et font encore, l'objet de nombreux travaux. Plusieurs articles de revues ont notamment été consacrés à ce sujet (Li et al., 2013, Bogdanović et al., 2020), et leur présentation exhaustive dépasse largement le cadre de ce manuscrit. En cohérence avec le diagramme de Pourbaix, la plupart des mécanismes proposés dans la littérature impliquent la formation de phases solides intermédiaires. Les paragraphes suivants décrivent certains des mécanismes pouvant amener à la formation de ces phases, qui peuvent d'une part être produites au cours de l'oxydation de la chalcopyrite, et d'autre part issues de réactions annexes avec les espèces chimiques en solution.

3.2.1. Formation de sulfures de cuivre et de soufre élémentaire

Pour toutes les réactions décrites ci-dessous, l'oxydant est Fe^{3+}.

Hackl et al. (1995) proposent le mécanisme suivant, dans lequel la chalcopyrite est convertie en sulfure de cuivre dépourvu de fer ($Cu_{1-x-z}S_2$ ou CuS_n avec n = 2/(1-x-z)) en passant par la formation de l'intermédiaire $Cu_{1-x}Fe_{1-y}S_2$ (avec y>>x) :

$$CuFeS_2 + 2(x+y)Fe^{3+} \longrightarrow Cu_{1-x}Fe_{1-y}S_2 + xCu^{2+} + (2x+3y)Fe^{2+} \quad [9]$$

avec y>>x et x+y~1

$$Cu_{1-x}Fe_{1-y}S_2 + 2(z+1-y)Fe^{3+} \longrightarrow Cu_{1-x-z}S_2 + zCu^{2+} + (2z+3(1-y))Fe^{2+} \quad [10]$$

$$Cu_{1-x-z}S_2 + 2(1-x-z)Fe^{3+} \longrightarrow (1-x-z)Cu^{2+} + 2S^{\circ} + 2(1-x-z)Fe^{2+} \quad [11]$$

Ce mécanisme est cohérent avec une dissolution préférentielle du fer par rapport au cuivre rapportée dans plusieurs travaux (McMillans et al., 1982, Nazari et Asselin, 2009). La dissolution de CuS_n en ions Cu^{2+} et en soufre élémentaire (S^0) (réaction [11]) serait la plus lente, et contrôlerait donc la vitesse de lixiviation de la chalcopyrite.

Plusieurs mécanismes ont également été proposés pour la conversion de la chalcopyrite en covellite (conversion directe (équations [12] et [13]) ou via la formation d'une phase intermédiaire (équation [14] et [15]) (Córdoba et al., 2008a, et Córdoba et al., 2008b):

$$CuFeS_2 + 2H_2O + 6Fe^{3+} \longrightarrow 0{,}5CuS + 0{,}5CuSO_4 + 7Fe^{2+} + S^0 + 4H^+ \quad [12]$$

$$2CuFeS_2 + 5Fe^{3+} \longrightarrow 1{,}5CuS + 0{,}5Cu^{2+} + 7Fe^{2+} + 2{,}5S^0 \quad [13]$$

$$CuFeS_2 + 2(x+y)Fe^{3+} \longrightarrow Cu_{1-x}Fe_{1-y}S_{2-z} + xCu^{2+} + (2x+3y)Fe^{2+} + zS^0 \quad [14]$$

$$Cu_{1-x}Fe_{1-y}S_{2-z} + 4(1-y)Fe^{3+} \longrightarrow (2-z)CuS_{non_stoichiométrique} + (1-y)Cu^{2+} + 5(1-y)Fe^{2+} \quad [15]$$

où y>x

La covellite est ensuite oxydée et du soufre élémentaire est produit (équation [16]) (Sasaki et al., 2009, et Córdoba et al., 2008b) :

$$CuS + 2Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 2Fe^{2+} + S^0 \quad [16]$$

Cette réaction est connue pour être lente (énergie d'activation élevée : 55-105 kJ.mol^{-1}), mais peut être favorisée par la génération rapide de Fe^{3+} à partir de Fe^{2+} en présence de microorganismes ferro-oxydants, sous réserve que la covellite ne soit pas passivée. La vitesse d'oxydation de la covellite augmente également avec la température (Petersen et Dixon, 2003 et Yu et al., 2022).

Certains auteurs ont également proposé une première réduction du minéral en chalcocite (équation [17]), qui est plus facile à lixivier (Hiroyoshi et al., 2001). Cette réaction aurait lieu pour des potentiels redox inférieurs à 610 mV vs. SHE, et dépend donc de la concentration en Fe^{2+} en plus de la concentration en Cu^{2+} (Córdoba et al., 2008a).

$$CuFeS_2 + 3Cu^{2+} + 3Fe^{2+} \longrightarrow 2Cu_2S + 4Fe^{3+} \quad [17]$$

L'oxydation de la chalcocite est rapide (faible énergie d'activation : 4-25 kJ.mol^{-1}) et conduit à la production de covellite (CuS) (ou pseudo covellite ($Cu_{1,2}S$)) (Petersen et Dixon, 2003 et Yu et al., 2022) :

$$Cu_2S + 2Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 2Fe^{2+} + CuS \quad [18]$$

$$Cu_2S + 1{,}6Fe^{3+} \longrightarrow 1{,}6Fe^{2+} + 0{,}8Cu^{2+} + Cu_{1,2}S \quad [19]$$

Il a également été suggéré que l'oxydation de la chalcocite en covellite passe par la formation d'intermédiaires (Córdoba et al., 2008b) :

$$\underset{\text{chalcocite}}{Cu_2S} \longrightarrow \underset{\text{djurleite}}{Cu_{1.93\text{-}1.96}S} \longrightarrow \underset{\text{digenite}}{Cu_{1.80}S} \longrightarrow \underset{\text{covellite}}{CuS} \quad [20]$$

La formation concomitante de sulfures de cuivre et de soufre élémentaire au cours de l'oxydation de la chalcopyrite a mené à l'hypothèse que la cinétique de cette réaction peut être contrôlée par la formation et l'évolution d'une couche compacte de sulfures de cuivre peu soluble et déficiente en fer par rapport à la chalcopyrite d'origine. Selon les auteurs Ammou-Chokroum et al. (1977), cette couche serait elle-même recouverte d'une couche poreuse de soufre produit par la dissolution des sulfures de cuivre.

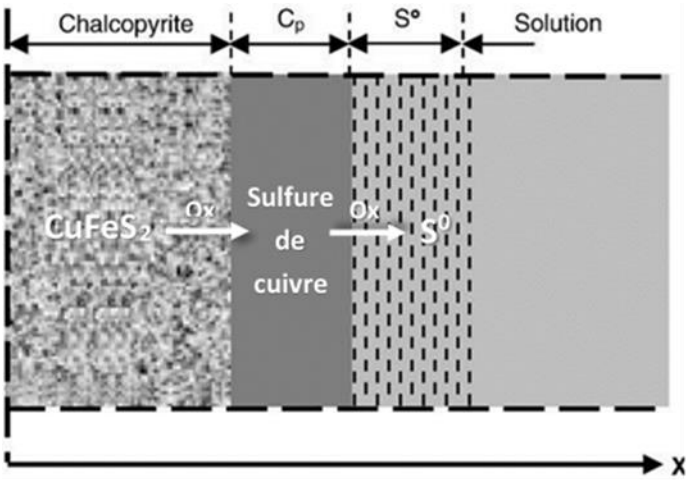


Figure 9 - Modèle de l'oxydation de la chalcopyrite ($CuFeS_2$) par Fe^{3+} avec la formation d'une couche interne de sulfures de cuivre (C_p) et une couche externe poreuse de soufre élémentaire (S^0). Ox : oxydation (adapté de Córdoba et al. (2008a))

Munoz et al. (1979) ont également proposé le transport d'électrons à travers la couche de soufre élémentaire comme étape limitante, mais contrairement à l'hypothèse précédente, cette couche serait peu poreuse. Cette différence de porosité pourrait s'expliquer par une différence des conditions opératoires.

Dans le cas de la biolixiviation, la présence de microorganismes capables d'oxyder le soufre élémentaire en SO_4^{2-} est peu compatible avec l'hypothèse d'une couche de soufre responsable de la passivation de la chalcopyrite. Il est néanmoins possible que la production de soufre soit plus rapide que son oxydation par les microorganismes (Bevilaqua et al., 2002), ce qui expliquerait pourquoi le soufre élémentaire est souvent retrouvé dans les résidus de biolixiviation, même après plusieurs mois d'opération (Sasaki et al., 2009). Par ailleurs, il existe différentes formes allotropiques du soufre élémentaire. Il est donc possible que l'oxydation de la chalcopyrite produise du soufre élémentaire sous forme de polymères (μ-S) non utilisable par les microorganismes. Les polymères de soufre sont au cours du temps convertis sous la forme orthorhombique (S_8), plus stable et oxydable par les bactéries. Ces deux formes présentent des propriétés de solubilité, de densité et une structure cristalline différentes (Klauber et al., 2008, Blight et al., 2009 et Zhao et al., 2019).

Enfin, Li et al. (2013) ont montré que la température jouait un rôle dans la passivation de la chalcopyrite par le soufre élémentaire et les sulfures intermédiaires. Ces auteurs ont mis en évidence un ralentissement de la dissolution de la chalcopyrite à 30°C et pas à 68°C et ont attribué ce phénomène à l'augmentation de la vitesse de dissolution du soufre élémentaire et des sulfures intermédiaires avec la température.

3.2.2. Formation de jarosite

Une autre phase souvent mentionnée comme potentiellement responsable de la passivation de la chalcopyrite est la jarosite (Stott et al., 2000, Parker et al., 2003, Sandström et al., 2005, et Zhu et al., 2011), dont la formule générale est $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ (avec M = K, Na, NH_4 ou H_3O) et dont l'équation de formation a été décrite à l'équation [8]. A 25 °C, cette espèce a une très faible solubilité (constante de solubilité $K = 10^{-11}$) et est très stable (énergie libre de formation $\Delta G°_f$ = -3310 kJ/mol) (Córdoba et al., 2008b).

La jarosite est produite à partir des ions Fe^{3+} en solution, sa formation est donc favorisée lorsque le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} de la solution, et donc le potentiel redox, est élevé. Ainsi, Córdoba et al. (2008b) ont

observé qu'à un potentiel redox faible (400 mV vs. Ag/AgCl), la surface de la chalcopyrite était presque identique à celle de la chalcopyrite brute, alors qu'à un potentiel plus élevé (600 mV vs. Ag/AgCl), et donc à une concentration plus élevée en ions Fe^{3+}, de la jarosite était présente à la surface du minéral lors de sa lixiviation. Certains auteurs suggèrent par ailleurs que la jarosite se forme à partir d'hydroxydes de fer issus de la réaction des ions Fe^{3+} avec l'eau ou encore que les hydroxydes sont des « précurseurs » de la passivation de la chalcopyrite (Córdoba et al., 2008b, et Khoskhoo et al., 2017). Par exemple, Córdoba et al. (2008b) ont détecté la présence de goethite (FeOOH) dans les résidus de lixiviation de la chalcopyrite, et propose la réaction suivante pour la formation de K-jarosite à partir de goethite :

$$2Fe^{3+} + 2SO_4^{2-} + FeOOH_{(s)} + K^+ \longrightarrow KFe_3(SO_4)_2(OH)_6 + 3H^+ \quad [21]$$

D'autres auteurs suggèrent la schwertmannite ($Fe_8O_8(OH)_6SO_4$) comme intermédiaire à la formation de jarosite (Klauber et al., 2008). Khoshkhoo et al. (2017) propose également que le soufre élémentaire et les autres espèces présentes à la surface de la chalcopyrite sont piégés par la formation des hydroxydes de fer, formant ainsi la couche de passivation. Cela rejoint l'hypothèse de Sasaki et al. (2009) qui suppose que l'accès au soufre et la covellite issus de l'oxydation de la chalcopyrite par les bactéries est limité par des intermédiaires « tenaces » à la surface du minéral.

En plus du risque d'inhiber le transport des électrons et des ions entre la surface de la chalcopyrite et la solution lixiviante (Córdoba et al., 2008b), la production de jarosite/précipités de fer réduit la concentration de Fe^{3+} en solution (réactions [8] et [21]), ce qui peut également affecter la cinétique de dissolution des sulfures de cuivre. Par ailleurs, les conditions spécifiques de la biolixiviation sont propices à la formation de jarosite :

- pH acide (à 68 °C , les pH favorisant la formation de la jarosite sont entre 1,5 et 2,5 (Li et al., 2013)) ;
- Concentration accrue en ions sulfates et ferriques du fait de l'activité des bactéries ;
- Présence de cations alcalins tels que les ions K^+, NH_4^+, et Na^+ en tant que nutriment pour les bactéries, ce qui favorise la formation notamment de la K-jarosite très peu soluble (Sasaki et al., 2009, Li et al., 2013).

3.2.3. Bilan

Le fait que différentes options soient proposées pour décrire le mécanisme de dissolution de la chalcopyrite et le rôle des différentes phases solides produites sur la cinétique d'oxydation du minéral tient à de nombreux facteurs. Parmi ces derniers, on peut citer la difficulté à caractériser les phases solides intermédiaires, le contrôle imparfait de certains paramètres d'étude, ou encore la variabilité du minerai utilisé, qui est rarement pur. De plus, la nature des solides intermédiaires issus de l'oxydation de la chalcopyrite varie en fonction des paramètres opératoires tels que le pH ou la température (Zhu et al., 2011).

Dans le cas où on considère que la passivation de la chalcopyrite est due à la formation d'une couche à la surface des particules de chalcopyrite, Klauber (2008) propose que cette couche de passivation soit dans un premier temps formée d'une épaisse couche de soufre élémentaire. Au cours du temps, les conditions opératoires favoriseraient une exfoliation de la couche de soufre, augmentant la vitesse d'oxydation de la chalcopyrite à condition qu'il n'y ait pas de précipitation de jarosite, auquel cas la vitesse de dissolution du minéral serait réduite.

Dans le cas de la biolixiviation de la chalcopyrite, l'accumulation de sulfure de cuivre intermédiaires (covellite par exemple), et de soufre élémentaire à la surface des particules est possible à condition que ces espèces soient produites plus rapidement qu'elles ne sont oxydées. En revanche, les conditions opératoires usuellement appliquées en biolixiviation sont favorables à la formation de jarosite. Ainsi, la couche de passivation peut être composée de sulfures de cuivre issus de l'oxydation de la chalcopyrite, de soufre élémentaire, de jarosite, ou d'une combinaison de ces espèces. En effet, les sulfures de cuivre et le soufre élémentaire étant produits à la surface des particules, il est possible que de la jarosite se forme par-dessus ces espèces, les rendant inaccessibles aux bactéries et aux réactifs permettant leur oxydation. La Figure 10 résume les hypothèses sur la nature et la formation de cette couche de passivation.

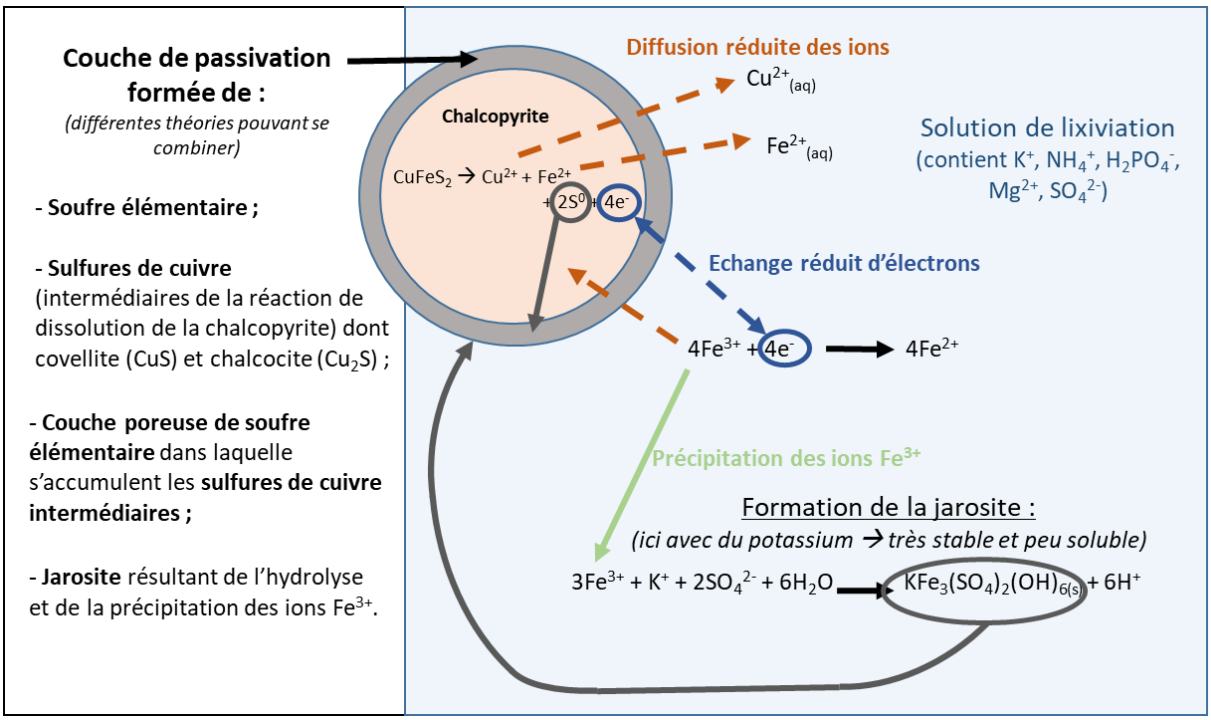


Figure 10 - Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans la formation d'une couche à la surface des particules lors de la (bio)lixiviation de la chalcopyrite (adapté de Córdoba, et al. (2008a)).

3.2.4. Solutions contre la passivation de la chalcopyrite en biolixiviation

Plusieurs solutions ont été étudiées afin de limiter la formation de couches de passivation lors de la biolixiviation de la chalcopyrite. La majorité d'entre elles consistent à choisir des conditions opératoires qui à la fois favorisent la dissolution de la chalcopyrite et sont défavorables à la formation ou l'accumulation d'espèces solides, en particulier les phases de jarosite.

Des études ont montré que l'oxydation de la chalcopyrite augmente avec le potentiel redox jusqu'à une valeur critique aux environs de 450 mV vs. Ag/AgCl (Córdoba et al., 2008b, Gericke et al., 2010), au-dessus de laquelle une passivation de la chalcopyrite est observée. Dans un système où Fe^{3+} est l'oxydant principal, le potentiel redox augmente avec le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} en solution. En biolixiviation, la catalyse de l'oxydation du Fe^{2+} par l'activité bactérienne peut conduire à une production excédentaire de Fe^{3+} induisant d'une part une augmentation rapide du potentiel redox jusqu'à des valeurs supérieures à la limite de passivation, et favorisant d'autre part la précipitation de jarosite. Afin de limiter l'excédent de Fe^{3+}, Christel et al. (2018) proposent d'utiliser certaines espèces microbiennes, dites « weak iron-oxidizers », avec lesquelles ils ont pu maintenir un potentiel redox favorable à

l'oxydation de la chalcopyrite. Ces microorganismes ne sont pas capables d'utiliser le Fe^{2+} en solution lorsque sa concentration est très faible, contrairement aux microorganismes dits « strong iron-oxidizers ». D'autres auteurs ont cherché à contrôler le potentiel redox afin qu'il reste inférieur au potentiel critique. Ce contrôle peut se faire en limitant l'injection d'air (Gericke et al., 2010) dans le système ou par voie électrochimique (Ahmadi et al., 2010). Cependant, aucune de ces méthodes n'est applicable à l'échelle industrielle et elles ne peuvent être considérées autrement que comme un dispositif de laboratoire permettant de mieux comprendre les processus de passivation.

Une autre voie consiste à utiliser des microorganismes thermophiles extrêmes opérant entre 75 °C et 80 °C, ce qui permet d'accélérer la solubilisation de la chalcopyrite et éviter sa passivation. Celle-ci a été mise en œuvre dans le procédé BioCOP® dont une démonstration à l'échelle semi-industrielle a été menée en 2005 pour traiter le minerai de Chuquicamata au Chili. S'il permet d'obtenir un rendement de dissolution élevé (Batty et Rorke, 2006), ce procédé présente de nombreux inconvénients qui n'ont pas encore permis d'étendre son application à l'échelle industrielle. Il met en jeu des archées qui sont des microorganismes fragiles, notamment vis-à-vis du cisaillement (voir section 2.3.2), et qui nécessitent de limiter le taux de solide dans le réacteur. Par ailleurs, ces températures favorisent les phénomènes de corrosion ce qui nécessite l'emploi de matériaux coûteux (Brierley et Brierley, 2013). Enfin, la solubilité de l'oxygène étant plus faible à ces températures, il est nécessaire d'enrichir l'air en oxygène pour permettre un transfert gaz-liquide suffisant et satisfaire la demande en oxygène (Deveci et al., 2003 et Brierley et Brierley, 2013). Ces trois éléments ont un impact significatif sur l'économie du procédé.

Les solutions à la passivation de la chalcopyrite présentées dans cette partie demandent un contrôle précis des conditions opératoires et présentent des contraintes d'installation et d'opération ne permettant pour le moment pas leur application à l'échelle industrielle. Il existe d'autres technologies visant à améliorer la dissolution de la chalcopyrite par de traitement physique du minéral. La suite de ce chapitre est consacrée à l'état des connaissances relatives à l'utilisation d'une de ces méthodes, l'attrition lixiviante.

4. L'attrition lixiviante : une solution à la passivation de la chalcopyrite en biolixiviation ?

En dehors des solutions physico-chimiques reposant sur la température ou le potentiel redox, de nombreux travaux se sont focalisés sur un traitement mécanique de la chalcopyrite en vue de faciliter la lixiviation par augmentation de la surface réactive et amorphisation des phases cristallines. Les effets de ces traitements sont brièvement décrits dans la première partie de cette section.

Une solution alternative, étudiée dans les travaux de cette thèse et plus largement dans le cadre du projet ANR Biomecalix, consiste à utiliser un media broyant pour exfolier *in situ* les couches de solides des phases intermédiaires produites lors de la (bio)lixiviation de la chalcopyrite. La présentation de ce concept d'attrition lixiviante viendra clore le chapitre et permettra d'établir les objectifs et questions de recherche de la thèse.

4.1. Traitements mécaniques

Le traitement mécanique de la chalcopyrite dans des dispositifs de broyage en voie sèche en amont de la lixiviation a été largement étudié ces dernières années (Granata et al., 2019, Zhao et al., 2021, Yang et al., 2022 et Bai et al., 2022). Un exemple de dispositif est présenté à la Figure 11 (Granata et al.,

2019). Dans ce dernier, le broyage est réalisé avec un média broyant constitué de billes de 1 cm de diamètre et de sable (quartz), et permet un broyage intense (à haute énergie) des particules.

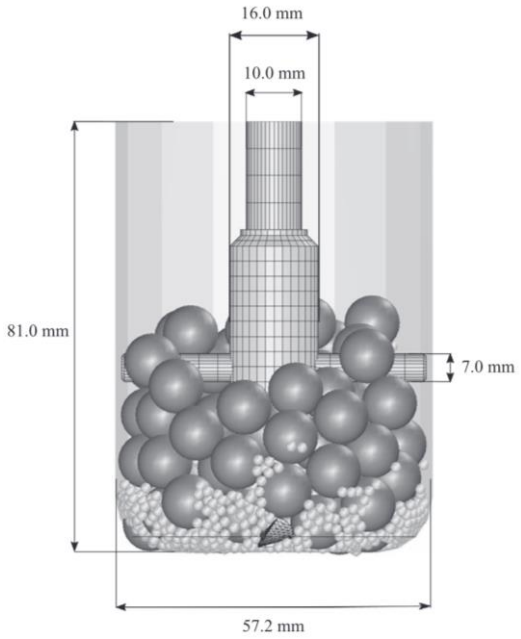


Figure 11 – Schéma d'un dispositif de broyage à billes à agitation verticale. Le média broyant est constitué de 80 billes de zirconium de 1 cm de diamètre et du sable (quartz) (Granata et al., 2019).

Ces dispositifs donnent lieu à plusieurs phénomènes concomitants, et dont l'importance varie selon la technologie utilisée et les paramètres appliqués.

D'une part, le broyage mène à une fragmentation des particules du minerai à lixivier, et permet de libérer (au sens de la libération minérale) la phase minérale d'intérêt (Mariano et al., 2016), ainsi que d'augmenter la surface spécifique et donc la réactivité de surface (Granata et al., 2019). Le broyage ultrafin (< 10 µm), qui vise à dissoudre les particules de chalcopyrite avant leur passivation, est ainsi au cœur du développement du procédé Albion^{TM} (Hourn et Turner, 2012).

Par ailleurs, l'énergie transmise au solide induit plusieurs phénomènes dits d'activation mécanique, dont des changements structuraux, une oxydation partielle des minéraux et la formation de phases métastables ou amorphes, dont la structure et la réactivité diffèrent généralement de la phase originelle (Onisei et al., 2012) et qui facilite éventuellement la lixiviation.

Enfin, l'attrition est un phénomène de frottement entre deux solides, qui mène à l'exfoliation des couches de surfaces, produisant de très fines particules. Elle peut ainsi conduite à l'amélioration du rendement de lixiviation de minéraux réfractaires, difficile à dissoudre, si tant est que leur nature réfractaire est associée à la formation de couches passivantes à la surface des particules et non à une autre limitation cinétique.

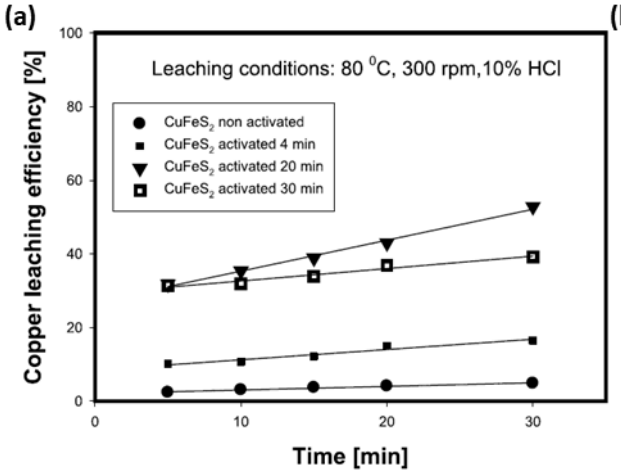
Dans le cas des minéraux sulfurés, il a été largement démontré que la réalisation d'un broyage à haute énergie en amont de la lixiviation se traduit par une augmentation de la vitesse de réaction et donc une meilleure dissolution du minéral, et une meilleure oxydation sélective vis-à-vis de certains métaux (Onisei et al., 2012, et Tešinský et al., 2017).

Tešinský et al. (2017) a ainsi étudié la possibilité d'augmenter le rendement en cuivre de la lixiviation de la chalcopyrite par activation mécanique, à l'aide d'un broyeur planétaire (400 rpm, sous

atmosphère d'argon et d'air, avec 50 boules en carbure de tungstène de 10 mm de diamètre). Différents temps de broyage ont été étudiés et les résultats ont montré qu'un meilleur rendement était obtenu avec une activation mécanique de 20 min dans les conditions opératoires appliquées dans l'étude (Figure 12a). Granata et al. (2019) ont également observé une augmentation de 20 % à 50 % en cuivre extrait et une augmentation de la vitesse de lixiviation de chalcopyrite, lorsque le minéral avait été préalablement broyé, par rapport à une lixiviation du minéral brut (sans activation).

Selon Tešinský et al. (2017) l'aire de la surface spécifique n'aurait pas d'impact sur l'efficacité de la lixiviation, car celle-ci ne change pas significativement après 4 minutes d'activation (Figure 12b). Granata et al. (2019) ne nie pas le lien entre la surface spécifique et le rendement en cuivre, mais suggère qu'elle n'est pas le principal paramètre responsable d'une meilleure dissolution de la chalcopyrite. En effet, ils ont observé que le rendement maximal en cuivre n'était pas obtenu dans les conditions de broyage donnant les plus fines particules et donc avec la plus grande surface spécifique. Plutôt que la surface spécifique en générale, il est possible que la libération de la phase minérale par comminution (augmentation de la surface « réactive ») soit plus à même d'influencer la dissolution de la chalcopyrite.

(a)



(b)

Milling time [min]	Specific surface area [$m^2.g^{-1}$]
0	0.28
4	2.67
20	2.7
30	2.63

Figure 12 – (a) Efficacité de la lixiviation du cuivre en fonction du temps selon le temps d'activation mécanique et (b) aire de la surface spécifique de la chalcopyrite pour chaque temps d'activation mécanique (issu de Tešinský et al. (2017)).

Par ailleurs, l'étude de Tešinský et al. (2017) a également montré que le broyage de la matière avant lixiviation avait un impact sur la sélectivité de l'oxydation du cuivre et du fer, qui diminue après 20 min de broyage dans les conditions opératoires choisies.

Les auteurs suggèrent également que l'activation mécanique entraîne des changements structuraux qui permettent une meilleure lixiviation de la chalcopyrite. C'est ce qu'ont observé Granata et al. (2019) et Onisei et al. (2012) lors de leurs études respectives avec :

- Une rupture partielle des mailles cristallines du minéral, qui dans les conditions opératoires de l'étude de Granata et al. (2019) semble sélective.
- La réduction de la taille des cristallites des minéraux induite par des microtensions au niveau de la structure cristalline. Cette réduction évolue exponentiellement avec l'augmentation du temps de broyage jusqu'à tendre vers une valeur limite (20 nm dans le cas des travaux d'Onisei et al. (2012)). Toutefois, malgré la présence de ces microcontraintes, les paramètres de mailles restent plus ou moins constants même après 60 min de broyage (Granata et al., 2019).

- L'amorphisation partielle de la chalcopyrite (Granata et al., 2019). Ce phénomène peut également s'appliquer à d'autres minéraux présents dans le minerai. Cette amorphisation pourrait être liée à la réduction de la taille des cristallites ou par réaction en phase solide (Onisei et al., 2012)

- La réduction de l'énergie d'activation de la lixiviation (environ de 11 kJ/mol dans le cas des travaux de Granata et al., 2019) liée aux microtensions et à la rupture partielle de la chalcopyrite.

En plus de modifications structurales, une oxydation partielle de la chalcopyrite par l'oxygène de l'air a été observée au cours de l'activation mécanique. Cette oxydation génère de l'oxyde de cuivre CuO et de la covellite par les réactions [22] et [23] (Granata et al., 2019) :

$$2CuFeS_{2(s)} + O_2 \longrightarrow CuO_{(s)} + 2FeS_{2(s)} \quad [22]$$

$$CuFeS_{2(s)} + 2O_2 \longrightarrow CuS_{(s)} + 2FeSO_{4(s)} \quad [23]$$

Toutefois, l'activation mécanique n'empêche pas la formation de couches de passivation à la surface de la chalcopyrite lors de sa lixiviation. En effet, Granata et al. (2019) ont observé dans leur étude que la lixiviation du concentré de chalcopyrite, qu'il ait été activé ou pas, est contrôlé par le phénomène de diffusion à travers une couche de produits issus de la dissolution de la chalcopyrite. Par ailleurs, l'énergie transmise au solide lors de son broyage peut générer des espèces transitoires à hautes énergies à la surface des particules. Ces espèces ayant un temps de relaxation de l'ordre de quelques secondes ou minutes, tout bénéfice dû à l'utilisation de ces phases transitoires est perdu lorsque l'activation mécanique et la lixiviation de la chalcopyrite sont opérées séparément (Baláž, 2004, et Chaiko et al., 2015). Pour remédier à ce problème, une solution menée à l'échelle pilote à la mine de Caribou (Canada) consiste à réaliser la lixiviation et l'activation mécanique dans deux réacteur séparés (voir Figure 13). Le réacteur dédié à l'activation mécanique (attriteur) reçoit la pulpe du réacteur de lixiviation et permet l'exfoliation des couches de passivation en plus de l'activation mécanique (broyage). Les conditions opératoires sont choisies de sorte que la vitesse de réduction de la taille des particules correspond au plus près à la vitesse des réactions ayant lieu au niveau des surfaces « fraîchement » fracturées. Cette technique correspond au procédé « Rapid Oxidative Leach » (ROL) de FLSmidth® (Chaiko et al., 2015, Mulligan et al., 2017, et Karcz, 2019).

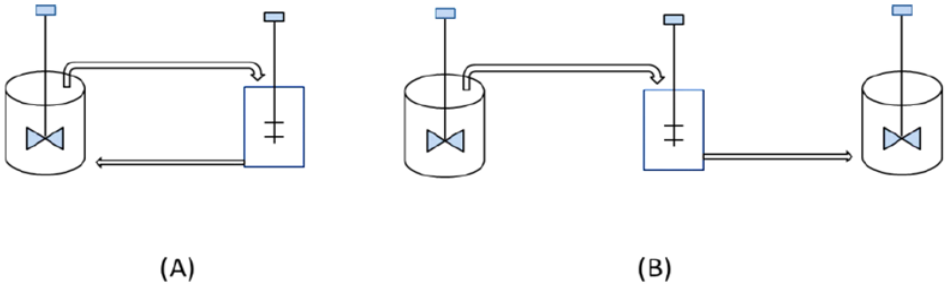


Figure 13 – Configuration de la lixiviation de la chalcopyrite en batch avec une recirculation continue entre l'attriteur et le réacteur agité de lixiviation (A), et en continue avec une étape intermédiaire de broyage dans un attriteur (B) (issu de Chaiko et al. (2015)).

Dans l'objectif d'une application à la biolixiviation, Esmailbagi et al. (2018) ont montré que, en dessous d'une certaine taille de particules, le rendement de lixiviation diminue (voir Figure 14). D'après les auteurs, cela pourrait être lié à la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ces espèces sont produites lorsque le minerai sulfuré broyé est au contact de la solution lixiviante acide et peuvent

conduire à la lyse des cellules (stress oxydatif) (Jones et al., 2011). La génération de Fe^{3+} et d'acide via l'activité bactérienne peut ainsi être impactée par la présence de ces ROS. Par ailleurs, la quantité de ROS générées augmente avec l'activité mécanique appliquée (Jones et al., 2011). Autrement dit, plus les particules sont finement broyées, plus de ROS sont produites et plus les bactéries sont sujettes au stress oxydatif, ce qui peut avoir un impact négatif sur la dissolution des sulfures. Il n'est toutefois pas exclu qu'une partie des ROS puisse réagir avec les sulfures (Jones et al., 2011).

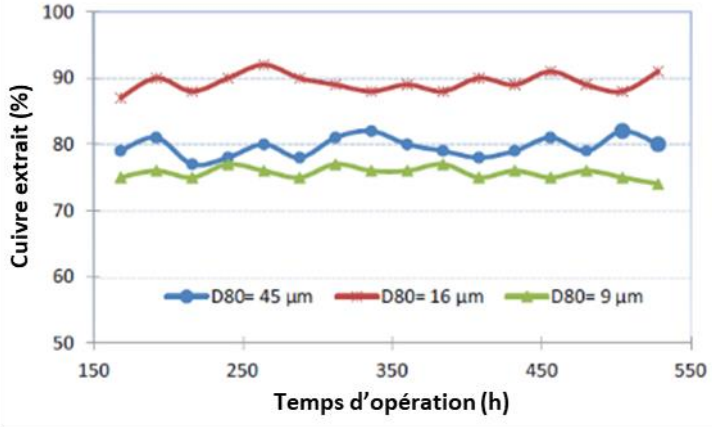


Figure 14 - Effets de la taille des particules en entrée du système (D80) sur l'extraction de cuivre à partir d'un concentré de chalcopyrite lors d'une opération de biolixiviation en continue (pH = 1.1 ± 0.2, taux de solide = 10 % massique, 50 ± 2°C, 300 rpm, ratio pyrite/chalcopyrite = 0.39, E_h = 400-500 mV) (adapté de Esmailbagi et al. (2018))

L'existence d'une dégradation des cellules bactériennes par effet d'attrition (collision) entre particules au cours de la biolixiviation est souvent mentionnée dans la littérature, mais peu d'études ont été réalisées sur l'impact de cet effet en fonction de la taille des particules. D'après les travaux de Deveci et al. (2004), la réduction de la taille des particules endommage les cellules des bactéries planctoniques (en solution) jusqu'à une taille critique (inférieure à 63 µm) à partir de laquelle l'effet inverse est observé (moins de cellules sont endommagées lorsque la taille des particules diminue). Les auteurs expliquent ce résultat par une diminution de la fréquence de collision entre particules : d'une part avec l'augmentation de la taille des particules lorsque celles-ci sont supérieures à 63 µm, et d'autre part avec la diminution de la masse des particules et de leur vitesse de terminal de chute lorsque la taille des particules est réduite en dessous de 63 µm (les particules ont plus tendance à suivre le mouvement du fluide). Cette taille critique dépend toutefois de l'hydrodynamique au sein du réacteur (conditions et système d'agitation), et peut être approximée grâce au rapport entre la taille minimale des tourbillons créés par effet de cisaillement sur le diamètre des particules (λ/d). Dans un système peu visqueux, plus λ/d est proche de 1, plus la fréquence de collision entre les particules est élevée, et plus les bactéries sont susceptibles d'être endommagées. Cette étude ne prend néanmoins pas en compte l'attachement des bactéries aux particules. Ainsi, il se pourrait que les particules de taille de l'ordre de 10-20 µm aient un impact mitigé sur la lyse des cellules par attrition entre particules.

4.2. Principe et intérêt de l'attrition lixiviante

L'attrition lixiviante consiste à réaliser la lixiviation de particules dans un environnement d'attrition. En pratique, des billes de taille millimétrique sont ajoutées dans un réacteur de lixiviation pour exfolier les couches de passivation au fur et à mesure de leur formation. Comme dans le cas des traitements mécaniques en voie sèche, l'action des billes peut également contribuer à fragmenter les particules *in situ*, mais de manière non prépondérante.

Comme l'illustre la Figure 15, cette solution physique, complémentaire des solutions chimiques, peut être envisagée pour répondre au phénomène de passivation de la chalcopyrite lors de sa lixiviation. Il ne s'agit ainsi pas d'empêcher la formation de phases passivantes, mais d'éliminer celles qui se forment

à la surface des particules pour ne pas entraver la lixiviation. A la différence d'une approche en deux étapes (activation mécanique puis lixiviation), la lixiviation s'opère directement dans un environnement attritif qui exfolie, de manière continue, les dépôts à la surface des particules réactives.

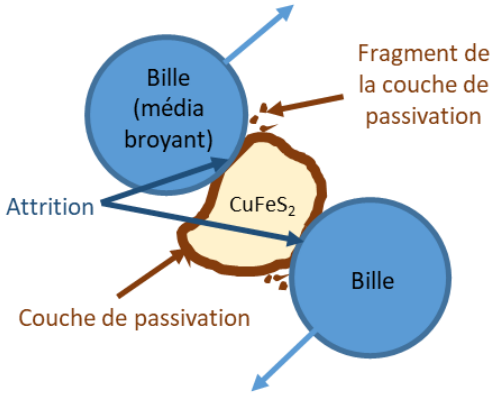


Figure 15 - Principe d'exfoliation de la couche de passivation de la chalcopyrite par phénomène d'attrition.

Le principe d'attrition lixiviante a été étudié dans le cadre de la carbonatation directe en voie aqueuse avec des silicates contenant du magnésium, comme l'olivine (Julcour et al., 2015) ou la serpentine (Rim et al., 2020). La dissolution de ces silicates entraîne en effet la formation d'une couche de passivation à la surface des particules solides (Figure 16).

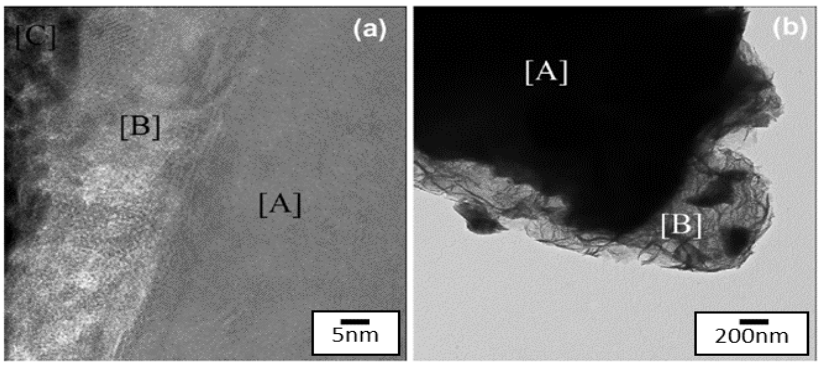


Figure 16 – Exemple de couche de passivation riche en silice se formant à la surface d'une particule d'olivine pendant la carbonatation directe en phase aqueuse (image obtenues par MET). (a) surface d'une particule d'olivine après 24 h à 120 °C ; (b) surface d'une particule d'olivine après 95 h à 180 °C (Julcour et al., 2015) ; [A] olivine résiduelle, [B] couche d'oxyde de fer et de silice.

Julcour et al. (2015) ont ainsi comparé l'effet d'une activation mécanique par attrition en deux étapes (activation mécanique, puis carbonatation) et in-situ (activation mécanique et carbonatation dans le même réacteur) sur le rendement. Il a été observé que quel que soit le type d'activation mécanique (en deux étapes ou *in situ*), le rendement est amélioré avec une activation mécanique. Néanmoins, lorsque cette dernière est réalisée *in situ*, le rendement est meilleur, ce qui montre que la différence de rendement entre les deux configurations d'activation mécanique est due à l'exfoliation des couches de passivation au fur et à mesure de leur formation lors de la carbonatation, tandis que l'augmentation du rendement par une activation mécanique en deux étapes représente l'amélioration due au broyage des particules (obtention de particules plus fines pour la carbonatation) (voir Figure 17).

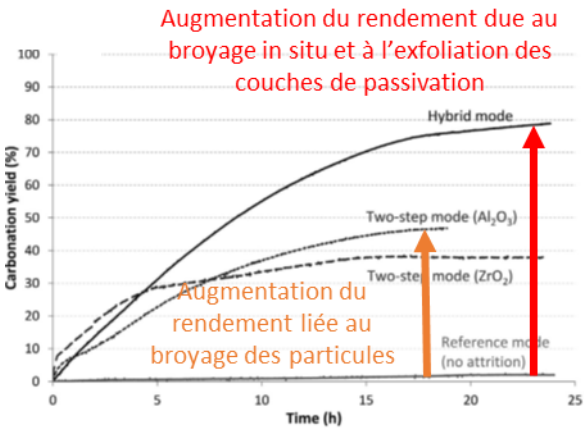


Figure 17 - Rendement de carbonatation de l'olivine en fonction du temps dans le cas d'absence d'activation mécanique par attrition (« Reference mode »), d'activation mécanique en deux étapes (« Two-step mode »), et in-situ (« Hybride mode ») (modifié de Julcour et al.**,** 2015).

Dans le cadre du projet ANR Biomecalix, dans lequel s'inscrivent ces travaux de thèse, un réacteur d'attrition lixiviante a été mis au point pour étudier dans un premier temps la lixiviation abiotique d'un concentré de chalcopyrite. Les rendements de dissolution du cuivre au cours du temps, obtenus dans différentes configurations, sont présentés à la Figure 18 (Dakkoune et al., 2023). De manière analogue au cas des silicates magnésiens, il apparaît que la mise en œuvre de billes dans le réacteur de lixiviation augmente de manière très importante les rendements de lixiviation (configuration AL vs L), et pas uniquement du fait d'un effet de fragmentation (configuration A-L).

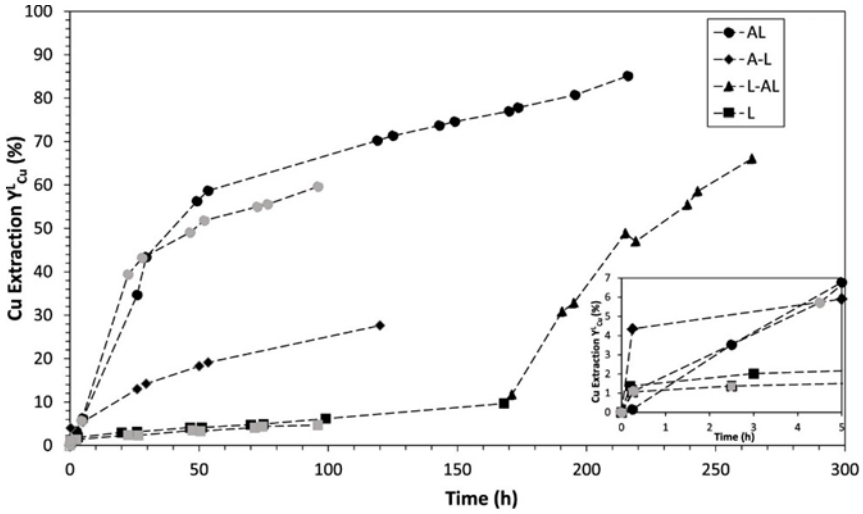


Figure 18 – Rendement de dissolution du cuivre lors de la lixiviation de 84 g d'un concentré de chalcopyrite dans différentes configuration, avec 0 ou 1 kg de billes en verre, 2,5 L d'eau, un pH de 1,3, un potentiel redox maintenu à 700 mV vs. SHE, une agitation de 556 rpm et à 42°C. L : lixiviation sans bille, AL : attrition lixiviante (avec billes), L-AL : lixiviation sans bille (170 h) suivie d'une attrition lixiviante, et A-L : attrition (sans régulation du pH, ni du potentiel redox) suivi d'une lixiviation. Les courbes grises correspondent à des duplicats des essais en configuration L et AL (Dakkoune et al., 2023)

Ces résultats soulèvent l'intérêt de mettre en œuvre un procédé hybride couplant l'attrition lixiviante et la biolixiviation (« biolixiviation attritive »).

Quelques rares études portant sur un concept similaire ont été publiées. Ainsi, Pan et al. (2012) ont comparé l'efficacité d'extraction du cuivre à partir de concentré de chalcopyrite lors d'essais de biolixiviation avec et sans billes de verres (5 g de billes dans 500 mL) en erlenmeyer. Le consortium utilisé était composé de bactéries thermophiles capables d'oxyder le fer et le soufre. L'addition des

billes de verre a permis d'augmenter le rendement en cuivre, passant de 50 % (biolixiviation conventionnelle) à 90 %. D'après les auteurs, cette augmentation de rendement était liée à un potentiel redox plus élevé dans le cas de la biolixiviation conventionnelle par rapport à la biolixiviation attritive, l'exfoliation et la limitation de la formation de la couche passivante par attrition, et la fragmentation du solide en plus fines particules (78% des particules ont une taille inférieure à 37 µm à la fin de la biolixiviation). Les auteurs ont par ailleurs montré qu'une couche compacte de jarosite formée à la surface de la chalcopyrite après 30 jours de biolixiviation, dans les conditions opératoires de l'étude, pouvait être détruite par addition de billes en verre en 30 minutes. Dong et al. (2013) ont également observé une augmentation de 20 % du cuivre extrait à partir de chalcopyrite lorsque 50 g/L de quartz est ajouté au système de biolixiviation, et invoquent l'exfoliation de la couche de passivation et l'élimination d'impuretés par attrition grâce aux particules de quartz.

Néanmoins, ces deux études ne précisent pas l'impact de l'environnement attritif sur les microorganismes présents dans le système. En effet, il est nécessaire de prendre en compte que le phénomène d'attrition induit par le média broyant et la réduction de la taille des particules couplé à l'hydrodynamique du système risque d'endommager les cellules. Par ailleurs, ces études ont été réalisées à petite échelle, dans des erlenmeyers, et donc avec des propriétés peu contrôlées, sans maîtrise du système d'agitation, de l'aération, et du pH.

5. Conclusion du chapitre

Le caractère réfractaire de la chalcopyrite (principale ressource primaire de cuivre) vis-à-vis de la lixiviation limite grandement l'utilisation de l'hydrométallurgie pour la production de cuivre. L'état de l'art montre que, même si l'origine de ce caractère réfractaire reste controversée, il existe un lien fort avec la formation de solides intermédiaires au cours des réactions de lixiviation oxydante. Par ailleurs, l'application de la biolixiviation, notamment pour les minéraux sulfurés, présente de nombreux avantages (réduction des coûts, minimisation des réactifs et des effluents notamment) et pourrait avantageusement être mise en œuvre pour traiter la chalcopyrite.

Parmi les solutions encore très peu explorées, l'attrition lixiviante couplée à la biolixiviation semble prometteuse. Ce procédé hybride, qui consiste à ajouter des billes de verres de taille millimétrique dans un réacteur de biolixiviation, permettrait d'opérer à pression atmosphérique, à des températures et acidité modérées (par exemple 40°C et pH compris entre 1 et 2), de produire *in situ* le réactif oxydant (Fe^{3+}) grâce à l'activité bactérienne, tout en exfoliant les couches de solides intermédiaires se formant à la surface des particules de chalcopyrite. La mise en œuvre de ce procédé soulève néanmoins de nombreux défis.

Tout d'abord, l'impact de l'environnement attritif sur les bactéries doit être évalué. En effet, les contraintes hydrodynamiques et mécaniques générées par les billes sont susceptibles de soumettre les microorganismes à un stress capable de modifier leur métabolisme voir d'endommager fortement les cellules. L'impact du média broyant et du taux de solide sur les bactéries doit donc être étudié, en lien avec les questions suivantes : Les bactéries restent-elles actives et peuvent-elles se multiplier malgré ces fortes contraintes ? Quelle est la limite de résistance des bactéries vis-à-vis de ces contraintes ? En plus des contraintes mécaniques directes, quel est l'impact de la présence d'une grande quantité de particules très fines (ici générées par l'attrition) sur les bactéries ?

Par ailleurs les rares études de biolixiviation attritive reportées dans la littérature n'ont jusqu'à présent été réalisées qu'à l'échelle d'erlenmeyer, avec de faibles quantités de billes. A l'échelle du réacteur agité (typiquement de l'ordre de 2 L), de nombreux paramètres doivent être pris en compte (système d'agitation, système d'aération, quantité du média broyant, …) pour permettre d'envisager un changement d'échelle. Les questions sont en particulier de savoir si les rendements de lixiviation sont suffisants, et d'évaluer l'influence des très nombreux paramètres opératoires.

Les travaux réalisés durant cette thèse et présentés dans la suite du manuscrit ont ainsi visé à étudier ce procédé hybride et à aborder ces questions de recherches. Pour atteindre ces objectifs, la stratégie globale des travaux s'est appuyée sur les points suivants :

- établir et valider une méthodologie pour obtenir des inocula similaire d'un essai de biolixiviation à l'autre, afin de faciliter la comparaison entre les essais ;

- étudier l'impact de la taille des particules de chalcopyrite sur l'activité bactérienne, et en particulier comparer les rendements de lixiviation obtenus avec des particules très fines (<20 µm) par rapport à des particules plus grossières (20-100 µm);

- mener et caractériser au mieux des essais de biolixiviation attritive dans un réacteur instrumenté pour évaluer les potentialités de ce concept hybride.

6. Références

Ahmadi, A., Schaffie, M., Manafi, Z., Ranjbar, M., 2010. Electrochemical bioleaching of high grade chalcopyrite flotation concentrates in a stirred bioreactor. *Hydrometallurgy 104*, 99–105. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.05.001

Ammou-Chokroum, M., Cambazoglu, M., Steinmetz, D., 1977. Oxydation ménagée de la chalcopyrite en solution acide : analyse cinétique des réactions. II. Modèles diffusionnels. *Bulletin de la Société française de Minéralogie et de Cristallographie 100*, 161–177. https://doi.org/10.3406/bulmi.1977.7133.

Arpalahti, A., Lundström, M., 2018. The leaching behavior of minerals from a pyrrhotite-rich pentlandite ore during heap leaching. *Minerals Engineering 119*, 116–125. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.01.025

Arpalahti, A., Lundström, M., 2019. Dual aeration tests with heap leaching of a pyrrhotite-rich pentlandite ore. *Hydrometallurgy 185*, 173–185. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.02.018

Bai, Y., Wang, W., Zhao, S., Lu, D., Xie, F., Dreisinger, D., 2022. Effect of Mechanical Activation on Leaching Behavior and Mechanism of Chalcopyrite, *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review 43* 440–452. https://doi.org/10.1080/08827508.2021.1906239.

Bailey, A.D., Hansford, G.S., 1993. Factors affecting bio-oxidation of sulfide minerals at high concentrations of solids: A review. *Biotechnol. Bioeng. 42*, 1164–1174. https://doi.org/10.1002/bit.260421006

Bailey, A.D., Hansford, G.S., 1994. Oxygen mass transfer limitation of batch bio-oxidation at high solids concentration. *Minerals Engineering 7*, 293–303. https://doi.org/10.1016/0892-6875(94)90071-X

Baláž, P. 2003. Mechanical Activation in Hydrometallurgy. *International Journal of Mineral Processing 72*, 341–354. https://doi.org/10.1016/S0301-7516(03)00109-1.

Baláž, P. 2004. "Mechanochemistry of Sulphides." *Journal of Materials Science* 39, 5097–5102. https://doi.org/10.1023/B:JMSC.0000039190.72325.cf.

Balci, N., Shanks, W.C., Mayer, B., Mandernack, K.W., 2007. Oxygen and sulfur isotope systematics of sulfate produced by bacterial and abiotic oxidation of pyrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta 71*, 3796–3811. https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.04.017

Batty, J.D., Rorke, G.V., 2006. Development and commercial demonstration of the BioCOP™ thermophile process. *Hydrometallurgy 83*, 83–89. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.049

Bevilaqua, D., Leite, A.L.L.C., Garcia, O., Tuovinen, O.H., 2002. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry 38*, 587–592. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00169-3

Blight, K.R., Candy, R.M., Ralph, D.E., 2009. The preferential oxidation of orthorhombic sulfur during batch culture. *Hydrometallurgy 99*, 100–104. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2009.05.013

Bogdanović, G.D., Petrović, S., Sokić, M., Antonijević, M.M., 2020. Chalcopyrite leaching in acid media: a review. *Metall Mater Eng 26*, 177–198. https://doi.org/10.30544/526

Boon, M., Heijnen, J.J., 1998. Gas–liquid mass transfer phenomena in bio-oxidation experiments of sulphide minerals: A critical review of literature data. *Hydrometallurgy 48*, 187–204. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(97)00077-7

Brierley, C.L., and Brierley, J.A., 2013. "Progress in Bioleaching: Part B: Applications of Microbial Processes by the Minerals Industries." *Appl Microbiol Biotechnol 97,* 7543–7552. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5095-3.

Bryan, C.G., Joulian, C., Spolaore, P., El Achbouni, H., Challan-Belval, S., Morin, D., d'Hugues, P., 2011. The efficiency of indigenous and designed consortia in bioleaching stirred tank reactors. *Minerals Engineering 24*, 1149–1156. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2011.03.014

Chaiko, D., Baczek, F., Rocks, S.S., Walters, T., Klepper, R., 2015. THE FLSMIDTH® RAPID OXIDATIVE LEACH (ROL) PROCESS. PART I: MECHANO-CHEMICAL PROCESS FOR TREATING CHALCOPYRITE. Conference of Metallurgists COM 2015. Toronto. ISBN: 978-1-926872-32-2.

Chéron, J., Loubière, C., Delaunay, S., Guézennec, A.-G., Olmos, E., 2020. CFD numerical simulation of particle suspension and hydromechanical stress in various designs of multi-stage bioleaching reactors. *Hydrometallurgy 197*, 105490. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105490

Christel, S., Herold, M., Bellenberg, S., Buetti-Dinh, A., El Hajjami, M., Pivkin, I.V., Sand, W., Wilmes, P., Poetsch, A., Vera, M., Dopson, M., 2018. Weak Iron Oxidation by Sulfobacillus thermosulfidooxidans Maintains a Favorable Redox Potential for Chalcopyrite Bioleaching. *Front. Microbiol. 9*, 3059. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03059

Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008a. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: General aspects. *Hydrometallurgy 93*, 81–87. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.015

Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008b. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part II: Effect of redox potential. *Hydrometallurgy 93*, 88–96. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.016

Crundwell, F.K., 2003. How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy 71*, 75–81. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00175-0

D'Hugues, P., Battaglia-Brunet, F., Clarens, M., Morin, D., 2003. Microbial diversity of various metal-sulfides bioleaching cultures grown under different operating conditions using 16S-rDNA nalysis. In: Tsezos, M., Remoudaki, E., Hatzikioseyian, A. (eds.), International Biohydrometallurgy Symposium IBS 2003. Hellas, Athens, pp.) 1313–1324

Daehn, K., Allanore, A., 2020. Electrolytic production of copper from chalcopyrite. *Current Opinion in Electrochemistry 22,* 110–119. https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.04.011

Dakkoune, A., Bourgeois, F., Po, A., Joulian, C., Hubau, A., Touzé, S., Julcour, C., Guézennec, A.-G., Cassayre, L., 2023. Hydrometallurgical Processing of Chalcopyrite by Attrition-Aided Leaching. *ACS Eng. Au.* https://doi.org/10.1021/acsengineeringau.2c00051

Debernardi, G., Carlesi, C., 2013. Chemical-Electrochemical Approaches to the Study Passivation of Chalcopyrite. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review 34*, 10–41. https://doi.org/10.1080/08827508.2011.623745

Dehaine, Q., Tijsseling, L.T., Glass, H.J., Törmänen, T., Butcher, A.R., 2021. Geometallurgy of cobalt ores: A review. *Minerals Engineering 160*, 106656. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106656

Demergasso, C., Galleguillos, F., Soto, P., Serón, M., Iturriaga, V., 2010. Microbial succession during a heap bioleaching cycle of low grade copper sulfides. *Hydrometallurgy 104*, 382–390. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.04.016

Deveci, H., Akcil, A., Alp, I., 2003. Parameters for Control and Optimization of Bioleaching of Sulfide Minerals. Materials Science & Technology 2003 Symposium: Process Control and Optimization in Ferrous and Non Ferrous Industry, Kongoli F., Thomas B., Sawamiphakdi K. (eds.), TMS

Deveci, H., 2004. Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. *Hydrometallurgy 71*, 385–396. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00112-9

Dodds, W.S., Stutzman, L.F., Sollami, B.J., 1956. Carbon Dioxide Solubility in Water. *Ind. Eng. Chem. Chem. Eng. Data Series 1*, 92–95. https://doi.org/10.1021/i460001a018

Dong, Y.B., Lin, H., Zhou, S., Xu, X., Zhang, Y., 2013. Effects of quartz addition on chalcopyrite bioleaching in shaking flasks. *Minerals Engineering 46–47*, 177–179. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.04.014

Esmailbagi, M.R., Schaffie, M., Kamyabi, A., Ranjbar, M., 2018. Microbial assisted galvanic leaching of chalcopyrite concentrate in continuously stirred bioreactors. *Hydrometallurgy 180*, 139–143. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.07.020

France Chimie et La société chimique de France, 2019. Cuivre. L'élémentarium. https://www.lelementarium.fr/element-fiche/cuivre/ (dernière mise à jour le 26.11.2022)

Gericke, M., Govender, Y., Pinches, A., 2010. Tank bioleaching of low-grade chalcopyrite concentrates using redox control. *Hydrometallurgy 104*, 414–419. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.024

Granata, G., Takahashi, K., Kato, T., Tokoro, C., 2019. Mechanochemical activation of chalcopyrite: Relationship between activation mechanism and leaching enhancement. *Minerals Engineering 131*, 280–285. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.11.027

Guézennec, A.-G., Hanke, M., Chmielarz, A., Joulian, C., Ménard, Y., d'Hugues, P., 2014. "Bio-hydrometallurgy: an alternative to pyrometallurgy for copper recovery in apolymineral concentrate." In: Proceedings of Hydrometallurgy 2014 Congress –June 22–25, Victoria, Canada

Guézennec, A.-G., Joulian, C., Jacob, J., Archane, A., Ibarra, D., de Buyer, R., Bodénan, F., d'Hugues, P., 2017. Influence of dissolved oxygen on the bioleaching efficiency under oxygen enriched atmosphere. *Minerals Engineering 106*, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.10.016

Guézennec, A.-G., Joulian, C., Delort, C., Bodénan, F., Hedrich, S., D'hugues, P., 2018. CO2 mass transfer in bioleaching reactors: CO2 enrichment applied to a complex copper concentrate. *Hydrometallurgy 180*, 277–286. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.08.006

Guézennec, A.-G., 2019. Bioleaching of copper ores and concentrates – fundamentals and practical aspects. In : Copper Hydrometallurgy: Principles and PracticePublisher: B. Wassink & E. Asselin (eds). METSOC, West Westmount, Québec, Canada.

Gouvernement du Canada. "Faits sur le cuivre". Ressources naturelles Canada. https://www.rncan.gc.ca/nos-ressources-naturelles/mineraux-exploitation-miniere/faits-sur-les-mineraux-les-metau/faits-sur-le-cuivre/20577 (date de mise à jour : 28.03.2023)

Hackl, R.P., Dreisinger, D.B., Peters, E., King, J.A., 1995. Passivation of chalcopyrite during oxidative leaching in sulfate media. *Hydrometallurgy 39*, 25–48. https://doi.org/10.1016/0304-386X(95)00023-A

Hatzikioseyian, A., Tsezos, M., 2006. Modelling of microbial metabolism stoichiometry: Application in bioleaching processes. *Hydrometallurgy 83*, 29–34. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.034

Hedrich, S., Guézennec, A.-G., Charron, M., Schippers, A., Joulian, C., 2016. Quantitative Monitoring of Microbial Species during Bioleaching of a Copper Concentrate. *Frontiers in Microbiology* 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02044

Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., 2001. Enhancement of chalcopyrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions. *Hydrometallurgy 60*, 185–197. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00155-9

Hourn, M., et Turner, D. W., 2012. Commercialisation of the Albion process. In: Proceedings of the ALTA 2012 gold conference (Vol. 19).

Hubau, A., Minier, M., Chagnes, A., Joulian, C., Silvente, C., Guézennec, A.-G., 2020a. Recovery of metals in a double-stage continuous bioreactor for acidic bioleaching of printed circuit boards (PCBs). *Separation and Purification Technology 238*, 116481. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116481

Hubau, A., Guézennec, A.-G., Joulian, C., Falagán, C., Dew, D., Hudson-Edwards, K.A., 2020b. Bioleaching to reprocess sulfidic polymetallic primary mining residues: Determination of metal leaching mechanisms. *Hydrometallurgy 197*, 105484. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105484

International Copper Study Group (ICSG). 2022. The World Copper Factbook 2022. International Copper Study Group. https://icsg.org/copper-factbook/

Johnson, D.B., Joulian, C., d'Hugues, P., Hallberg, K.B., 2008. *Sulfobacillus benefaciens* sp. nov., an acidophilic facultative anaerobic *Firmicute* isolated from mineral bioleaching operations. *Extremophiles 12*, 789–798. https://doi.org/10.1007/s00792-008-0184-4

Jones, G.C., Corin, K.C., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L., 2011. The generation of toxic reactive oxygen species (ROS) from mechanically activated sulphide concentrates and its effect on thermophilic bioleaching. *Minerals Engineering 24*, 1198–1208. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2011.05.016

Julcour, C., Bourgeois, F., Bonfils, B., Benhamed, I., Guyot, F., Bodénan, F., Petiot, C., Gaucher, É.C., 2015. Development of an attrition-leaching hybrid process for direct aqueous mineral carbonation. *Chemical Engineering Journal 262*, 716–726. https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.031

Justel, F.J., Camacho, D.M., Taboada, M.E., Roberts, K.J., 2019. Crystallisation of copper sulphate pentahydrate from aqueous solution in absence and presence of sodium chloride. *Journal of Crystal Growth 525*, 125204. https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2019.125204

Karcz, AP 2019, Surface Characterization of Activated Chalcopyrite Particles. Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby.

Khoshkhoo, M., Dopson, M., Engström, F., Sandström, Å., 2017. New insights into the influence of redox potential on chalcopyrite leaching behaviour. *Minerals Engineering 100*, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.10.003

Klauber, C., 2008. A critical review of the surface chemistry of acidic ferric sulphate dissolution of chalcopyrite with regards to hindered dissolution. *International Journal of Mineral Processing 86*, 1–17. https://doi.org/10.1016/j.minpro.2007.09.003

Kinnunen, P.H.-M., Puhakka, J.A., 2005. High-rate iron oxidation at below pH 1 and at elevated iron and copper concentrations by a *Leptospirillum ferriphilum* dominated biofilm. *Process Biochemistry 40*, 3536–3541. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.050

Kuenen, J., Pacyna, J.M., Rentz, O., Oertel, D., Pulles, T., Appelman, W., Dellaert, S., 2019. Copper production. In : European Environment Agency (eds) EMEP/EEA air pollutant emission inventory guidebook 2019. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 8, ISBN 978-92-9480-098-5

Li, Y., Kawashima, N., Li, J., Chandra, A.P., Gerson, A.R., 2013. A review of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopyrite. *Advances in Colloid and Interface Science 197–198*, 1–32. https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.03.004

Lotfalian, M., Ranjbar, M., Fazaelipoor, M.H., Schaffie, M., Manafi, Z., 2015. The effect of redox control on the continuous bioleaching of chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering 81*, 52–57. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2015.07.006

Ma, Y., Svärd, M., Xiao, X., Ashoka Sahadevan, S., Gardner, J., Olsson, R.T., Forsberg, K., 2022. Eutectic freeze crystallization for recovery of NiSO4 and CoSO4 hydrates from sulfate solutions. *Separation and Purification Technology 286*, 120308. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.120308

Mahmoud, A., Cézac, P., Hoadley, A.F.A., Contamine, F., D'Hugues, P., 2017. A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors. *International Biodeterioration & Biodegradation 119*, 118–146. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.015

Maluckov, BS. 2017. The Catalytic Role of Acidithiobacillus Ferrooxidans for Metals Extraction from Mining - Metallurgical Resource. *Biodiversity International Journal* 1. https://doi.org/10.15406/bij.2017.01.00017.

Mariano, R.A., Evans, C.L., Manlapig, E., 2016. Definition of random and non-random breakage in mineral liberation - A review. *Minerals Engineering 94*, 51–60. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.05.005

McDonald, R.G., Muir, D.M., 2007. Pressure oxidation leaching of chalcopyrite. Part I. Comparison of high and low temperature reaction kinetics and products. *Hydrometallurgy 86*, 191–205. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.11.015

McMillan, R.S., MacKinnon, D.J., Dutrizac, J.E., 1982. Anodic dissolution of n-type and p-type chalcopyrite. *Journal of Applied Electrochemistry 12*, 743–757. https://doi.org/10.1007/BF00617495

Mulligan, M., Chaiko, D., Baczek, F., Rocks, S., Eyzaguirre, C., Dickinson, C., Klepper, R., 2017. The FLSmidth® Rapid Oxidative Leach (ROL) process: a mechano-chemical approach and industrial applications for rapid metal sulphide dissolution. *J. South. Afr. Inst. Min. Metall. 117*, 741–747. https://doi.org/10.17159/2411-9717/2017/v117n8a3

Munoz, P.B., Miller, J.D., Wadsworth, M.E., 1979. Reaction mechanism for the acid ferric sulfate leaching of chalcopyrite. *Metallurgical Transactions B* 10, 149–158. https://doi.org/10.1007/BF02652458

Nazari, G., Asselin, E., 2009. Morphology of chalcopyrite leaching in acidic ferric sulfate media. *Hydrometallurgy 96*, 183–188. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.09.004

Nemati, M., Lowenadler, J., Harrison, S.T.L., 2000. Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile Sulfolobus metallicus (BC). *Applied Microbiology and Biotechnology 53*, 173–179. https://doi.org/10.1007/s002530050005

O'Connor, G.M., Eksteen, J.J., 2020. A critical review of the passivation and semiconductor mechanisms of chalcopyrite leaching. *Minerals Engineering 154*, 106401. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106401

Onisei, S., Badilita, V., Stoiciu, F., Velea, T., Predica, V., Lupu, C., Butu, M., Moldovan, P., 2012. Mechanochemical Activation of Copper Concentrate and the Effect on Oxidation of Metal Sulphides. *REV. CHIM. 6, 591-597*

Pan, H., Yang, H., Tong, L., Zhong, C., Zhao, Y., 2012. Control method of chalcopyrite passivation in bioleaching. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China 22*, 2255–2260. https://doi.org/10.1016/S1003-6326(11)61457-X

Parker, A., Klauber, C., Kougianos, A., Watling, H.R., van Bronswijk, W., 2003. An X-ray photoelectron spectroscopy study of the mechanism of oxidative dissolution of chalcopyrite. *Hydrometallurgy 71*, 265–276. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00165-8

Peters, E., 1976. Direct Leaching of sulfides: Chemistry and applications. Metallurgical Transactions B, 7, 505-517.

Petersen, J, and D G Dixon. 2002. Thermophilic Heap Leaching of a Chalcopyrite Concentrate. *Minerals Engineering* 15, 777–785

Petersen, J., Dixon, D.G., 2003. The Dynamics of Chalcocite Heap Bioleaching. *Hydrometallurgy* 1, 351-364.

Pradhan, N., Nathsarma, K.C., Srinivasa Rao, K., Sukla, L.B., Mishra, B.K., 2008. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. *Minerals Engineering 21*, 355–365. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.10.018

Rawlings, D.E., et Johnson, D.B., 1998. Biomining Theory, Microbes and Industrial Processes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 302. ISBN 3-540-63252-2

Rawlings, D.E., 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories 4*, 13. https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-13

Ren, Z., Chao, C., Krishnamoorthy, P., Asselin, E., Dixon, D.G., Mora, N., 2022. The overlooked mechanism of chalcopyrite passivation. *Acta Materialia 236*, 118111. https://doi.org/10.1016/j.actamat.2022.118111

Rim, G., Wang, D., Rayson, M., Brent, G., Park, A.-H.A., 2020. Investigation on Abrasion versus Fragmentation of the Si-rich Passivation Layer for Enhanced Carbon Mineralization via CO2 Partial Pressure Swing. *Ind. Eng. Chem. Res. 59*, 6517–6531. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b07050.

Rizet, L., et Charpentier, P-E., 2000. Métallurgie extractive Hydrométallurgie. *Techniques de l'ingénieur*. Référence M2235 V2, 13

Roberto, F.F., Schippers, A., 2022. Progress in bioleaching: part B, applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol 106*, 5913–5928. https://doi.org/10.1007/s00253-022-12085-9

Rubio, A., García Frutos, F.J., 2002. Bioleaching capacity of an extremely thermophilic culture for chalcopyritic materials. *Minerals Engineering 15*, 689–694. https://doi.org/10.1016/S0892-6875(02)00124-3

Sandström, Å., Shchukarev, A., Paul, J., 2005. XPS characterisation of chalcopyrite chemically and bio-leached at high and low redox potential. *Minerals Engineering 18*, 505–515. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2004.08.004

Santos, AL., Schippers A., 2022. Reductive mineral bioprocessing. In: Johnson DB, Bryan CG, Schlömann M., Roberto FF (eds) Biomining Technologies: Extracting and Recovering Metals from Ores and Wastes, Springer (in press)

Sasaki, K., Nakamuta, Y., Hirajima, T., Tuovinen, O.H., 2009. Raman characterization of secondary minerals formed during chalcopyrite leaching with Acidithiobacillus ferrooxidans. *Hydrometallurgy 95*, 153–158. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.009

Schippers, A., 2004, Biogeochemistry of metal sulfide oxidation in mining environments, sediments, and soils, in Amend, J.P., Edwards, K.J., and Lyons, T.W. (eds), Sulfur biogeochemistry—Past and present: Boulder, Colorado, Geological Society of America Special Paper 379, p. 49–62. https://doi.org/10.1130/0-8137-2379-5.49

Schlesinger, M.E., King, M.J., Sole, K.C., Davenport, W.G., 2011. Hydrometallurgical Copper Extraction, In: Extractive Metallurgy of Copper. Elsevier, pp. 281–322. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096789-9.10015-0

Smith, S.L., Grail, B.M., Johnson, D.B., 2017. Reductive bioprocessing of cobalt-bearing limonitic laterites. *Minerals Engineering 106*, 86–90. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.09.009

Spolaore, P., Joulian, C., Gouin, J., Morin, D., d'Hugues, P., 2011. Relationship between bioleaching performance, bacterial community structure and mineralogy in the bioleaching of a copper concentrate in stirred-tank reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology 89*, 441–448. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2888-5

Stanković, S., Kamberović, Ž., Friedrich, B., Stopić, S.R., Sokić, M., Marković, B., Schippers, A., 2022. Options for Hydrometallurgical Treatment of Ni-Co Lateritic Ores for Sustainable Supply of Nickel and Cobalt for European Battery Industry from South-Eastern Europe and Turkey. *Metals 12*, 807. https://doi.org/10.3390/met12050807

Stott, M.B., Watling, H.R., Franzmann, P.D., Sutton, D., 2000. The role of iron-hydroxy precipitates in the passivation of chalcopyrite during bioleaching. *Minerals Engineering 13*, 1117–1127. https://doi.org/10.1016/S0892-6875(00)00095-9

Tešinský, M., et Baláž, P. 2017 "Copper Leaching from Chalcopyrite: Mechanochemical Approac." *Journal of the Polish Mineral Engineering Society*. DOI: 10.29227/IM-2017-01-01

Touchard, C.S, 2021. Développement d'un modèle thermodynamique pour la valorisation de la chalcopyrite par voie hydrométallurgique, thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

Urbieta, M., Porati, G., Segretín, A., González-Toril, E., Giaveno, M., Donati, E., 2015. Copahue Geothermal System: A Volcanic Environment with Rich Extreme Prokaryotic Biodiversity. *Microorganisms 3*, 344–363. https://doi.org/10.3390/microorganisms3030344

van Aswegen, P. C., van Niekerk, J., & Olivier, W. 2007. The BIOX™ Process for the Treatment of Refractory Gold Concentrates. In: Rawlings, D.E., Johnson, D.B. (eds) Biomining. Springer, Berlin, Heidelberg, 1–33. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34911-2_1

Vera, M., Schippers, A., Sand, W., 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Appl Microbiol Biotechnol 97*, 7529–7541. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4954-2

Vera Véliz, M.,Videla Leiva, A.,Martínez Bellange, P., 2023. Copper Bioleaching Operations in Chile: Towards New Challenges and Developments. In: Johnson, D.B., Bryan, C.G., Schlömann, M., Roberto, F.F. (eds) Biomining Technologies. Springer, Cham, 163−176 https://doi.org/10.1007/978-3-031-05382-5_9

Xia, L., Liu, X., Zeng, J., Yin, C., Gao, J., Liu, J., Qiu, G., 2008. Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of Acidithiobacillus ferrooxidans after adaptation with chalcopyrite. *Hydrometallurgy 92*, 95–101. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.01.002

Yang, H., Zhao, S., Wang, G., Zhang, Q., Jin, Z., Tong, L., Chen, G., Qiu, X., 2022. Mechanical activation modes of chalcopyrite concentrate and relationship between microstructure and leaching efficiency. *Hydrometallurgy 207*, 105778. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2021.105778

Yu, S., Liao, R., Yang, B., Fang, C., Wang, Z., Liu, Y., Wu, B., Wang, J., Qiu, G., 2022. Chalcocite (bio)hydrometallurgy - current state, mechanism, and future directions: A review. *Chinese Journal of Chemical Engineering 41*, 109–120. https://doi.org/10.1016/j.cjche.2021.12.014

Zhao, H., Wang, J., Tao, L., Cao, P., Yang, C., Qin, W., Qiu, G., 2017. Roles of oxidants and reductants in bioleaching system of chalcopyrite at normal atmospheric pressure and 45 °C. International Journal of Mineral Processing 162, 81–91. https://doi.org/10.1016/j.minpro.2017.04.002

Zhao, H., Zhang, Yisheng, Zhang, X., Qian, L., Sun, M., Yang, Y., Zhang, Yansheng, Wang, J., Kim, H., Qiu, G., 2019. The dissolution and passivation mechanism of chalcopyrite in bioleaching: An overview. *Minerals Engineering 136*, 140–154. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2019.03.014

Zhao, S. Wang, G. Yang, H. Chen, G. Qiu, X., 2021. Agglomeration-aggregation and leaching properties of mechanically activated chalcopyrite, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 31, 1465–1474. https://doi.org/10.1016/S1003-6326(21)65590-5.

Zhu, W., Xia, J., Yang, Y., Nie, Z., Zheng, L., Ma, C., Zhang, R., Peng, A., Tang, L., Qiu, G., 2011. Sulfur oxidation activities of pure and mixed thermophiles and sulfur speciation in bioleaching of chalcopyrite. *Bioresource Technology 102*, 3877–3882. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.090

Chapitre II - Matériel et Méthodes

Dans le cadre de l'étude du procédé de biolixiviation attritive, des essais de biolixiviation sans ou avec attrition (biolixiviation conventionnelle et biolixiviation attritive respectivement) ont été réalisés. La comparaison de ces essais vise d'une part à étudier le phénomène de passivation de ce minéral selon les conditions opératoires appliquées, et d'autre part à comprendre les phénomènes ayant lieu lors de la biolixiviation attritive appliquée à la chalcopyrite. Outre les essais qui viennent d'être mentionnés, le programme expérimental a également inclus au préalable la préparation de la matière à lixivier (chalcopyrite) et de la culture bactérienne utilisée pour inoculer ces essais.

Ce chapitre est consacré à la présentation de la méthodologie utilisée pour réaliser ce travail expérimental. Dans un premier temps, la préparation des échantillons de chalcopyrite sera décrite, suivi de celle de la culture bactérienne utilisée pour produire les inocula. Puis les dispositifs et protocoles expérimentaux mis en œuvre pour les essais de biolixiviation de chalcopyrite seront détaillés. Enfin, les techniques et protocoles d'analyses physico-chimiques et biologiques utilisées pour caractériser les échantillons minéraux et ceux issus des opérations de biolixiviation seront présentées.

1. Préparation des échantillons de chalcopyrite

Les échantillons de chalcopyrite utilisés pour les essais de biolixiviation ont été obtenus à partir d'un concentré de chalcopyrite. Ce concentré a été préparé de manière à obtenir des échantillons dont la taille des particules est comprise dans un intervalle défini.

Le concentré de chalcopyrite brut est tout d'abord présenté, puis la préparation de la matière et enfin les échantillons finaux utilisés pour les essais de biolixiviation.

1.1. Concentré de chalcopyrite

Le concentré de chalcopyrite est issu d'un procédé de flottation, en provenance de la mine d'Aitik (Boliden, Suède). Deux lots ont été reçus au cours de la thèse (Tableau 2). Le lot n°1 a été utilisé pour déterminer la composition chimique du concentré de chalcopyrite en fonction de sa granulométrie (voir Annexe 1). Les essais de biolixiviation ont été réalisés avec des échantillons issus du lot n°2 préparés à deux fractions granulométriques différentes.

Tableau 2 - Lots de concentré de chalcopyrite reçus au cours de la thèse.

Numéro de lot de concentré de chalcopyrite	Année de réception	Origine	Masse (kg)
Lot n°1	2019	mine d'Aitik (Boliden, Suède)	9
Lot n°2	2020	mine d'Aitik (Boliden, Suède)	106

1.2. Préparation de la matière

Dans un premier temps, un échantillon du Lot n°1, obtenu par quartage avec un diviseur à rifles (Minemet), a été tamisé à 5 coupures granulométriques (160 µm, 100 µm, 63 µm, 40 µm et 20 µm) en voie humide. Les fractions granulométriques ont été séchées à 40°C, puis broyées finement (< 80 µm) avant d'être analysées (voir section 4.2.1).

Le lot n°2 a quant à lui été traité de manière à obtenir une fraction contenant des particules entre 20 et 100 µm (fraction 20-100 µm) et une fraction avec des particules ayant une taille inférieure à 20 µm (fraction < 20 µm) pour les essais de biolixiviation. Les différentes étapes du traitement sont résumées sur la Figure 19.

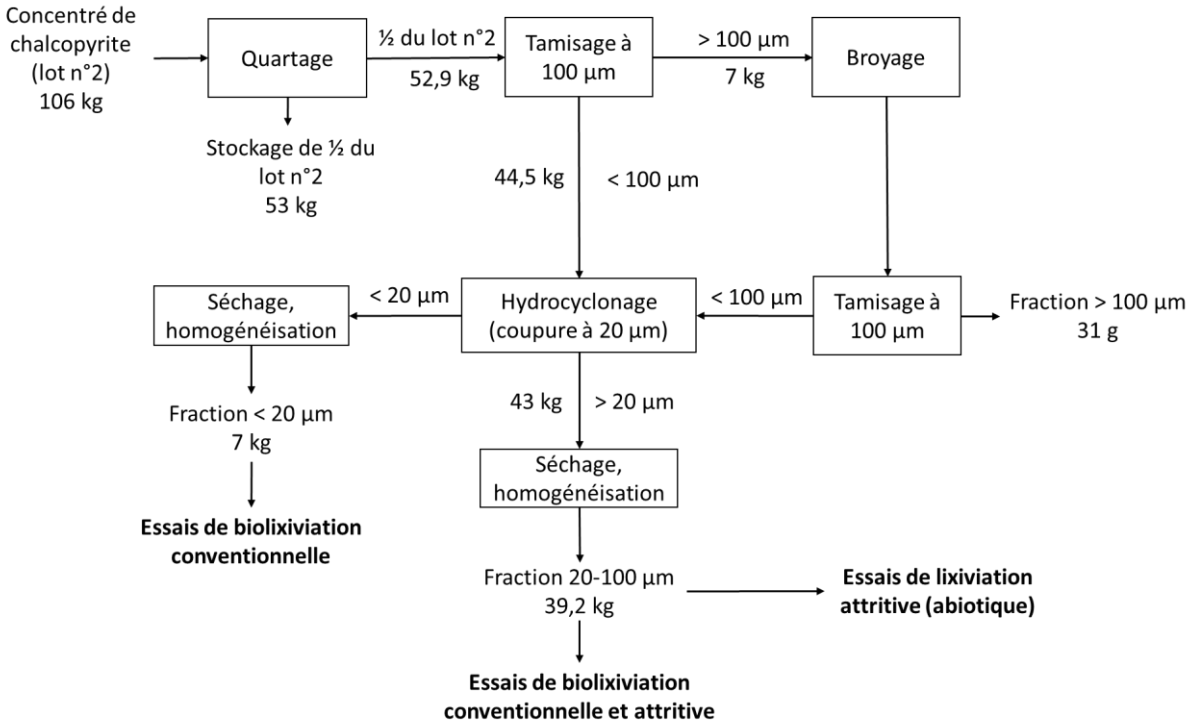


Figure 19 – Etapes du traitement du concentré de chalcopyrite (lot n°2) pour l'obtention des fractions 20-100 µm et < 20 µm.

Tout d'abord, le lot n°2 a été divisé en deux échantillons équivalents à l'aide d'un diviseur à rifles (Minemet) en voie sèche. L'un a été stocké, tandis que l'autre a été tamisé à 100 µm en voie sèche (Tamiseuses Roto-Sieve 400 mm). Afin de perdre le moins de matière possible, la fraction supérieure à 100 µm a été broyée dans un broyeur à meule (Siebtechnik Tema) avant d'être à nouveau tamisée à 100 µm. Les fractions inférieures à 100 µm issues des deux opérations de tamisage ont ensuite été mélangées dans un hydrocyclone (Mozley modèle C124) avec un diamètre interne de 51 mm, équipé d'une cheminée d'un diamètre de 11 mm, et d'une buse de sousverse de 4,5 mm. L'opération d'hydrocyclonage a été réalisée à 2 bars avec un taux de solide à l'alimentation entre 20 et 25% (m/m). Au vu de la quantité de matière à traiter et du matériel disponible, l'utilisation d'un hydrocyclone a été préférée au tamisage pour réaliser la coupure granulométrique à 20 µm. En effet, malgré une coupure moins précise, cette méthode permet d'obtenir une séparation granulométrique correcte (seulement 12 à 14% de particules inférieures à 20 µm dans la fraction 20-100 µm). Ainsi, deux opérations successives d'hydrocyclonage (retraitement de la sousverse obtenue à la première opération) ont été réalisées pour obtenir une fraction entre 20 et 100 µm et une fraction inférieure à 20 µm. Ces deux fractions ont ensuite été séchées à 40°C pendant une semaine, avant d'être émottées (homogénéisation).

1.3. Préparation des lots

Les fractions 20-100 µm et < 20 µm ont été quartées en différents lots d'échantillons équivalents de 220 g à 310 g environs avec un diviseur à rifles (Minemet), pour les essais de (bio)lixiviation. Les échantillons issus de la fraction 20-100 µm ont été utilisés pour les essais en lien avec l'étude du procédé de biolixiviation attritive et de la passivation de la chalcopyrite en biolixiviation. Les échantillons provenant de la fraction < 20 µm ont quant à eux été utilisés pour évaluer l'influence des particules fines sur la cinétique de biolixiviation de la chalcopyrite.

La caractérisation des fractions 20-100 µm et < 20 µm, et du concentré brut de chalcopyrite sera présentée au Chapitre III.

2. Culture bactérienne (production de l'inoculum)

Les inocula des essais de biolixiviation menés au cours de cette thèse sont obtenus à partir de la culture de bactéries impliquées dans les mécanismes biochimiques de la biolixiviation (bactéries ferro-oxydantes et bactéries sulfo-oxydantes). La culture de l'inoculum a consisté en une opération de biolixiviation d'un minerai, dont la dissolution produit les substrats nécessaires à l'activité et la croissance des bactéries. On parlera donc de cultures pour les opérations de biolixiviation réalisées dans le cadre de la préparation et l'entretien de l'inoculum, afin de les différencier des essais de biolixiviation de chalcopyrite. Une méthodologie a été mise en place pour entretenir un inoculum actif et similaire pour tous les essais de biolixiviation. L'inoculum « actif » est ici défini comme un inoculum dans lequel les bactéries sont actives et oxydent le fer ferreux (Fe^{2+}) et le soufre dès le début de l'opération de biolixiviation réalisée avec cet inoculum.

Tout d'abord, le consortium bactérien et le milieu nutritif utilisés seront décrits. La culture de l'inoculum sera ensuite détaillée avec la méthode adoptée pour maintenir et entretenir un inoculum actif. La validation de cette méthode a nécessité l'étude de la répétabilité de l'inoculum d'une culture à l'autre. La méthodologie appliquée pour cette étude sera également présentée.

2.1. Consortium bactérien et milieu nutritif

Le consortium utilisé pour les essais de biolixiviation, « nommé AKL », a été obtenu à partir des consortia suivants, issus de la banque de souche du BRGM :

- BRGM-KCC : consortium de référence au BRGM pour la biolixiviation et décrit dans les travaux de d'Hugues et al. (2008) comme étant composé des espèces *Leptospirillum ferriphilum*, '*Fervidacidithiobacillus caldus*' (anciennement *Acidithiobacillus caldus*), et *Sulfobacillus benefaciens*. Il est cultivé sur de la pyrite cobaltifère provenant de la mine de Kasese (Ouganda).
- Bioshale-BRGM : consortium issu du mélange entre le consortium BRGM-KCC et un second consortium cultivé sur un concentré de cuivre (Spolaore et al., 2011). Il est composé des espèces *Leptospirillum ferriphilum*, '*Fervidacidithiobacillus caldus*', *Sulfobacillus benefaciens*, et *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Hedrich et al., 2018). Ce consortium est cultivé sur un concentré de cuivre provenant de la mine de Lubin (Pologne).
- KCC-Aitik : consortium issu du consortium BRGM-KCC cultivé sur des résidus miniers (tailings) riche en pyrite de la mine d'Aitik (Guezennec et al., 2014). Les principales espèces bactériennes se développant sur ce substrat solide sont majoritairement celles présentent dans le consortium BRGM-KCC (Guézennec et al., 2017).

Ces trois consortia ont tout d'abord été cultivés séparément, puis mélangés en fin de culture pour former le consortium « AKL ». Ces cultures ont été réalisées en batch de 100 mL en erlenmeyer, à 42 °C, à 3% (m/m) de solide (masse de solide/masse pulpe), sur une durée de 15 jours en suivant le même protocole que celui décrit dans la section 2.2. En fin de culture du consortium AKL, la composition de la communauté bactérienne a été analysée. Les résultats de cette analyse montrent que le consortium AKL est majoritairement composé des espèces acidophiles et thermophiles modérées *L. ferriphilum* (autotrophe, oxyde le fer), '*F. caldus*' (autotrophe, oxyde le soufre), et *S. thermosulfidooxidans* (mixotrophe, oxyde le fer et le soufre) (Annexe 2).

Le milieu nutritif, qui contient les nutriments nécessaires au développement des bactéries, est le milieu « 0KM » (Guezennec et al., 2018) dont la composition est : 3,7 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)_2SO_4$, 0,48 $g.L^{-1}$ de KOH, 0,52 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4,7H_2O$, et 0,8 $g.L^{-1}$ de H_3PO_4 à 85%. Tous les essais de biolixiviation, y compris les cultures réalisées pour la préparation et l'entretien de l'inoculum, ont été réalisés avec ce milieu.

2.2. Culture de l'inoculum

La préparation et l'entretien de l'inoculum ont été réalisés par cultures successives du consortium AKL, l'objectif étant d'avoir un inoculum actif et similaire pour tous les essais de biolixiviation (conventionnelle ou attritive) de chalcopyrite. Avec la préparation de cet inoculum, se pose la question du substrat minéral à utiliser. En général, on utilise le solide que l'on souhaite ensuite mettre en œuvre dans les essais de biolixiviation, ici le concentré de chalcopyrite d'Aitik décrit au paragraphe précédent. Cependant, celui-ci se passive très rapidement, et se dissout donc très peu. L'apport de Fe^{2+} et de soufre qui résulte de cette dissolution est donc insuffisant pour soutenir la croissance et l'activité bactérienne. Plutôt que d'utiliser le concentré de chalcopyrite d'Aitik, il a donc été décidé de cultiver le consortium AKL avec un autre substrat, plus facilement utilisable par les bactéries.

Le minerai de culture sera tout d'abord décrit, puis le dispositif et le protocole de culture de l'inoculum seront détaillés. Enfin, la méthodologie appliquée pour l'étude de la répétabilité de l'inoculum d'une culture à l'autre sera présentée.

2.2.1. Minerai de culture

Le minerai utilisé pour la préparation et l'entretien de l'inoculum est un concentré de cuivre issu de minerais de type schiste noir (Kupferschiefer) (KGHM, mine de Lubin, Pologne). On le nommera « concentré de Lubin ». La composition chimique de ce concentré est indiquée dans le Tableau 3. On peut noter en particulier qu'il contient 13,9% de Cu contenu exclusivement dans des minéraux sulfurés. D'après, Rahfeld et al. (2018), les principaux sulfures de Cu présents dans le concentré de Lubin sont la bornite (Cu_5FeS_4, 36% des sulfures de Cu), la chalcocite (Cu_2S, 23%), et la chalcopyrite ($CuFeS_2$, 20%). Il contient également de la covellite (1%) et d'autres sulfures de cuivres (voir composition minérale globale en Annexe 3) (19% de la totalité des sulfures de cuivre) (Spolaore et al., 2009). Le concentré de Lubin contient également 15% (m/m) de pyrite et plus de 10% (m/m) de carbonate. Malgré une quantité significative de chalcopyrite, ce concentré contient des sulfures connus pour être rapidement oxydés en biolixiviation à pression atmosphérique, ce qui permet de générer rapidement le Fe^{2+} et S nécessaire à l'activité des bactéries (Spolaore et al., 2009 ; Hedrich et al., 2017 ; Guezennec et al., 2018). Une partie de l'énergie produite par cette activité est utilisée pour le développement bactérien. Comparé à un minerai de pyrite (FeS_2), aussi rapidement oxydables en biolixiviation, le concentré de Lubin permet de cultiver les bactéries dans des conditions opératoires plus proches de celles appliquées lors des essais de biolixiviation de la chalcopyrite (avec le concentré d'Aitik, la fraction 20-100 µm ou la fraction < 20 µm).

La distribution de la taille des particules du concentré de Lubin mesurée par granulométrie laser (voir section 4.2.3) indique une taille médiane d_{50} de 24,8 µm.

Tableau 3 - Composition (% (m/m) ou ppm) du concentré de Lubin déterminée par analyses chimiques (Guezennec et al., 2018). C_{tot} : Carbone total, C_{org} : Carbone organique, C_{min} : Carbone minéral, S_{SO4} : Soufre correspondant aux sulfates, $S_{sulfure}$: Soufre correspondant aux sulfures.

Ag	As	Ca	Co	Cu	Fe	Ni	Pb	S	Zn	C_{tot}	C_{org}	C_{min}	S_{SO4}	$S_{sulfure}$
ppm	ppm	%	ppm	%	%	ppm	%	%	%	%	%	%	%	%
644	438	3,51	134	13,9	8,7	46	4,50	13,7	1,21	9,84	8,30	1,53	0,58	12,3

2.2.2. Dispositif et protocole de culture de l'inoculum

Dans le cadre de la préparation de l'inoculum, le consortium AKL a tout d'abord été cultivé avec le concentré de Lubin dans des erlenmeyers de 250 mL avec un volume utile de 100 mL, maintenus à température constante dans un incubateur rotatif (agitation orbitale). Ces cultures sont inoculées à 10% (v/v) (10 mL pour 100 mL de culture) dans le milieu nutritif 0KM et maintenues à 42 °C. La vitesse d'agitation est de 100 rpm, et le taux de solide est de 3% (m/m).

Puis, afin d'adapter progressivement les bactéries à un taux de solide de 10% (m/m), les quatre premières étapes du protocole utilisé par Hedrich et al. (2016) ont été appliquées. Ainsi, à l'issue de 5 cultures en erlenmeyer, le consortium AKL a été repiqué dans un réacteur de 2L contenant 1800 mL de milieu nutritif, 200 mL d'inoculum (10% (v/v)) et 5% (m/m) de concentré de Lubin. A la fin de cette culture en réacteur (14 jours), le consortium a été repiqué à un taux de solide de 10% (m/m). Les inoculations se font toujours à 10% (v/v) avec un volume homogène de pulpe (phase liquide et particules). Le dispositif expérimental utilisé est identique pour les cultures à 5 et 10% (m/m) et est décrit dans la section 3.1.1 de ce chapitre.

Des repiquages successifs de la culture à 10% (m/m) de solide, dans les mêmes conditions, ont ensuite été réalisés afin d'entretenir un inoculum « actif » pour les essais de biolixiviation de chalcopyrite. La durée de chaque culture est de 6 ou 7 jours. Les cultures ont été réalisées à 42°C, avec un volume utile de 2 L, une agitation de 700 rpm et un débit d'air et de CO_2 de 60 et 0,6 $L.h^{-1}$ respectivement.

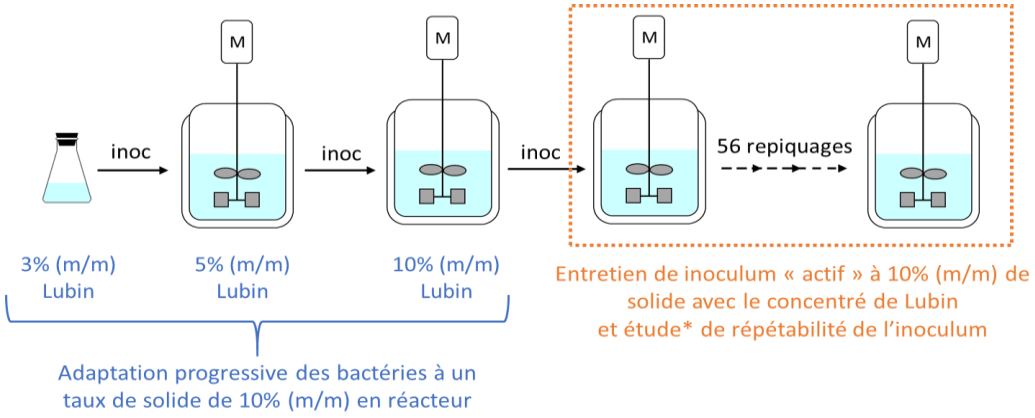


Figure 20 – Schéma récapitulatif de la préparation de l'inoculum (adaptation des bactéries à un taux de solide de 10% (m/m) en réacteur) et de son entretien. *L'étude de répétabilité de l'inoculum a été réalisée sur 34 cultures.

Au cours des cultures, le pH et le potentiel redox (Eh) sont suivis quotidiennement. Une fois par jour, la quantité d'eau évaporée est compensée par ajout d'eau ultra-pure, et le pH ajusté entre 1,6 et 1,7 avec de l'acide sulfurique à 96%, lorsque la valeur mesurée est supérieure à 1,7. Des prélèvements de pulpe sont réalisés quotidiennement pour mesurer la biomasse (concentration en bactéries) et les concentrations en métaux (cuivre et fer). Une mesure de la concentration en sulfate en fin de culture est réalisée pour les cultures utilisées pour inoculer les essais de biolixiviation de chalcopyrite. L'ensemble de ces techniques de mesures et d'analyses sont décrites dans la suite du chapitre.

2.2.3. Méthodologie pour l'étude de la répétabilité de l'inoculum

Lors d'une opération de biolixiviation (culture de l'inoculum ou essai de biolixiviation de chalcopyrite) la variation de certaines caractéristiques de l'inoculum est susceptible d'impacter les phénomènes et les cinétiques de réaction ayant lieu dans le système. Dans le cadre de la thèse, on cherche à maintenir ces caractéristiques les plus constantes possible d'un repiquage à l'autre de l'inoculum, afin d'éviter

qu'une trop forte variabilité de l'inoculum ne compromette l'interprétation des résultats d'essais. Cinq paramètres, dont la justification est donnée en suivant, sont sélectionnés dans ce travail pour caractériser l'état final d'une culture de l'inoculum. Il s'agit de :

- La biomasse mesurée à la fin de la culture (quantité finale de bactéries) ;
- Les concentrations finales en métaux (cuivre et fer) ;
- La concentration finale en Fe^{3+} en solution, qui est l'oxydant dans les réactions d'oxydation des sulfures (déduit de la mesure du potentiel et de la concentration totale en fer);
- La concentration finale en protons (H^+), mesurée via le pH.

L'activité bactérienne catalyse l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} (équation [24]) et permet d'oxyder le soufre élémentaire issu de l'oxydation des sulfures en sulfates (SO_4^{2-}) (équation [25]). La quantité de bactéries en fin de culture est donc une caractéristique importante de l'inoculum, car celle-ci détermine la quantité de bactéries à l'instant initial de la culture suivante. De même la concentration en Fe^{3+} en fin de culture peut avoir un impact sur l'oxydation des sulfures (équations [26] à [30] pour les sulfures contenus dans le concentré de Lubin (Hong et al., 2021, Hiroyoshi et al., 2001, Rawlings et Johnson, 1998, Cordoba et al., 2008, Schippers, 2004)), en particulier au début de la culture suivante. Dans le cas du concentré de Lubin, l'oxydation des sulfures peut être observée par le suivi des concentrations en cuivre et fer en solution. D'autre part, l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} consomme des protons (équation [24]), tandis que l'oxydation du S en produit ([25]). La concentration en protons en fin de culture via la mesure du pH est donc également une caractéristique importante à prendre en compte. Le suivi du potentiel redox au cours des cultures de l'inoculum permet aussi de déterminer si l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} est limitante par rapport à l'oxydation des sulfures (seules réactions consommant du Fe^{3+} dans le système).

$$4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{Bactéries Fe-ox}} 5Fe^{3+} + 2H_2O \quad [24]$$

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Bactéries S-ox}} 2SO_4^{2-} + 4H^+ \quad [25]$$

$$Cu_5FeS_2 + 12Fe^{3+} \longrightarrow 5Cu^{2+} + 13Fe^{2+} + 4S \quad [26]$$

$$CuFeS_2 + 4Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 5Fe^{2+} + 2S \quad [27]$$

$$Cu_2S + 2Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 2Fe^{2+} + CuS \quad [28]$$

$$CuS + 2Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 2Fe^{2+} + S \quad [29]$$

$$FeS_2 + 14Fe^{3+} + 8H_2O \longrightarrow 2SO_4^{2-} + 15Fe^{2+} + 16H^+ \quad [30]$$

Parmi les cultures réalisées pour l'entretien de l'inoculum, 34 cultures ont été intégrées dans l'étude de répétabilité de l'inoculum. Les cultures exclues sont des cultures de redémarrage après un arrêt dans la série de repiquage, des cultures dont la durée est plus longue, ou des cultures pour lesquelles au moins un problème technique (bouchage du système d'injection des gaz par exemple) ou un phénomène inhabituel et non-expliqué à ce jour (diminution ponctuelle de la concentration en fer au cours d'une culture sans raison particulière par exemple) a été rencontré.

Les 5 paramètres sélectionnés pour caractériser l'inoculum sont suivis tout au long des 34 cultures (dans le cas de la biomasse, seules 32 cultures ont été incluses, car elle a été mesurée avec un protocole

différent pour 2 des 34 cultures). Pour l'évaluation de la répétabilité de l'inoculum, on obtient pour chaque paramètre un jeu d'observations $X_{i=1,n}$ (où n = 32 ou 34 selon les paramètres) qui permet d'accéder aux estimateurs de propriétés statistiques d'intérêt dudit paramètre :

- Moyenne du paramètre, dont l'estimateur est décrit par sa valeur ponctuelle (moyenne arithmétique des n observations $X_{i=1,n}$) et son intervalle de confiance à 95%.
- Coefficient de variation (CV) du paramètre, rapport entre la moyenne et l'écart-type des n observations, dont l'estimateur est décrit par sa valeur ponctuelle et son intervalle de confiance à 95%. Le CV est un marqueur pertinent de la dispersion des mesures autour de leur moyenne.

L'intervalle de confiance à 95% de la moyenne ou du CV des n observations, pour chaque paramètre, est estimé en utilisant la méthode du bootstrap, une méthode classique de ré-échantillonnage, ici utilisée avec 5000 tirages pour chaque jeu de n = 32 ou 34 observations. Le choix calculatoire d'utiliser cette méthode d'estimation des intervalles de confiance des estimateurs d'intérêt réside dans le fait qu'elle ne présage pas de la nature de la distribution statistique qui sous-tend les observations.

A notre connaissance, la répétabilité d'un inoculum entretenu par repiquage et utilisé pour différents essais de biolixiviation n'a jamais été étudiée dans la littérature. Dans le cadre de notre étude, la répétabilité de l'inoculum d'un repiquage à l'autre sera évaluée sur la base de l'invariance statistique de la moyenne et du CV pour les 5 paramètres sélectionnés.

Une évaluation de la contribution de la variabilité propre à l'inoculum sera réalisée par soustraction de la variabilité du mesurage de la variabilité expérimentale, lorsque l'incertitude de mesure a pu être déterminée (concentrations en cuivre et en fer et biomasse).

3. Dispositif et protocoles expérimentaux de (bio)lixiviation de chalcopyrite

Dans le cadre des essais de biolixiviation de chalcopyrite, deux dispositifs expérimentaux ont été utilisés selon le type d'essai (biolixiviation attritive ou biolixiviation conventionnelle). Le réacteur utilisé pour les essais de lixiviation attritive a été mis au point au LGC pour des essais en conditions abiotiques (Dakkoune et al., 2023), puis transféré et adapté au BRGM pour des essais en conditions biotiques.

Le dispositif et le protocole expérimental, ainsi que les conditions opératoires appliquées lors des essais de biolixiviation conventionnelle sont présentés, suivi de ceux des essais de biolixiviation attritive.

3.1. Biolixiviation conventionnelle

Des essais de biolixiviation conventionnelle ont été réalisés afin de servir de référence aux essais de biolixiviation attritive. Les essais ont été menés sans phénomène d'attrition (absence de média broyant). Le dispositif, le protocole expérimental et les conditions opératoires sont décrits ci-après.

3.1.1. Dispositif expérimental

Le dispositif des essais de biolixiviation conventionnelle est constitué d'un réacteur d'une capacité de 2 L équipé de 4 contre-pales et d'une double-enveloppe permettant la circulation d'eau pour maintenir une température constante dans le réacteur. La température de cette eau est régulée par un cryothermostat et un thermocouple placé dans le réacteur. Le système d'agitation est composé d'une turbine Rushton standard à 6 pales, et une hélice marine à 3 pales inclinées à 45°C. De l'air enrichi avec du CO_2 (1%) est également injecté sous le système d'agitation pour une bonne dispersion du gaz. Pour limiter l'évaporation d'eau, un réfrigérant relié à un cryothermostat, dans lequel circule de l'eau entre 5 et 10°C, est placé au niveau du couvercle du réacteur.

Le dispositif expérimental est également équipé d'un système de régulation du pH (Figure 21) composé d'une électrode pH (Solitrode, Metrohm) reliée à un titreur (Dosino, Metrohm) permettant l'ajout d'acide (H_2SO_4 à 96%) ou de base (Na_2CO_3 à 2M).

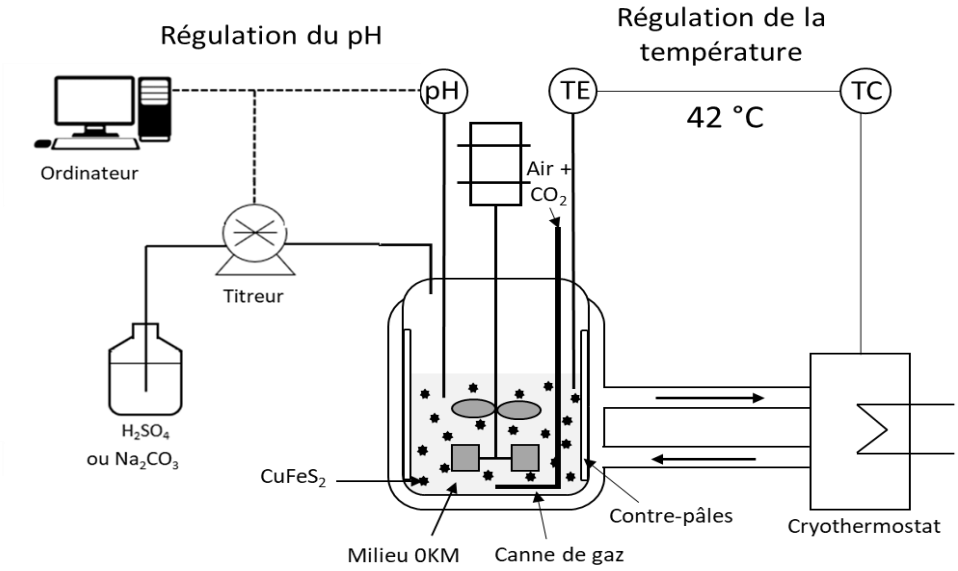


Figure 21 - Dispositif expérimental des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite.

3.1.2. Protocole expérimental et conditions opératoires

Les matériaux utilisés sont ceux issus du concentré de chalcopyrite (concentré brut, fraction 20-100 µm ou fraction < 20 µm) et les essais sont inoculés avec l'inoculum cultivé en réacteur à 10% (m/m) de solide avec le concentré de Lubin.

Tous les essais sont réalisés en batch à 42 °C, avec un taux de solide à 10% (m/m), une vitesse d'agitation à 700 rpm et des débits en air et CO_2 de 60 $L.h^{-1}$ et 0,6 $L.h^{-1}$ respectivement. Ils ont été inoculés à 10% (v/v). Les conditions opératoires spécifiques à chaque essai de biolixiviation conventionnelle sont indiquées dans le Tableau 4.

Tableau 4 - Conditions opératoires particulières pour chaque essai de biolixiviation conventionnelle (42°C, 10% (m/m), 700 rpm, 60 $L.h^{-1}$ air, 0,6 $L.h^{-1}$ CO_2).

N° de l'essai	Dénomination des essais dans le Chapitre IV	Durée (jours)	Matériau utilisé	Régulation continue du pH
1	20-100 µm	15	Fraction 100-20 µm	non
2	brut	15	Concentré chalcopyrite brut	non
3	< 20 µm	15	Fraction < 20 µm	non
4	pH régulé (réplicat)	7	Fraction 100-20 µm	oui (pH = 1,3)
5	pH non-régulé (réplicat)	7	Fraction 100-20 µm	non

Pour chaque essai, la quantité d'eau évaporée est compensée par ajout d'eau ultra-pure une fois par jour. Le pH et le potentiel redox sont suivis au minimum quotidiennement. Pour les essais sans régulation automatique et continue du pH, ce dernier est ajusté manuellement entre 1,7 et 1,6 avec de l'acide sulfurique (96%) si la valeur mesurée est supérieure à 1,7. Dans le cas où le pH est régulé en continue à 1,3, la régulation automatique et l'enregistrement des mesures (pH et volume d'acide/de

base ajouté, une mesure par minute) sont réalisés grâce au logiciel Tiamo 2.5 (Metrohm). Pour minimiser la dérive des mesures, l'électrode pH est calibrée quotidiennement, et la valeur du pH après calibration est systématiquement vérifiée avec une autre électrode pH (Sentix®41, WTW). D'autre part, une électrode de platine (Blueline 32 Rx, SI Analytics) a été placée dans le réacteur pendant les deux et trois premiers jours des essais de biolixiviation conventionnelle n°1 et 2, et de l'essai n°3 respectivement (voir Tableau 4), pour une mesure du potentiel redox en continu. Des mesures ponctuelles d'oxygène dissous sont également réalisées à l'aide d'un capteur optique d'oxygène dissous (VisiProDO, avec membrane ODO Cap H0, Hamilton) et du logiciel d'acquisition ArcAir (Hamilton).

Le potentiel redox est mesuré en mV vs. Ag/AgCl. La mesure est ensuite rapportée vis-à-vis de l'électrode normale à hydrogène (Standard Hydrogen Electrode (SHE)) en tenant compte de la température selon l'équation [31] :

$$\mathrm{Eh\ [mV\ vs.\ SHE]} = \mathrm{Eh_{mes}} + 225{,}07 - 0{,}7443 \times \mathrm{T} - \mathrm{Eh_{220}} - (262.226 - 1.692 \times \mathrm{T_{220}}) \qquad [31]$$

avec Eh_{mes} le potentiel redox mesuré en mV vs. Ag/AgCl, T la température dans le réacteur (en °C), Eh_{220} le potentiel de la solution de référence (en mV vs. Ag/AgCl) et T_{220} la température de la solution de référence (°C). Cette formule prend en compte les données constructeurs (WTW) sur l'évolution de l'électrode de référence Ag/AgCl/KCl en fonction de la température. Elle prend également en compte une déviation potentielle de la mesure de la sonde au cours de son utilisation, qui est évaluée quotidiennement par rapport à une solution de référence à 220 mV (Hach).

Des prélèvements de pulpe sont réalisés quotidiennement pour mesurer la biomasse et les concentrations en métaux (Cu, Fe, et K), et éventuellement en sulfates (essais n°1 à 3, voir Tableau 4). D'autres échantillons de pulpe sont prélevés ponctuellement au cours des essais pour analyser la communauté bactérienne par des approches biomoléculaires. Des mesures d'oxygène dissous ont également été réalisées ponctuellement.

En fin d'essai, la pulpe est récupérée puis filtrée sur un filtre en microfibre de verre (grade GF/B, Whatman). Le filtrat est ensuite filtré à nouveau sur le même filtre. Puis, le résidu est lavé avec de l'eau acidifiée à pH 1,8 pour éliminer toute trace résiduelle de métaux dissouts), avant d'être séché à 40°C, pesé, puis émotté. Un échantillon représentatif du résidu est ensuite finement broyé (< 80 µm) avant d'être analysé pour déterminer sa composition chimique. Des échantillons du filtrat et de la solution de lavage sont également prélevés pour mesurer les concentrations en cuivre, en fer, en potassium, et éventuellement en sulfates (essais n°1 à 3, voir Tableau 4) en solution.

3.2. Biolixiviation attritive

Les essais de biolixiviation attritive ont pour objectif de réaliser l'attrition lixiviante en présence de bactéries. L'attrition est générée par l'utilisation d'un média broyant (billes de verres de taille millimétrique) dans un réacteur dédié. Dans un premier temps, le dispositif expérimental sera présenté, suivi du protocole et des différentes conditions opératoires étudiées.

3.2.1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour les essais de (bio)lixiviation attritive est représenté sur la Figure 22. Les différences principales entre le dispositif utilisé pour les essais de biolixiviation attritif et celui utilisé pour les essais de biolixiviation conventionnelle sont les dimensions du réacteur, le mobile d'agitation, et l'utilisation de billes de verre (média broyant). Ces derniers ont été choisis et utilisés pour obtenir un environnement attritif au sein du réacteur.

Le réacteur a une capacité de 6 L et est muni d'une vanne de drainage pour la vidange du réacteur en fin d'essai. La température dans le réacteur est maintenue constante par circulation d'eau dans la double enveloppe. La température de l'eau qui circule est régulée par un cryothermostat et un thermocouple positionné dans le réacteur. De l'air enrichi en CO_2 (1%) est injecté dans le réacteur au niveau du mobile d'agitation. L'agitation est assurée par un agitateur à 4 pales en Téflon (Figure 22b) permettant la dispersion du gaz ainsi que la suspension du solide et des billes de verre. Ces dernières ont un diamètre variant entre 1,25 et 1,65 mm de diamètre (Netzsch Glassbeads 1.5). Comme pour le réacteur de biolixiviation conventionnelle, un réfrigérant relié à un cryothermostat, dans lequel circule de l'eau entre 5 et 10°C, a été placé au niveau du couvercle du réacteur. Celui-ci permet de limiter les phénomènes d'évaporation. Pour protéger les sondes de mesures (pH, potentiel redox) de l'environnement attritif, deux tubes en inox sont positionnés dans le réacteur de manière à ce que l'extrémité des sondes puisse être immergée dans la pulpe en agitation (Figure 22b). L'extrémité de ces tubes est équipée d'une grille en inox avec une taille de maille légèrement inférieure à la taille des billes.

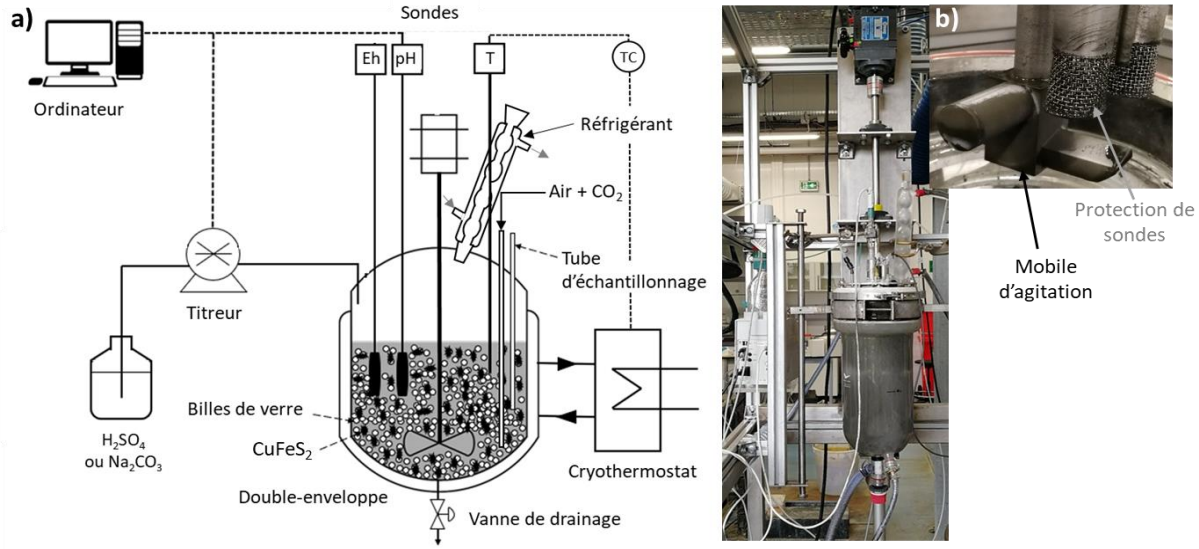


Figure 22 - (a) Dispositif expérimental (modifié de Dakkoune et al., 2023) ; (b) mobile d'agitation et extrémités des protections de sondes utilisés lors des essais de biolixiviation attritive.

3.2.2. Protocole expérimental et conditions opératoires

Tout d'abord, 2430 mL de milieu nutritif acidifié à pH 2 avec de l'acide sulfurique (96%), 250 g de billes, et environ 310 g (soit 10% (m/m)) ou 150 ± 9 g (soit 5% (m/m)) de chalcopyrite (fraction 100-20 µm) sont introduits dans le réacteur. Puis, 270 mL d'inoculum sont ajoutés, l'air enrichi en CO_2 est injecté en continu dans le réacteur, et le pH est ajusté puis régulé à 1,3 jusqu'à la fin de l'essai. Dans le cas d'un essai abiotique (attrition lixiviante), le volume de milieu nutritif est de 2700 mL au lieu de 2430 mL, et 4,3 g de $Fe_2(SO_4)_3$ sont ajoutés au début de l'essai à la place de l'inoculum (masse de $Fe_2(SO_4)_3$ environ équivalente à la quantité de Fe^{3+} ajoutée avec l'inoculum). Tous les essais ont été réalisés avec la fraction 20-100 µm, à 42°C, avec un débit d'air de 30 $nL.h^{-1}$, un débit de CO_2 de 0,3 $nL.h^{-1}$, et une vitesse d'agitation à 556 rpm. Cette vitesse permet la mise en suspension complète de l'ensemble des solides (concentré et billes). Chaque essai a été inoculé avec un inoculum cultivé en réacteur à 10% (m/m) de solide avec le concentré de Lubin (Chapitre II, section 2.2.2), excepté l'essai de biolixiviation attritive n°10 (Tableau 5) qui a été inoculé avec de la pulpe prélevée à la fin de l'essai n°7 (Tableau 5). Les conditions opératoires spécifiques à chaque essai de biolixiviation attritive sont indiquées dans le Tableau 5.

Tableau 5 - Conditions opératoires particulières des essais de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante (42°C, pH 1,3, 250 g de billes, 556 rpm, 30 $nL.h^{-1}$ air, 0,3 $nL.h^{-1}$ CO_2). NA : non applicable.

N° des essais	Noms des essais	Taux de solide (% (m/m))	inoculum	Durée des essais (jours)
6	AL 5%	5	NA	14
7	BL 5% (1)	5	Culture avec le concentré de Lubin	14
8	BL 5% (2)	5	Culture avec le concentré de Lubin	14
9	BL 10%	10	Culture avec le concentré de Lubin	21
10	BL 5%rep	5	BL 5% (1)	14
11	Test BA	10	Culture avec le concentré de Lubin	16
12	Test AL	10	NA	7

Pour chaque essai, la quantité d'eau évaporée est quotidiennement compensée par ajout d'eau ultra-pure. Le pH et le potentiel redox sont mesurés respectivement via une électrode pH (LL-Unitrode SC, Metrohm) et une électrode de platine (Blueline 32 Rx, SI Analytics) chacune placée dans une des protections de sonde. Ces paramètres sont mesurés en continu, hormis lorsque l'arrêt momentané des mesures est nécessaire, en particulier pour des manipulations au cours des suivis quotidiens. La régulation automatique du pH et l'enregistrement des mesures (pH et volume d'acide/de base ajouté, une mesure par minute) sont réalisés grâce au logiciel Tiamo 2.5 (Metrohm). L'électrode pH est calibrée et entretenue (niveau de KCl dans la sonde ajusté si nécessaire avec du KCl 3M) au minimum deux fois par semaine, et la valeur de pH est vérifiée quotidiennement avec une seconde électrode pH (Sentix®41, WTW). Les mesures d'oxygène dissous sont réalisées ponctuellement à l'aide d'une sonde à oxygène optique (FDO 925, WTW). Après chaque passage dans le réacteur, les sondes sont rincées à l'eau ultra-pure pour récupérer le solide collé sur les sondes. Ce solide est réintroduit dans le réacteur le jour suivant après décantation pendant une journée dans un bécher et élimination du surnageant. Cette récupération du solide n'a pas été réalisée au cours des tests préliminaires de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante (essai n°11 et 12 respectivement (Tableau 5)). En fin d'essai, le contenu du réacteur est récupéré sur un tamis avec une maille de 80 µm pour séparer la pulpe des billes. Puis, cette pulpe est filtrée sur un filtre en microfibre de verre (grade GF/B, Whatman) et le filtrat obtenu est filtré à nouveau sur le même filtre pour éliminer les particules et colloïdes résiduels. De l'eau acidifiée à pH 1,8 avec de l'acide sulfurique (96%) est ensuite utilisée pour laver les billes et rincer le réacteur et les équipements qu'il contient (protection de sondes, agitateur, canne de gaz, tube de prélèvement, etc.), afin de récupérer le solide resté dans le dispositif. La pulpe obtenue après rinçage du réacteur et des billes est ensuite filtrée comme pour la pulpe prélevée à l'étape précédente. Les résidus obtenus en fin de filtration sont lavés avec l'eau acidifiée à 1,8 avant d'être séchés à 40°C. Les billes sont également séchées à 40°C. Une fois secs, les billes et les résidus sont pesés. Les résidus sont par la suite émottés, et des échantillons représentatifs de chaque résidu sont finement broyés (< 80 µm) avant d'être analysés pour déterminer leur composition chimique.

Des prélèvements de pulpe sont réalisés quotidiennement au cours des essais afin de mesurer la concentration en cuivre et en fer dissous, et ponctuellement dans le cas de la concentration en sulfates dissous. Les concentrations en cuivre, en fer et en sulfates dissous sont aussi mesurées dans les filtrats et les solutions de lavages de chaque résidu à la fin de chaque essai. Des échantillons de pulpe sont prélevés quotidiennement au cours des essais pour mesurer la biomasse et analyser la communauté

bactérienne par des approches biomoléculaires. Au cours de tests préliminaires de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante, des prélèvements ponctuels de pulpe ont également été réalisés pour analyse granulométrique (après environ 1 et 4 jours d'opération). Ces échantillons ont été dilués avec de l'eau ultra-pure dans un flacon de 40 mL et conservés à 4°C avant de réaliser l'analyse (voir section 4.2.3).

3.2.3. Tests de viabilité

Les tests de viabilité ont été réalisés uniquement pour les essais de biolixiviation attritive, afin de déterminer si les bactéries soumises à un environnement attritif sont toujours capables de se développer dans des conditions favorables à leur croissance. Ces tests permettent de vérifier si le réacteur contient des bactéries vivantes et capables d'oxyder le Fe^{2+} et le S.

Ces tests sont réalisés en erlenmeyer avec 90 mL de milieu nutritif acidifié à pH 2 additionné de 4 g de $FeSO_4,7H_2O$ et de 0,9 g de S. Puis, les erlenmeyers sont inoculés avec 10 mL de pulpe provenant de l'essai de biolixiviation attritive en cours et le pH ajusté à 1,7. Les cultures sont incubées à 42°C dans un incubateur rotatif avec une agitation à 100 rpm. Le nombre de tests par essai dépend des phénomènes observés au cours de ces essais. Un test de viabilité témoin est également réalisé à l'instant initial des essais de biolixiviation attritive, selon le protocole décrit ci-dessus, sur l'inoculum utilisé pour l'essai de biolixiviation attritive en cours.

Le pH, le potentiel redox et la biomasse sont suivis tous les trois jours. L'évaporation de l'eau est compensée avec de l'eau distillée à chaque suivi. En fin de test, un échantillon de pulpe est prélevé pour analyser la communauté bactérienne par des approches biomoléculaires.

4. Analyses physico-chimiques

Cette section détaille l'ensemble des analyses physico-chimiques. La préparation et l'analyse de la phase liquide des échantillons de pulpe sont détaillées dans un premier temps, suivi de la description de la préparation et de l'analyse des échantillons solides (concentrés de chalcopyrite, phase solide de la pulpe, résidus solides en fin d'essai).

4.1. Analyse des échantillons liquides

Chaque échantillon de pulpe prélevé (3 à 5 mL) pour mesurer les concentrations en métaux et plus ponctuellement en sulfates et potassium en solution est filtré à 0,45 µm. La **concentration en sulfates** en solution est mesurée sur le filtrat non dilué par chromatographie ionique (940 Professional IC Vario, Metrohm) avec une colonne échangeuse d'anion (Metrosep A Supp 7 - 250/4.0, Metrohm).

Une partie de l'échantillon filtré est diluée à 1/10 dans une fiole jaugée et conservée à 4°C avant analyse pour la mesure des concentrations en métaux (cuivre, fer, et éventuellement potassium). Cet échantillon est ensuite à nouveau dilué par 20, 50 ou 100 (facteur de dilutions finaux : 200, 500 ou 1000) dans des tubes de 5 mL par pipetage. Les dilutions sont réalisées avec de l'acide nitrique (HNO_3) (1%). Les **concentrations en cuivre, fer** en solution ont été mesurées par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) (Varian SpectrAA-300) pour une partie des cultures de l'inoculum en réacteur (32 premières cultures de l'inoculum en réacteur réalisées), et par spectrométrie d'émission atomique par plasma micro-ondes (MP-AES) (4210 MP-AES, Agilent Technologies) pour toutes les autres cultures et les essais de biolixiviation de chalcopyrite. La **concentration en potassium** a également été mesurée par MP-AES. Les résultats obtenus par ces deux dernières méthodes sont proches (écart au plus de l'ordre de 0,7 $g.L^{-1}$ pour les concentrations en cuivre et en fer). L'erreur relative sur la mesure de la

concentration en cuivre et en fer est de 5%. Une méthodologie adaptée de Brochot et al. (2022), qui repose sur la propagation de variance a été utilisée pour estimer cette erreur (voir Annexe 4).

La **concentration en fer ferrique** (Fe^{3+}) est calculée à partir du ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} en solution (lui-même déterminé à partir de la mesure de potentiel redox (Eh) selon l'équation empirique de Yue et al. (2014) (équation [32])), et de la concentration de fer totale en solution (équation [33]).

$$Eh\ [mV\ vs.SHE] = -10^{-3} \times (T[K])^2 + 0{,}91T[K] + \frac{2{,}303RT[K].10^3}{nF} log(\frac{Fe^{3+}}{Fe^{2+}}) + 492 \quad [32]$$

$$Fe^{3+}\ [g.L^{-1}] = \frac{Fe_{tot}}{1 + \frac{Fe^{2+}}{Fe^{3+}}} \quad [33]$$

Avec Fe_{tot} la concentration en fer (totale) en solution en $g.L^{-1}$.

A partir des concentrations en cuivre, la **quantité de cuivre dissoute** ($Cu_{dissous}$) et le **rendement de dissolution du cuivre** sont calculés selon les équations suivantes :

$$Cu_{dissous}\ [mol] = (C_{Cu} \times V + m(Cu)_{prélèv} - m(Cu)_{inoc}) \quad [34]$$

$$Rendement\ en\ Cu\ (\%) = \frac{m(Cu)_{sol} + m(Cu)_{prélèv} - m(Cu)_{inoc}}{m(Cu)_{solide}} \quad [35]$$

Où C_{Cu} est la concentration en cuivre en solution (en $g.L^{-1}$), V le volume de liquide (en L), $m(Cu)_{prélèv}$ la masse de cuivre perdue dans la phase liquide des prélèvements (en g), $m(Cu)_{inoc}$ la masse de cuivre provenant de l'inoculum (en g), $m(Cu)_{sol}$ la masse de cuivre en solution (en g) égale au produit C_{cu} x V, et $m(Cu)_{solide}$ la masse de cuivre introduite dans le réacteur (en g).

La masse de cuivre perdue dans les prélèvements est calculée selon l'équation [36] et la masse de cuivre contenue dans l'inoculum est calculée selon l'équation [37].

$$m(Cu)_{prélèv}[g] = \sum_{i=1}^{n} C_{Cu_prélèv_i} \times V_i \quad [36]$$

$$m(Cu)_{inoc}[g] = C_{Cu_inoc} \times V_{inoc} \quad [37]$$

Avec $C_{Cu_prélève_i}$ la concentration en cuivre dans le prélèvement i, V_i le volume du prélèvement i, C_{Cu_inoc} la concentration en cuivre dans l'inoculum ($g.L^{-1}$) et V_{inoc} le volume de l'inoculum.

La quantité de fer dissoute et le rendement en fer sont calculés à partir de la concentration en fer de manière analogue à la quantité de cuivre dissoute et au rendement en cuivre respectivement.

4.2. Analyse des échantillons solides

Quatre types d'analyses sont réalisées sur les échantillons solides (matériaux utilisés pour les essais de biolixiviation de chalcopyrite et les résidus obtenus à l'issu de ces essais) et éventuellement la fraction solide des échantillons de pulpe. La composition chimique des échantillons solides est déterminée par des analyses chimiques, la composition minérale par Diffraction des Rayons X (DRX), la distribution de la taille des particules par analyse au granulomètre laser, et la surface spécifique par la méthode BET. Les parties suivantes détaillent les protocoles et appareils utilisés pour ces analyses.

4.2.1. Analyses chimiques

Les différentes méthodes d'analyse utilisées pour déterminer la composition chimique des solides sont détaillées ci-dessous (analyses réalisées par la société ALS (Loughrea, Irlande)) :

- Les concentrations en métaux sont déterminées par ICP-AES après une digestion oxydative (cuivre et fer par exemple) ou acide (potassium et aluminium par exemple) selon des protocoles permettant la dégradation de tous les sulfures (analyse ME-ICPORE et ME-ICP61 respectivement).
- Les concentrations totales en carbone et en soufre sont déterminées à l'aide d'un analyseur LECO (oxydation dans un four à induction couplée à une analyse infrarouge) (analyse ME-IR08). Cette technique est également utilisée pour déterminer la concentration en carbone organique, après dissolution de l'échantillon dans de l'acide chloridrique (HCl) et filtration, et la concentration en sulfure, après dissolution de l'échantillon dans une solution de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3) chauffée, puis filtration (analyse C-IR06).
- La concentration en sulfate est mesurée selon deux méthodes en fonction de la gamme de concentration attendue. Pour les lots de concentré de chalcopyrite, et les fractions granulométriques issues de ces lots, une faible concentration en sulfate est attendue. Elle est donc mesurée par ICP-AES après lixiviation des échantillons dans une solution de carbonate de sodium, filtration et acidification du filtrat (analyse S-ICP19). Pour les échantillons de résidus de biolixiviation, une plus forte concentration en sulfate est attendue. Elle est donc mesurée par gravimétrie après lixiviation des sulfates présents dans l'échantillon avec une solution de carbonate de sodium, puis filtration et précipitation des sulfates en tant que sulfates de baryum ($BaSO_4$) (analyse S-GRA06).
- La concentration en soufre élémentaire est déterminée par lixiviation dans une solution de disulfure de carbone (CS_2), puis évaporation d'une aliquote du lixiviat jusqu'à obtenir un résidu sec, pesé en tant que soufre élémentaire (analyse S-GRA07).
- Enfin, la concentration en silice est mesurée par ICP-AES après fusion au peroxyde de sodium (analyse Si-ICP81).

4.2.2. Mesure de la composition minérale

L'identification des phases minérales présentes dans les différents échantillons solides secs est réalisée par diffraction des rayons X (DRX). Les échantillons sont dans un premier temps micronisés (RXD Mcrome, Recht) par voie humide avec de l'éthanol (7 mL) à vitesse maximale pendant 5 min. Le produit micronisé est ensuite séché à 40°C, puis émotté avant analyse dans un diffractomètre (Bruker D8 Advance Da Vinci) équipé d'une source de rayonnement Cu-Kα (40 kV et 40 mA) et d'un détecteur linéaire LYNXEYE XE-T. Les données sont collectées entre 4 et 90°Θ avec un pas de 0,03°Θ par le logiciel d'acquisition Diffrac Stat Jobs. L'identification des phases est réalisée sur le logiciel Diffrac Eva V5.1 avec la base de données ICDD.

4.2.3. Mesure de la taille des particules

La distribution de la taille des particules dans les échantillons contenant du solide, est mesurée par granulométrie laser (Mastersizer, Malvern) avec une cellule de 2,4 mm et un faisceau de longueur 2,4 mm. Les données sont collectées par le logiciel Mastersizer-Sv2.18F (Malvern) jusqu'à atteindre 7500 particules pour une mesure de distribution de taille de particules dans un échantillon. Selon le type d'échantillons, ces derniers sont préalablement préparés de manières différentes :

- Les échantillons des lots de concentré de chalcopyrite et des fractions granulométriques issues de ce concentré sont mélangés avec de l'eau, puis agités pendant 4 h pour casser les agglomérats. La suspension obtenue est ensuite tamisée à 315 µm pour enlever les « grosses » impuretés, et ainsi éviter d'endommager l'appareil. Puis, cette suspension est à nouveau agitée pendant 15 minutes en appliquant des ultrasons et en ajoutant 10 mL de DISPEX (10 $g.L^{-1}$) et 10 mL de l'héxamétaphosphate de sodium (HMP) (10$mg.L^{-1}$). Une partie de l'échantillon est ensuite prélevée sous agitation et introduite dans le « Sample presentation unit » du granulomètre laser où 1 min d'ultrasons est appliquée avant la mesure.
- Les échantillons de résidus de biolixiviation sec, sont préparés de façon similaire aux échantillons précédents, excepté qu'au lieu d'agiter la suspension pendant 4 h, celle-ci est agitée pendant 30 min à 1 h en appliquant des ultrasons pour rompre les agglomérats.
- Les échantillons de pulpes prélevés durant les tests préliminaires de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante sont transvasés dans un récipient contenant le minimum d'eau pour permettre une première agitation de l'échantillon avec ultrasons pendant 10 min. Du DISPEX (10 $g.L^{-1}$) et de HMP (10 $g.L^{-1}$) sont également ajoutés en début d'agitation avec un volume égal à 1/5 du volume de la suspension. Cette-dernière est ensuite tamisée à 315 µm. Une partie de l'échantillon est ensuite prélevée sous agitation et introduite dans le « Sample presentation unit » du granulomètre laser ou 5 min d'ultrasons sont appliquées avant la mesure.

Pour toutes les préparations, la masse de la fraction supérieure à 315 µm est négligeable par rapport à la masse de l'échantillon.

4.2.4. Mesure de la surface spécifique

La surface spécifique a été mesurée par la méthode BET, seulement pour les échantillons du concentré de chalcopyrite brut et les fractions 20-100 µm et < 20 µm. Dans un premier temps, le dégazage de l'échantillon a été réalisé sous vide (VacPrep 061, Micromeritics) pendant une semaine à température ambiante, afin d'enlever les impuretés, les traces d'humidité à la surface de l'échantillon (y compris dans les pores). Puis, après avoir mesuré la masse de l'échantillon, ce-dernier est placé dans l'analyseur (ASAP 2050, Micromeritics). Les mesures sont réalisées par adsorption de N_2. Le logiciel d'acquisition des données est ASAP 2050 V1.01 (Micromeritics).

4.3. Bilan de matière, protons produit

A partir des résultats d'analyse sur les échantillons liquides et solides, des bilans de matière sont réalisés sur la phase solide ou sur l'ensemble de la pulpe (phases liquide et solide) en fin d'essai.

Les bilans de matière sur la phase solide ont été réalisés pour le soufre élémentaire et les SO_4^{2-} selon l'équation [38].

$$m_{init_x} - m_{résidu_x} = m_{prod_x} - m_{conso_x} \quad [38]$$

Avec m_{init_x} la masse de l'espèce x dans le matériau à lixivier (en g), $m_{résidu_x}$ la masse de l'espèce x dans le résidu (g), m_{prod_x} la masse produite de l'espèce x (en g), et m_{conso_x} la masse consommée de l'espèce x (g). L'espèce x fait ici référence au soufre élémentaire ou aux ions sulfates.

Les pertes en cuivre et en fer ont été calculées à partir d'un bilan de matière sur la pulpe pour chacun de ces métaux (équation [39]).

$$m_{init_CF} + m_{liq_i} = m_{résidu_CF} + m_{liq_f} \quad [39]$$

Avec m_{init_CF} et $m_{résidu_CF}$ les masses de cuivre ou de fer dans le matériau à lixivier et dans le résidu (en g), et m_{liq_i} et m_{liq_f} les masses de cuivre ou de fer dans la phase liquide à l'instant initial et à la fin d'un essai de biolixiviation (en g).

En ce qui concerne la quantité de protons produite (H^+_{prod}), elle est calculée de deux manières différentes selon si le pH est régulé ou non au cours de l'essai de biolixiviation.

Dans le cas où le pH n'est pas régulé, la quantité de protons produite est calculée à partir des mesures de pH selon l'équation [40].

$$H^+_{prod}\ [mol] = \sum_{t=0}^{t_f-1} (10^{-pH_{t+1}} - 10^{-pH_t}) \times V \qquad [40]$$

Avec t_f la durée de l'essai de biolixiviation (en jour) et pH_t et pH_{t+1} les pH mesurés à l'instant t et t+1 respectivement.

Dans le cas où le pH est régulé, la quantité de protons produite est calculée à partir des concentrations et des volumes d'acide (H_2SO_4) et de base (Na_2CO_3) ajoutés (équation [41]) (sachant qu'à un pH de 1,3, l'ion CO_3^{2-} est sous forme de $H_2CO_{3(aq)}$ et consomme donc 2 protons).

$$H^+_{prod}\ [mol] = 2 \times C_{Na2CO3} \times V_{Na2CO3} - 2 \times C_{H2SO4} \times V_{H2SO4} \qquad [41]$$

Avec V_{Na2CO3} et V_{H2SO4} et les volumes de base et d'acide ajoutés (en L) et C_{H2SO4} et C_{Na2CO3} les concentrations de la base et de l'acide ajoutés ($mol.L^{-1}$).

5. Analyses biologiques

Comme détaillé au Chapitre I, au cours des opérations de biolixiviation, la communauté bactérienne joue un rôle primordial dans la régénération du Fe^{3+} consommé pour l'oxydation des sulfures, ainsi que pour l'oxydation du soufre formé lors de l'oxydation des sulfures puisqu'elles catalysent ces réactions. Il est donc important de suivre la croissance de ces bactéries par mesure de la biomasse. Il est également important de connaitre l'évolution de la composition de la communauté bactérienne présente dans les essais, en particulier la présence et l'abondance des bactéries ferro-oxydantes et sulfo-oxydantes, ce qui nécessite de réaliser des analyses biomoléculaires. Par ailleurs, la présence de particules fines rend difficile la différenciation des cellules de bactéries et des particules et peut biaiser la mesure de la biomasse par comptage au microscope. Une méthodologie a donc été développée pour mesurer la biomasse de manière précise en présence de fines particules.

Dans un premier temps, les différentes méthodes de mesure de la biomasse seront présentées. Puis, l'analyse biomoléculaire utilisée pour déterminer la diversité des communautés bactériennes sera détaillée.

5.1. Mesure de biomasse

Quatre méthodes de mesure de biomasse ont été étudiées et utilisées dans ce travail, elles peuvent être regroupées en deux ensembles : les premières méthodes consistent à compter les cellules dans un volume donné sous un microscope, tandis que les autres méthodes ciblent l'ADN des bactéries via des analyses biomoléculaires. Ces méthodes ont été comparées afin de définir une méthodologie pour la mesure de biomasse au cours des différentes opérations de biolixiviation (essais de biolixiviation de chalcopyrite et culture de l'inoculum).

5.1.1. Méthode de comptage en cellule de Thoma (microscopie optique)

Lors des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite et cultures de l'inoculum, la biomasse (nombre de cellules par millilitre) a été mesurée par comptage sur cellules de Thoma (Préciss) sous microscope optique à partir d'un échantillon de la phase liquide issu d'un prélèvement de pulpe.

Pour les premières cultures du consortium ou de l'inoculum en erlenmeyer et en réacteur (5 et 8 premières cultures en erlenmeyer et en réacteur respectivement), les échantillons de pulpe sont dilués avec de l'eau acidifiée à pH 1,5 avec de l'acide sulfurique. Les dilutions sont comprises entre un facteur 40 et 80 pour les essais en erlenmeyer, et entre 400 et 1600 pour les essais en réacteur agité mécaniquement, afin de n'avoir pas plus d'une dizaine de cellules dans un carreau (taille du carreau : 0,05 mm x 0,05 mm).

La concentration de biomasse est alors déterminée par l'équation [42].

$$\text{Biomasse } (\text{cellules.mL}^{-1}) = \frac{\text{cellules totales comptées}}{\text{Nombre de carrés}} \times 4 \times 10^{6} \qquad [42]$$

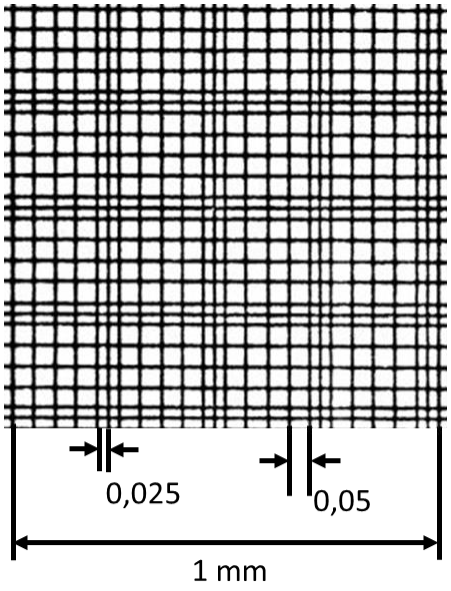


Figure 23 – Quadrillage d'une cellule de Thoma

Suite aux premiers résultats obtenus avec cette méthode, il a été décidé de laisser décanter l'échantillon de pulpe pendant 5 minutes et de réaliser les comptages sur le surnageant après dilution si nécessaire. Cette étape préliminaire de décantation a été mise en œuvre pour toutes les autres cultures de l'inoculum et les essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite. Elle a permis de réduire la probabilité de confondre particules solides et bactéries (voir section 5.1.4), de réduire la dilution des échantillons, et de faciliter le comptage. L'incertitude de mesure de la biomasse par cette méthode a été évaluée entre 12 et 32% selon la quantité de bactéries comptées.

5.1.2. Méthode de comptage par marquage DAPI (microscopie à fluorescence)

Une autre méthode de comptage a été développée afin de s'affranchir du biais induit par la présence de particules fines, en particulier pour les essais de biolixiviation attritive. Celle-ci s'appuie sur le marquage des cellules au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), un marqueur qui pénètre dans les cellules, se fixe à l'ADN et émet une fluorescence avec maximum d'émission à 456 nm (excitation à

372 nm). Les cellules peuvent ensuite être comptées plus aisément sous microscope optique à fluorescence.

Pour réaliser le marquage, 25 µL de surnageant obtenu après décantation de 2 mL d'un échantillon de pulpe sont mélangés à 1 mL d'eau ultra pure filtrée à 0,2 µm et 10 µL de DAPI à 0,1 $mg.L^{-1}$. Le temps de décantation est de 30 min pour l'essai de biolixiviation attritive n°9 (Tableau 5), et de 2 h pour le reste des essais de biolixiviation attritive. Cette différence de temps de décantation vient d'une adaptation du protocole suite à l'observation d'une décantation plus lente au fur et à mesure du temps lors des essais de biolixiviation attritive. Le mélange est ensuite incubé à l'obscurité pendant 10 min, avant d'être filtré sur un filtre (IsoporeTM, 0,2 µm blk PC Membrane, Merck) préalablement rincé avec 1 mL d'eau physiologique. Le filtre est ensuite déposé sur une lame et une goutte de milieu de montage (Vectashield) est déposée sur le filtre. Puis, le filtre est recouvert d'une lamelle et stocké à l'obscurité à -20°C avant de réaliser l'observation au microscope à épifluorescence.

Lors de l'observation au microscope, 10 champs différents sont photographiés. Puis, les bactéries sont comptées sur chaque champ. La surface du filtre pour 10 champs est de $3{,}77.10^5$ μm^2, et la surface totale du filtre (diamètre 20 mm) est de $3{,}1416.10^8$ μm^2. La biomasse a donc été calculée selon [43].

$$\text{Biomasse}\ (\text{cellules}.\,\text{mL}^{-1}) = \frac{\text{bactéries}_{\text{tot}} \times \text{surface}_{\text{10champs}}}{\text{surface}_{\text{tot}} \times \text{V}_{\text{éch}}(\text{mL})} \quad [43]$$

Avec $bactéries_{tot}$ le nombre total de bactéries comptées, $surface_{10champs}$ la surface du filtre pour 10 champs, $surface_{tot}$ la surface totale du filtre, et $V_{éch}$ le volume de l'échantillon avant marquage au DAPI (dans le cadre des travaux il était égale à 25 µL).

5.1.3. Mesure de la biomasse par des techniques biomoléculaires

La quantité d'ADN dans la pulpe des opérations de biolixiviation (culture de l'inoculum et essais de biolixiviation de chalcopyrite) est liée à la quantité la biomasse bactérienne présente dans cette pulpe. Ainsi, quantifier l'ADN extrait à partir d'échantillons de pulpe prélevés à différents moments des opérations de biolixiviation permet un suivi de la biomasse présente dans le réacteur. Cette biomasse peut également être suivie en déterminant le nombre de copies d'un gène marqueur présent chez toutes les bactéries, le gène codant l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), grâce à une amplification quantitative de ce gène par réaction de polymérisation en chaîne (appelée par la suite PCR quantitative ou qPCR), et exprimée en nombre de copie de gène par millilitre.

Les échantillons prélevés pour mesurer la biomasse par des approches biomoléculaires sont préparés de deux manières différentes :

- Pour la mesure de biomasse dans la pulpe, 2 mL de pulpe sont centrifugés à 14500 rpm pendant 10 min, puis le surnageant est retiré et le culot remis en suspension dans 1 mL de tampon tris(hydroxymethyl)aminomethane (pH 8, 100 mM) avant d'être à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que le pH atteigne 7 dans le surnageant. Le culot est ensuite stocké à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN.
- Pour la mesure de biomasse dans la phase liquide et/ou la phase solide, ces deux phases sont séparées à partir de 2 mL de pulpe après centrifugation à 5 000 rpm pendant 30 s pour tous les essais de biolixiviation conventionnelle, après décantation de 30 min pour l'essai de biolixiviation attritive n°9 (Tableau 5), et après décantation de 2 h pour le reste des essais de biolixiviation attritive. Ces différences résultent d'une adaptation progressive du protocole de séparation des deux phases suite à une étude réalisée dans le cadre d'un stage (Agra-Ferreira, 2022). En effet, d'après cette étude, la centrifugation à 5 000 rpm pendant 30 s entraîne des

bactéries planctoniques (en solution, dans le surnageant) dans la phase solide (culot). En comparaison, la décantation réduit l'entraînement des bactéries planctoniques vers la phase solide (pour un même échantillon, la concentration en bactéries dans le surnageant après décantation est plus élevée que dans le surnageant après centrifugation). Après la séparation liquide-solide, chaque phase est traitée en suivant la même méthodologie que celle présentée précédemment pour les échantillons de pulpe.

Extraction et quantification des ADN

L'ADN des échantillons est extrait à partir des culots stockés à -20°C à l'aide du FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) en suivant le protocole fourni par le fabricant, avec une homogénéisation pendant 30 s dans l'instrument FastPrep® à une vitesse de 5 $m.s^{-1}$ suivie d'une centrifugation de 15 min à 14500 g. Les ADN sont élués dans un volume de 100 µL de solution DES fournie dans le kit, puis la concentration en ADN extrait est mesurée par fluorimétrie en utilisant le Quantifluor dsDNA sample kit et le Quantus Fluorometer selon le protocole du fabriquant (Promega). La concentration en ADN extrait par millilitre de pulpe ou de liquide est ensuite calculée selon l'équation suivante :

$$ADN_{extrait}\ (ng.\mathrm{mL}^{-1}) = \frac{ADN_{mes} \times \mathrm{V_{mes}}}{\mathrm{V_{éch}}} \quad [44]$$

Avec AND_{mes} la concentration en ADN extrait mesurée dans l'échantillon de 100 µL (en $ng.\mu L^{-1}$), V_{mes} le volume d'échantillon d'ADN extrait (100 µL) et $V_{éch}$ le volume d'échantillon de pulpe ou de liquide (en mL).

Les ADN extraits des échantillons (pulpe, phase liquide) sont également utilisés pour amplifier le gène codant l'ARNr 16S pour la mesure du nombre de copies de gène par PCR quantitative comme mesure biomasse et pour l'analyse de la diversité des communautés bactériennes.

PCR quantitative (qPCR)

Pour compléter les résultats de biomasse issus des comptages de cellules en microscopie optique ou à fluorescence, des PCR quantitatives ont été réalisées afin de mesurer l'abondance du gène codant l'ARNr 16S des bactéries sans différenciation des espèces. Pour ces analyses, le protocole de préparation des échantillons utilisé par Hedrich et al. (2016) est appliqué avec les amorces 341F et 534R. Le mélange réactionnel utilisé est composé de 7,68 µL d'eau, 10 µL de SSO advanced Supermix 2X (BIORAD), 0,4 µM de chaque amorce et de 2 µL d'ADN extrait dilué à 1 $ng.\mu L^{-1}$ ou non dilué si sa concentration est inférieure à 1 $ng.\mu L^{-1}$. Le gène codant l'ARNr 16S est amplifié à partir de l'ADN extrait, dans l'appareil CFXConnect (BioRad) selon les conditions opératoires suivantes : une première dénaturation à 95 °C pendant 3 min, puis 35 cycles de 30 s à 95 °C (dénaturation), 30 s à 61 °C (hybridation), 30 s à 72 °C (post-élongation), 30 s à 80 °C (acquisition des données), et enfin une dernière étape d'acquisition des courbes de dénaturation avec des cycles de 10 s à une température augmentant de 65 à 95 °C à raison de 0,5 °C par cycle.

Pour chaque qPCR, le nombre de copies de gène est déduit à l'aide d'une gamme étalon, réalisée à partir de dilutions en série d'une solution plasmidique contenant un nombre connu de copies du gène cible. Les données en temps réel et le nombre de copies de gène sont obtenus avec le logiciel CFX Manager (BioRad), et les résultats sont exprimés en copies de gènes par millilitre d'échantillon.

$$\text{Biomasse}\ (copies\ de\ gène\ 16S.\mathrm{mL}^{-1}) = \frac{n_{éch}}{ADN_{éch}} \times \mathrm{ADN_{extrait}} \quad [45]$$

Avec $n_{éch}$ le nombre de copies de gène 16S mesuré dans le tube contenant 2 µL d'ADN, donnée par l'appareil de mesure (en copies de gène 16S), $ADN_{échantillon}$ la quantité d'ADN dans le tube (en ng), et $ADN_{extrait}$ la concentration en ADN extrait à partir de 2 mL d'échantillon de pulpe ou de liquide prélevé ($ng.mL^{-1}$).

5.1.4. Méthodologie : mesure de la biomasse au cours des opérations de biolixiviation

Les méthodes de comptage de cellule par microscopie optique et à fluorescence, la mesure de la concentration en ADN extrait et du nombre de copie du gène codant l'ARNr 16S des bactéries, sont quatre méthodes permettant de suivre l'évolution de la biomasse au cours d'un essai. Elles présentent chacune des avantages et inconvénients. Ces méthodes ont donc été comparées afin de déterminer laquelle est la mieux adaptée pour le suivi de la biomasse selon les conditions opératoires (présence de plus ou moins de particules fines par exemple).

Comme précisé dans la section 5.1.1, la mesure de la biomasse par comptage de cellules bactérienne en cellule de Thoma peut être réalisée avec ou sans décantation de l'échantillon. Or en biolixiviation, les bactéries sont capables de s'attacher aux particules et pourraient donc décanter avec ces dernières et biaiser l'évolution de la biomasse au cours des essais. La comparaison des résultats obtenus avec et sans décantation de l'échantillon (Figure 24) permet de déterminer si le nombre de cellules et l'évolution de la biomasse en fonction du temps sont comparables. Les mesures présentées ont été obtenus au cours de 7 cultures successives de l'inoculum, ce qui implique une diminution de la biomasse à chaque repiquage (mesure de la biomasse à l'instant initial de la nouvelle culture).

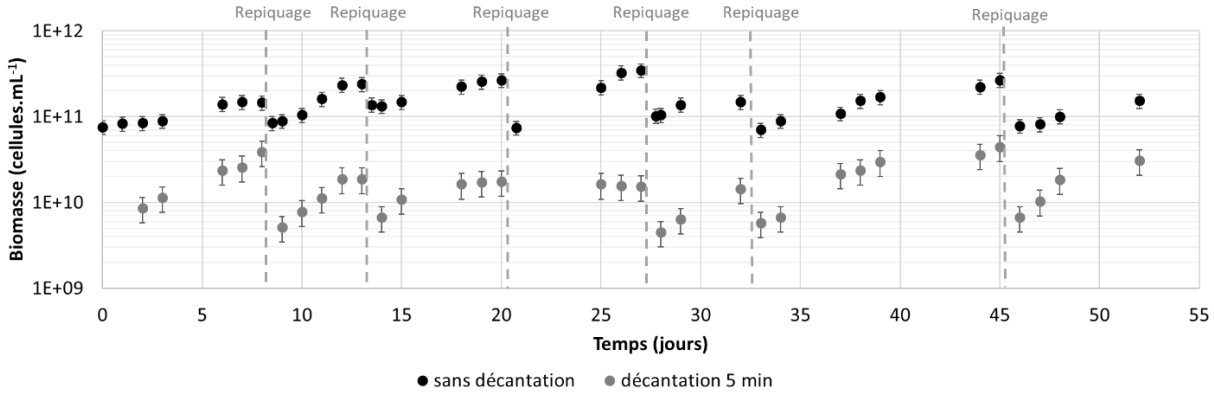


Figure 24 - Evolution de la biomasse en fonction du temps avec décantation préalable des échantillons pendant 5 min ou sans décantation lors de 7 cultures successives de l'inoculum (réacteur 2L, batch, 42 °C, 10% (m/m) de solide, concentré de Lubin, vitesse d'agitation à 700 rpm, 60 $L.h^{-1}$ air, 0,6 $L.h^{-1}$ CO_2, cultures inoculées à 10% (v/v) avec le consortium AKL).

Globalement, l'évolution de la biomasse avec le temps suit la même tendance avec et sans décantation. Toutefois, lorsque l'échantillon est décanté pendant 5 min, le nombre de bactéries comptées est plus faible, et la croissance bactérienne est plus accentuée (par exemple au cours de la première culture (entre 0 et 7 jours), la biomasse mesurée est multipliée par 4 avec décantation et par 2 sans décantation). La présence de particules fines (taille du même ordre de grandeur que les bactéries) dans les matériaux utilisés peut induire un biais non-négligeable lors du comptage. En effet, il est parfois difficile de distinguer les particules fines des cellules bactériennes par observation au microscope optique. Lorsque l'échantillon de pulpe est décanté, le surnageant, utilisé pour le comptage des cellules bactériennes, contient moins de particules, ce qui pourrait expliquer une

biomasse mesurée plus faible. Il est également possible qu'au cours de la décantation, des bactéries soient entraînées dans la phase solide par les particules.

Pour estimer le biais lié à la présence de particules fines, des mesures de biomasse par comptage de cellules bactériennes au microscope optique, avec décantation préalable de l'échantillon pendant 5 et 30 min, ont été comparées à des mesures de biomasse par comptage de cellules bactérienne marquées au DAPI sous microscope à épifluorescence. Ces mesures ont été complétées par des mesures de biomasse réalisées par qPCR (en nombre de gène codant l'ARNr 16S.mL^{-1}) dans la phase liquide de la pulpe obtenue après décantation de l'échantillon pendant 30 min. Toutes ces mesures ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés lors d'une même opération de biolixiviation (culture de l'inoculum) (Figure 25).

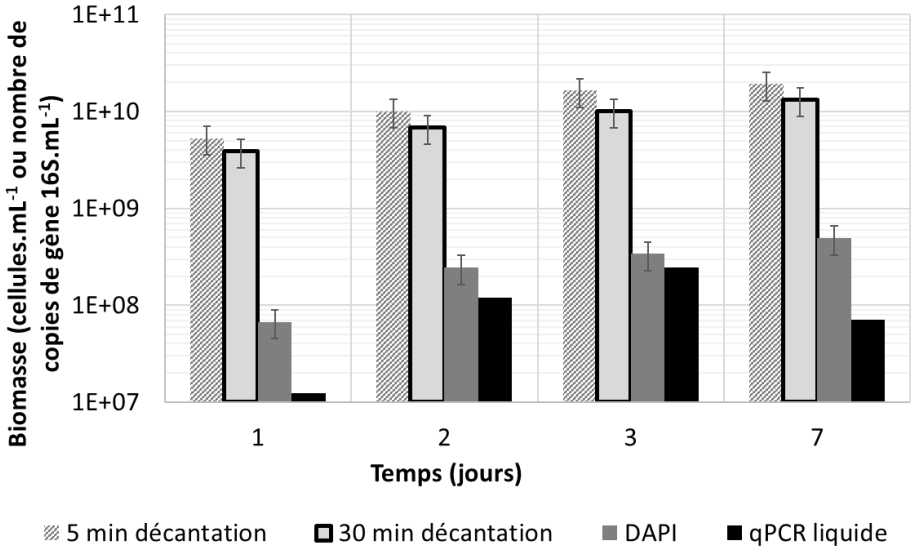


Figure 25 – Mesures de biomasse par différentes méthodes au cours d'une culture de l'inoculum (réacteur 2L, batch, 42 °C, 10% (m/m) de solide, concentré de Lubin, vitesse d'agitation à 700 rpm, 60 L.h^{-1} air, 0,6 L.h^{-1} CO_2, inoculées à 10% (v/v) avec le consortium AKL). Les méthodes utilisées sont les suivantes : comptage au microscope optique en lumière blanche avec décantation de 5 min et 30 min de l'échantillon, comptage par microscopie à fluorescence après marquage des cellules au DAPI, et mesure de la biomasse dans la phase liquide par qPCR, exprimée en nombre de copies de gène codant l'ARNr 16S (« gène 16S ») par millilitre.

La biomasse mesurée par comptage au microscope optique avec 30 min de décantation est proche de celle mesurée par la même méthode avec une décantation de 5 min. Il n'y a donc pas d'effet notable du temps de décantation sur la mesure de biomasse au microscope optique lorsqu'il est compris entre 5 et 30 min. En revanche, la quantité de bactéries mesurée par microscopie optique avec 30 min de décantation est en moyenne 28 fois supérieure à celle mesurée par microscopie à fluorescence, voir 58 fois plus élevée au 1er jour. Or, 30 min de décantation ont également été appliquées pour le comptage des cellules marquées au DAPI. La présence de particules fines peut avoir un effet sur la mesure de biomasse par comptage en cellule de Thoma, même avec décantation préalable de l'échantillon. Le risque est de compter à la fois des bactéries et des particules, rendant l'observation de la croissance bactérienne plus difficile. En effet, en présence d'un très grand nombre de particules, la biomasse mesurée est telle que la croissance bactérienne observée est du même ordre de grandeur que l'incertitude de mesure. D'autre part, afin de mieux évaluer la fiabilité de la mesure de biomasse par marquage DAPI, il serait nécessaire de déterminer le biais éventuel dû à la préparation de l'échantillon lors du marquage des cellules au DAPI.

Dans le cas de la biomasse mesurée par qPCR, celle-ci augmente dans un premier temps, puis diminue entre le 3ème et dernier jour. Cette diminution n'apparaît pas lorsque la biomasse est mesurée par les comptages au microscope. Elle pourrait être liée à une diminution du rendement en ADN extrait en fin de culture, où les bactéries pourraient être fragilisées et donc plus exposées à une lyse lors de la préparation des échantillons (centrifugation à 14 000 rpm, voir section 5.1.3). Une partie des cellules peut être perdue avant extraction de l'ADN en raison de cette lyse, ce qui peut induire des concentrations en ADN extrait et donc en copie du gène 16S plus faibles qu'attendues. On peut également remarquer que la biomasse mesurée par qPCR est très faible le premier jour. Il est possible qu'à ce moment-là la concentration en cellules soit encore trop faible pour une extraction d'ADN efficace, ce qui pourrait expliquer la faible concentration en copies de gène 16S obtenue. D'autre part, la biomasse mesurée par qPCR dépend de la quantité d'ADN extrait (équation [45]), qui dépend du nombre de bactéries dans le système. En effet, plus il y a de bactéries, plus il y a d'ADN, ce qui est confirmé avec la Figure 26, qui montre une augmentation de la quantité d'ADN extrait de la phase liquide de la pulpe avec la concentration en cellules (biomasse mesurée par comptage en cellule de Thoma au microscope optique) dans le surnageant, obtenu après décantation d'un échantillon de pulpe pendant 5 min. La quantification de l'ADN extrait permet donc également d'évaluer la biomasse dans le milieu et de suivre son évolution en fonction du temps.

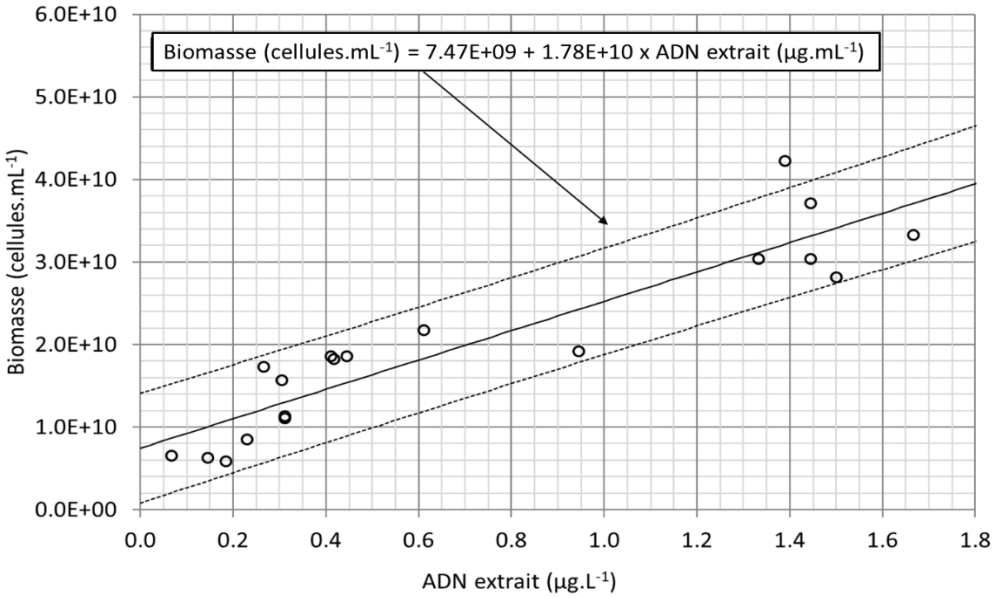


Figure 26 – Biomasse en fonction de la quantité d'ADN extrait de la phase liquide lors d'opérations de biolixiviation (culture de l'inoculum et essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite). La biomasse a été mesurée par méthode de comptage de cellules au microscope optique dans le surnageant obtenu après décantation d'un échantillon de pulpe pendant 5 min. Les courbes pleines et en pointillées correspondent à la courbe de tendance et son intervalle de confiance à 95% respectivement.

En résumé, la mesure de biomasse par comptage de cellules au microscope optique ne permet d'accéder qu'à la concentration bactérienne dans la fraction liquide du système mais ne nécessite qu'un temps de manipulation court comparé aux autres méthodes de mesure de biomasse considérées ici. Elle est donc très utile pour suivre l'évolution de cette grandeur au cours d'une opération de biolixiviation et vérifier si la croissance bactérienne a bien lieu. Elle est toutefois moins adaptée lorsque la quantité de particules fines ou le ratio particules fines/bactéries est élevé, tel que la distinction entre bactéries et particules n'est plus possible. Au contraire, la méthode de comptage après marquage des cellules au DAPI permet de suivre l'évolution de la biomasse au cours d'un essai de biolixiviation en s'affranchissant du biais induit par la présence de particules fines. Cette technique demande un temps

de manipulation plus long et l'utilisation de produits plus coûteux. Par ailleurs, avec les protocoles utilisés (voir section 5.1.2), cette méthode, comme celle en cellule de Thoma, ne donne accès qu'à la concentration en microorganismes dans la fraction liquide du système. Enfin, la quantification de l'ADN extrait et la mesure de l'abondance de gène par qPCR permettent également de suivre l'évolution de la biomasse sans biais induit par la présence de particules fines. De plus, elles permettent d'obtenir des mesures de biomasse dans les échantillons de pulpe ainsi que dans les phases liquide et solide de cette pulpe, contrairement aux méthodes de comptage au microscope. Cependant, elles dépendent du rendement en ADN extrait, qui peut être impacté par l'état des cellules et l'évolution des paramètres opératoires de biolixiviation (pH très acide, concentrations en métaux et ratio particules/bactéries élevés), qui compliquent l'extraction de l'ADN. Elles sont aussi plus chronophages que les méthodes de comptage au microscope, et demandent l'utilisation de matériel et de réactifs coûteux.

En considérant les avantages et les inconvénients de chaque méthode, il a été décidé de mesurer la biomasse au cours des opérations de biolixiviation par comptage au microscope optique, avec décantation préalable de l'échantillon de pulpe pendant 5 min. En effet, malgré une surestimation de la biomasse due à la présence de particules fines, cette mesure plus simple à appliquer est adaptée pour un suivi quotidien et permet d'estimer facilement la tendance de la croissance bactérienne. Les méthodes de mesure de la biomasse par microscopie à fluorescence, par qPCR ou par quantification des ADN extraits ont été appliquées lorsque la mesure par microscopie optique n'est pas adaptée, autrement dit en présence d'une très grande quantité de particules fines (essais n°4 de biolixiviation conventionnelle (Tableau 4) et essais de biolixiviation attritive).

5.2. Analyse de la diversité des communautés bactériennes

La diversité des communautés bactériennes est déterminée par l'obtention de profils de diversité en ciblant le gène codant l'ARNr 16S par analyse T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism).

Un fragment de 900 pb du gène de l'ARNr 16S est amplifié par PCR à partir des ADN extraits, en utilisant les amorces 907R (0,2 µL, 50 µM) et 8F-FAM (0,2 µL, 50 µM) marquée en 5' avec le fluorochrome FAM. Le mélange réactionnel est composé de 12,2 µL d'eau, 4 µL de TP 5x, 2 µL de $MgCl_2$ à 25 mM, 0,2 µL de dNTP à 10 mM et 0,2 µL de GOTaq polymérase, auquel est ajouté 1 µL d'ADN extrait et les amorces. Le gène codant l'ARNr 16S est amplifié à partir de l'ADN extrait, dans l'appareil CFXConnect (BioRad) selon les conditions opératoires suivantes : une première dénaturation à 95 °C pendant 2 min, puis 35 cycles de 45 s à 95 °C (dénaturation), 45s à 60 °C (hybridation), 60 s à 72 °C (post-élongation), 30 s à 80 °C (acquisition des données), et enfin une dernière étape d'acquisition des courbes de dénaturation pendant 10 min à une température de 72 °C.

La qualité de l'amplification par PCR est vérifiée par électrophorèse du produit PCR sur gel d'agarose à 2%. Puis, entre 27 et 100 ng de produit PCR sont digérés avec l'enzyme de restriction *Hae*III, à 37 °C pendant 4 h La digestion enzymatique du produit PCR est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 3%. Le produit digéré est ensuite préparé pour analyse en mélangeant 1 µL de produit à 18,7 µL de formamide HiDi et 0,3 µL du standard ADN Genescan-600 LIZ avant d'être dénaturé. Les fragments de restriction terminaux (tRF), marqués avec le fluorochrome FAM incorporé grâce à l'amorce 8F-FAM, sont alors analysés par électrophorèse capillaire dans l'analyseur génétique SeqStudio (Life technologies).

Les profils de diversité se présentent sous forme de pics, un pic correspondant à un tRF. Ils sont traités à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths) pour les aligner grâce au standard ADN interne, définir

la position de migration des différents tRF obtenus pour chaque échantillon et les assigner par homologie de migration avec ceux correspondant à des espèces bactériennes acidophiles connues. Les proportions relatives des différentes espèces bactériennes identifiées sont calculées en fonction de l'intensité de fluorescence des pics.

6. Conclusion du chapitre

Ce chapitre a fait l'objet de la présentation de l'ensemble de la méthodologie mise en œuvre pour réaliser le travail expérimental. La Figure 27 propose un schéma récapitulatif des différents dispositifs expérimentaux et techniques analytiques utilisés lors des opérations de biolixiviation.

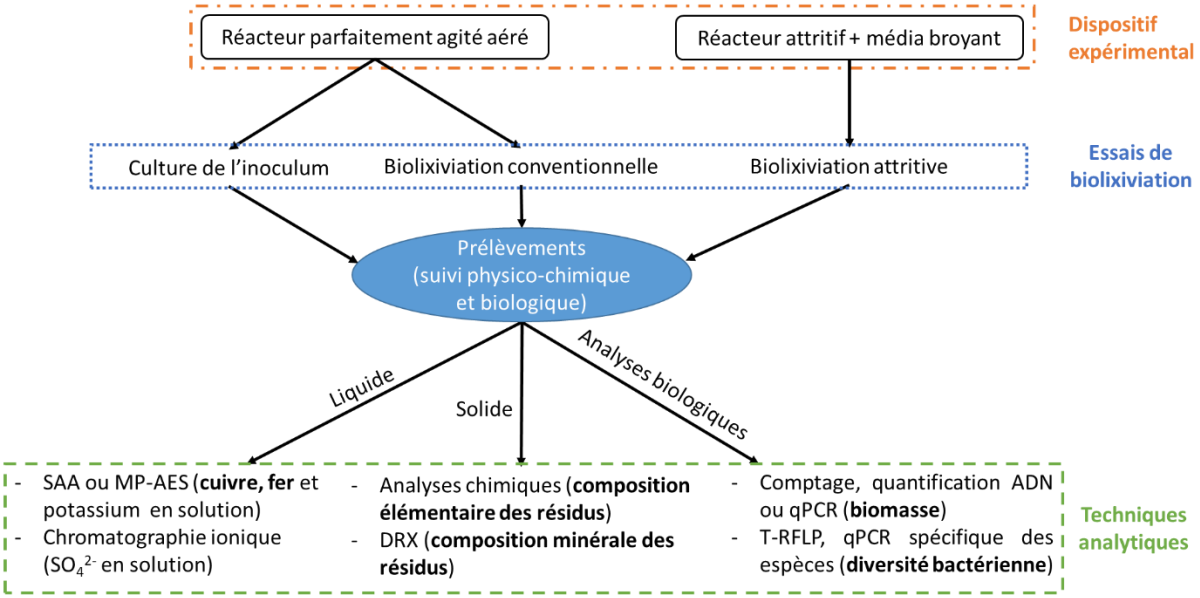


Figure 27 – Récapitulatif des dispositifs expérimentaux et techniques analytiques utilisés au cours des différents essais de biolixiviation. Les éléments en gras dans l'encadré « techniques analytiques » correspondent à ceux qui sont systématiquement mesurés lors des essais de biolixiviation conventionnelle et attritive.

Outre des méthodologies analytiques relativement standards, on peut souligner qu'un travail méthodologique spécifique a été mené sur le plan de l'évaluation de la biomasse, le comptage des bactéries par microscopie optique étant rendu difficile en présence d'une quantité importante de particules fines. Ces dernières sont produites par les interactions mécaniques avec les billes de verre présentes dans le réacteur ou directement introduites dans le réacteur dans le cas des échantillons < 20 µm. Ce comptage repose sur le dénombrement des cellules, présentes dans la phase liquide de la pulpe, dans un volume déterminé au microscope optique. Toutefois, au-dessus d'un certain ratio particules fines/bactéries, la différenciation entre les cellules et les particules n'est plus possible et une méthode alternative, indépendante de la présence de ces particules doit être utilisée. Le comptage des cellules marquées au DAPI, la quantification de l'ADN extrait ou encore la PCR quantitative sans différenciation des espèces sont des méthodes adaptées pour suivre l'évolution de la biomasse au cours d'un essai de biolixiviation quelle que soit la quantité de particules fines.

Le principe de préparation des échantillons de concentré de chalcopyrite a été exposé dans ce chapitre, ainsi que le protocole de culture bactérienne. Le chapitre suivant est consacré aux résultats des caractérisations qui ont été menées sur les deux intrants principaux des diverses expériences de biolixiviation, dans l'objectif de connaître au mieux leurs propriétés.

7. Références

Aggra-Ferreira, K., 2022. Mise au point de protocoles pour le suivi de bactéries acidophiles en bioréacteurs de biolixiviation. Rapport de stage, Lycée Jacques Monod, Fleury-les-Aubrais, France.

Brochot, S., Wavrer, Ph., Hubau, A., Touzé, S., 2022. Experimental determination of the constitutional heterogeneity for sampling of waste printed circuit boards. TOS Forum 2022, 217. https://doi.org/10.1255/tosf.151

Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part II: Effect of redox potential. Hydrometallurgy 93, 88–96. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.016

d'Hugues, P., Joulian, C., Spolaore, P., Michel, C., Garrido, F., Morin, D., 2008. Continuous bioleaching of a pyrite concentrate in stirred reactors: Population dynamics and exopolysaccharide production vs. bioleaching performance. Hydrometallurgy 94, 34–41. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.045

Dakkoune, A., Bourgeois, F., Po, A., Joulian, C., Hubau, A., Touzé, S., Julcour, C., Guezennec, A.-G., Cassayre, L., 2023. Hydrometallurgical Processing of Chalcopyrite by Attrition-Aided Leaching. ACS Eng. Au. https://doi.org/10.1021/acsengineeringau.2c00051

Guezennec, A.-G., Delclaud, M., Savreux, F., Jacob, J., d'Hugues, P., 2014, "The Use of Bioleaching Methods for the Recovery of Metals Contained in Sulfidic Mining Wastes". Hydrometallurgy 2014, Victoria, Canada. 7 p. ⟨hal-00988746⟩

Guézennec, A.-G., Joulian, C., Jacob, J., Archane, A., Ibarra, D., de Buyer, R., Bodénan, F., d'Hugues, P., 2017. Influence of dissolved oxygen on the bioleaching efficiency under oxygen enriched atmosphere. *Minerals Engineering 106*, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.10.016

Guezennec, A.-G., Joulian, C., Delort, C., Bodénan, F., Hedrich, S., D'hugues, P., 2018. "CO2 mass transfer in bioleaching reactors: CO2 enrichment applied to a complex copper concentrate". Hydrometallurgy 180, 277–286. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.08.006

Hedrich, S., Guézennec, A.-G., Charron, M., Schippers, A., Joulian, C., 2016. "Quantitative Monitoring of Microbial Species during Bioleaching of a Copper Concentrate". Frontiers in Microbiology 07 (December). https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02044

Hedrich, S., Joulian, C., Graupner, T., Schippers, A., Guézennec, A.-G., 2018. "Enhanced Chalcopyrite Dissolution in Stirred Tank Reactors by Temperature Increase during Bioleaching". Hydrometallurgy 179 (August): 125–31. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.05.018.

Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., 2001. Enhancement of chalcopyrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions. Hydrometallurgy 60, 185–197. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00155-9

Hong, M., Liu, S., Huang, X., Yang, B., Zhao, C., Yu, S., Liu, Y., Qiu, G., Wang, J., 2021. A review on bornite (bio)leaching. Minerals Engineering 174, 107245. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107245

Rahfeld, A., Kleeberg, R., Möckel, R., et Gutzmer, J. (2018) "Quantitative Mineralogical Analysis of European Kupferschiefer Ore". Minerals Engineering 115: 21-32. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2017.10.007.

Rawlings, D.E., et Johnson, D.B. (1998). « Biomining Theory, Microbes and Industrial Processes ». Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 302. ISBN 3-540-63252-2

Schippers, A., 2004, Biogeochemistry of metal sulfide oxidation in mining environments, sediments, and soils, in Amend, J.P., Edwards, K.J., and Lyons, T.W. (eds), Sulfur biogeochemistry—Past and present: Boulder, Colorado, Geological Society of America Special Paper 379, p. 49–62. https://doi.org/10.1130/0-8137-2379-5.49

Spolaore, P., Joulian, C., Gouin, J., Morin, D., d'Hugues., P., 2011. "Relationship between Bioleaching Performance, Bacterial Community Structure and Mineralogy in the Bioleaching of a Copper Concentrate in Stirred-Tank Reactors". Applied Microbiology and Biotechnology 89 (2): 441–48. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2888-5.

Yue, G., Zhao, L., Olvera, O.G., Asselin, E., 2014. "Speciation of the H2SO4–Fe2(SO4)3–FeSO4–H2O system and development of an expression to predict the redox potential of the Fe3+/Fe2+ couple up to 150°C". Hydrometallurgy 147–148, 196–209. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.05.008

Chapitre III - Caractérisation de la matière et préparation de l'inoculum

Les essais de biolixiviation qui seront présentés dans les chapitres suivants nécessitent l'utilisation de deux matériaux de nature différente : d'une part la matière contenant la chalcopyrite et, d'autre part, l'inoculum qui contient les microorganismes impliqués dans les processus biochimiques de la biolixiviation. Bien connaître ces deux matériaux est essentiel pour définir l'état initial du système, ce qui est nécessaire pour comprendre les phénomènes ayant lieu au cours des essais de biolixiviation. Une méthodologie a été mise en place pour la préparation de ces matériaux afin de limiter leur variabilité en termes de composition et de propriétés, et ainsi faciliter la comparaison des résultats entre essais.

Le chapitre s'articule autour de deux parties consacrées à la caractérisation et à la méthodologie de préparation respectives de la matière contenant la chalcopyrite et de l'inoculum. La deuxième partie inclut également une étude statistique détaillée de la répétabilité de l'inoculum.

1. Caractérisation de la matière

Comme indiqué au Chapitre II, deux lots de concentrés bruts de chalcopyrite ont été reçus au cours de la thèse. Le premier (Lot n°1) a donné lieu à diverses caractérisations chimiques et minérales, dont une analyse chimique de différentes coupes granulométriques. Ce lot a uniquement été utilisé pour les expériences de lixiviation attritive abiotique menées au LGC de Toulouse.

Le second lot (Lot n°2) a quant à lui été utilisé pour préparer les échantillons des essais de biolixiviation réalisés dans le cadre de la thèse. Comme l'utilisation d'un média broyant dans les essais de (bio)lixiviation attritive réduit la taille des particules, il a été décidé de travailler avec des échantillons essentiellement constitués de particules très fines (< 20 µm) et d'autres contenant peu de particules fines (20-100 µm) pour étudier l'impact de la taille des particules sur la biolixiviation de la chalcopyrite. Ces fractions granulométriques (20-100 µm et < 20 µm) ont également été caractérisées en termes de composition chimique et minérale et de granulométrie.

Les résultats de caractérisation du concentré brut est décrit dans un premier temps, suivi de ceux concernant la caractérisation des fractions 20-100 µm et < 20 µm. Pour rappel, l'ensemble des techniques analytiques mises en œuvre pour l'analyse de ces échantillons solides ont été décrites dans la section 4.2 du Chapitre II.

1.1. Caractérisation du concentré de chalcopyrite brut

Le Tableau 6 présente les compositions chimiques élémentaires des deux lots de concentré brut. Celles-ci sont globalement similaires. Les éléments majeurs sont le fer, le cuivre et le soufre. Ce-dernier est très majoritairement sous forme de sulfures (97% du soufre sous forme de sulfures).

Tableau 6 - Compositions chimiques (%m/m) des lots de concentré de chalcopyrite bruts déterminées par analyses chimiques. *La concentration en soufre élémentaire dans le lot n°1 a été calculée par différence entre la concentration totale en soufre et la somme des concentrations en soufre correspondant aux sulfates et sulfures. S_{SO4} : soufre correspondant aux sulfates, $S_{sulfures}$: soufre correspondant aux sulfures, $S_{élémentaire}$: soufre élémentaire, C_{orga} : carbone organique.

Echantillons	Fe	Cu	Al	Si	K	Mo	S	S_{SO4}	$S_{sulfures}$	$S_{élémentaire}$	C	C_{orga}
Lot n°1	29,5	24,4	1,0	-	0,5	0,1	32,8	0,1	31,9	0,80*	0,2	0,04
Lot n°2	28,4	24,5	1,3	5,2	0,7	0,3	30,6	0,2	29,7	0,01	0,1	0,03

Etant donné que le Lot n°1 n'a pas été utilisé pour les expérimentations menées dans la thèse, les résultats additionnels de caractérisation de ce lot ont été regroupés dans l'Annexe 1. Parmi ces résultats, l'analyse chimique menée sur 6 fractions granulométriques différentes indique que la pyrite

et la chalcopyrite sont les phases majeures quelle que soit la granulométrie des particules. De plus, l'analyse des différentes fractions montre que la concentration en aluminium augmente avec la taille des particules, tandis que celle en cuivre diminue : ceci indique qu'il y a plus de gangue minérale dans les fractions granulométriques les plus grossières.

La Figure 28 montre les phases minérales identifiées par DRX dans le Lot n°2. Les phases cristallines majeures sont la chalcopyrite, la pyrite et la molybdénite.

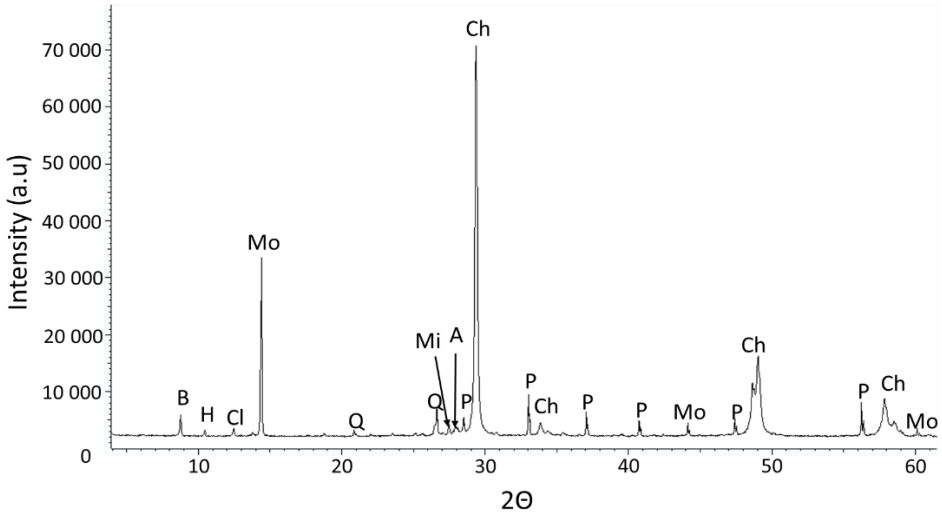


Figure 28 - Diffractogramme du Lot n°2 de concentré de chalcopyrite. A : Albite, B : Biotite, Ch : Chalcopyrite, Cl : Chlorite, H : Hornblende, Mi : Microcline, Mo : Molybdénite, P : Pyrite, Q : Quartz.

La quantification des phases a été réalisée en combinant les résultats des analyses chimiques et DRX. Ainsi, la chalcopyrite ($CuFeS_2$), la pyrite (FeS_2) et la molybdénite (MoS_2) sont les seules phases sulfurées identifiées dans le concentré. Par ailleurs, la chalcopyrite et la molybdénite sont les seules phases porteuses de cuivre et de molybdène respectivement. On en déduit les concentrations en chalcopyrite et molybdénite à partir des concentrations en cuivre et en molybdène respectivement (équation [46]).

$$C_{mi} = \frac{C_i}{M_i} \times M_{mi} \quad [46]$$

Où « mi » fait référence à la chalcopyrite ou la molybdénite, « i » au cuivre ou au molybdène, C à la concentration en « mi » ou en « i » dans le solide (en % massique) et M à la masse molaire de mi ou i (en $g.mol^{-1}$).

D'après les formules chimiques de la chalcopyrite, de la molybdénite et de la pyrite, on a :

$$n_{CuFeS2} = n_{Cu} = (C_{Cu} \times m_{solid})/M_{Cu} = n_{S_CuFeS2}/2 \quad [47]$$

$$n_{MoS2} = n_{Mo} = (C_{Mo} \times m_{solid})/M_{Mo} = n_{S_MOS2}/2 \quad [48]$$

$$n_{FeS2} = n_{S_FeS2}/2 \quad [49]$$

Où n fait référence à la quantité de chalcopyrite, molybdénite, pyrite, cuivre ou molybdène dans le solide (en mol), m_{solid} à la masse du solide (en g), et n_S la quantité de soufre dans la chalcopyrite, la molybdénite ou la pyrite contenue dans le solide (en mol).

Ces trois phases sont les seuls sulfures présents dans le concentré donc :

$$n_{S_FeS2} = n_{sulfures_tot} - n_{S_CuFeS2} - n_{S_MoS2} = n_{sulfures\ tot} - n_{Cu} \times 2 - n_{Mo} \times 2 \quad [50]$$

Avec $n_{sulfures_tot}$ la quantité totale de sulfures dans le concentré de chalcopyrite (en mol).

On en déduit que la concentration de la pyrite (C_{FeS2}) (en % massique) est égale à :

$$C_{FeS2} = ((n_{S_FeS2}/2) \times M_{FeS2})/m_{solid} \quad [51]$$

Avec M_{FeS2} la masse molaire de la pyrite (en g.mol^{-1}).

Il est également possible de calculer la part du fer contenue dans la chalcopyrite et la pyrite ($Fe_{sulfures}$) par rapport à la quantité totale de fer dans le concentré (Fe_{tot}) (rapport $Fe_{sulfures}/Fe_{tot}$) (équation [52]).

$$\frac{Fe_{sulfures}}{Fe_{tot}} = (n_{FeS2} + n_{CuFeS2})/(C_{Fe} \times m_{solid}/M_{Fe}) \quad [52]$$

Avec C_{Fe} la concentration en fer dans le concentré de chalcopyrite (en % massique) et M_{Fe} la masse molaire du fer (en g.mol^{-1}).

Les concentrations en chalcopyrite, en molybdénite et en pyrite calculées dans le Lot n°2 sont indiquées dans le Tableau 7 avec le rapport $Fe_{sulfures}/Fe_{tot}$.

Tableau 7 - Concentrations (% (m/m)) en chalcopyrite, molybdénite et pyrite calculées à partir de la composition chimique du concentré de chalcopyrite (Lot n°2), et rapport $Fe_{sulfures}/Fe_{tot}$.

Echantillon	Chalcopyrite	Molybdénite	Pyrite	$Fe_{sulfures}/Fe_{tot}$
Lot n°2	70,8	0,4	8,9	90 %

La chalcopyrite et la pyrite sont les deux phases minérales majoritaires dans le concentré (elles représentent environ 80% de la masse), et au moins 90 % du fer total est contenu dans ces deux phases. Le fer et les autres éléments chimiques mineurs se trouvent dans la chlorite ($(Mg,Fe,Al)_6(Si,Al)_4O_{10}(OH)_8$), la biotite ($(Mg,Fe^{2+})_3(Al,Fe^{3+})Si_3O_{10}(OH,F)_2$), et une hornblende ($Na_{0,9}K_{0,4}Ca_{1,6}Mg_{2,8}Fe_{1,4}Ti_{0,5}Al_{2,4}Si_6O_{23}(OH)$). Les autres phases minérales identifiées sont la microcline ($KAlSi_3O_8$), le quartz (SiO_2) et l'albite $Na(AlSi_3O_8)$ (Figure 28). Ces phases mineures n'ont pas été quantifiées, mais cela n'est pas critique car elles sont majoritairement des phases silicates insolubles dans les conditions expérimentales appliquées.

La Figure 29 présente la distribution de la taille des particules pour un échantillon du Lot n°2. Celle-ci est comprise entre 0,3 et 350 µm. Le d_{50} est égal à 58,1 ± 9,7 µm. La surface spécifique a également été mesurée et est égale à 0,4 m².g^{-1}.

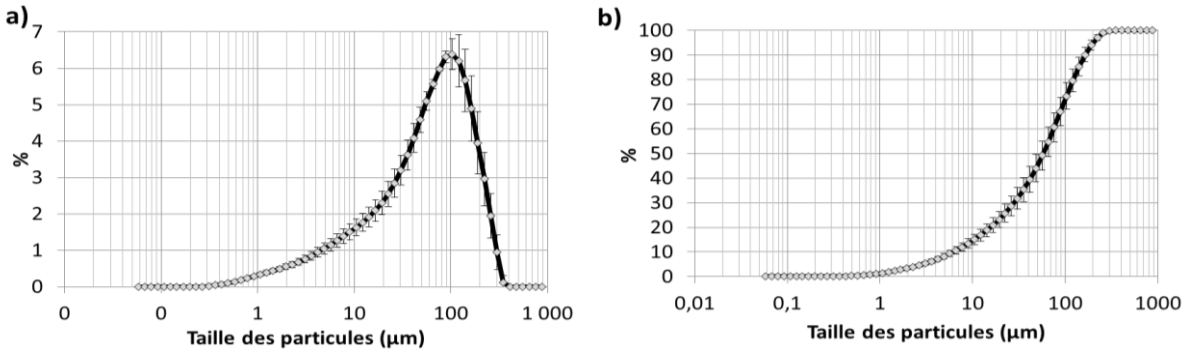


Figure 29 - Distribution (a) et distribution cumulée (b) de la taille des particules au sein du Lot n°2 de concentré brut de chalcopyrite (moyenne de 5 mesures).

1.2. Caractérisation des fractions 20-100 µm et < 20 µm

Dans un premier temps, une analyse granulométrique des échantillons a été réalisée pour vérifier la qualité des séparations à 20 et 100 µm. La Figure 30 compare la distribution de la taille des particules dans le concentré brut (Lot n° 2) et dans les deux fractions obtenues par tamisage et hydrocyclonage du Lot n° 2. Dans la fraction 20-100 µm, 80 % des particules ont une taille inférieure à 100 µm et 12 % des particules ont une taille inférieure à 20 µm. D'autre part, 91% des particules ont une taille inférieure à 20 µm dans la fraction < 20 µm. En comparaison, 73% des particules dans le concentré brut (Lot n°2) ont une taille inférieure à 100 µm et 23% des particules ont une taille inférieure à 20 µm. La proportion de particules inférieures à 100 µm et supérieures à 20 µm dans la fraction 20-100 µm est donc effectivement plus élevée que dans le concentré brut, et la fraction < 20 µm contient peu de particules supérieures à 20 µm. La séparation granulométrique à 20 et 100 µm est donc suffisamment discriminante pour considérer que les deux fractions ont des granulométries distinctes, dont une est composée de particules fines.

Les compositions chimiques et minérales des fractions 20-100 µm et < 20 µm ont également été déterminées (Tableau 8 et Figure 31). Les concentrations en chalcopyrite, molybdénite et pyrite (Tableau 9), sont cohérentes avec les résultats des analyses chimiques réalisées sur les différentes coupes granulométriques du Lot n°1. En particulier, la fraction < 20 µm est plus riche en chalcopyrite, et plus pauvre en minéraux appartenant à la gangue du minerai, certains d'entre eux ne sont d'ailleurs plus détectés par DRX. La répartition des phases entre les deux coupes granulométriques est estimée suffisamment proche pour qu'une comparaison puisse être établie entre les essais de biolixiviation.

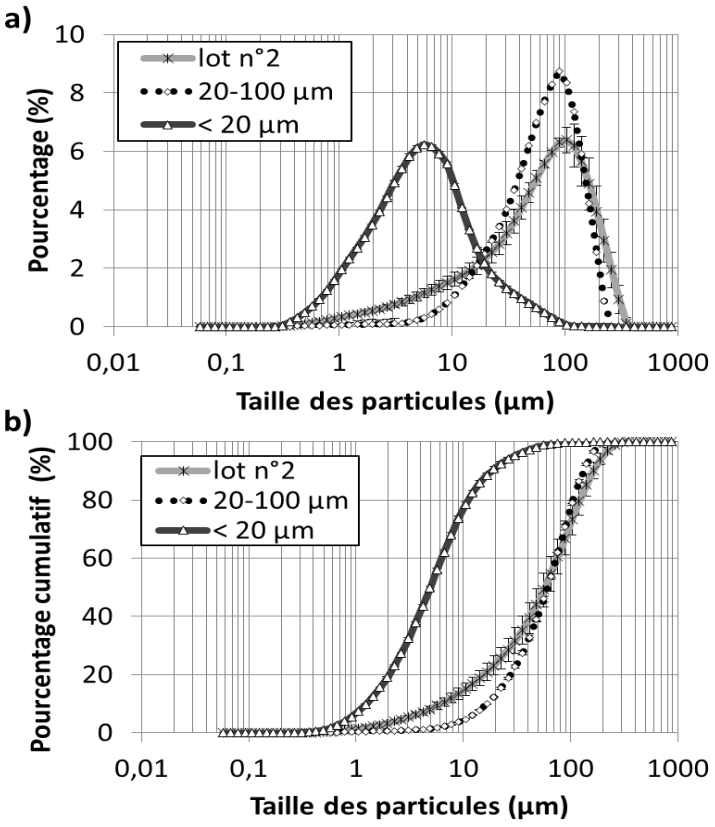


Figure 30 - Distribution (a) et distribution cumulée (b) de la taille des particules au sein du lot n°2 du concentré brut de chalcopyrite et des fractions granulométriques obtenues à partir de ce lot.

Tableau 8 - Compositions chimiques (% (m/m)) du concentré brut de chalcopyrite (lot n°2) et des fractions 20-100 µm et < 20 µm déterminées par analyse chimiques. S_{SO4} : soufre correspondant aux sulfates, $S_{sulfures}$: soufre correspondant aux sulfures, $S_{élémentaire}$: soufre élémentaire.

	Cu	Fe	S_{total}	$S_{sulfure}$	S_{SO4}	$S_{élémentaire}$	K	Mo	Si	Al
Lot n°2	24,5	28,4	30,6	29,7	0,2	0,01	0,7	0,3	5,2	1,3
20-100 µm	23,5	28,1	30,2	29,2	0,1	0,02	0,8	0,3	5,4	1,4
< 20 µm	27,9	28,1	30,9	30,7	0,3	0,02	0,4	0,2	3,1	1,0

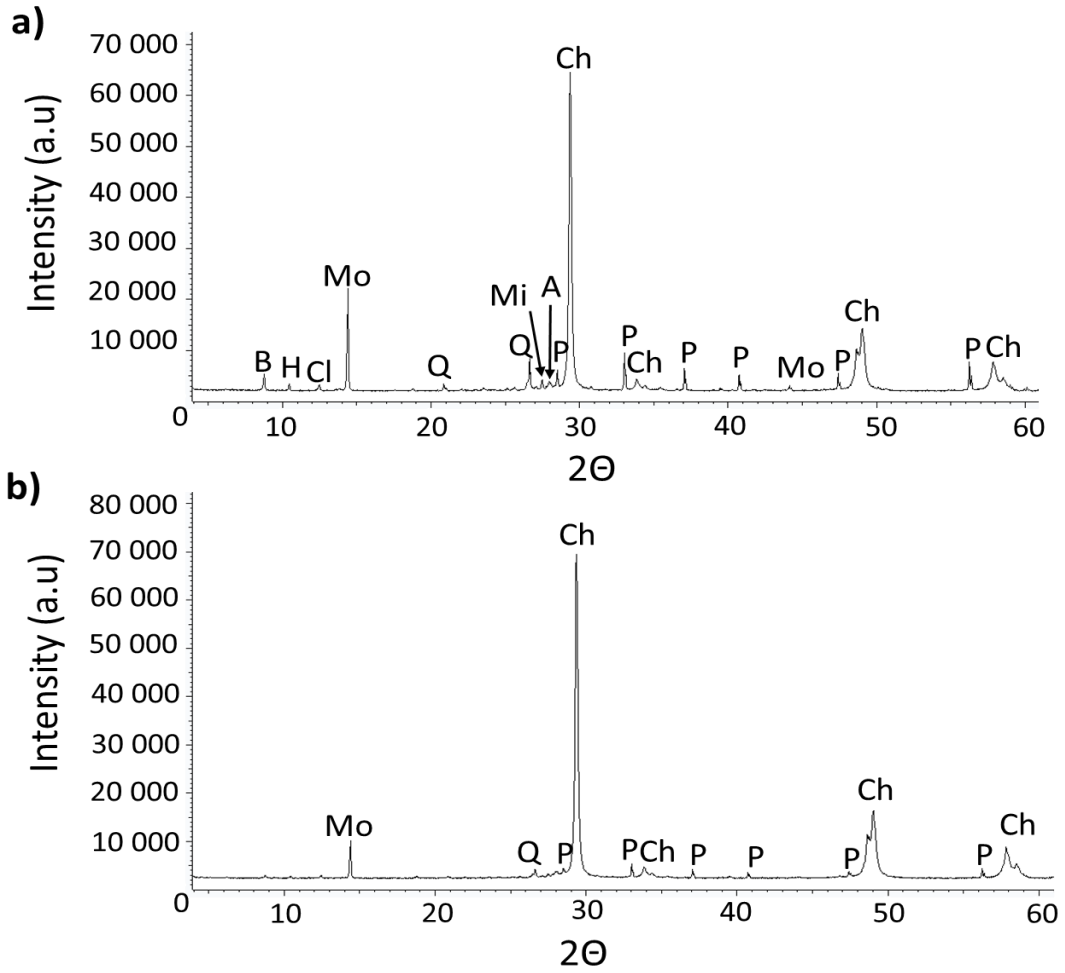


Figure 31 - Diffractogrammes des fractions 20-100 µm (a) et < 20 (b). A : Albite, B : Biotite, Ch : Chalcopyrite, Cl : Chlorite, H : Hornblende, Mi : Microcline, Mo : Molybdénite, P : Pyrite, Q : Quartz.

Tableau 9 - Concentrations (%m/m) en chalcopyrite, molybdénite et pyrite calculées à partir des compositions chimiques du Lot n°2 et des fractions 20-100 µm et < 20 µm, et rapport $Fe_{sulfures}/Fe_{tot}$.

Echantillons	Chalcopyrite	Molybdénite	Pyrite	$Fe_{sulfures}/Fe_{tot}$
Lot n°2	70,8	0,4	8,9	90%
20 - 100 µm	68,0	0,4	9,8	90%
< 20 µm	80,6	0,4	4,4	94%

Les surfaces spécifiques des fractions 20-100 µm et < 20 µm ont également été mesurées et comparées avec celle du concentré brut (Lot n°2) (Tableau 10). La surface spécifique de la fraction < 20 µm est 8 et 17 fois supérieure à celle mesurée avec le concentré brut et la fraction 20-100 µm respectivement. Dans le cas de la fraction 20-100 µm, elle est également 2 fois plus faible que la surface spécifique

mesurée avec le concentré brut. Ces résultats sont cohérents avec les différences de granulométries observées précédemment (Figure 30).

Tableau 10 – Surface spécifique du concentré brut (Lot n°2) de chalcopyrite et des fractions 20-100 µm et < 20 µm.

	Lot n°2	20-100 µm	< 20 µm
Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)	0,4	0,2	3,4

2. Préparation de l'inoculum des essais de biolixiviation de chalcopyrite

Comme présenté au Chapitre II, l'inoculum a été préparé à partir du consortium microbien AKL, maintenu en erlenmeyers sur le concentré de Lubin à un taux de solide de 3% (m/m). Ce concentré est facilement utilisable par les bactéries pour leur développement et contient majoritairement des sulfures de cuivre, et une quantité importante de pyrite (15% (m/m)).

Le consortium AKL a été adapté progressivement à un taux de solide de 10% (m/m), puis il a été entretenu en réacteur agité aéré sur le concentré de Lubin par repiquages successifs. Ces cultures ont servi à inoculer les essais de biolixiviation présentés dans les chapitres suivants. Les caractéristiques principales de ces inocula sont traduites par 5 grandeurs mesurables :

- La quantité de bactéries ;
- Les concentrations en cuivre et en fer en solution ;
- La concentration en fer ferrique (déduite de la mesure du potentiel redox et de la concentration en fer en solution) ;
- Le pH.

Dans un souci de répétabilité, les caractéristiques des inocula utilisés lors des essais de biolixiviation doivent être les plus proches possible. Une méthodologie a donc été développée pour assurer leur répétabilité au cours de ce travail de thèse. Sur les 59 cultures qui ont été menées au cours de la thèse pour maintenir un inoculum actif, seules 7 cultures ont été utilisées pour inoculer les essais de biolixiviation de chalcopyrite. Cependant, les résultats accumulés au cours de l'ensemble des cultures ont permis d'étudier statistiquement la répétabilité des inocula.

Cette partie du Chapitre III est divisée en deux sous-parties :

- la première est dédiée à la description détaillée d'une culture de l'inoculum représentative, et des principaux phénomènes qui influencent les caractéristiques des inocula ;
- La seconde présente et discute l'étude de répétabilité menée à partir des résultats obtenus lors de 34 cultures de l'inoculum, selon la méthodologie indiquée au Chapitre II.

2.1. Suivi d'une culture de l'inoculum et interprétation des mesures

Les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus au cours d'un essai représentatif d'une culture de l'inoculum.

2.1.1. Suivi physico-chimique et biologique

La Figure 32 présente le suivi des concentrations en cuivre et en fer au cours d'une culture de l'inoculum. La dissolution du cuivre a lieu en deux temps. Tout d'abord, le cuivre est rapidement mis en solution, puis la dissolution ralentit. Dans le cas du fer, la courbe de dissolution présente trois phases distinctes : au cours du premier jour, très peu de fer est dissous, la dissolution devient ensuite

très rapide avant de ralentir à nouveau nettement après trois jours. La phase de dissolution rapide du fer est donc décalée par rapport à celle du cuivre.

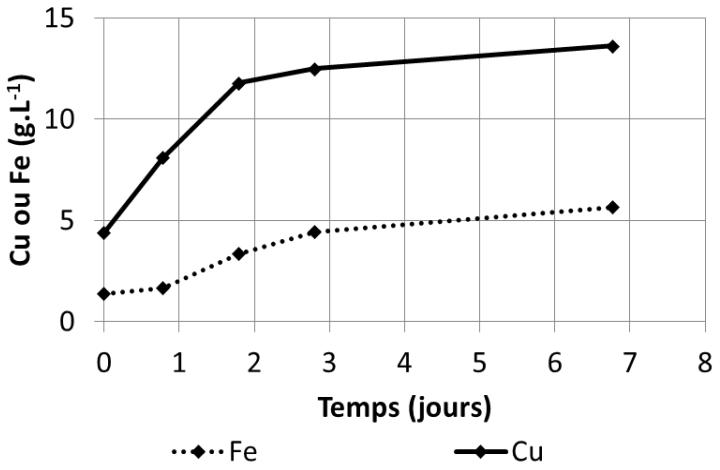


Figure 32 – Concentrations en cuivre et en fer au cours d'un essai représentatif d'une culture de l'inoculum.

Le concentré de Lubin contient des sulfures de cuivre composés ou non de fer (Chapitre II, section 2.2.1). Il est donc possible qu'il y ait une oxydation préférentielle de certains sulfures par rapport à d'autre (par exemple la chalcopyrite est connue pour être plus réfractaire que la chalcocite). Les réactions d'oxydation des sulfures majoritaires dans le concentré de Lubin (bornite, chalcopyrite et chalcocite) sont décrites ci-après (équations [53] à [55] respectivement) avec l'oxydation de la covellite (CuS) (équation [56]), connue comme un intermédiaire de l'oxydation de la chalcocite, et l'oxydation de la pyrite (FeS_2) (équation [57]) (Hong et al., 2021, Hiroyoshi et al., 2001, Rawlings et Johnson, 1998, Cordoba et al., 2008, Schippers, 2004).

$$Cu_5FeS_2 + 12Fe^{3+} \longrightarrow 5Cu^{2+} + 13Fe^{2+} + 4S \quad [53]$$

$$CuFeS_2 + 4Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 5Fe^{2+} + 2S \quad [54]$$

$$Cu_2S + 2Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 2Fe^{2+} + CuS \quad [55]$$

$$CuS + 2Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 2Fe^{2+} + S \quad [56]$$

$$FeS_2 + 14Fe^{3+} + 8H_2O \longrightarrow 2SO_4^{2-} + 15Fe^{2+} + 16H^+ \quad [57]$$

Dans ces réactions, l'espèce Fe^{3+} joue un rôle important en tant qu'oxydant. Ce réactif est produit par oxydation du fer ferreux (Fe^{2+}), qui, en présence de bactéries ferro-oxydantes, est catalysée par l'activité de ces bactéries (équation [58]). En conditions abiotiques (sans activité microbienne), l'oxydation du Fe^{2+} est très lente. Par ailleurs, le soufre et les autres intermédiaires soufrés, produits par oxydation des sulfures, sont oxydés en ions sulfates via l'activité des bactéries sulfo-oxydantes (équation [59]). Cette réaction produit des protons.

$$4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{Bactéries Fe-ox}} 5Fe^{3+} + 2H_2O \quad [58]$$

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Bactéries S-ox}} 2SO_4^{2-} + 4H^+ \quad [59]$$

La présence de bactéries ferro- et sulfo-oxydantes est donc importante pour deux raison : d'une part pour régénérer le Fe^{3+} consommé par oxydation des sulfures ; et, d'autre part, pour compenser la consommation en protons par oxydation du Fe^{2+} (équation [58]) et maintenir un pH favorable au développement de ces bactéries acidophiles.

La Figure 33 présente l'évolution de la biomasse en fonction du temps au cours de la culture de l'inoculum.

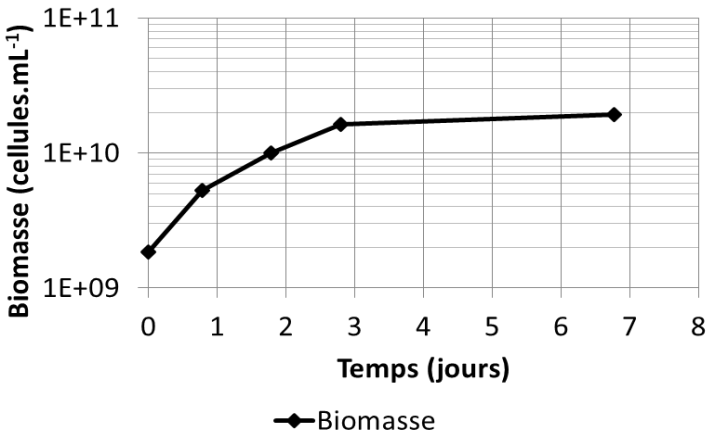


Figure 33 – Biomasse en fonction du temps au cours d'un essai représentatif d'une culture de l'inoculum. Les mesures de biomasse ont été réalisées sur le surnageant d'échantillons de pulpe obtenu après 5 min de décantation.

Une croissance significative a lieu au cours des 3 premiers jours de la culture (biomasse planctonique multipliée par 10). Puis la concentration en bactéries se stabilise. Contrairement à d'autres essais de biolixiviation menés dans des conditions relativement similaires (par exemple lors d'un essai de bio-oxydation de Fe^{2+} en batch (Hubau, 2019)), aucune phase de latence n'est observée. Cette phase est caractérisée par une croissance bactérienne quasi-nulle et précède la phase d'accélération de la croissance des bactéries. Elle correspond souvent à une phase d'adaptation des bactéries au milieu et aux conditions opératoires. Ici, l'absence de cette phase signifie que les bactéries sont bien adaptées au milieu et aux conditions opératoires appliquées, ce qui permet leur croissance rapide dès l'instant initial. La stabilisation de la biomasse en fin d'essai correspond à la phase stationnaire de la croissance bactérienne. A un temps de culture plus long, la quantité de substrat disponible pour les bactéries deviendrait plus faible jusqu'à avoir un déclin de la biomasse.

La Figure 34 indique l'évolution du potentiel redox au cours de la culture de l'inoculum. Celui-ci augmente de manière importante (phase exponentielle) dès l'instant initial. Dans une seconde phase, cette augmentation ralentit (phase quasi-stationnaire) à l'instar de la concentration en cuivre (Figure 32). D'autre part, d'après la Figure 35, qui présente le suivi de la concentration en Fe^{3+} en solution en fonction du temps, la production de Fe^{3+} peut être divisée en deux temps. Tout d'abord, la production de ce réactif est rapide, puis elle ralentit à partir de 3 jours.

Lorsque l'oxydation bactérienne du Fe^{2+} en Fe^{3+} est plus rapide que la consommation du Fe^{3+} par l'oxydation des sulfures, le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} en solution augmente, ce qui se traduit également par une augmentation du potentiel redox. La phase exponentielle observée dès l'instant initial de la culture (Figure 34) traduit donc une oxydation rapide du Fe^{2+} en Fe^{3+} catalysée par l'activité bactérienne, ce qui est cohérent avec la croissance de la biomasse (Figure 33). Au $2^{ème}$ jour, le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} est égal à 48, le fer en solution est donc majoritairement sous forme de Fe^{3+} (Figure 35 et Figure 32). Ce résultat

montre qu'en moins de 48h, l'oxydation biologique du Fe^{2+} est plus rapide que la consommation de Fe^{3+} par l'oxydation des sulfures.

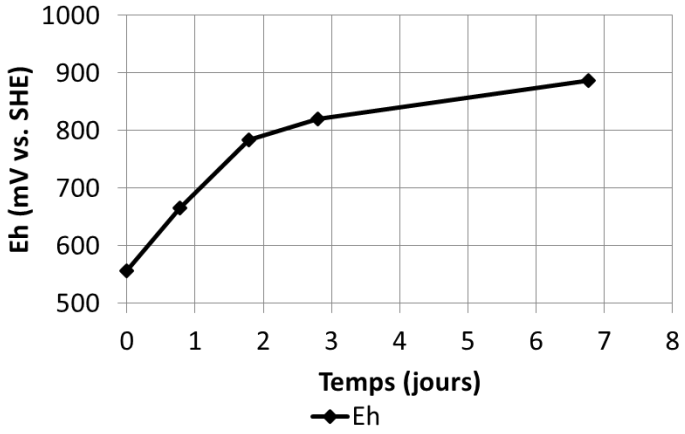


Figure 34 – Potentiel redox (Eh) mesuré en fonction du temps au cours d'un essai représentatif d'une culture de l'inoculum.

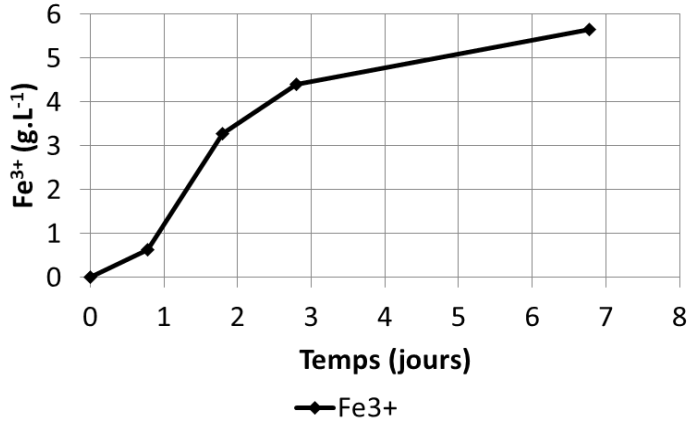


Figure 35 – Concentration en Fe^{3+} en solution en fonction du temps au cours d'un essai représentatif d'une culture de l'inoculum.

La Figure 36 présente l'évolution du pH en fonction du temps au cours de la culture de l'inoculum.

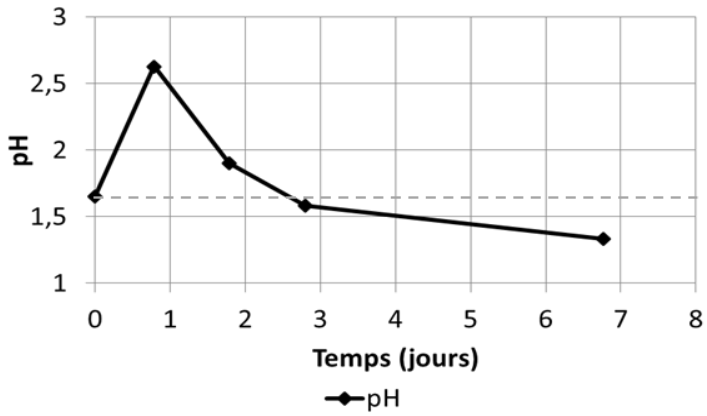


Figure 36 – pH en fonction du temps au cours d'un essai représentatif d'une culture de l'inoculum. Lorsque le pH mesuré est supérieur à 1,7 (ligne en tiret), le pH est ajusté à 1,7 avec de l'acide (H_2SO_4 à 96%) au plus une fois par jour.

Le pH augmente d'abord nettement pour atteindre 2,6 au premier jour, puis diminue progressivement et atteint 1,3 à la fin de l'essai. Lors des deux premiers jours, le pH étant supérieur à 1,7, de l'acide sulfurique a été ajouté dans le réacteur (juste après la mesure) pour ajuster le pH à 1,7. Lors de cette phase, la production de protons liée à l'oxydation biologique des espèces soufrées (équation [59]) est plus lente que les réactions consommatrices de protons (oxydation biologique du Fe^{2+} (équation [58])). Au-delà de 2 jours, la diminution du pH indique que la quantité de protons produite est supérieure à la quantité de protons consommée.

2.1.2. Composition de l'inoculum

La Figure 37 indique les proportions relatives des espèces identifiées à la fin de la culture de l'inoculum.

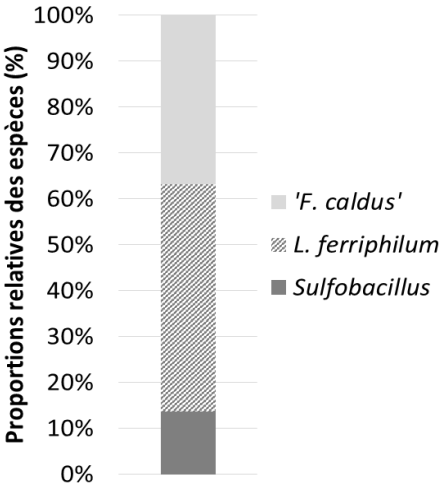


Figure 37 – Proportions des espèces identifiées à la fin d'un essai représentatif d'une culture de l'inoculum.

Ces espèces correspondent à celles présentes dans le consortium AKL : '*F. caldus'* (sulfo-oxydante), *L. ferriphilum* (ferro-oxydante) et les espèces du genre *Sulfobacillus* (sulfo- et ferro-oxydantes). On observe également une dominance de l'espèce *L. ferriphilum* (50%) à la fin de la culture, suivie de l'espèce '*F. caldus'* (37%). Les espèces du genre *Sulfobacillus* sont au contraire minoritaires (13%).

2.1.3. Récapitulatif des caractéristiques principales de l'inoculum

Les caractéristiques de l'inoculum sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11 – Principales caractéristiques d'un inoculum obtenues à la fin d'un essai représentatif d'une culture de l'inoculum

Cu ($g.L^{-1}$)	Fe (g.L-1)	Fe^{3+} ($g.L^{-1}$)	Eh (mV vs. SHE)	pH	Biomasse ($cellules.mL^{-1}$)	Espèces bactériennes majoritaires
13,7	5,7	5,7	886	1,33	$1,9.10^{10}$	*'F. caldus', L. ferriphilum* (dominant) et *Sulfobacillus*

2.2. Etude de répétabilité de l'inoculum

L'entretien de l'inoculum au cours de la thèse a été réalisé par repiquages successifs selon le protocole décrit au Chapitre II. Parmi ces cultures, 34 ont été réalisées sans qu'aucun problème technique ou d'analyse ne survienne et ne représentent pas de cas particulier (voir Chapitre II, section 2.2.3). Au cours de ces 34 cultures, il s'est avéré que l'évolution de certaines caractéristiques présentait des

variations notables. A titre d'exemple, la Figure 38 illustre l'évolution de la concentration en Fe totale au cours de trois cultures.

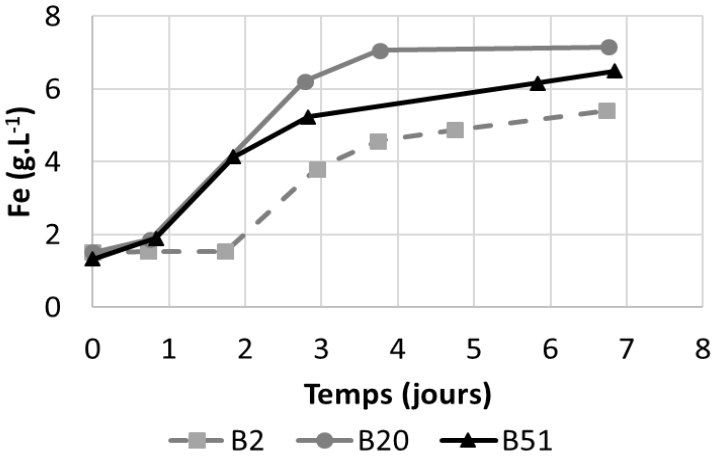


Figure 38 – Concentration en fer en fonction du temps au cours de trois cultures de l'inoculum (B2, B20 et B51). Les numéros correspondent aux numéros de la culture qui sont incrémentés de 1 à chaque repiquage.

D'après la Figure 38, quelle que soit la culture, la dissolution du fer est divisée en trois phases comme montré précédemment. Toutefois, la première phase de dissolution est plus longue dans le cas de la culture B2. De même, la phase de la dissolution rapide du fer n'a pas la même durée d'une culture à l'autre. Autrement dit, malgré des tendances similaires d'une culture à l'autre (3 phases), des différences temporelles induisent un écart entre les concentrations en fer obtenues à la fin des cultures.

D'autres écarts plus ou moins importants et du même type ont également été observés d'une culture à l'autre pour les autres grandeurs mesurées (Annexe 5). Afin d'évaluer la répétabilité des inocula, les données issues des 34 cultures ont donc été analysées selon la méthodologie décrite dans la partie 2.2.3 du Chapitre II. La répétabilité a été évaluée via la dispersion des mesures de concentrations en cuivre et fer, du potentiel redox, de la concentration en Fe^{3+}, du pH et de la biomasse au cours des 34 cultures.

2.2.1. Répétabilité de l'inoculum : étude des caractéristiques principales

Concentrations en cuivre et en fer

La Figure 39 présente les concentrations en cuivre obtenues au cours des 34 cultures, ainsi que la moyenne et le coefficient de variation obtenu à partir de ces concentrations en fonction du temps. Le coefficient de variation correspond au rapport de l'écart-type à la moyenne et permet d'évaluer la répétabilité des mesures. Pour cette mesure, l'erreur analytique est estimée à 5% (voir Chapitre II).

D'après la Figure 39a, au cours de la phase de dissolution rapide du cuivre, la concentration en cuivre varie de manière importante d'une culture à l'autre (variation maximale entre 4 et 5 $g.L^{-1}$). Toutefois, à partir de 4 jours, la moyenne des concentrations ne varie plus significativement, et une droite horizontale correspondant à une concentration de 13,8 $g.L^{-1}$ peut être tracée dans l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne. La variabilité de la concentration en cuivre en fin de culture est donc liée à une variabilité intrinsèque du système sans effet notable de la variation de la concentration en début d'essai. Par ailleurs, d'après la Figure 39b, le coefficient de variation est plus élevé en début de culture qu'en fin de culture. Il est également plus élevé que l'erreur analytique (5%) mais s'en

rapproche, voir l'atteint, à partir de 3 jours où il devient plus ou moins stable (coefficient de variation compris entre 5% et 7%). La répétabilité des mesures est donc meilleure en fin de culture et stable à partir de 3 jours ; l'erreur sur la mesure contribue de manière non négligeable à la variabilité de la concentration en cuivre observée au-delà de 3 jours.

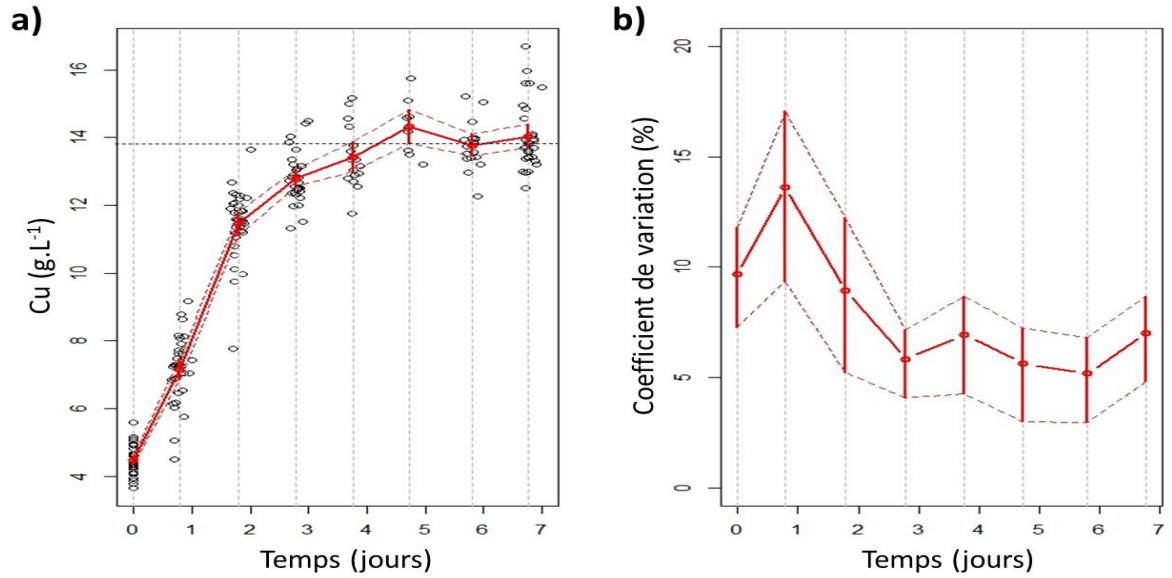


Figure 39 – (a) Concentrations en cuivre (points blancs) et moyenne des concentrations en cuivre (courbe pleine rouge) en fonction du temps au cours de 34 cultures de l'inoculum. (b) Coefficient de variation calculé à partir des concentrations en cuivre mesurées en fonction du temps. Les courbes rouges en pointillées délimitent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne et du coefficient de variation en fonction du temps.

La Figure 40 présente les concentrations en fer mesurées au cours des 34 cultures, en plus de la moyenne et du coefficient de variation déterminés à partir de ces concentrations en fonction du temps. L'erreur analytique est comparable à celle de la concentration en cuivre (5%).

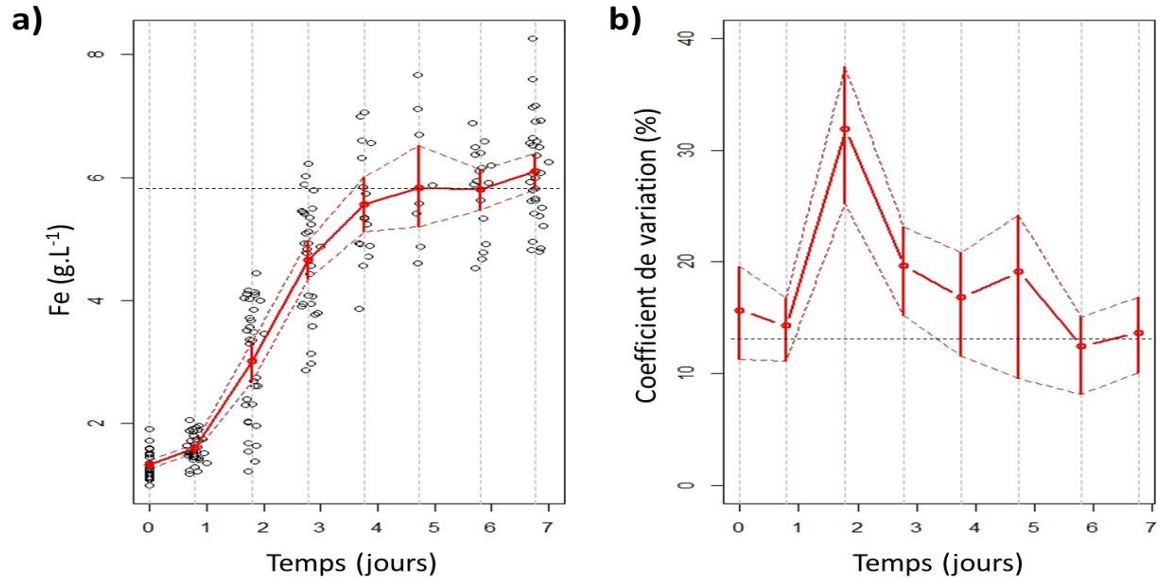


Figure 40 - (a) Concentrations en fer (points blancs) et moyenne des concentrations en fer (courbe pleine rouge) en fonction du temps au cours de 34 cultures de l'inoculum. (b) Coefficient de variation calculé à partir des concentrations en fer mesurées en fonction du temps. Les courbes rouges en pointillées délimitent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne et du coefficient de variation en fonction du temps.

Au cours de la première phase de dissolution du fer (peu de dissolution du métal), la variation des concentrations en fer d'une culture à l'autre est de l'ordre de 1 $g.L^{-1}$. Cette variation devient ensuite plus importante avec un maximum de 3,5 $g.L^{-1}$ (Figure 40a). Toutefois, comme pour la concentration en cuivre, la moyenne des concentrations en fer ne varie plus significativement à partir de 4 jours. La variation des concentrations en fer en début de culture, en particulier pendant la phase de dissolution rapide du fer, n'a donc pas d'effet significatif sur la variabilité de cette concentration en fin de culture. D'autre part, le coefficient de variation, compris entre 12 et 20%, excepté à 2 jours où il atteint 32%, est bien supérieur à l'erreur analytique (5%). La variabilité de la concentration en fer observée au-delà de 4 jours est donc due à la variabilité intrinsèque du système plutôt qu'à l'erreur sur la mesure, avec une concentration finale stable de l'ordre de 5,8 $g.L^{-1}$. Au dernier jour de culture, le coefficient de variation est également supérieur à celui obtenu pour la concentration en cuivre. Autrement dit, les mesures de concentration en cuivre sont plus répétables que les mesures de concentration en fer.

Potentiel redox et concentration en Fe^{3+}

La Figure 41 montre les potentiels redox observés au cours des 34 cultures, et la moyenne et le coefficient de variation obtenus à partir de ces potentiels en fonction du temps. La variation du potentiel redox d'une culture à l'autre est plus importante en début de culture, avec un maximum de 130 mV vs. SHE à 2 jours, pendant la phase exponentielle. Elle est ensuite près de quatre fois plus faible au dernier jour de culture. Au cours de la phase exponentielle, le potentiel redox augmente de manière exponentielle. Un faible décalage temporel de la mesure d'une culture à l'autre peut donc se traduire en une différence notable de potentiel redox mesuré. Cela pourrait en partie expliquer la variation importante du potentiel redox observée en début de culture, autrement dit au cours de la phase exponentielle. Néanmoins, cette variation n'impacte pas de manière notable le potentiel redox final obtenu proche de 890 mV vs. SHE. Par ailleurs, le coefficient de variation est faible (égal à 1% en fin de culture) comparé à ceux obtenus pour les concentrations en cuivre et en fer (Figure 39b et Figure 40b). La répétabilité des mesures de potentiel redox, notamment en fin de culture, est donc meilleure que celle des mesures de concentrations en cuivre et en fer et est stable à partir de 4 jours. Néanmoins, le coefficient de variation est plus élevé en début de culture qu'en fin de culture. Autrement dit, les mesures sont plus dispersées autour de la moyenne en début de culture.

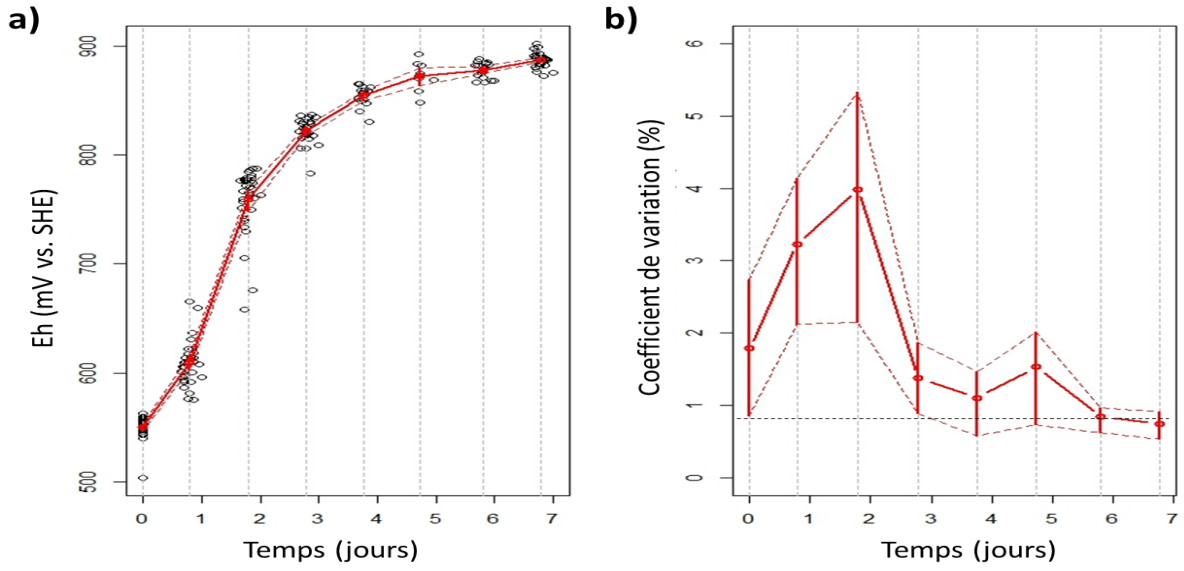


Figure 41 - (a) Potentiels redox (points blancs) et moyenne des potentiels redox (courbe pleine rouge) en fonction du temps au cours de 34 cultures de l'inoculum. (b) Coefficient de variation calculé à partir des potentiels redox mesurés en fonction du temps. Les courbes rouges en pointillées délimitent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne et du coefficient de variation en fonction du temps.

La Figure 42 montre les concentrations en Fe^{3+} observées au cours des 34 cultures, ainsi que la moyenne et le coefficient de variation calculés à partir de ces concentrations en fonction du temps.

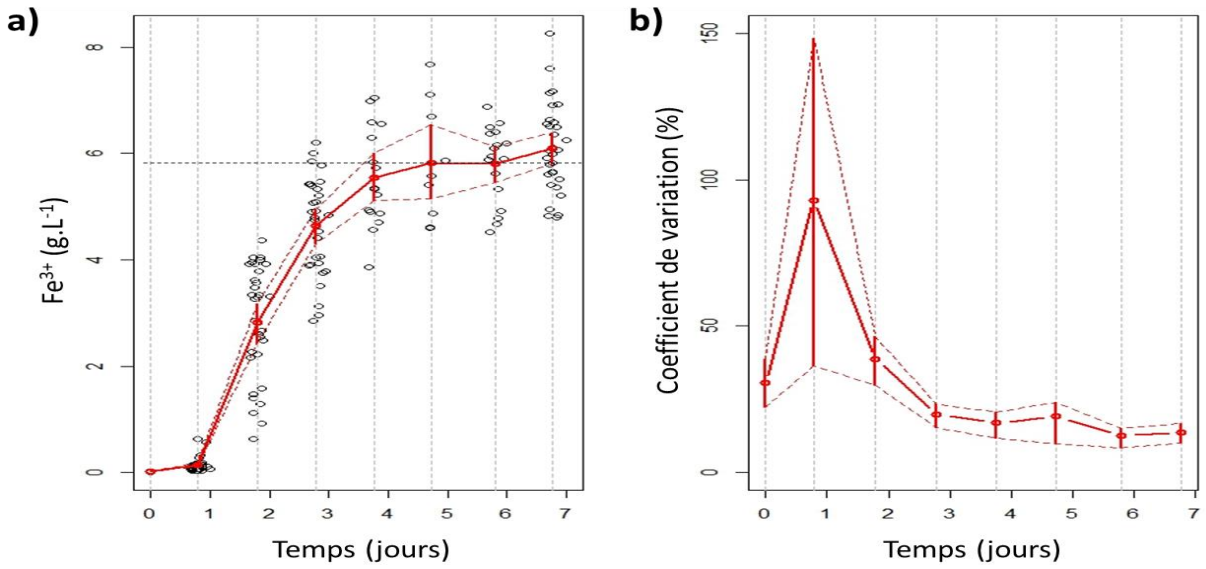


Figure 42 - (a) Concentrations en Fe^{3+} (points blancs) et moyenne des concentrations en Fe^{3+} (courbe pleine rouge) en fonction du temps au cours de 34 cultures de l'inoculum. (b) Coefficient de variation calculé à partir des concentrations en Fe^{3+} mesurées en fonction du temps. Les courbes rouges en pointillées délimitent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne et du coefficient de variation en fonction du temps.

En début de culture, la concentration en Fe^{3+} est proche de zéro. Cette faible concentration est probablement à l'origine de la valeur élevée du coefficient de variation observé au jour 1. En effet, lorsque la moyenne est proche de zéro, le coefficient de variation est plus sensible aux faibles variations. A partir de 2 jours la concentration en Fe^{3+} varie de manière plus importante d'une culture à l'autre avec un écart de maximal proche de 4 $g.L^{-1}$. D'après la Figure 41, à partir de 3 jours, le potentiel redox est compris entre 783 et 837 mV vs. SHE, ce qui correspond à un ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} supérieur à 45 : la majorité du fer en solution est sous forme Fe^{3+}. Le comportement de Fe^{3+} est donc identique à celui de la concentration en fer totale.

pH

La Figure 43 présente les pH obtenus lors des 34 cultures, leur moyenne et le coefficient de variation obtenu à partir des pH mesurés en fonction du temps. A l'instant initial, l'ajustement manuel du pH est à l'origine de la variation de ce paramètre d'une culture à l'autre.

La variation du pH entre les différentes cultures est élevée en début de culture et maximale à 1 jour (variation proche de 1), puis diminue avec le temps. Précédemment, une variation importante des concentrations en cuivre, en fer et en Fe^{3+} a été constatée d'une culture à l'autre au cours des 2 premiers jours des 34 cultures. Une hypothèse est que la quantité de carbonate contenue dans le concentré de Lubin varie avec la masse de concentré utilisée (variation de l'ordre de 10 g maximum), et donc que la consommation en protons pour la dissolution des carbonates et la production de Fe^{3+} (équation [58]) varie également d'une culture à l'autre. Elle pourrait donc expliquer les variations de pH observées entre les différentes cultures lors des deux premiers jours. Toutefois, à partir de 5 jours, la moyenne des mesures de pH ne varie plus significativement et est d'environ 1,4. La variabilité du pH en début de culture n'a donc pas d'impact notable sur la variabilité du pH en fin de culture. D'autre part, le coefficient de variation est également plus élevé en début d'essai et devient plus ou moins stable entre 3% et 5% dès 3 jours. La répétabilité du pH est donc stable à partir de 3 jours. Au dernier

jour de culture, elle est également meilleure que celle des mesures de concentrations en cuivre et en fer, mais moins bonne que celle des mesures de potentiel redox.

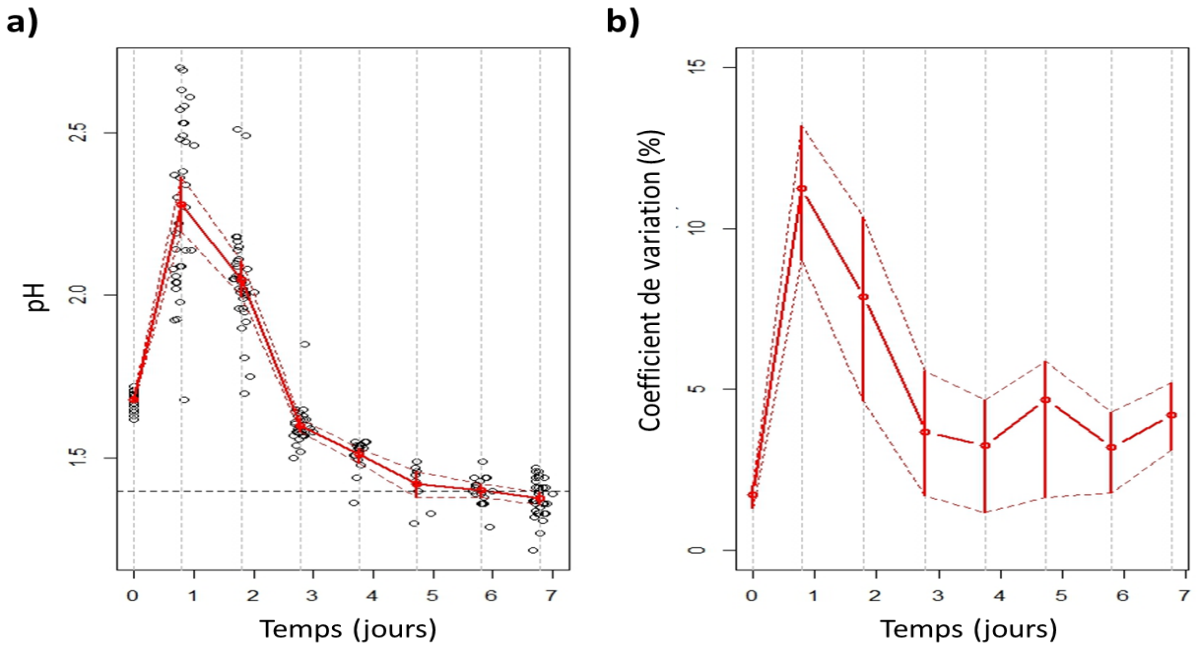


Figure 43 - pH (points blancs) et moyenne des pH (courbe pleine rouge) en fonction du temps au cours de 34 cultures de l'inoculum. (b) Coefficient de variation calculé à partir des pH mesurés en fonction du temps. Les courbes rouges en pointillées délimitent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne et du coefficient de variation en fonction du temps.

Biomasse

La Figure 44 montre la biomasse mesurée au cours de 32 cultures parmi les 34 étudiées, ainsi que la moyenne et le coefficient de variation calculés à partir ces mesures en fonction du temps. La biomasse a été mesurée par comptage des cellules au microscope optique sur des échantillons de surnageant obtenus après 5 min de décantation d'échantillons de pulpe.

On peut souligner que, contrairement aux autres caractéristiques, la variation de la biomasse est très élevée en début de culture. Cela pourrait être dû à la dilution de l'échantillon et à l'opérateur. En effet, le comptage des cellules n'est pas complètement objectif et dépend de l'opérateur. La dilution de l'échantillon est décidée en fonction du nombre de cellules comptées et peut donc varier d'un opérateur à l'autre. Cette variation de dilution a été observée de manière plus fréquente au début des cultures qu'à la fin des cultures. A partir de 4 jours, la biomasse est stable et est de l'ordre de 3.10^{10} cellules.mL^{-1}). La variation de la biomasse observée en début de culture n'a donc pas d'effet significatif sur la variabilité de la biomasse en fin de culture. Le coefficient de variation est maximal à l'instant initial, puis diminue et se stabilise entre 17% et 23% à partir de 4 jours. Comme pour les autres paramètres étudiés, la répétabilité des mesures de biomasse est donc stable à 4 jours et au-delà, mais elle est moins bonne que celle des autres grandeurs mesurées. Par ailleurs, le coefficient de variation au dernier jour de culture est du même ordre de grandeur que l'incertitude sur la mesure de biomasse calculée (entre 12 et 32%, voir Chapitre II). La variabilité de la biomasse observée dans l'inoculum obtenu en fin de culture est donc essentiellement attribuable à la variabilité de la mesure.

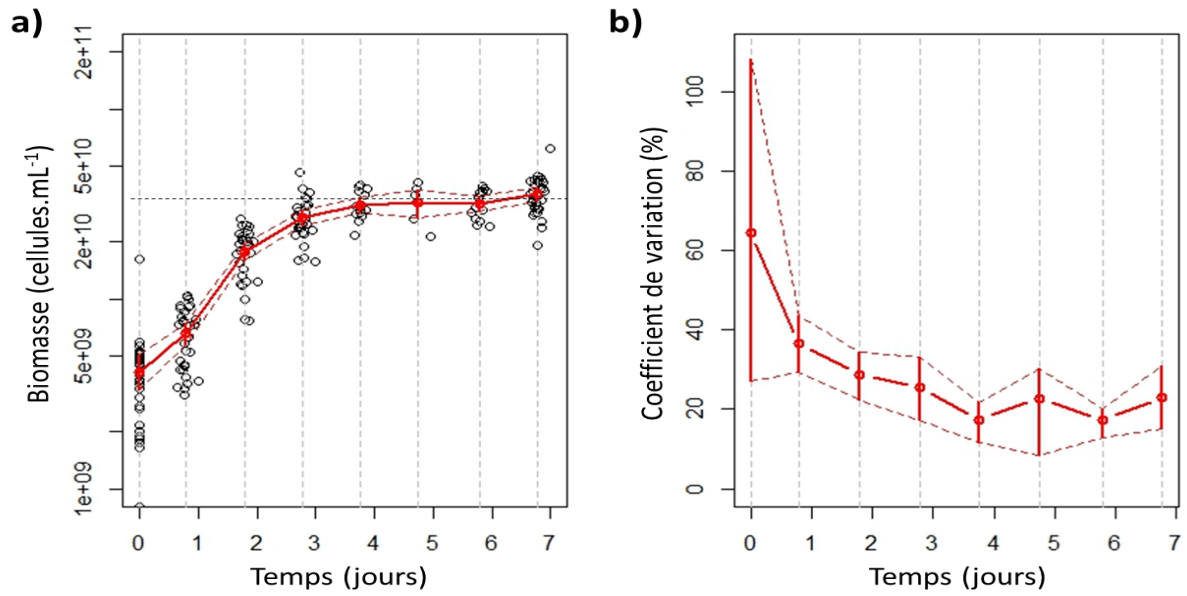


Figure 44 - Biomasses (points blancs) et moyenne des biomasses (courbe pleine rouge) en fonction du temps au cours de 32 cultures de l'inoculum. (b) Coefficient de variation calculé à partir des biomasses mesurées en fonction du temps. Les courbes rouges en pointillées délimitent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne et du coefficient de variation en fonction du temps.

2.2.2. Répétabilité de l'inoculum : diversité bactérienne

La Figure 45 présente les proportions des espèces (profil de diversité) présentes le dernier jour d'incubation de 6 des 34 cultures étudiées. Ces 6 cultures ne correspondent pas nécessairement aux cultures utilisées pour les essais de biolixiviation de chalcopyrite.

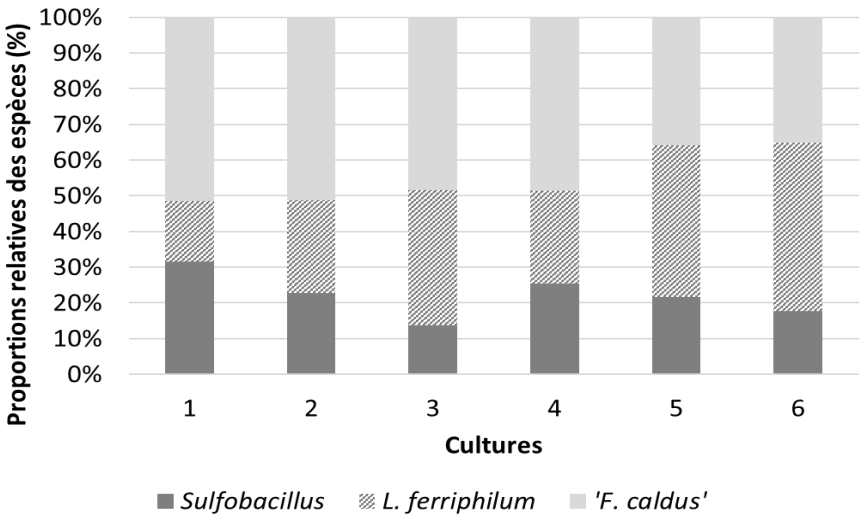


Figure 45 – Profils de diversité de la communauté bactérienne à la fin de 6 des 34 cultures de l'inoculum étudiées (numérotation indépendante des numéros du repiquage de la culture de l'inoculum). Les résultats ont été obtenus à partir de d'échantillons de pulpe par analyse T-RFLP.

A la fin des 6 cultures, les espèces majoritaires présentes dans le consortium AKL sont identifiées dans chaque culture. D'autre part, les proportions relatives des différentes espèces varient de manière notable d'une culture à l'autre. En effet, dans plus de la moitié des cultures (cultures 1, 2, 3, et 4), la communauté bactérienne est dominée par l'espèce *'F. caldus'*, dont la proportion relative est

d'environ 50%, contrairement au reste des cultures (culture 5 et 6) dominées par l'espèce *L. ferriphilum* (proportion relative de 42% et 47% à la fin des cultures 5 et 6 respectivement). Dans la culture 1, *L. ferriphilum* est minoritaire par rapport aux espèces du genre *Sulfobacillus*, qui est généralement le genre dont la proportion relative est la plus faible. Ces analyses bactériennes indiquent que la croissance et/ou l'activité des bactéries de chaque espèce diffère(nt) d'une culture à l'autre, sans impact majeur sur les caractéristiques finales des inocula.

Lorsque l'on observe l'évolution du pH au cours des 6 cultures étudiées (Figure 46), le pH reste généralement plus longtemps à un pH supérieur à 2 (soit une diminution du pH qui commence au 2ème jour au lieu du 1er jour) lorsque la communauté bactérienne est dominée par l'espèce *'F. caldus'* en fin de culture, excepté pour la culture 4. D'après Hallberg et Lindström (1994), la croissance de cette espèce est optimale pour un pH compris entre 2 et 2,5, tandis que l'intervalle de pH optimal pour la croissance de l'espèce *L. ferriphilum* est compris entre 1,4 et 1,8 (Coram et al., 2002). Ainsi, la croissance de l'espèce *'F. caldus'* pourrait être davantage favorisée lorsque le pH reste plus longtemps supérieur à 2 et inversement pour l'espèce *L. ferriphilum*. Ainsi la variation du pH en début de culture pourrait en partie expliquer la variation des proportions des espèces *'F. caldus'* et *L. ferriphilum* d'une culture à l'autre.

D'autre part la culture qui précède la culture 1 et a servi à l'inoculer a été maintenue un peu plus longtemps (8 jours au lieu de 7 jours). Or en fin de culture, l'oxydation des sulfures est plus lente (Figure 32), donc moins de Fe^{2+} est produit pour l'activité ferro-oxydante des bactéries. Par ailleurs, l'espèce *L. ferriphilum* produit l'énergie dont elle a besoin par oxydation des Fe^{2+}, tandis que les espèces du genre *Sulfobacillus* sont capables de produire cette énergie par oxydation du soufre en plus de l'oxydation des ions Fe^{2+}. Il est donc possible que les bactéries appartenant à l'espèce *L. ferriphilum* soient moins actives dans l'inoculum de la culture 1 que dans l'inoculum des autres cultures. La faible proportion de l'espèce *L. ferriphilum* à la fin de la culture 1 pourrait alors provenir d'un développent plus lent de cette espèce, et expliquerait l'oxydation du Fe^{2+} plus faible au début de la culture 1 (léger retard de l'augmentation du potentiel redox (Figure 47)).

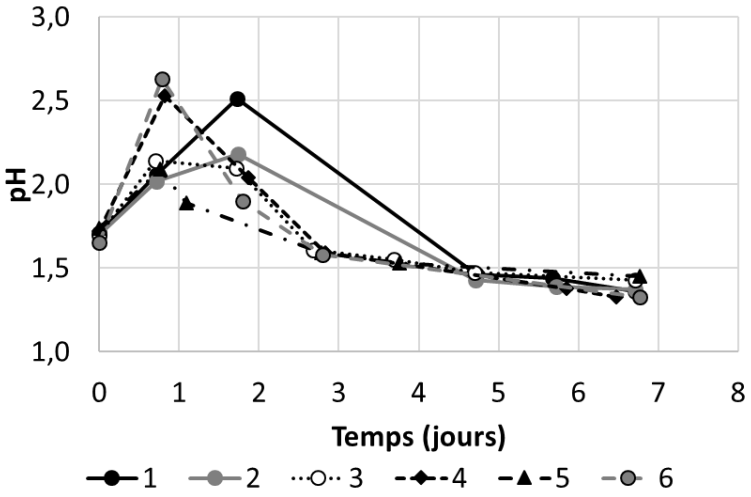


Figure 46 – pH en fonction du temps au cours de 6 des 34 cultures de l'inoculum étudiées (numérotation indépendante des numéros du repiquage de la culture de l'inoculum).

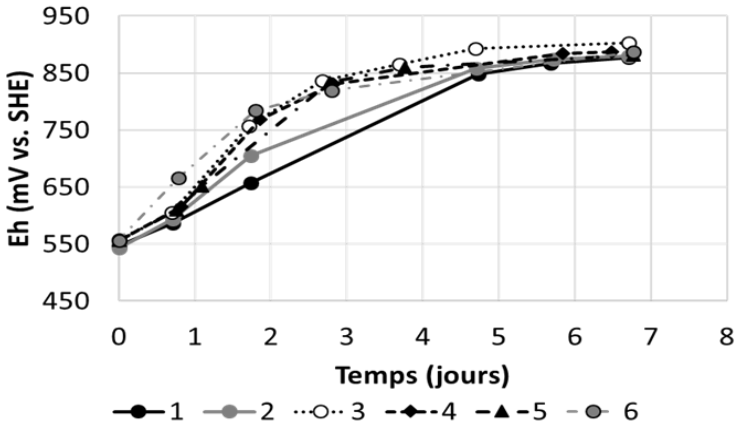


Figure 47 – Potentiel redox (Eh) en fonction du temps au cours de 6 des 34 cultures de l'inoculum étudiées (numérotation indépendante des numéros du repiquage de la culture de l'inoculum).

2.2.3. Conclusions

L'étude statistique des 34 cultures, basée sur la mesure journalière de 5 grandeurs caractéristiques de l'inoculum, montre principalement que la variabilité de ces grandeurs est principalement liée à la variabilité intrinsèque du système et aux incertitudes des mesures. Elle n'est pas liée à la variabilité observée en début de culture, qui est peut-être due à des différences temporelles de mesures, de cinétiques des réactions, et/ou à la faible variabilité de l'échantillon de concentré introduit dans le réacteur. La variabilité intrinsèque du système, quant à elle, peut être en partie due à une croissance et/ou une activité bactérienne variable pour chaque espèce présente, lors des différentes cultures.

Par ailleurs, quel que soit le paramètre, la répétabilité des mesures évaluée par le coefficient de variation devient stable dès le quatrième jour. Elle est meilleure dans le cas des mesures de potentiel redox, suivi des mesures de pH, de concentration en cuivre, de concentration en fer et Fe^{3+}, et enfin des mesures de biomasse. On peut donc considérer que les inocula obtenus via la méthodologie détaillée dans la section 2.2.3 du Chapitre II sont répétables avec une certaine variabilité, qui dépend du système et des méthodes de mesure.

D'autre part, la concentration en sulfate dissout est très grande dans le système en raison notamment de la bio-oxydation des espèces réduites du soufre qui se forme lors de la dissolution des sulfures. Il n'est donc pas impossible qu'une partie du Fe^{3+} en solution précipite avec le SO_4^{2-} sous forme de jarosite ([60]) (A. G. Guézennec, 2019).

$$3Fe^{3+} + 2SO_4^{2-} + 6H_2O + M^+ \longrightarrow MFe_3(SO_4)_2(OH)_6 + 6H^+ \qquad [60]$$

Avec M^+ : K^+, Na^+, NH_4^+ ou H_3O^+

Ce phénomène pourrait également être en partie à l'origine de la variabilité observée sur les mesures de concentration en fer et en Fe^{3+}.

Cette étude pourrait être affinée en étudiant des paramètres plus précis, tels que : le jour de lancement des cultures (la plupart du temps aucun suivi n'est fait lors des weekends), la quantité d'acide ajoutée à l'instant initial, le moment où le pH est ajusté à 1,7 lorsque le pH mesuré est supérieur à 1,7 au cours de la culture. L'influence de l'historique de l'inoculum de chaque culture sur la variabilité de chaque paramètre pourrait aussi être étudiée. L'affinage de cette étude pourrait être réalisé par une approche de type « data mining », mais ceci n'est pas le cœur du travail de cette thèse.

3. Conclusion du chapitre

L'objectif de ce chapitre était de produire les informations nécessaires pour bien définir l'état initial de chaque essai de biolixiviation de chalcopyrite.

Pour cela, les compositions chimique et minérale et la granulométrie du concentré brut de chalcopyrite et des deux fractions granulométriques issues de ce concentré ont été caractérisées. La principale différence entre ces trois matériaux est la teneur en chalcopyrite, qui dépend de la granulométrie des échantillons.

Les propriétés de l'inoculum ont également été définies et étudiées d'une culture à l'autre, montrant la répétabilité de l'inoculum, malgré la persistance d'une certaine variabilité, en partie due à la variabilité intrinsèque du système. La méthodologie appliquée pour l'entretien d'un inoculum actif permet donc d'avoir des inocula dont les propriétés sont relativement proches, d'un essai de biolixiviation à l'autre.

Dans les chapitres suivants, les essais de biolixiviation de chalcopyrite seront donc considérés comme ayant été inoculés avec des inocula similaires.

4. Références

Coram, N.J., Rawlings, D.E., 2002. Molecular Relationship between Two Groups of the Genus *Leptospirillum* and the Finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. Dominates South African Commercial Biooxidation Tanks That Operate at 40°C. Appl Environ Microbiol 68, 838–845. https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.838-845.2002

Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part II: Effect of redox potential. Hydrometallurgy 93, 88–96. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.016

Guézennec, A.-G., 2019. Bioleaching of copper ores and concentrates – fundamentals and practical aspects. In : Copper Hydrometallurgy: Principles and PracticePublisher: B. Wassink & E. Asselin (eds). METSOC, West Westmount, Québec, Canada.

Hallberg, K.B., Lindström, E.B., 1994. Characterization of Thiobacillus caldus sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. Microbiology 140, 3451–3456. https://doi.org/10.1099/13500872-140-12-3451

Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., 2001. Enhancement of chalcopyrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions. Hydrometallurgy 60, 185–197. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00155-9

Hong, M., Liu, S., Huang, X., Yang, B., Zhao, C., Yu, S., Liu, Y., Qiu, G., Wang, J., 2021. A review on bornite (bio)leaching. Minerals Engineering 174, 107245. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107245

Hubau, A., 2019. Conception d'un procédé de biolixiviation pour la valorisation des métaux contenus dans les déchets de cartes électroniques. Thèse, Université Paris sciences et lettres.

Rawlings, D.E., et Johnson, D.B. (1998). « Biomining Theory, Microbes and Industrial Processes ». Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 302. ISBN 3-540-63252-2

Schippers, A., 2004, Biogeochemistry of metal sulfide oxidation in mining environments, sediments, and soils, in Amend, J.P., Edwards, K.J., and Lyons, T.W. (eds), Sulfur biogeochemistry—Past and present: Boulder, Colorado, Geological Society of America Special Paper 379, p. 49–62. https://doi.org/10.1130/0-8137-2379-5.49

Chapitre IV - Effet de la taille des particules et de la régulation du pH sur la biolixiviation de la chalcopyrite en réacteur conventionnel

Ce chapitre est consacré à l'étude de la biolixiviation de la chalcopyrite en réacteur conventionnel, c'est-à-dire sans phénomène d'attrition. Les essais serviront de référence pour évaluer dans le chapitre suivant l'influence de l'attrition sur la biolixiviation de la chalcopyrite. Par commodité, on appellera ces essais, « essais de biolixiviation conventionnelle » par opposition à « essai de biolixiviation attritive ». Les essais de biolixiviation conventionnelle correspondent ainsi aux essais réalisés en réacteur parfaitement agité (RPA) sans utiliser de média broyant.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'influence de la taille des particules sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite. En effet, la présence du média broyant induit, outre des phénomènes d'attrition, une réduction de taille de particules. Les essais ont pour but de fournir des données qui permettront ensuite de discriminer l'influence de l'attrition et celle de la taille des particules sur la cinétique de biolixiviation de la chalcopyrite. De plus, l'impact de la taille des particules (et en particulier des fines particules) sur les bactéries thermophiles modérées ou mésophiles utilisées en biolixiviation conventionnelle est peu étudié dans la littérature. Cette étude a donc également pour objectif d'apporter un complément d'information sur ce sujet.

La seconde partie du chapitre aborde la question de l'influence du pH sur les différents mécanismes impliqués dans la biolixiviation. En effet, afin de limiter la variation simultanée de plusieurs paramètres au cours des essais de biolixiviation attritive, il a été décidé de réguler le pH à 1,3 sur toute la durée de ces essais. Un essai de biolixiviation conventionnelle de référence (avec régulation du pH) a donc été réalisé avec un échantillon issu de la fraction 20-100 µm. Cette fraction est celle qui a été utilisée pour les essais de biolixiviation attritive. Cet essai permettra de discuter l'effet de la régulation du pH sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite.

1. Influence de la taille des particules sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite

Cette sous-partie s'intéresse à l'effet de la taille des particules sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite et a pour objectif de :

- Caractériser le phénomène de passivation de la chalcopyrite lors d'essais de biolixiviation conventionnelle ;
- Déterminer l'influence de la taille des particules sur la cinétique d'oxydation de la chalcopyrite et sur l'apparition des couches passivantes ;
- Déterminer l'effet des particules fines sur la communauté bactérienne. En effet l'effet délétère des particules fines sur la croissance et l'activité des microorganismes a été démontré pour une espèce d'archée thermophile (Nemati et al., 2000) et souvent mentionné ou supposé dans le cas de bactéries thermophiles modérées ou mésophiles (Olubambi et al., 2009 et Manafi et al., 2021).

Trois essais de biolixiviation conventionnelle ont été réalisés avec des échantillons de granulométrie différente : la fraction < 20 µm du concentré de chalcopyrite, la fraction 20-100 µm, et le concentré de chalcopyrite brut (Chapitre II, section 1.2). Comme détaillé au Chapitre III, la fraction < 20 µm contient 91% de particules inférieures à 20 µm (en volume), la fraction 20-100 µm en contient 12% et le concentré brut 23%. Les essais ont été effectués dans les conditions opératoires et selon le protocole décrits dans la section 3.1.2 du Chapitre II (essais n°1 à 3). L'inoculum utilisé pour ces essais provient d'une seule et même culture (Chapitre II, section 2.2.2), dont les caractéristiques ont été détaillées au Chapitre III.

1.1. Oxydation de la chalcopyrite en fonction de la taille des particules

1.1.1. Dissolution des sulfures (chalcopyrite et pyrite)

La Figure 48 présente l'évolution des rendements de dissolution du cuivre (a) et du fer (b) pour chacune des fractions.

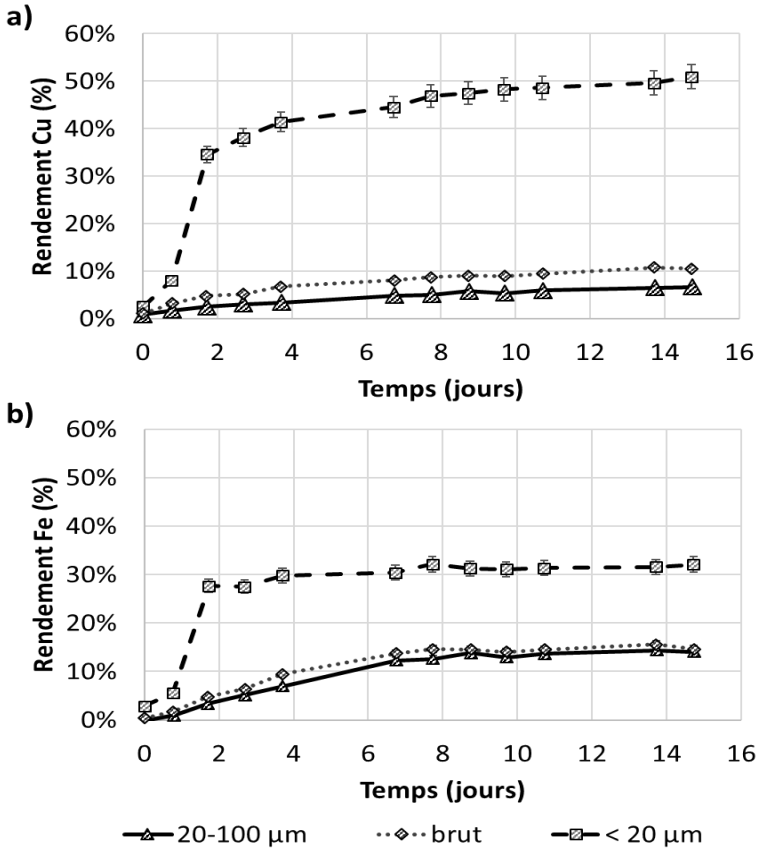


Figure 48 – Rendements de dissolution du (a) cuivre et du (b) fer en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm. Les rendements ont été calculés à partir de l'analyse de la phase liquide de la pulpe (Chapitre II, section 4.1).

Les cinétiques de dissolution observées lors des essais de biolixiviation de la fraction 20-100 µm et du concentré brut sont très proches. Pour ces deux matériaux, la vitesse de dissolution du cuivre est faible (inférieure à 1 $g.L^{-1}.j^{-1}$) lors des 4 premiers jours et devient ensuite quasi-nulle. Assez similairement, le rendement de dissolution du fer augmente d'abord à vitesse constante, puis reste constant.

Dans le cas de l'essai avec la fraction < 20 µm, la cinétique de dissolution des deux métaux est nettement plus rapide (la vitesse de dissolution du cuivre et du fer entre le 1er et 2ème jour est d'environ 8 $g.L^{-1}.j^{-1}$). Toutefois, au-delà de 2 jours, la vitesse de dissolution du cuivre diminue fortement, et la dissolution du fer s'arrête. D'après la Figure 48a, le rendement final de dissolution du cuivre obtenu à partir de la concentration en cuivre de la phase liquide est de 7% pour la fraction 20-100 µm, 10% pour le concentré brut et 51% pour la fraction <20µm.

Le récapitulatif complet des analyses élémentaires des résidus récupérés à la fin des essais est présenté en Annexe 6.

Le Tableau 12 indique les rendements finaux de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite calculés à partir des équations [61] et [62]. Le tableau indique également les pertes en cuivre et en fer au cours des essais en raison des prélèvements, et des pertes en solide et en liquide générées par les différentes opérations de traitement en fin d'essais (mesure des volumes, filtration, etc.). Ces pertes ont été évaluées grâce au bilan matière effectué à la fin de chaque essai (Chapitre II, section 4.3).

$$Rendement\ en\ chalcopyrite\ (\%) = \frac{C_{CuFeS2_init} \times m_{init} - C_{CuFeS2_résidu} \times m_{résidu}}{C_{CuFeS2_init} \times m_{init}} \quad [61]$$

$$Rendement\ en\ pyrite\ (\%) = \frac{C_{FeS2_init} \times m_{init} - C_{FeS2_résidu} \times m_{résidu}}{C_{FeS2_init} \times m_{init}} \quad [62]$$

Où C_{CuFeS2_init} et C_{FeS2_init} les concentrations en chalcopyrite et en pyrite dans le matériau de départ (en % (m/m)), $C_{CuFeS2_résidu}$ et $C_{FeS2_résidu}$ les concentrations en chalcopyrite et en pyrite dans le résidu (en % (m/m)), m_{init} la masse du matériau initial (en g) et $m_{résidu}$ la masse du résidu (en g). Les concentrations en chalcopyrite et pyrite sont calculées selon la méthodologie décrite dans la section 1.1 du Chapitre III.

Tableau 12 – Rendements de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite obtenus à la fin des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm, et bilan de matière du cuivre et du fer sur l'ensemble de la pulpe entre l'instant initial et la fin de ces essais. Les rendements ont été obtenus à partir de l'analyse chimique des matériaux initiaux et des résidus (Chapitre II, 4.2.1). NA : La quantité de fer dans cet échantillon n'a pas été déterminée.

Essais	20-100 µm	brut	< 20 µm
Rendements en chalcopyrite (%)	11	21	55
Rendements en pyrite (%)	73	46	100
Pertes cuivre (%)	5	10	3
Pertes fer (%)	8	NA	6

On peut noter que les rendements finaux de dissolution de la chalcopyrite issus de l'analyse des résidus (Tableau 12) sont plus élevés que les rendements de dissolution du cuivre mesurés dans la phase liquide (Figure 48), alors que la chalcopyrite est la seule phase porteuse de cuivre. Ces écarts peuvent être attribués aux pertes en cuivre, ainsi qu'aux incertitudes de mesure lors de l'analyse des échantillons solides et liquides. Néanmoins, l'analyse des résidus confirme la dissolution beaucoup plus importante de la chalcopyrite avec la fraction fine. Par ailleurs, la totalité de la pyrite est oxydée au cours de l'essai réalisé avec la fraction < 20 µm.

D'après les mesures de surface spécifiques des trois matériaux de départ, présentés au chapitre III, la surface spécifique de la fraction fine (3,4 $m^2.g^{-1}$) est environ 8 à 17 fois plus importante que celle du concentré brut (0,4 $m^2.g^{-1}$) et de la fraction 20-100 µm (0,2 $m^2.g^{-1}$) respectivement. La surface réactive est donc beaucoup plus importante avec la fraction < 20 µm. D'autre part, d'après la caractérisation des trois matériaux initiaux, la concentration en chalcopyrite est plus élevé dans la fraction fine. Ces caractéristiques expliquent très probablement les meilleurs rendements et vitesses de dissolution obtenus avec cette fraction.

Pour mieux comprendre les différentes phases observées dans les profils de dissolution, il faut s'intéresser à l'évolution du potentiel redox au cours des essais (Figure 49). Lors des premières heures de l'essai, le potentiel augmente lentement jusqu'à atteindre une valeur proche de 600 mV. Cette première phase est très courte dans le cas des essais de biolixiviation de la fraction grossière et du concentré brut (inférieure à un jour), et plus longue dans le cas de l'essai de biolixiviation de la fraction

fine (environ 2 jours). Le potentiel redox augmente ensuite exponentiellement avant de se stabiliser entre 870 et 890 mV vs. SHE. Ceci se traduit par le fait que le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} devient supérieur à 1, jusqu'à atteindre environ 1000 à la fin des essais de biolixiviation du concentré brut et de la fraction 20-100 µm, et 2000 à la fin de l'essai de biolixiviation de la fraction < 20 µm. A partir de la phase exponentielle, le fer en solution est donc quasi exclusivement sous forme de Fe^{3+}.

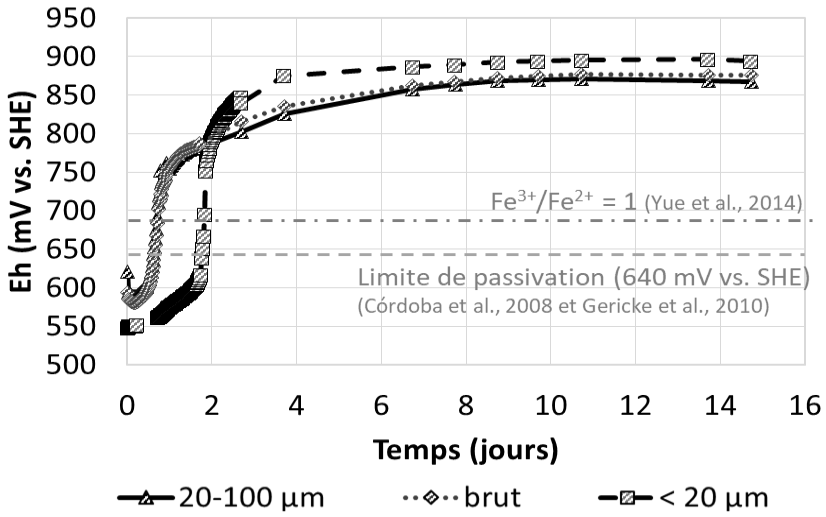


Figure 49 – Potentiel redox (Eh) en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm.

La Figure 50 montre que la concentration de Fe^{3+} en solution (calculée grâce à la mesure de la concentration totale de fer en solution et à la mesure du potentiel) augmente jusqu'à une concentration de 5 $g.L^{-1}$, dans le cas des essais réalisés avec le concentré brut et la fraction 20-100 µm, et de 10 $g.L^{-1}$ pour l'essai de biolixiviation de la fraction < 20 µm.

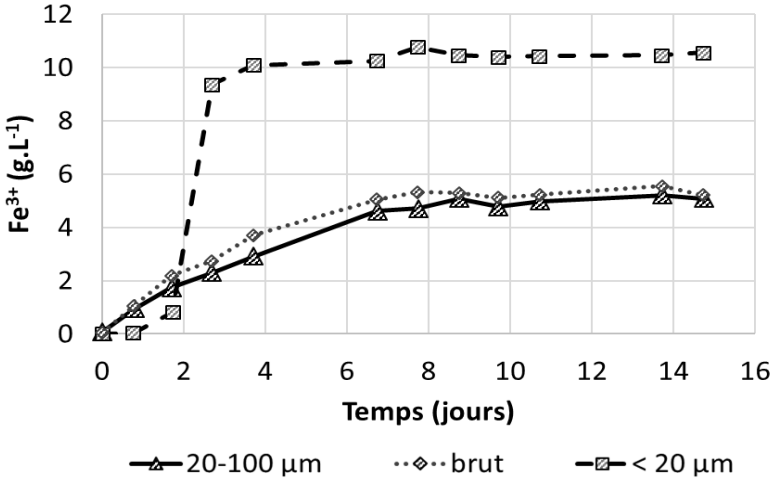


Figure 50 – Concentration en Fe^{3+} en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm.

Par ailleurs, il est établi que la chalcopyrite peut être oxydée par le Fe^{3+} (équation [63]) ou l'oxygène dissous (équation [64]) (Hiroyoshi et al., 2001).

$$CuFeS_2 + 4Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 5Fe^{2+} + 2S \quad [63]$$

$$CuFeS_2 + 4H^+ + O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + Fe^{2+} + 2S + 2H_2O \quad [64]$$

D'après Zhao et al. (2017), lorsque ces deux oxydants sont présents en solution, la chalcopyrite est principalement oxydée par Fe^{3+}. Au cours des essais, la concentration en Fe^{3+} varie entre $6{,}2.10^{-4}$ et 9.10^{-2} mol.L^{-1} avec le concentré brut et la fraction 20-100 µm et entre $2{,}2.10^{-4}$ et $1{,}8.10^{-1}$ mol.L^{-1} avec la fraction < 20 µm, tandis que la concentration de l'oxygène dissous est de l'ordre de $1{,}6.10^{-4}$ mol.L^{-1}, (excepté au cours des deux premiers jours de l'essai mené avec la fraction < 20 µm où la concentration est de l'ordre de $1{,}2.10^{-4}$ mol.L^{-1}). La dissolution très lente de la chalcopyrite observée dans ces essais de biolixiviation n'est donc pas liée à une limitation par le réactif oxydant, puisque celui-ci est présent en excès.

D'après la littérature, la chalcopyrite se passive pour des potentiels dépassant 640 mV vs. SHE (Córdoba et al., 2008b, et Gericke et al., 2010). Comme l'illustre la Figure 49, cette limite de potentiel est franchie au cours de la phase exponentielle, et se traduit par un ralentissement de la dissolution du cuivre, et donc de la chalcopyrite (Figure 48a). On peut donc en déduire que la diminution de la vitesse de dissolution du cuivre est due à la passivation de la chalcopyrite. Ce phénomène apparaît plus tardivement lors de l'essai de biolixiviation de la fraction fine qu'au cours des essais de biolixiviation du concentré brut et de la fraction grossière.

La Figure 51 montre la quantité de fer dissous en fonction de la quantité de cuivre dissous pour les trois essais. Dans le cas des essais de biolixiviation du concentré brut et de la fraction 20-100 µm (Figure 51a), trois phases de dissolution distinctes sont observées. En début d'essai, le ratio fer sur cuivre (Fe/Cu) est proche de 1. Or la chalcopyrite ($CuFeS_2$), seule phase porteuse de cuivre dans les matériaux utilisés, contient autant de cuivre que de fer. Seule la chalcopyrite est donc dissoute initialement. Ceci est cohérent avec les mesures du potentiel redox (valeurs de l'ordre de 550 à 600 mV vs SHE, Figure 49). En effet, la pyrite ne peut être dissoute lorsque le redox est inférieur à 650 mV vs. SHE (Liu et al., 2017). Après 1 jour, le ratio Fe/Cu passe d'environ 1 à 2 avec le concentré brut et d'environ 1 à 3 avec la fraction 20-100 µm, indiquant que la quantité de fer dissous est supérieure à la quantité de cuivre dissous (pentes de 3 et 4 respectivement). Or le ratio Fe/Cu dans les sulfures contenus dans le concentré brut et la fraction 20-100 µm est de 1,2. Le ratio Fe/Cu dissous est donc bien supérieur à celui des matériaux de départ, ce qui montre que le fer est dissous plus rapidement que le cuivre. On en déduit que, dans cette phase de l'essai, la pyrite (FeS_2) se dissout à une vitesse plus rapide que la chalcopyrite. Enfin, après 7 jours, la quantité de fer dissous n'évolue quasiment plus, tandis que la quantité de cuivre augmente faiblement. Or la dissolution de cuivre, et donc de chalcopyrite, implique forcément une dissolution de fer. Le seul phénomène pouvant expliquer cette observation est la précipitation d'une partie du fer en solution. La diminution de la pente des courbes de 3 à 0,6 dans le cas du concentré brut, et de 4 à 1,3 dans le cas de la fraction 20-100 µm est donc liée à cette précipitation.

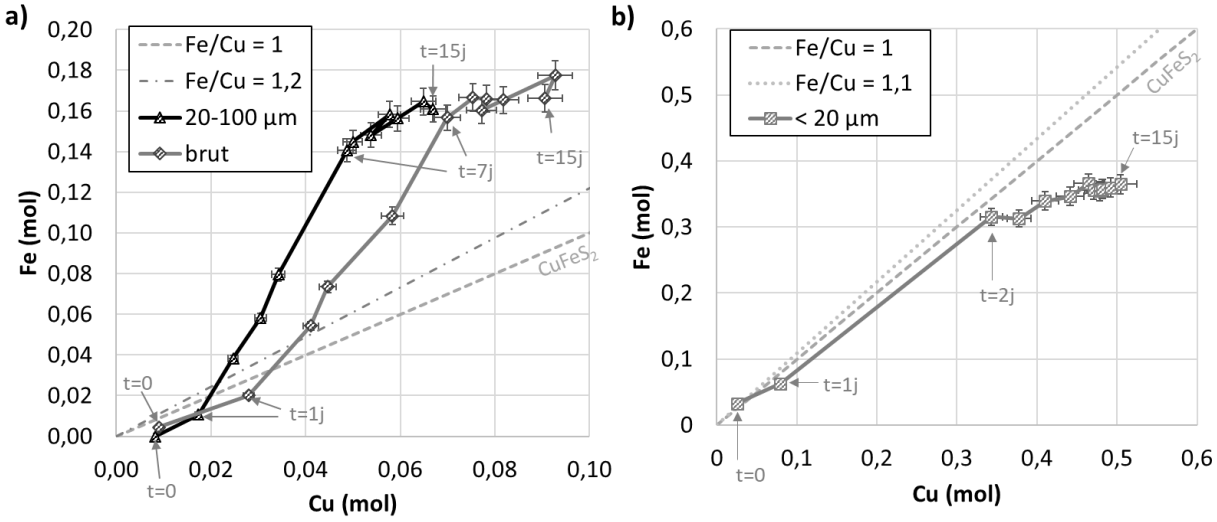


Figure 51 - Quantité de fer dissous en fonction de la quantité de cuivre dissous au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec (a) la fraction 20-100 µm, le concentré brut et (b) la fraction < 20 µm.

Dans le cas de l'essai de biolixiviation de la fraction < 20 µm (Figure 51b), seules deux phases de dissolution sont observées. Dans un premier temps, le ratio Fe/Cu est proche de 1, ce qui correspond à l'oxydation de la chalcopyrite. Puis, le ratio Fe/Cu diminue jusqu'à être égal à 0,7 (pente égale à 0,3 et ratio Fe/Cu dans les sulfures contenus dans la fraction < 20 µm égal à 1,1), traduisant une dissolution de fer plus faible que celle du cuivre, que l'on peut à nouveau interpréter comme due à la précipitation d'une phase contenant du fer. De plus, d'après le Tableau 12, la totalité de la pyrite a été oxydée au cours de cet essai, mais celle-ci n'est pas dissoute au cours de la première phase de dissolution. La pyrite est donc probablement oxydée au cours de la seconde phase de dissolution, mais le fer provenant de ces sulfures est probablement immédiatement précipité.

L'étude de l'évolution du ratio Fe/Cu en solution montre donc qu'il n'y a pas un arrêt de la dissolution de fer au cours des trois essais, mais plutôt un équilibre entre dissolution et précipitation du fer qui aboutit à une concentration en fer constante au cours du temps. L'hypothèse la plus probable, en s'appuyant sur les connaissances issues de la bibliographie présentées au chapitre I, est la formation de phases de jarosite ($MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, avec M = K, NH_4, ou H_3O). Cet aspect a été exploré en caractérisant la composition des résidus de lixiviation.

1.1.2. Caractérisations des résidus solides

1.1.2.1. Distribution de taille des particules

La Figure 52 présente l'évolution de la taille des particules entre le début et la fin des essais. Pour l'ensemble des essais, on observe un enrichissement des classes granulométriques les plus fines et un appauvrissement des classes de particules les plus grossières. Ce résultat est caractéristique des phénomènes de dissolution mis en évidence dans la section précédente. Il indique également que les précipités contenant du fer ne forment pas de gros agrégats qui viendraient impacter la distribution globale.

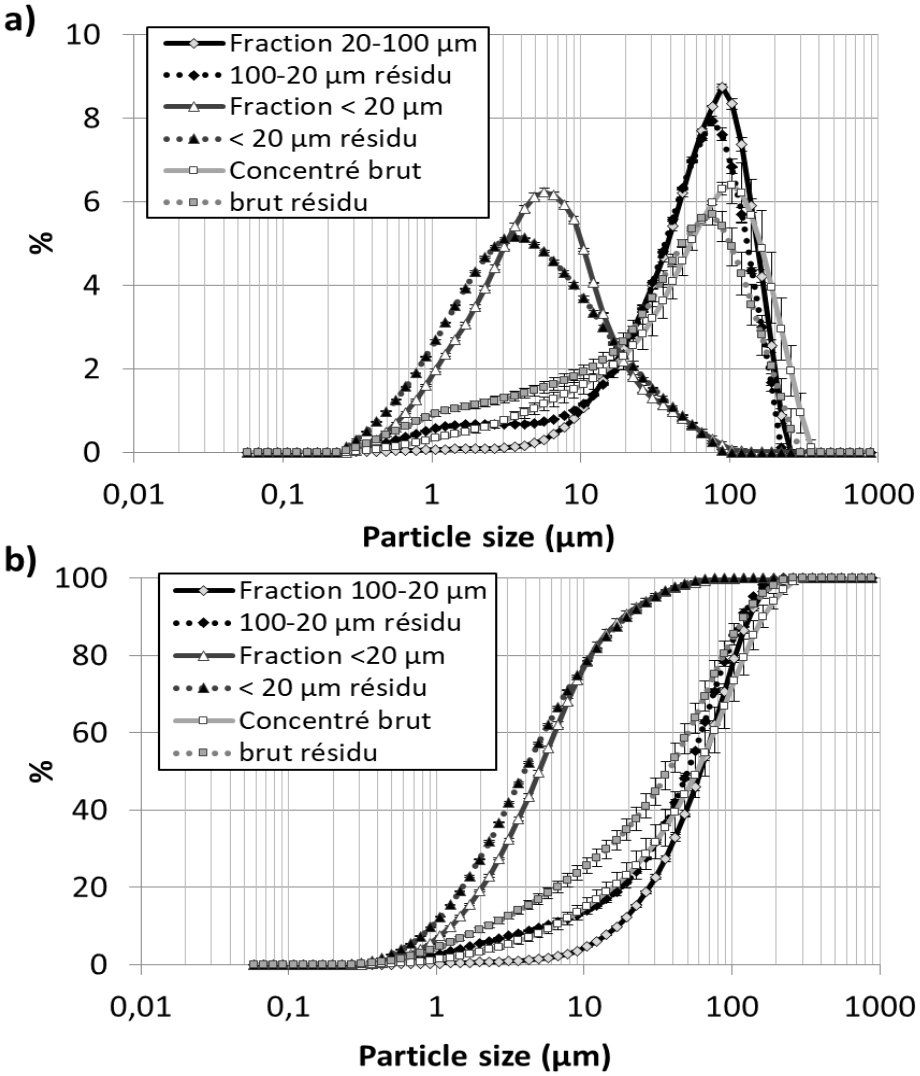


Figure 52 – (a) Distribution et (b) distribution cumulée de la taille des particules dans la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm, ainsi que dans les résidus obtenus à l'issus des essais de biolixiviation conventionnelle de ces matériaux.

1.1.2.2. Analyses DRX des résidus

La Figure 53 rassemble les résultats des analyses DRX réalisées sur les résidus obtenus à la fin des essais. En comparant ces diffractogrammes à ceux issus de l'analyse des matériaux initiaux (Chapitre III, section 1), on observe que la pyrite n'est plus détectée dans le résidu de biolixiviation de la fraction < 20 µm, contrairement aux résidus des deux autres essais. Ces résultats sont cohérents avec les rendements finaux de dissolution de la pyrite (Tableau 12). La chalcopyrite, n'ayant été qu'au plus dissous à un peu plus de 50%, est bien identifiée dans les trois résidus. Deux nouvelles phases, la jarosite et le soufre élémentaire, sont également mises en évidence dans certains résidus.

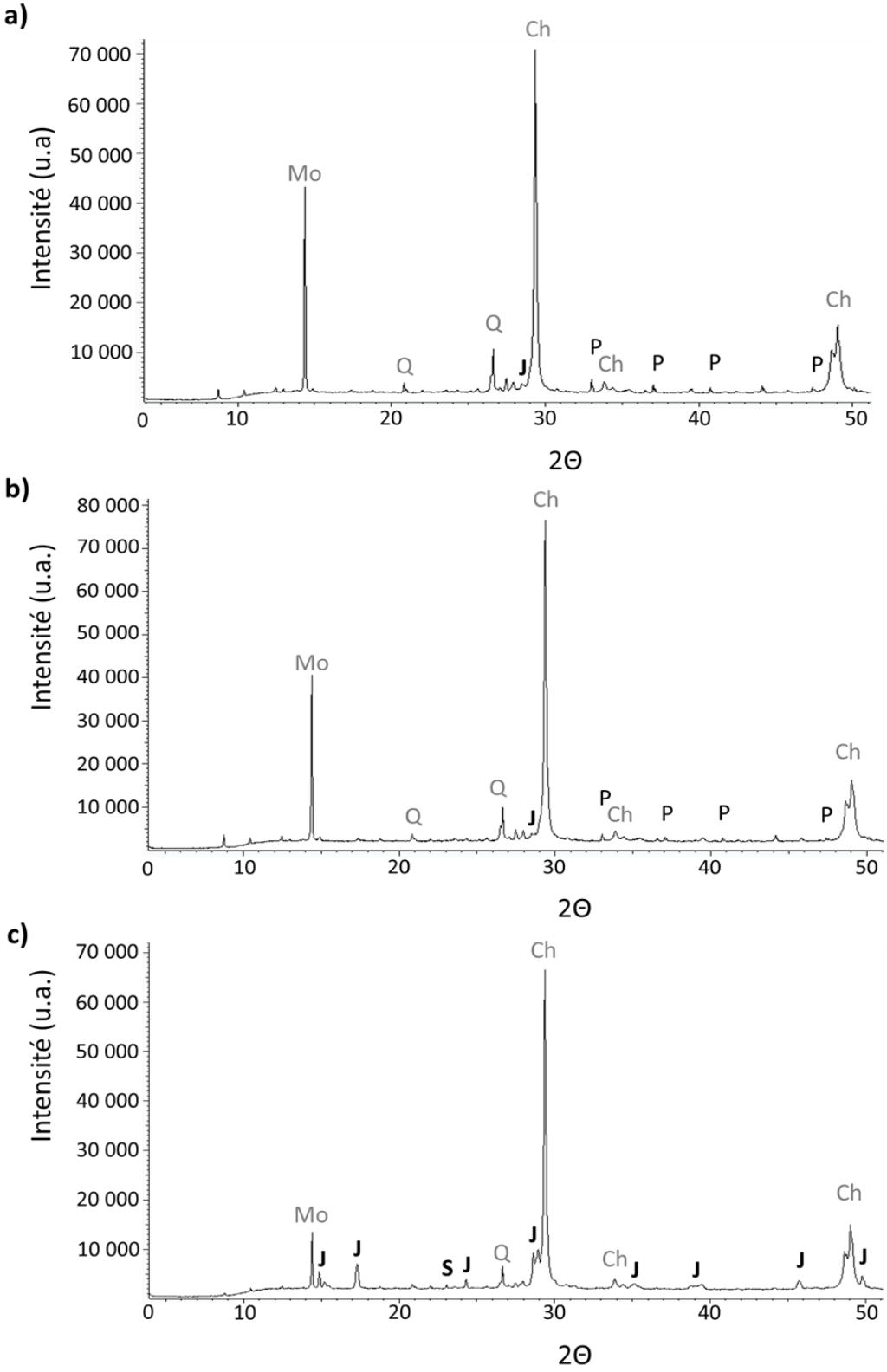


Figure 53 - Diffractogrammes des résidus récupérés à la fin des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec (a) la fraction 100-20 µm, (b) le concentré brut, et (c) la fraction < 20 µm. Ch : Chalcopyrite, J : jarosite, Mo : Molybdénite, P : Pyrite, Q : Quartz, S : Soufre élémentaire.

1.1.2.3. Caractérisation des phases jarosites

Les diffractogrammes de la Figure 53 révèlent l'apparition d'une nouvelle phase dans les résidus : la jarosite. La présence de cette phase, cohérente avec la stabilité du rendement de lixiviation du fer en fin d'essai discutée précédemment, résulte notamment de la précipitation du Fe^{3+} en solution selon l'équation [65].

$$3Fe^{3+} + 2SO_4^{2-} + 6H_2O + M^+ \longrightarrow MFe_3(SO_4)_2(OH)_6 + 6H^+ \quad [65]$$
(avec $M^+ = K^+$, NH_4^+, ou H_3O^+)

Comme l'indique l'équation [65], il n'existe pas une jarosite mais de nombreuses phases ayant une structure cristallographique similaire, avec substitution possible sur le site M^+ de différents ions monovalents. Dans notre système, les ions K^+, NH_4^+ et H_3O^+ sont concernés et peuvent donner lieu à la formation d'autant de phases de K-jarosite, NH_4-jarosite et H_3O-jarosite. Les paramètres de mailles de ces différentes phases sont trop proches pour permettre de les distinguer par analyse DRX. Néanmoins, les différentes analyses chimiques permettent de préciser la composition de ces phases.

La quantité de fer précipité dans les phases de jarosite ($Fe_{précip}$) peut être calculée selon l'équation suivante, basée sur l'analyse de la teneur en fer dans le résidu solide :

$$Fe_{précip}\,[mol] = Fe_{res} - Fe_{CuFeS2_res} - Fe_{FeS2_res} \quad [66]$$

Avec Fe_{res} la quantité de fer dans le résidu (en mol), Fe_{CuFeS2_res} la quantité de fer provenant de la chalcopyrite dans le résidu (en mol), et Fe_{FeS2_res} la quantité de fer provenant de la pyrite dans le résidu (en mol).

La chalcopyrite étant la seule phase porteuse de cuivre dans le résidu, Fe_{CuFeS2_res} est égale à la quantité de cuivre (en mol). La quantité de pyrite (FeS_2), Fe_{FeS2_res}, est déduite de la teneur en sulfures dans le résidu, connaissant la quantité de chalcopyrite et de molybdénite qui sont les autres phases sulfurées présentes dans le résidu (Figure 53). On obtient les équations suivantes :

$$S_{FeS2} = S_{sulfures_tot} - S_{CuFeS2} - S_{MoS2} = S_{sulfures\,tot} - Cu_{res} \times 2 - Mo_{res} \times 2 \quad [67]$$

$$Fe_{FeS2_res} = (S_{FeS2}/2) \times M_{FeS2} \quad [68]$$

Où $S_{sulfures_tot}$, S_{FeS2}, S_{CuFeS2}, et S_{MoS2} correspondent à la quantité de soufre associée respectivement à l'ensemble des sulfures, la pyrite, la chalcopyrite, et la molybdénite dans le résidu (en mol), Cu_{res} à la quantité de cuivre dans le résidu (en mol), Mo_{res} à la quantité de molybdénite dans le résidu (en mol), et M_{FeS2} la masse molaire de la pyrite (en $g.mol^{-1}$).

Un bilan de matière a également été réalisé sur les ions sulfates (Chapitre II, section 4.3), pour déterminer la quantité de SO_4^{2-} accumulée (précipitée) dans la phase solide entre l'instant initial et la fin de l'essai. Les résultats de ce bilan sont indiqués dans le Tableau 13 avec les quantités de fer précipitées lors de chaque essai. La quantité de fer précipitée correspond environ à 3/2 de la quantité de SO_4^{2-} précipitée. Ce facteur correspond au ratio Fe/SO_4 dans la jarosite (équation [65]). Ces résultats confirment que le fer précipite en majeure partie sous forme de jarosite.

Tableau 13 – Quantités de fer et de SO_4^{2-} précipités au cours des essais de biolixiviation conventionnelle réalisés avec la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm. NA : La quantité de fer dans cet échantillon n'a pas été déterminée.

Essais	20-100 µm	brut	< 20 µm
Fer précipité (mol)	0,043	NA	0,219
SO_4^{2-} précipité (mol)	0,029	0,021	0,148
Rapport molaire Fe/SO_4	1,48	-	1,48

Les nutriments présents dans le milieu nutritif sont des sources de monocations (K^+ et NH_4^+) susceptibles de précipiter lors de la formation de jarosite. D'après Sasaki et al. (2009), la K-jarosite ($KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$) est moins soluble que la NH_4-jarosite et la H_3O-jarosite, et est donc potentiellement formée préférentiellement.

Un bilan de matière a été réalisé sur le potassium dans la phase solide, en s'appuyant sur le suivi de la concentration de cet élément en solution présenté à la Figure 54. Pour les trois essais, la précipitation du potassium débute entre 2 et 3 jours, avec une précipitation complète dès 4 jours lors de la biolixiviation de la fraction < 20 µm. Pour ce dernier essai, la précipitation du potassium coïncide avec la précipitation du fer (Figure 51). Dans le cas des essais réalisés avec la fraction 20-100 µm et le concentré brut, la concentration en potassium diminue plus lentement, mais s'accélère entre 7 et 11 jours, de manière cohérente avec l'analyse des ratios Fe/Cu en solution présentés à la Figure 51 et montrant une précipitation du fer. Le milieu étant très concentré en ions sulfate, la différence de cinétique de précipitation de la K-jarosite en fonction des essais peut être attribué à la différence de concentration en Fe^{3+} en solution, qui augmente très rapidement et est plus élevée avec les particules fines. La concentration finale en potassium est faible, voire quasi-nulle, pour tous les essais.

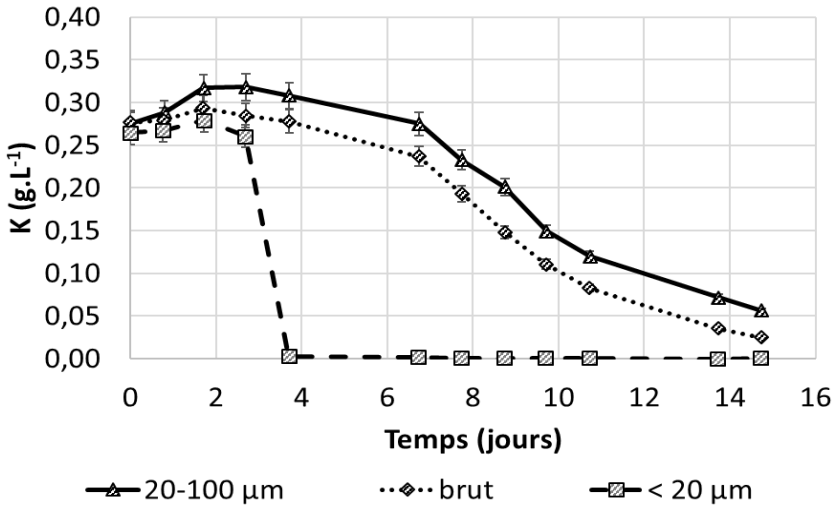


Figure 54 – Concentration en potassium en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, la fraction < 20 µm et le concentré brut.

En supposant que le potassium ne précipite que sous forme de jarosite, la quantité de potassium précipitée (en mol) est égale à la quantité de K-jarosite formée (équation [65]). En l'absence d'une analyse plus détaillée, la jarosite formée restante a été considérée comme étant sous forme d'NH_4-jarosite ou d'H_3O-jarosite (ces deux phases ont quasiment la même masse molaire). Les résultats obtenus convertis en masse sont indiqués sur la Figure 55, qui résume les résultats de quantification des phases présentes dans les échantillons initiaux à lixivier (fraction 20-100 µm, concentré brut, et fraction < 20 µm) et dans les résidus de chaque essai. Le quartz et les phases mineures présentes à la

fois dans les échantillons initiaux et les résidus n'ont pas été quantifiés et sont indiqués comme phase « autre » sur la figure.

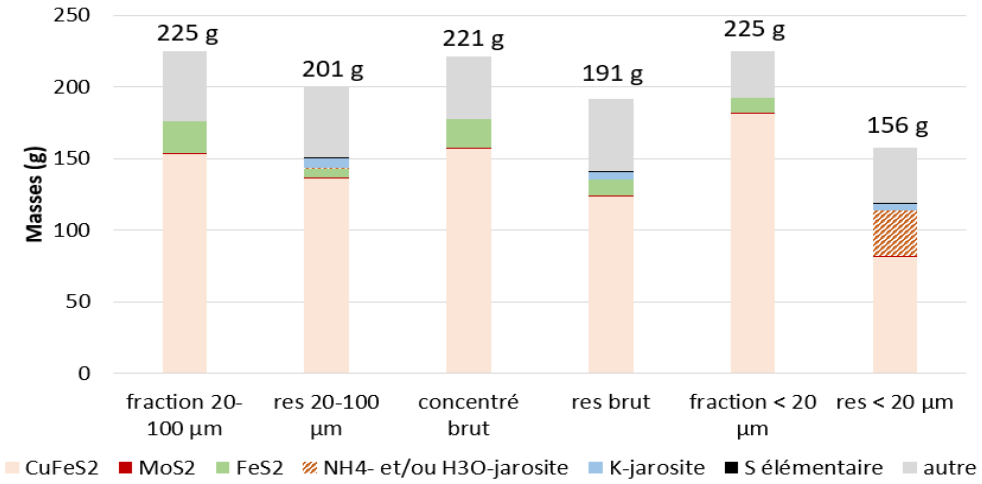


Figure 55 – Quantification massique des phases présentes dans les échantillons initiaux à lixivier (fraction 20-100 µm, concentré brut, et fraction < 20 µm), et dans les résidus obtenus à la fin des essais de biolixiviation conventionnelle de ces échantillons. Pour chaque échantillon, cette quantification a été réalisée à partir des analyses élémentaires et la spéciation du soufre. res 20-100 µm : résidu de biolixiviation de la fraction 20-100 µm, res brut : résidu de biolixiviation du concentré brut, res < 20 µm : résidu de biolixiviation de la fraction < 20 µm, autre : ensemble des phases non-quantifiées.

La quantité de K-jarosite est similaire dans les trois résidus et correspond à la quasi-totalité du potassium disponible en solution. En plus de la K-jarosite, une quantité non-négligeable de NH_4- et/ou H_3O-jarosite est également formée lors de la biolixiviation de la fraction < 20 µm, contrairement aux deux autres essais. La différence entre ces essais est la vitesse à laquelle le potassium précipite. Lors de la biolixiviation de la fraction fine la quasi-totalité du potassium est précipitée dès 4 jours, tandis que la précipitation quantitative du potassium ne se produit qu'après 6 à 8 jours avec la fraction grossière et le concentré brut, et qu'il en reste une faible quantité en solution à la fin des essais.

1.1.2.4. Soufre élémentaire

L'analyse chimique des résidus a également montré la présence de soufre élémentaire (Tableau 14), alors qu'il n'y en avait qu'à l'état de trace (concentration inférieure ou égale à 0,02% (m/m)) dans les échantillons initiaux. Le bilan de matière réalisé sur la phase solide a permis de déterminer la quantité de soufre formée au cours de chaque essai (Chapitre II, section 4.3). Celle-ci est plus élevée dans le cas de l'essai de biolixiviation de la fraction < 20 µm (1,2 g), suivi de l'essai réalisé avec le concentré brut (0,5 g), puis de l'essai réalisé avec la fraction 20-100 µm (0,3 g). Cette différence explique probablement pourquoi le soufre n'a été détecté par DRX que dans le résidu issu de l'essai avec la fraction fine. Le soufre est l'un des produits de la réaction d'oxydation de la chalcopyrite (équation [63]), et est généralement oxydé très rapidement par les bactéries (équation [69]). Il est possible que le soufre élémentaire présent dans les résidus soit sous une forme allotropique non-utilisable par les bactéries (Klauber et al. 2008 et Blight et al. 2009), ce qui pourrait expliquer pourquoi il n'a pas été oxydé.

Tableau 14 – Concentrations en soufre élémentaire dans les résidus obtenus à la fin des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm.

Essais	20-100 µm	brut	< 20 µm
Concentration en soufre élémentaire (en % (m/m))	0,15	0,27	0,80

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Bactéries S-ox}} 2SO_4^{2-} + 4H^+ \quad [69]$$

1.1.3. Conclusions

L'ensemble des caractérisations chimiques montre que la dissolution de la chalcopyrite est similaire avec le concentré brut et la fraction grossière (soit avec une proportion en particules fines (< 20 µm) de 12 et 23% (en volume)). Le rendement de dissolution est faible et la cinétique lente du fait d'une passivation rapide du minéral. En revanche, une proportion en particules fines supérieure à 90% (fraction < 20 µm) permet de dissoudre la chalcopyrite plus rapidement et d'obtenir un rendement 5 fois plus élevé grâce à une surface spécifique significativement plus élevée et une passivation plus tardive.

Cette meilleure dissolution résulte notamment en une production de soufre élémentaire plus importante et l'augmentation plus rapide de la concentration en Fe^{3+}, induisant une précipitation plus élevée de jarosite. L'accumulation de ces deux phases à la surface des particules est souvent considérée comme responsable de la passivation de la chalcopyrite (Stott et al., 2000, Bevilaqua et al., 2002, Parker et al., 2003, Sasaki et al., 2009, He et al. 2012). Ayant été détectées dans les résidus, quelle que soit la taille des particules, il est donc possible qu'elles contribuent à la passivation de la chalcopyrite au cours des essais réalisés pour cette étude.

1.2. Effet de la taille des particules sur les communautés bactériennes

1.2.1. Impact de la taille des particules sur la croissance bactérienne

L'évolution des communautés bactériennes en fonction de la taille des particules a tout d'abord été observée à travers la quantification de la biomasse au cours des essais (Figure 56, Figure 57 et Figure 58). La Figure 56 présente les résultats de comptages bactériens effectués en cellule de Thoma. Lors des essais de biolixiviation de la fraction grossière et du concentré brut, la biomasse augmente au cours des deux premiers jours, puis se stabilise (phase stationnaire). Dans le cas de la biolixiviation de la fraction fine, la biomasse évolue très peu au cours des premières 24 h, puis augmente rapidement, et de manière plus importante que lors des deux autres essais, avant de se stabiliser également. Pour les trois essais, l'augmentation de la biomasse est concomitante de la phase d'augmentation exponentielle du potentiel redox (voir Figure 49). Les comptages montrent qu'il y a dix fois plus de bactéries dans l'essai avec les particules fines que dans les deux autres essais. Cependant, il est parfois difficile de distinguer les particules fines des bactéries lors de l'observation au microscope optique. Ainsi, la biomasse a également été quantifiée par analyse qPCR. Cette analyse permet de mesurer l'évolution de la quantité du gène codant l'ARNr 16S, commun à toutes les bactéries et ainsi de vérifier les résultats obtenus par comptage des bactéries au microscope optique. La concentration en copies de gène de l'ARNr 16S a été mesurée sur deux types d'échantillons distincts :

- dans la phase liquide (Figure 57), pour pouvoir comparer cette information à la concentration en biomasse obtenue par comptage en lumière blanche ;
- dans la pulpe (Figure 58) ce qui permet de quantifier la biomasse totale (microorganismes planctoniques et sessiles).

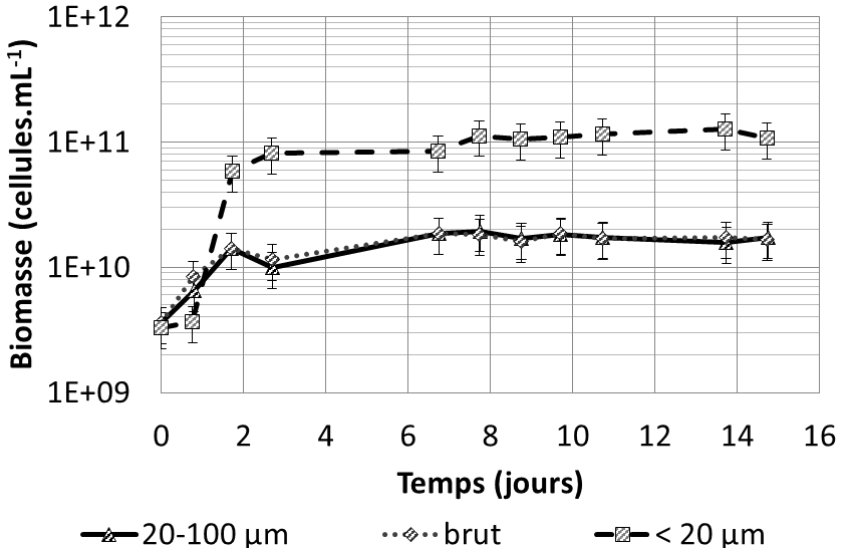


Figure 56 – Biomasse mesurée par comptage au microscope optique en fonction du temps au cours d'essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm. Les mesures ont été faites sur le surnageant d'un échantillon de pulpe après 5 min de décantation.

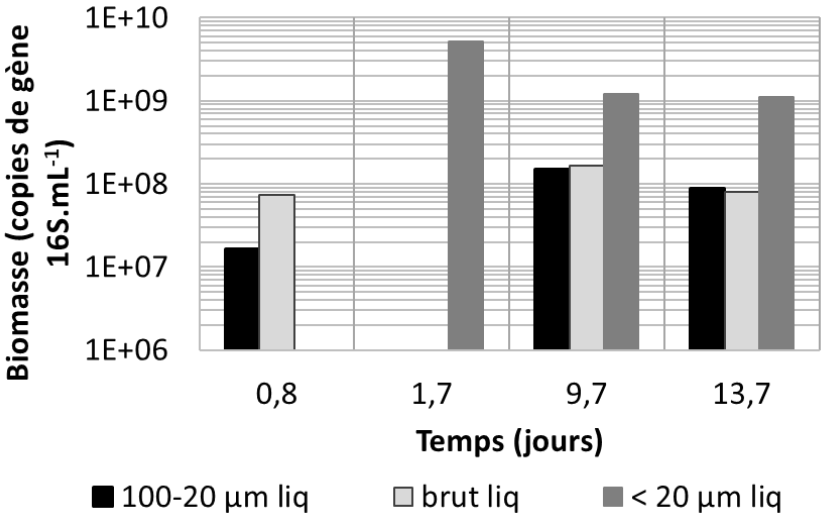


Figure 57 - Biomasse mesurée par qPCR en fonction du temps au cours d'essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm. Les mesures de biomasses par qPCR ont été réalisées sur la phase liquide séparée de la phase solide par centrifugation à 5 000 rpm pendant 30 s (Chapitre II, section 5.1.3).

D'après la Figure 57, l'analyse qPCR sur la phase liquide de la pulpe confirme qu'une biomasse plus élevée est obtenue avec la fraction fine. Par ailleurs, que la biomasse ait été quantifiée par comptage ou par qPCR, on retrouve une différence d'un ordre de grandeur entre la biomasse obtenue avec la fraction fine et celle obtenue en présence de particules plus grossières. Une diminution de la biomasse mesurée par qPCR est observée à la fin de l'essai de biolixiviation de la fraction < 20 µm. Il est possible qu'en fin d'essai, les bactéries soient plus fragiles ou susceptibles d'être lysées, en particulier lors de la préparation de l'échantillon avant extraction de l'ADN (Chapitre II, section 5.1.3). Ceci pourrait conduire à une diminution de la quantité d'ADN récupérée et expliquerait la diminution de biomasse observée sur la Figure 57.

La biomasse mesurée par comptage et par qPCR dans la phase liquide ne prend pas en compte les bactéries présentes à la surface des particules. Des mesures de biomasse par qPCR sur des

prélèvements de pulpes ont donc été réalisées (Figure 58). On observe globalement la même tendance que pour la biomasse en phase liquide avec une concentration en copies de gènes plus élevées dans l'essai avec la fraction fine que dans les deux autres essais. Par ailleurs, la biomasse mesurée à partir d'échantillons de pulpe est généralement plus élevée que celle mesurée dans la phase liquide, ce qui confirme qu'une partie des bactéries est attachée à la surface des particules.

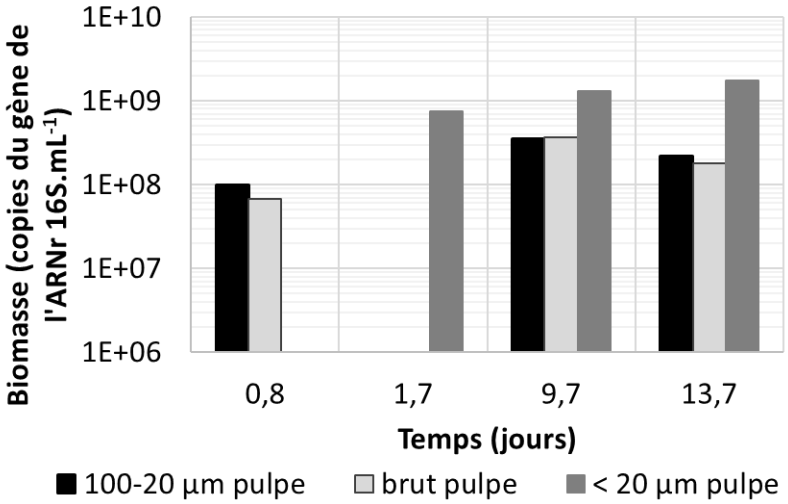


Figure 58 - Biomasse mesurée par qPCR en fonction du temps au cours d'essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm. Les mesures de biomasses par qPCR ont été faites à partir d'échantillons de pulpe.

Dans le cas de la fraction fine, le prélèvement réalisé après 1,7 jours présente un profil atypique avec une concentration en copies de gènes dans la pulpe inférieure à la concentration mesurée dans la phase liquide. Il est possible que l'extraction d'ADN soit moins efficace en présence de particules fines, ce qui pourrait expliquer cette différence.

Lors des essais de biolixiviation du concentré brut et de la fraction 20-100 µm, l'évolution de la biomasse est similaire. Cependant, alors, que les trois essais ont été initiés avec le même inoculum, l'ensemble des analyses montre que la croissance bactérienne est plus rapide et plus élevée lors de la biolixiviation de la fraction fine. Cet essai est également caractérisé par une courte phase de latence (1 jour) que l'on n'observe pas dans les deux autres essais. Les particules fines n'inhibent donc pas la croissance bactérienne, mais au contraire la favorise.

1.2.2. Impact de la taille des particules sur la diversité bactérienne

La Figure 59 présente les proportions relatives des espèces bactériennes identifiées (profils de diversité) dans l'inoculum et au cours des essais. L'inoculum contient les espèces : *'F. caldus'* (36%), *L. ferriphillum* (42%) et des espèces appartenant au genre *Sulfobacillus* (22%) (probablement *S. thermosulfidooxidans* et *S. benefaciens* qui ont été identifiées dans le consortium AKL). Ces espèces sont globalement présentes tout au long des essais, dans des proportions variant légèrement. En particulier, la proportion de *Sulfobacillus* augmente légèrement entre le début et la fin des essais au détriment de *L. ferriphillum* et *'F. caldus'*. Cette évolution est caractéristique de ce type de consortium (d'Hugues et al., 2008) et s'explique par le caractère mixotrophe des espèces du genre *Sulfobacillus*. En effet, ces dernières sont capables de se développer à partir de carbone inorganique (CO_2) ou organique. Au cours des essais, des cellules bactériennes sont lysées. Les débris cellulaires deviennent ainsi une source de carbone qui peut être utilisée par ces microorganismes, alors que les bactéries autotrophes *'F. caldus'* et *L. ferriphillum* se développent exclusivement à partir de carbone

inorganique. Cela favorise ainsi la croissance des bactéries appartenant au genre *Sulfobacillus*, ce qui peut expliquer l'augmentation de leur proportion au cours des essais.

On note également l'absence des espèces appartenant au genre *Sulfobacillus* au 1er jour de l'essai de biolixiviation du concentré brut. Ces espèces sont présentes puisqu'elles se développent par la suite mais leur proportion est trop faible pour qu'elles soient détectées par la méthode utilisée. L'établissement des profils de diversité montre donc que la taille des particules n'impacte pas l'évolution de la composition des communautés bactériennes.

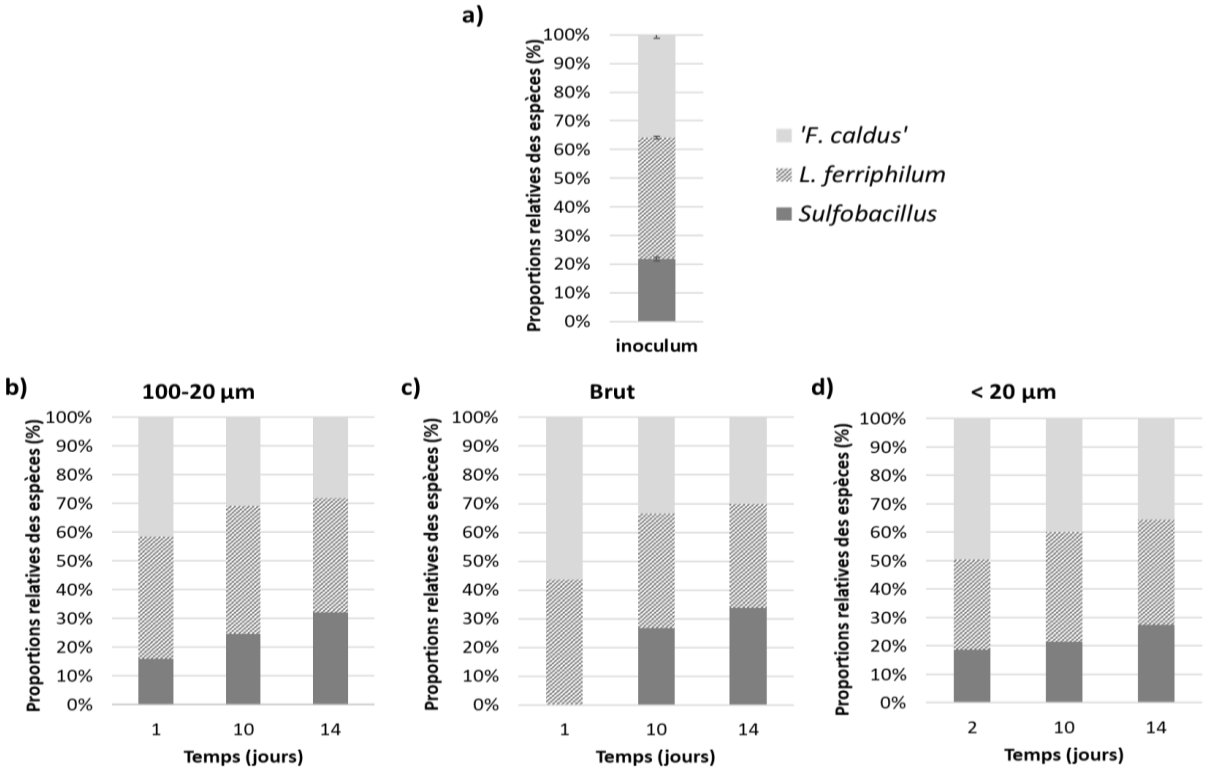


Figure 59 – Profils de diversité des communautés bactériennes (a) dans l'inoculum et à différents temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec (b) la fraction 100-20 µm, (c) le concentré brut, et (d) la fraction < 20 µm. Les résultats présentés ont été obtenus à partir de d'échantillons de pulpe par analyse T-RFLP (Chapitre II, section 5.2).

Les proportions relatives de chaque espèce dans la phase solide (Figure 60) et dans la phase liquide (Figure 61) sont globalement similaires entre les essais. En effet, l'espèce *L. ferriphilum* est dominante dans la phase solide, excepté au 2ème jour de l'essai de biolixiviation de la fraction < 20 µm. L'espèce *'F. caldus'* est quant à elle dominante dans la phase liquide au début des essais, et devient ensuite co-dominante avec les espèces *L. ferriphilum* et celles du genre *Sulfobacillus*. La taille des particules affecte donc peu la répartition des espèces entre la phase liquide et solide, et donc la capacité de chaque espèce à coloniser la surface des particules.

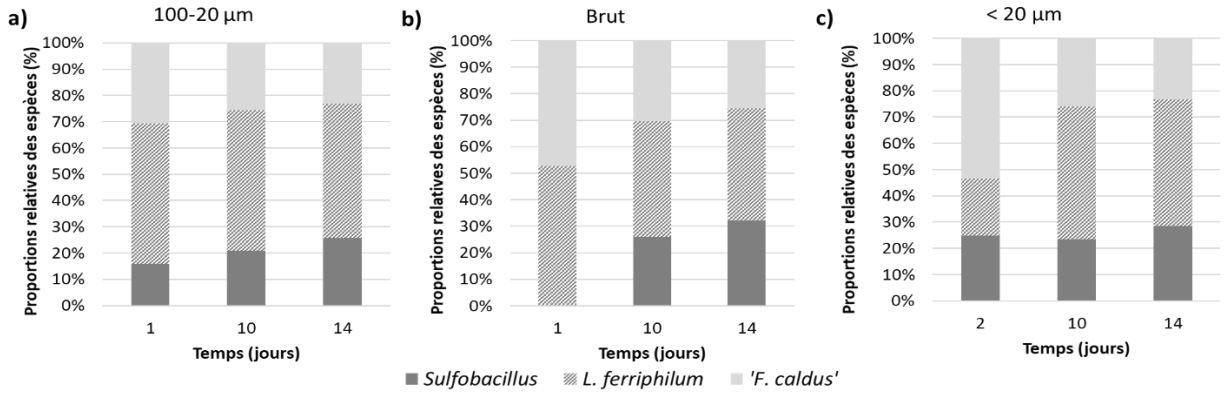


Figure 60 - Profils de diversité des communautés bactériennes **dans la phase solide** à différents temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec (a) la fraction 100-20 µm, (b) le concentré brut, et (c) la fraction < 20 µm. Les résultats ont été obtenus par analyse T-RFLP sur la phase solide séparée de la phase liquide par centrifugation à 5000 rpm pendant 30 s (Chapitre II, sections 5.1.3 et 5.2).

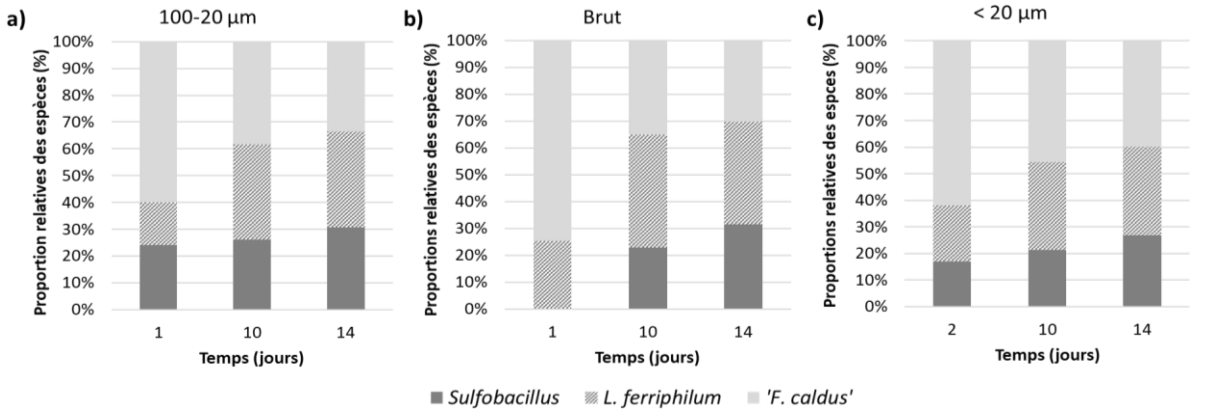


Figure 61 - Profils de diversité des communautés bactériennes **dans la phase liquide** à différents temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec (a) la fraction 100-20 µm, (b) le concentré brut, et (c) la fraction < 20 µm. Les résultats ont été obtenus par analyse T-RFLP sur la phase liquide séparée de la phase solide par centrifugation à 5000 rpm pendant 30 s (Chapitre II, sections 5.1.3 et 5.2).

1.2.3. Impact de la taille des particules sur l'activité bactérienne

Si la quantification de la biomasse est un bon indicateur de la capacité des microorganismes à se développer dans un milieu, celle-ci ne donne que très peu d'information sur l'activité microbienne. Pour la quantifier, il faut donc s'intéresser à la cinétique des réactions catalysées par ces microorganismes, à savoir l'oxydation du fer ferreux (Fe^{2+}) et l'oxydation des espèces soufrées.

1.2.3.1. Oxydation de fer ferreux

En ce qui concerne l'oxydation du Fe^{2+} (équation [71]), la mesure de la concentration en Fe^{3+} dans le milieu ne permet d'obtenir qu'une cinétique apparente d'oxydation. En effet une partie du Fe^{3+} produit est immédiatement consommée par l'oxydation des phases sulfurées (chalcopyrite et pyrite) (équations [63] et [70]). Pour obtenir la cinétique réelle d'oxydation du fer, il faut donc quantifier également la consommation de Fe^{3+} par ces réactions.

$$CuFeS_2 + 4Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 5Fe^{2+} + 2S \quad [63]$$

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Bactéries S-ox}} 2SO_4^{2-} + 4H^+ \quad [69]$$

$$FeS_2 + 14Fe^{3+} + 8H_2O \longrightarrow 2SO_4^{2-} + 15Fe^{2+} + 16H^+ \quad [70]$$

$$4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{Bactéries Fe-ox}} 5Fe^{3+} + 2H_2O \quad [71]$$

Pour ce calcul, on fait l'hypothèse que la chalcopyrite et la pyrite sont complètement oxydées jusqu'à oxydation du soufre en ions SO_4^{2-} (équations [63], [69] et [70]) (on néglige donc la fraction de soufre non oxydée). L'augmentation du potentiel redox étant rapide dès les premiers jours des essais, le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} devient rapidement supérieur à 1. On peut alors supposer que sur toute la durée des essais la chalcopyrite est oxydée par le Fe^{3+} en solution et non par l'oxygène dissous. D'autre part, la chalcopyrite et la pyrite contiennent au moins 90% du fer total quel que soit le matériau à lixivier (fraction 20-100 µm, concentré brut ou fraction < 20 µm). Le fer restant se trouve dans des phases mineures considérées comme insolubles dans les conditions expérimentales appliquées (Chapitre III, section 1.2). Au cours des essais, une précipitation de jarosite a lieu, mais la quantité de fer précipitée n'a pu être calculée qu'à la fin de chaque essai. La chalcopyrite ($CuFeS_2$) contenant autant de cuivre que de fer, la quantité de pyrite oxydée a donc été approximée comme étant égale à la différence entre la quantité de fer dissous et la quantité de cuivre dissous au cours des essais. Le calcul de la quantité totale de Fe^{3+} produit (Fe^{3+}_{prod}) par l'activité microbienne ferro-oxydante a ainsi été calculée selon l'équation suivante :

$$Fe^{3+}_{prod}[g.L^{-1}] = (Fe^{3+}_t - Fe^{3+}_{t=0}) + \left(4 \times \frac{Cu_t}{M(Cu)} + 14 \times \left(\frac{Fe_t}{M(Fe)} - \frac{Cu_t}{M(Cu)}\right)\right) \times M(Fe) \quad [72]$$

Où :

- M(Fe) (en $g.mol^{-1}$) : la masse molaire du fer ;
- M(Cu) (en $g.mol^{-1}$) : la masse molaire du cuivre ;
- Fe^{3+}_t (en $g.L^{-1}$) : la concentration en Fe^{3+} en solution à l'instant t ;
- $Fe^{3+}_{t=0}$ (en $g.L^{-1}$) : la concentration en Fe^{3+} en solution à l'instant initial ;
- Cu_t (en $g.L^{-1}$) : la concentration en cuivre dissous à l'instant t ;
- Fe_t (en $g.L^{-1}$) : la concentration en fer dissous à l'instant t ;

La concentration en cuivre dissous prend en compte la quantité de cuivre provenant de l'inoculum et les pertes liées aux prélèvements selon l'équation [73]. Il en est de même pour la concentration en fer dissous.

$$Cu_t\,[g.L^{-1}] = Cu_{liq} + \frac{\sum_i Cu_{prél_i} \times V_{prél_i} - Cu_{inoc} \times V_{inoc}}{V} \quad [73]$$

Avec :

- Cu_{liq} (en $g.L^{-1}$) : la concentration en cuivre en solution ;
- $Cu_{prél_i}$ (en $g.L^{-1}$) : la concentration en cuivre dans le prélèvement i ;
- $V_{prél_i}$ (en L) : le volume du prélèvement i ;
- Cu_{inoc} (en $g.L^{-1}$) : la concentration en cuivre dans l'inoculum ;
- V_{inoc} (en L) : le volume de l'inoculum.

Lorsque la quantité de fer dissous est inférieure à la quantité de cuivre dissous ($\frac{Fe_t}{M(Fe)} - \frac{Cu_t}{M(Cu)} < 0$), le terme $\frac{Fe_t}{M(Fe)} - \frac{Cu_t}{M(Cu)}$ est considéré comme nulle, ce qui est le cas lors de l'essai de biolixiviation de la fraction fine. Or ce terme correspond à l'approximation de la quantité de pyrite dissous et d'après les résultats précédents, 100% de la pyrite est oxydée lors de cet essai (Tableau 12). La quantité de

Fe^{3+} consommée par l'oxydation de la pyrite ne pouvant être prise en compte pour le calcul de la quantité de Fe^{3+} produit, cette dernière est donc sous-estimée avec l'équation [72] dans le cas de la biolixiviation de la fraction < 20 µm. Elle a donc été recalculée à la fin de l'essai pour tenir compte de la quantité de Fe^{3+} consommée par l'oxydation de la pyrite, selon l'équation suivante :

$$Fe^{3+}_{prod}[g.L^{-1}] = (Fe^{3+}_{t} - Fe^{3+}_{t=0}) + \left(4 \times \frac{C_{CuFeS2_init} \times m_{init} - C_{CuFeS2_res} \times m_{res}}{M(CuFeS_2)} + 14 \times \frac{C_{FeS2_init} \times m_{init} - C_{FeS2_res} \times m_{res}}{M(FeS_2)}\right) \times M(Fe) \quad [74]$$

Où :

- C_{CuFeS2_init} (en % (m/m)) : la concentration en chalcopyrite dans le matériau de départ ;
- m_{init} (en g) : la masse du matériau de départ ;
- C_{CuFeS2_res} (en % (m/m)) : la concentration en chalcopyrite dans le résidu ;
- m_{res} (en g) : la masse du résidu ;
- M(CuFeS2) (en $g.mol^{-1}$) : la masse molaire de la chalcopyrite ;
- C_{FeS2_init} (en % (m/m)) : la concentration en pyrite dans le matériau de départ ;
- C_{FeS2_res} (en % (m/m)) : la concentration en pyrite dans le résidu ;
- M(FeS2) (en $g.mol^{-1}$) : la masse molaire de la pyrite ;

On notera que l'équation [74] prend en compte la précipitation du fer en solution, et sera donc utilisée pour recalculer à la fin des deux autres essais la quantité de Fe^{3+} produit qui tient compte de la quantité de Fe^{3+} produite et précipitée.

La Figure 62 compare les quantités de Fe^{3+} produites, calculées avec les équations [72] et [74], à la fin de chaque essai.

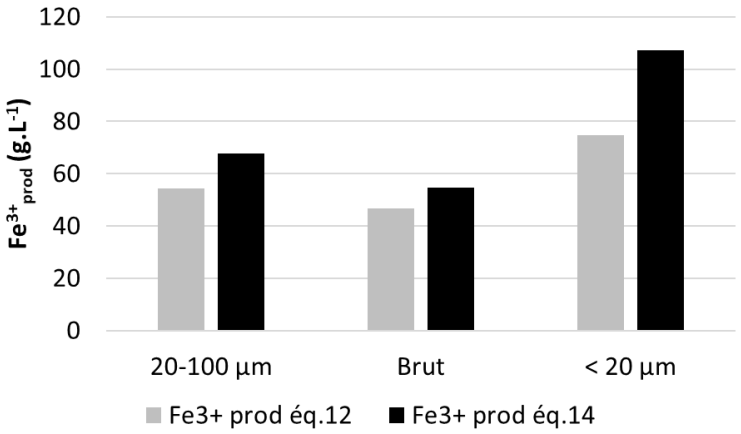


Figure 62 – Fe^{3+} produit (Fe^{3+}_{prod}) quantifié à la fin des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, la fraction < 20 µm et le concentré brut selon l'équation [72] (Fe3+ prod éq.12) ou selon l'équation [74] (Fe3+ prod éq.14).

Comparé à la concentration en Fe^{3+} en solution (Figure 50), la quantité de Fe^{3+} produite via l'activité bactérienne ferro-oxydante est beaucoup plus élevée, et met en évidence que la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} observée via le suivi de la concentration en Fe^{3+} est sous-estimée. D'après la Figure 62, seulement 1,6 fois plus de Fe^{3+} est produit lors de l'essai avec la fraction fine comparé aux deux autres essais, bien que la dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite soit plus importante (Tableau 12). Cela s'explique par le fait que la fraction < 20 µm est 2 fois moins concentrée en pyrite que la fraction 20-100 µm et que le concentré brut (4,4% (m/m) contre 9,8% et 8,9% (m/m) respectivement). En effet,

l'oxydation de la pyrite consomme une quantité beaucoup plus importante de Fe^{3+} que l'oxydation de la chalcopyrite (équations [63] et [70] respectivement). Ainsi, la minéralogie et les concentrations des minéraux sulfurés ont un impact non-négligeable sur la consommation du Fe^{3+}.

D'autre part, d'après la Figure 62 la quantité de Fe^{3+} produite, calculée via l'équation [72], est sous-estimée lorsque la consommation de Fe^{3+} par l'oxydation de la pyrite et la précipitation du Fe^{3+} ne peuvent pas être prises en compte (cas de l'essai « < 20 µm »). Toutefois, elle permet d'estimer une vitesse d'oxydation du Fe^{2+} plus juste qu'avec la concentration en Fe^{3+}. La Figure 63, présente la quantité totale de Fe^{3+} produit, calculée via l'équation [72], en fonction du temps au cours des essais.

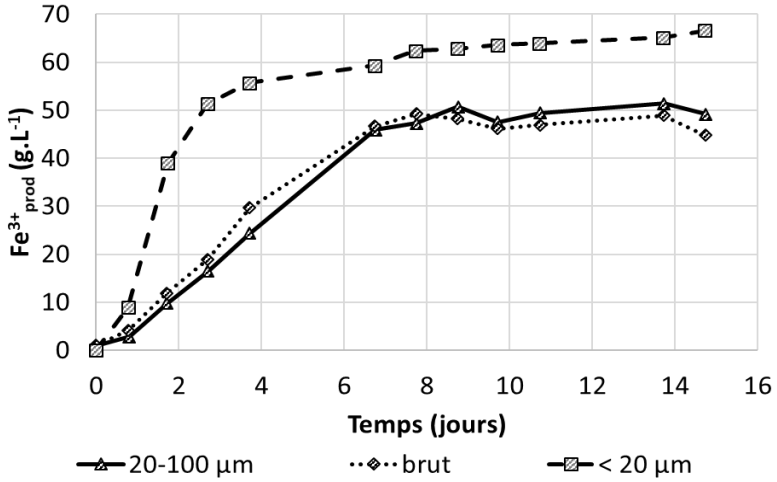


Figure 63 – Fe^{3+} produit (Fe^{3+}_{prod}) en fonction du temps au cours d'essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, la fraction < 20 µm et le concentré brut. Les quantités de Fe^{3+} produit ont été calculées avec l'équation [72].

Pour chaque essai, la cinétique d'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} peut être divisée en deux phases : une première phase où le Fe^{2+} est rapidement oxydé en Fe^{3+}, suivi d'une seconde phase où la quantité de Fe^{3+} produite au cours du temps est faible. Lors de la première phase, la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} est plus élevée avec la fraction fine qu'avec la fraction grossière et le concentré brut. Au cours de la seconde phase, la dissolution de la chalcopyrite est plus lente (Figure 48), et une précipitation du Fe^{3+} a lieu en parallèle de la dissolution de la pyrite et de la chalcopyrite (Figure 51). La quantité de Fe^{2+} à oxyder est donc plus faible, ce qui explique la diminution de la vitesse d'oxydation du Fe^{2+}.

Les vitesses maximales d'oxydation du Fe^{2+} ont été calculées pour chaque essai et sont indiquées dans le Tableau 15. Les vitesses maximales obtenues lors des essais de biolixiviation de la fraction grossière et du concentré brut sont proches, mais environ 3 fois plus faibles que celle observée lors de la biolixiviation de la fraction fine. Cette dernière est du même ordre de grandeur que la vitesse maximale de bio-oxydation du Fe^{2+} obtenue dans les travaux de Hubau (2019) lors d'un essai de bio-oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} en mode continu (21 $g.L^{-1}.j^{-1}$). Cet essai a été réalisé avec le consortium BRGM-KCC, qui est l'un des consortia à l'origine du consortium AKL utilisé dans notre étude (Chapitre II, section 2.1), et dans une colonne à bulle avec un support solide sur lequel les bactéries peuvent s'attacher pour éviter leur lessivage. Le milieu nutritif était la seule source de Fe^{2+} et ne contenait aucun autre substrat à l'exception des nutriments nécessaires au développement des bactéries (pas de substrat solide, soit pas de particules qui pourraient induire un stress hydrodynamique supplémentaire sur les microorganismes). Ces conditions sont donc propices au développement et à l'activité des bactéries ferro-oxydantes. La vitesse maximale d'oxydation du Fe^{2+} en présence de particules fines est donc équivalente à celle observée dans des conditions très favorables au développement et à l'activité des bactéries ferro-oxydantes.

Tableau 15 – Vitesses d'oxydation maximales du Fe^{2+} au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm.

	20-100 µm	Brut	< 20 µm
Vitesse d'oxydation maximale du Fe^{2+} ($g.L^{-1}.j^{-1}$)	7,2	7,1	22,3

1.2.3.2. Oxydation du soufre

Outre l'activité ferro-oxydante, l'activité des bactéries sulfo-oxydantes permet d'oxyder les intermédiaires soufrés issus de l'oxydation de la chalcopyrite et de la pyrite. En première approche, l'oxydation de ces intermédiaires peut être représentée par la réaction d'oxydation du soufre élémentaire (équation [69]) rappelée ci-dessous.

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Bactéries S-ox}} 2SO_4^{2-} + 4H^+ \quad [69]$$

Cette réaction, la précipitation du fer en jarosite (équation [65]) et l'oxydation de la pyrite (équation [70]) produisent des protons contrairement à l'oxydation du Fe^{2+} (équation [71]) qui en consomme. Ces trois réactions affectent donc l'évolution du pH au cours des essais. La Figure 64 trace l'évolution du pH au cours de ces trois essais.

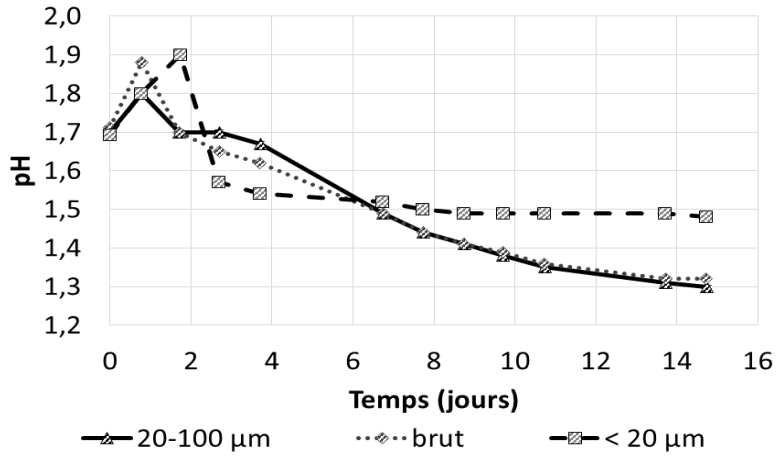


Figure 64 – pH en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm.

Pour tous les essais, au cours des premiers jours, le pH augmente ce qui indique que la quantité de protons consommée est supérieure à la quantité de protons produite. Si besoin, de l'acide (H_2SO_4) est alors ajouté quotidiennement pour ajuster le pH à 1,7. Cette phase est plus longue dans le cas de l'essai réalisé avec la fraction fine, et la quantité d'acide utilisée pour ajuster le pH est donc plus grande. Le Tableau 16 indique les quantités totales d'acide ajoutées au cours des essais. On observe que 6 et 2 fois plus d'acide a été ajouté avec la fraction fine comparé à la fraction grossière et le concentré brut.

Tableau 16 – Quantité totale d'acide sulfurique (96%) ajouté au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, la fraction < 20 µm et le concentré brut.

20-100 µm	Brut	< 20 µm
0,97 g	3 g	6 g

Au cours d'une seconde phase, lors des essais de biolixiviation de la fraction 20-100 µm et du concentré brut, le pH diminue jusqu'à atteindre un pH de 1,3. La quantité de protons produite est alors supérieure

à la quantité de protons consommée. Dans le cas de la biolixiviation de la fraction fine, le pH diminue jusqu'à se stabiliser à 1,5. La quantité de protons produite est donc supérieure à la quantité de protons consommée, puis la production et la consommation de protons s'équilibrent. En parallèle, l'oxydation du Fe^{2+} en solution ralentit. La production de protons par oxydation des espèces soufrés et/ou par précipitation de jarosite diminue donc également.

La quantité totale de SO_4^{2-} produits a été calculée afin de déterminer la cinétique d'oxydation du soufre et déterminer si elle est cohérente avec les résultats précédents. La quantité totale de SO_4^{2-} produits ($SO_4^{2-}{}_{prod}$) doit prendre en compte les différentes sources de SO_4^{2-} ajouté dans le système (milieu nutritif, inoculum et acide ajouté pour ajustement du pH). Comme pour la quantité de Fe^{3+} produit, la quantité de SO_4^{2-} précipités n'ayant pu être mesurée au cours des essais, elle sera prise en compte seulement pour le suivi final de chaque essai. La quantité de SO_4^{2-} produits a donc été calculée selon l'équation suivante :

$$SO_4^{2-}{}_{prod}[g.L^{-1}] = C_{SO4} + \frac{m(SO4)_{prélèv} - C_{SO4_{inoc}} \times V_{inoc} - m(SO4)_{nutri} - C_{ac} \times V_{ac} \times M(SO_4^{2-}) + m(SO4)_p}{V} \quad [75]$$

Avec :

- C_{SO4} (en $g.L^{-1}$) : la concentration en SO_4^{2-} en solution ;
- V (en L) : le volume de liquide ;
- C_{SO4_inoc} (en $g.L^{-1}$) : la concentration en SO_4^{2-} dans l'inoculum ;
- V_{inoc} (en L) : le volume de l'inoculum ;
- $m(SO4)_{nutri}$ (en g) : la masse de SO_4^{2-} contenue dans le milieu nutritif ;
- $m(SO4)_{prélèv}$ (en g) : la masse de SO_4^{2-} perdue dans les prélèvements ;
- $m(SO4)_p$ (en g) : la masse de SO_4^{2-} précipitée (seulement pris en compte à la fin de chaque essai) ;
- C_{ac} (en $mol.L^{-1}$) : la concentration en H_2SO_4 ;
- V_{ac} (en L) : le volume de H_2SO_4 ajouté pour réguler le pH ;
- M(SO4) (en $g.mol^{-1}$) : la masse molaire de SO_4^{2-}.

La masse de SO_4^{2-} soutirée dans les n prélèvements réalisés est calculée selon l'équation [76].

$$m(SO4)_{prélèv}[g] = \sum_{i=1}^{n} C_{SO4_prélèv_i} \times V_i \quad [76]$$

Avec $C_{SO4_prélèv_i}$ la concentration en SO_4^{2-} dans le prélèvement i (en $g.L^{-1}$) et V_i le volume du prélèvement i (en L).

Les nutriments sources de SO_4^{2-} dans le milieu nutritif sont $(NH_4)_2SO_4$ et $MgSO_4.7H_2O$. La masse de SO_4^{2-} contenue dans le milieu nutritif a été calculée selon l'équation [77].

$$m(SO4)_{nutri}[g] = V_{0KM} \times \sum_i \frac{C_i \times M(SO4)}{M(i)} \quad [77]$$

Où i fait référence aux nutriments $(NH_4)_2SO_4$ ou $MgSO_4.7H_2O$, V_{0KM} le volume du milieu nutritif (en L), C_i la concentration en i ($g.L^{-1}$), et M(i) la masse molaire de i ($g.mol^{-1}$).

La Figure 65 compare les quantités de SO_4^{2-} produits calculées à la fin de chaque essai en tenant compte ou non de la précipitation de jarosite. Dans le cas de la biolixiviation de la fraction 20-100 µm et du concentré brut, la quantité de SO_4^{2-} précipité en jarosite est négligeable comparé à la quantité de SO_4^{2-}

produit et en solution (différence entre « SO4 à tf » et « SO4 prod sans précip » négligeable). Avec la fraction fine, la quantité de SO_4^{2-} précipités représente 13% de la quantité totale de SO_4^{2-} produits. Les quantités de SO_4^{2-} produit calculées avec l'équation [75] sont donc globalement adéquats pour en déterminer une cinétique et vitesse d'oxydation du soufre (ou de production de SO_4^{2-}).

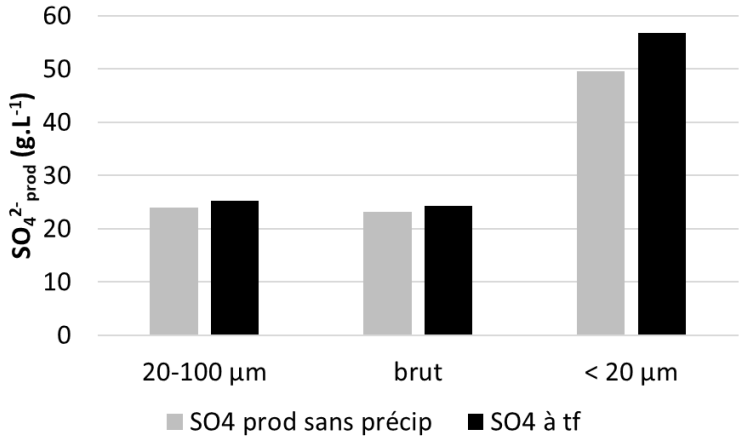


Figure 65 – SO_4^{2-} produits ($SO_4^{2-}{}_{prod}$) quantifiés à la fin des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, la fraction < 20 µm et le concentré brut en prenant en compte ou non de la précipitation de jarosite (« SO4 à tf » et « SO4 prod sans précip » respectivement).

La Figure 66 présente la quantité totale de SO_4^{2-} produits en fonction du temps au cours des trois essais de biolixiviation.

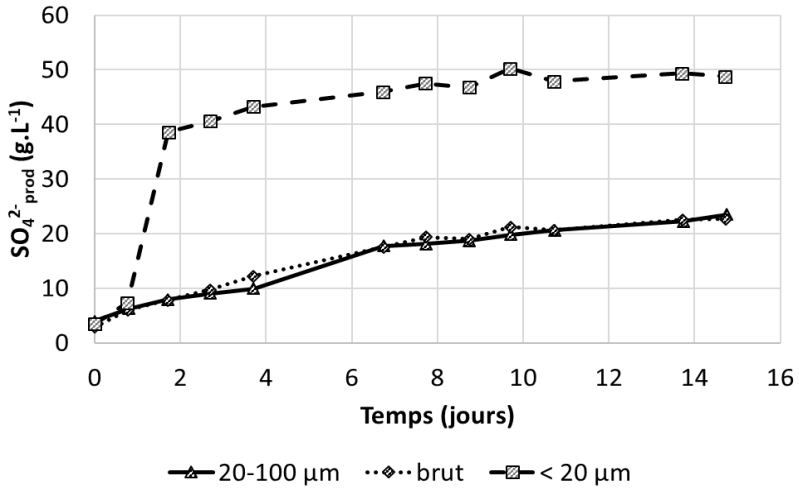


Figure 66 – SO_4^{2-} produit ($SO_4^{2-}{}_{prod}$) en fonction du temps au cours d'essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 100-20 µm, la fraction < 20 µm et le concentré brut.

Lors des essais de biolixiviation de la fraction grossière et du concentré brut, les cinétiques d'oxydation du soufre sont similaires à celles obtenues pour l'oxydation du Fe^{2+}, avec une première phase où le soufre est oxydé plus rapidement qu'au cours d'une seconde phase où peu de SO_4^{2-} sont produits. Dans le cas de l'essai de biolixiviation de la fraction fine, la vitesse d'oxydation du soufre est initialement identique à celle observée au début des deux autres essais. Puis, cette vitesse augmente avant de diminuer rapidement. Au cours de cette dernière phase, peu de SO_4^{2-} est produit, ce qui est cohérent avec les cinétiques de dissolution du cuivre et du fer, et donc des sulfures (Figure 48).

La vitesse maximale d'oxydation du soufre a été calculée de manière analogue à la vitesse maximale d'oxydation du Fe^{2+} avec la quantité de SO_4^{2-} produite. Elle est égale à 7,2 g de soufre.L^{-1}.j^{-1} dans le cas

de l'essai de biolixiviation de la fraction fine et égale à 0,9 g de soufre.L^{-1}.j^{-1} lors des deux autres essais. En comparaison, les vitesses de bio-oxydation de soufre élémentaire observées dans les travaux de Plumb et al. (2008) sont de 0,55 et 0,75 g.L^{-1}.j^{-1} à environ 45°C et à pH 1,5 et 2 respectivement, tandis que dans les travaux de Basitere et al. (2012) la vitesse est de 0,83 g.L^{-1}.j^{-1} à 40°C et pH initial de 2,5. La vitesse d'oxydation du soufre obtenue avec le concentré brut et la fraction 20-100 µm est donc du même ordre de grandeur que celle obtenu par ces auteurs, et indique donc une activité sulfo-oxydante similaire à celle observée dans des conditions choisies pour favoriser la croissance et l'activité de bactéries sulfo-oxydantes. On en déduit qu'avec la fraction fine, la vitesse d'oxydation du soufre est probablement plus élevée du fait d'une production plus importante de soufre issue d'une meilleure dissolution de la chalcopyrite.

Ainsi, l'activité ferro-oxydante et sulfo-oxydante est importante dès le 2ème jour de l'essai réalisé avec la fraction < 20 µm. Les particules fines n'inhibent pas l'activité bactérienne et les produits des réactions sont donc bien le Fe^{3+} et le SO_4^{2-}. D'après les réactions [63], [69], [70] et [71], on peut donc réécrire les réactions globales d'oxydation de la chalcopyrite et de la pyrite comme suit :

$$CuFeS_2 + 4{,}25O_2 + H^+ \longrightarrow Cu^{2+} + Fe^{3+} + 2SO_4^{2-} + 0{,}5H_2O \quad [78]$$

$$FeS_2 + 3{,}75O_2 + 0{,}5H_2O \longrightarrow Fe^{3+} + 2SO_4^{2-} + H^+ \quad [79]$$

D'après la Figure 51, seule la chalcopyrite est oxydée au cours du premier jour ou des 2 premiers jours dans le cas de la fraction fine. Cette réaction consommatrice de proton (équation [78]) est à l'origine de l'augmentation du pH (Figure 64) au début des essais. Puis la pyrite est oxydée en parallèle de la chalcopyrite et sa vitesse de dissolution est plus rapide que celle de la chalcopyrite. L'oxydation de la pyrite étant productrice de protons (équation [79]), le pH diminue. La précipitation de jarosite produisant également des protons (équation [65]), cette réaction participe également à la diminution de pH. En fin d'essai, la dissolution de la chalcopyrite est quasi-nulle avec la fraction 20-100 µm et le concentré brut, tandis qu'avec la fraction < 20 µm la chalcopyrite est encore oxydée, mais lentement (Figure 48 et Figure 51). Autrement dit, en parallèle de la production de protons via l'oxydation de la pyrite et la précipitation de jarosite, la consommation en protons est plus faible avec la fraction grossière et le concentré brut, ce qui explique le pH plus bas à la fin des essais menés avec ces deux matériaux.

La présence de particules fines entraîne une croissance bactérienne plus élevée, et permet une dissolution rapide des sulfures, en particulier de la chalcopyrite, générant plus de Fe^{2+} et de S. Cela conduit à une activité bactérienne plus élevée.

1.3. Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la dissolution de la chalcopyrite est plus rapide lorsque la quantité de particules fines est élevée, ce qui conduit à des rendements de dissolution plus élevés. Cela est attribuable à une surface spécifique plus élevée et donc à une plus grande surface réactive, qui facilite les réactions de dissolution et augmente le nombre de sites disponibles pour l'attachement des microorganismes (Jonglertjunya, 2003). D'autre part la concentration en chalcopyrite est plus élevée dans la fraction < 20 µm que dans la fraction 20-100 µm et le concentré brut (Chapitre III, section 1.2). Cette différence minéralogique pourrait également bonifier l'oxydation de la chalcopyrite en présence de particules fines.

Dans la littérature, il a aussi été démontré qu'une réduction de la taille des particules résulte en une dissolution plus efficace de la chalcopyrite, toutefois, certaines études montrent une diminution du

rendement de dissolution du minéral pour des tailles de particules telles que $d_{80} \leq 10$ µm (le d_{80} de la fraction < 20 µm est d'environ 10 µm (Figure 52)) (Esmailbagi et al., 2018, et Manafi et al., 2021). Les premiers auteurs expliquent ce phénomène par une production de dérivés réactifs d'oxygène (ROS), toxiques pour les bactéries, tandis que les seconds justifient ce résultat par l'agglomération ou l'agrégation des particules fines, et donc l'accessibilité réduite des bactéries aux minéraux sulfurés, ainsi qu'à une dégradation des cellules et une perte d'activité bactérienne (perte de viabilité des cellules). L'effet limitant de l'agglomération et de l'agrégation des particules sur la dissolution de la chalcopyrite a été montré au cours des travaux de Zhao et al. (2021). Toutefois, comparé à ces études, la fraction < 20 µm n'a pas été obtenue par broyage (pas de génération de ROS) et la vitesse d'agitation est beaucoup plus élevée (700 rpm contre 300 et 500 rpm respectivement). La turbulence générée est donc probablement plus importante au cours des essais de notre étude et pourrait limiter la formation d'agrégats ou d'agglomérats au cours de la biolixiviation de la fraction fine. Cela expliquerait le rendement de dissolution du cuivre plus élevé par rapport à celui obtenu dans les travaux de Manafi et al. (2021), pour des conditions opératoires proches, excepté la température (55% à 42°C dans notre étude contre 33% à 50°C dans les travaux de Manafi et al. (2021)).

La taille des particules, ou la proportion en particules fines, a également un impact sur l'évolution du potentiel redox au cours des essais (Figure 49). De nombreuses études ont montré que le potentiel redox influence l'oxydation de la chalcopyrite, et que lorsque celui-ci franchit une valeur limite, la dissolution de la chalcopyrite ralentit du fait de sa passivation. Lors de la biolixiviation de ce minéral à pression atmosphérique et à 45°C Gericke et al. (2010) ont ainsi identifié une limite située entre 633 et 643 mV vs. SHE à partir de laquelle le rendement en chalcopyrite diminue. De même Córdoba et al. (2008b) ont identifié une limite de passivation aux environs de 643 mV vs. SHE lors de la lixiviation chimique de la chalcopyrite. D'après la relation de Yue et al. (2014) (Chapitre II, section 4.1), ces potentiels correspondent à un ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} entre 0,31 et 0,44 respectivement. Le potentiel redox lors d'un essai de biolixiviation dépend de la vitesse de consommation du Fe^{3+} par oxydation des sulfures (équations [63] et [70]), et de la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} (équation [71]). Les bactéries ferro-oxydantes catalysent cette dernière réaction faisant intervenir des échanges d'électrons et de protons au sein des cellules bactériennes (Chapitre I, section 2.2.1). L'oxydation du Fe^{2+} dépend donc de la concentration en bactéries, du pH et de la quantité de Fe^{2+} en solution. Lors des essais de biolixiviation, quelle que soit la taille des particules, le potentiel redox est dans un premier temps inférieur à 600 mV vs. SHE. Le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} est alors inférieur à 0,05, et le fer en solution est majoritairement sous forme Fe^{2+}. En parallèle, du fer est dissous (augmentation de la concentration en fer et donc en Fe^{2+}) (Figure 48b), et la biomasse augmente (Figure 56). Cela favorise l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} et la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} augmente progressivement, jusqu'à devenir plus rapide que la consommation de Fe^{3+} par la dissolution des sulfures. Le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} et le potentiel redox augmentent alors (phase exponentielle). La vitesse de dissolution de la chalcopyrite ralentit à partir d'un potentiel redox compris entre 600 et 750 mV vs. SHE (Figure 48a et Figure 49).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Gericke et al. (2010) et Córdoba et al. (2008b). D'après ces résultats, une oxydation rapide du Fe^{2+} n'est favorable à l'oxydation de la chalcopyrite que si le Fe^{3+} produit est rapidement consommé, de sorte que le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} reste faible et le potentiel redox inférieur à la limite de passivation. C'est ce qui est notamment observé au début de l'essai de biolixiviation de la fraction < 20 µm. En effet, comparé aux deux autres essais, la dissolution de la chalcopyrite est plus rapide (Figure 48a). La consommation de Fe^{3+} est donc plus importante, ce qui retarde l'augmentation du ratio Fe^{3+}/Fe^{2+}. La limite de passivation est ainsi atteinte plus tardivement. Une alternative proposée dans la littérature afin d'avoir une augmentation moins rapide du potentiel redox est de n'utiliser que des bactéries qualifiées de « weak iron oxydizer » comme les espèces du genre *Sulfobacillus*, contrairement à l'espèce *L. ferriphilum* qui est qualifié de « strong iron oxydizer ».

Ces qualificatifs viennent notamment du fait que l'espèce *L. ferriphilum* est capable d'oxyder le Fe^{2+} en Fe^{3+} même à des concentrations faibles de Fe^{2+} contrairement aux espèces du genre *Sulfobacillus* (Christel et al., 2018). Comparée à cette méthode, l'utilisation de particules fines permet de retarder la passivation de la chalcopyrite du fait d'une oxydation plus rapide impliquant la consommation des ions Fe^{3+}.

Contrairement à d'autres études, aucun sulfure intermédiaire n'a été détecté dans les résidus. Par exemple, Manafi et al. (2021) ont observé que la concentration en covellite avait augmentée entre le début et la fin d'essais de biolixiviation de chalcopyrite passant de 8,8 à 30,6%. L'oxydation de la covellite est également connue pour être lente et cette phase peut potentiellement former une fine couche à la surface des particules, parfois avec d'autres phases (jarosite et soufre élémentaire) (Sasaki et al., 2009 et Ren et al., 2022). Il se pourrait donc que dans les conditions opératoires appliquées, l'oxydation de la chalcopyrite ne génère pas cet intermédiaire réactionnel, ou alors la quantité produite est trop faible pour être détectée par DRX. En revanche, la jarosite et le soufre élémentaire accumulés dans la phase solide pourraient participer à la passivation de la chalcopyrite. Si tel est le cas, alors une faible quantité de ces espèces est suffisante pour passiver la chalcopyrite (0,1% et 2,8% de la masse du solide dans le cas du soufre et de la jarosite respectivement).

D'autre part, il existe très peu de données relatives à l'influence de la taille des particules sur les espèces acidophiles utilisées en biolixiviation. Dans le cas de microorganismes thermophiles de type archée, Nemati et al. (2000) ont montré que des particules dont le diamètre moyen est de 6,4 µm endommagent les cellules et inhibent l'activité microbienne. Ce résultat a été obtenu dans le cadre de l'étude de l'effet de la taille des particules sur la biolixiviation de pyrite. Or d'après Jones et al. (2012), plus les particules de pyrite sont fines, plus de ROS peuvent être produites. Il est donc possible qu'en plus des contraintes mécaniques, une génération plus importante de ROS participe à l'inhibition du développement et de l'activité microbienne lorsque les particules sont fines. Plusieurs études portant sur la biolixiviation de minerais sulfurés avec des microorganismes thermophiles modérées et/ou mésophiles ont ainsi attribué la baisse du rendement de dissolution avec la réduction de la taille des particules à l'effet délétère des particules fines sur ces microorganismes. C'est également ce qui est supposé par Manafi et al. (2021) pour expliquer la faible variation du nombre de cellules comptées et la diminution du rendement de dissolution lors d'un essai de biolixiviation de chalcopyrite mené avec des particules inférieures à 30 µm et un consortium bactérien composé d'espèces thermophiles modérées. Toutefois, comparé aux microorganismes thermophiles, la paroi cellulaire des espèces thermophiles modérées et mésophiles est plus résistantes aux contraintes mécaniques, ce qui permet notamment de travailler à des taux de solide plus élevés (Nemati et al., 2000). On pourrait alors s'attendre à une meilleure résistance des bactéries thermophiles modérées et mésophiles aux contraintes générées par les particules fines. En ce sens, Jonglertjunya (2003) a observé une augmentation de la vitesse spécifique de croissance de l'espèce mésophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* (anciennement *Thiobacillus ferrooxidans*) avec la réduction de la taille des particules lors d'essais de biolixiviation de chalcopyrite en erlenmeyer. La biomasse obtenue avec la fraction la plus fine était de l'ordre de 10^{11} cellules.mL^{-1} contre environ 10^{10} cellules.mL^{-1} pour les fractions les plus grossières. La phase de latence qui précède la croissance des bactéries était également plus courte avec les particules les plus fines. Toutefois, ces-dernières étaient plus grossières que celles utilisées dans les travaux de Manafi et al. (2021). Deveci (2004) a étudié l'effet de la taille des particules sur des bactéries appartenant à des espèces mésophiles. Cet auteur a mis en évidence l'existence d'une taille de particule critique au-dessus de laquelle plus la taille des particules est réduite, moins les cellules sont viables (cellules endommagées et activité bactérienne inhibée), et en dessous de laquelle l'effet inverse est observé. Cette taille critique est dépendante des conditions et du système d'agitation.

Cependant, cette étude a été réalisée avec un matériau inerte (peu d'attachement des bactéries au solide) et l'effet de la taille des particules observé n'est donc applicable qu'aux cellules planctoniques.

Dans le cas de nos travaux, la meilleure dissolution de la chalcopyrite avec la fraction < 20 µm génère une plus grande quantité de Fe^{2+} et de soufre, ce qui favorise l'activité des bactéries (Figure 63 et Figure 66) et donc la croissance bactérienne (Figure 56) (une partie de l'énergie produite par l'activité bactérienne ferro- et sulfo-oxydante est utilisée pour le développement des bactéries). Ainsi, une biomasse de l'ordre de 10^{11} cellules.mL^{-1} est obtenue avec la fraction fine contre dix fois moins avec les matériaux plus grossiers. La vitesse de croissance maximale est également atteinte avec la fraction < 20 µm (6.10^{10} cellules.$mL^{-1}.j^{-1}$ contre 6.10^{9} cellules.$mL^{-1}.j^{-1}$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Jonglertjunya (2003). En ce qui concerne l'activité bactérienne, l'oxydation du Fe^{2+} et du soufre sont au moins aussi rapide que lorsque les bactéries sont dans des conditions spécialement choisies pour favoriser leur développement (absence de particules solides, turbulence faible, etc.). Ainsi, contrairement à ce qui est souvent supposé dans la littérature et à ce qui a été observé pour des microorganismes thermophiles, les résultats obtenus soulignent l'absence d'effet négatif des particules fines sur la communauté bactérienne, lorsque celle-ci est composée de microorganismes mésophiles (*L. ferriphilum*) et thermophiles modérés (*'F. caldus'* et *Sulfobacillus*)). Par ailleurs, comparé à nos travaux, une majorité des études portant sur l'effet de la taille des particules sur la biolixiviation de minéraux métallifères sulfurés impliquent un broyage préalable du matériau, susceptible de générer des ROS, toxiques pour les microorganismes. Jones et al. (2011) ont montré que la quantité de ROS produite augmente avec l'intensité du broyage et donc avec la réduction de la taille des particules. Ils ont également mis en évidence que selon la nature du minéral sulfuré, la génération de ROS est différente : moins de ROS est produit avec la chalcopyrite comparé à la pyrite. Dans notre cas, la fraction < 20 µm contient très peu de pyrite (4,4% (m/m), ce qui n'est pas favorable à la production de ROS, et donc au contraire favorable au développement et à l'activivté bactérienne. Cela met en évidence l'importance de la minéralogie du matériau à lixivier.

Par ailleurs, d'après les biomasses mesurées dans la phase liquide (Figure 56b) et dans la pulpe (Figure 58), à la fin des essais, la proportion de bactéries dans la phase solide est plus élevée avec les particules fines (différences de biomasse entre la phase liquide et la pulpe 6 fois plus élevée que celle obtenue avec le concentré brut et la fraction 20-100 µm). Cela pourrait être lié à une plus grande surface solide colonisable par les bactéries. Ainsi, la taille des particules peut avoir un effet sur l'attachement des bactéries, mais pas à l'échelle des espèces bactériennes. En effet, quelle que soit la teneur en particules fines, l'espèce *L. ferriphilum*, est dominante dans la phase solide (exceptée au début de l'essai réalisé avec la fraction < 20 µm). Cette espèce est par ailleurs connue pour coloniser en première les particules lorsqu'elle est en co-culture avec l'espèce *'F. caldus'* (Noel et al., 2010). D'après la littérature, l'attachement des bactéries au solide améliore la dissolution des sulfures (Rawlings, 2005, et Noel et al., 2010). La taille des particules pourrait donc également influencer l'oxydation de la chalcopyrite en impactant l'attachement des microorganismes au solide.

Enfin, en comparaison des essais de biolixiviation présentés au Chapitre III, réalisés avec le concentré de Lubin, qui contient des sulfures plus facilement oxydables comme la bornite et la chalcocite et dont la granulométrie des particules est plus grossière que la fraction < 20 µm, l'évolution du potentiel redox et du pH est similaire avec le concentré brut de chalcopyrite et la fraction 20-100 µm. L'activité ferro-oxydante et sulfo-oxydante des bactéries est donc probablement similaire entre ces essais. En revanche, la dissolution du cuivre est moins efficace dans le cas de la biolixiviation chalcopyrite (80% du cuivre est dissous en 7 jours avec le concentré de Lubin contre un peu plus de 50% en 14 jours avec des particules de chalcopyrite plus fines (fraction < 20 µm)). Une phase de dissolution lente du fer est également observée au tout début des essais réalisés avec le concentré de Lubin, contrairement aux

essais de biolixiviation de chalcopyrite. La minéralogie des échantillons joue donc un rôle majeur dans la dissolution des métaux.

1.4. Conclusion

La passivation de la chalcopyrite se produit lorsque le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} dépasse un certain seuil (environ 0,4, correspondant à un potentiel redox de l'ordre de 640 mV vs SHE), du fait d'une production de Fe^{3+} par biooxydation du Fe^{2+} plus rapide que la consommation de Fe^{3+} par oxydation chimique des sulfures. Lorsque les particules sont fines, l'oxydation de la chalcopyrite est rapide et s'accompagne d'une consommation de Fe^{3+} élevée. Nos essais de biolixiviation conventionnelle ont ainsi permis de montrer que la réduction de la taille des particules en dessous de 20 µm permet une meilleure dissolution de la chalcopyrite, et retarde l'apparition du phénomène de passivation du minéral.

D'autre part, l'analyse des résidus indique la formation de jarosite et de soufre élémentaire non-oxydé. Ces phases minérales sont souvent citées dans la littérature comme étant responsables de la passivation de la chalcopyrite lors de la biolixiviation, dans des conditions opératoires similaires à celle appliquées dans l'étude. En l'absence d'autres phases néoformées identifiées dans les résidus, il est probable qu'elles contribuent à la passivation de la chalcopyrite lors de la biolixiviation conventionnelle.

Enfin, un résultat important est que la présence de particules fines n'inhibe ni la croissance, ni l'activité bactérienne (ferro- et sulfo-oxydante). Au contraire, la croissance semble favorisée grâce à la génération d'une plus grande quantité de Fe^{2+} et de S issus d'une oxydation plus importante de la chalcopyrite. L'oxydation de ces deux substrats permet ainsi de générer plus d'énergie pour le développement des bactéries. Les particules fines n'ont pas d'effet marqué sur la composition de la communauté bactérienne et un faible impact sur la répartition des espèces entre la phase solide et liquide. Elles pourraient toutefois influencer l'attachement des bactéries au solide, qui est désigné dans la littérature comme un paramètre important impactant la dissolution des minéraux sulfurés.

2. Effet d'une régulation du pH à 1,3 sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite

Au cours des essais de biolixiviation attritive qui seront présentés au Chapitre V, le pH a été maintenu à 1,3 sur toute la durée des essais afin de de limiter la variation simultanée de plusieurs paramètres. A l'inverse les essais présentés précédemment étaient menés sans régulation continue du pH, car l'oxydation du soufre via l'activité des bactéries sulfo-oxydantes est suffisante pour maintenir un pH acide favorable à la croissance et à l'activité bactérienne. La valeur de 1,3 correspond au pH obtenu en fin d'essai de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm (Figure 64). Il est donc favorable au développement des microorganismes présents dans le consortium. Il correspond également à la valeur fixée dans les essais de lixiviation attritive menés au LGC.

Afin de déterminer l'influence de la régulation continue du pH sur la dissolution et la passivation de la chalcopyrite, ainsi que sur la croissance et l'activité bactérienne, un essai de biolixiviation conventionnelle avec régulation du pH à 1,3 a été réalisé avec la fraction 20-100 µm. Les résultats sont comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions sans régulation du pH. Les informations issues de cette comparaison serviront à la compréhension des phénomènes ayant lieu lors des essais de biolixiviation attritive.

Chacun des essais (« pH non-régulé » et « pH régulé »), d'une durée de 7 jours, a été dupliqué. Les conditions sont spécifiées au chapitre II, section 3.1.2. Pour des raisons techniques, les essais avec régulation du pH ont été menés successivement (avec des inocula provenant de deux cultures différentes), contrairement aux essais sans régulation du pH (deux essais en parallèle avec des inocula provenant d'une même culture).

2.1. Effet de la régulation du pH sur l'oxydation de la chalcopyrite

La Figure 67 présente le suivi du pH des essais de biolixiviation avec et sans régulation du pH. Le pH est bien maintenu à 1,3 ± 0,05 avec le système de régulation, tandis qu'il varie entre 1,7 et 1,34 au cours de l'essai où le pH n'est pas régulé. La différence de pH est plus marquée au début qu'à la fin des essais.

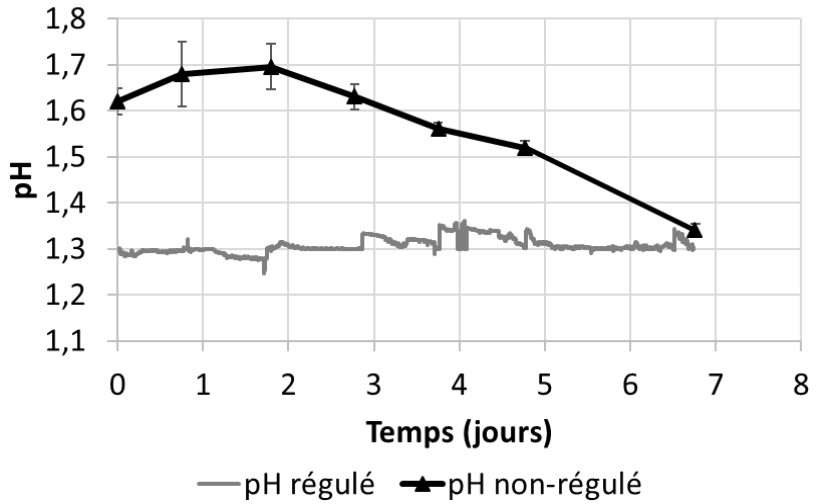


Figure 67 – pH en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec et sans régulation du pH. Les résultats correspondent à la moyenne des résultats des réplicats respectifs de chaque essai et les barres d'erreur aux écarts-types obtenus à partir de ces résultats.

L'évolution des rendements de dissolution du cuivre et du fer au cours des essais avec et sans régulation du pH est présentée sur la Figure 68. Les résultats de dissolution obtenus lors d'un essai en absence de régulation sur une durée de 15 jours ont également été représentés sur cette figure pour comparaison. Cet essai correspond à l'essai « 20-100 µm » présenté dans la section 1 de ce chapitre et est ici nommé « pH non-régulé 15j » pour plus de clarté.

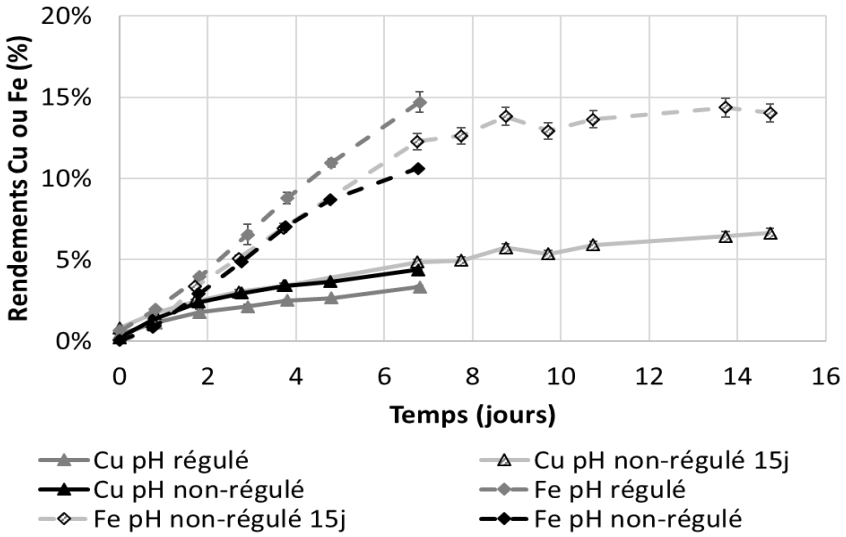


Figure 68 – Rendements de dissolution du cuivre et du fer en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec et sans régulation du pH. Les résultats correspondent à la moyenne des résultats des réplicats respectifs de chaque essai et les barres d'erreur aux écarts-types obtenus à partir de ces résultats, excepté pour l'essai « 20-100 µm » où elles correspondent à l'incertitude des mesures. Les rendements ont été calculés à partir de l'analyse de la phase liquide de la pulpe (Chapitre II, section 4.1).

Les rendements de dissolution du cuivre sont faibles que le pH soit régulé ou non. Ce rendement est par ailleurs légèrement plus faible lorsque le pH est régulé (3% contre 4% à 7 jours). Les cinétiques de dissolution sont également similaires entre les deux essais. Les vitesses de dissolution du cuivre sont initialement de l'ordre de à 0,2 et 0,4 $g.L^{-1}.j^{-1}$ lorsque le pH est ou n'est pas régulé respectivement, et diminuent avec le temps. La régulation du pH impacte donc très peu la dissolution de la chalcopyrite, en termes de rendement et de cinétique. Par ailleurs, lorsque l'essai non-régulé est prolongé sur 15 jours, le rendement n'augmente que de 2,2%, ce qui confirme la cinétique de dissolution lente de la chalcopyrite dans ces conditions opératoires.

La cinétique de dissolution du fer avec régulation du pH est aussi globalement proche de celle observée lorsque le pH n'est pas régulé. Au cours de l'essai régulé, le fer est dissous à vitesse constante sur toute la durée de l'essai (0,65 $g.L^{-1}.j^{-1}$). Dans le cas sans régulation du pH, la vitesse de dissolution du fer est constante au cours des 5 premiers jours, mais est plus faible que celle observée avec régulation du pH (0,56 $g.L^{-1}.j^{-1}$). Puis, cette vitesse diminue, ce qui n'est toutefois pas observé sur le même intervalle de temps lors de l'essai de 15 jours. Or, d'après les résultats détaillés dans la partie précédente, au 7ème jour de l'essai « 20-100 µm », une précipitation du fer a lieu. Il se pourrait donc que lors de l'essai de 7 jours sans régulation du pH, la précipitation du fer soit plus précoce, ce qui expliquerait la diminution de la vitesse de dissolution du fer. D'autre part, le rendement de dissolution du fer est plus élevé lorsque le pH est régulé. Or les rendements de dissolution du cuivre, et donc de chalcopyrite sont proches. La quantité de fer dissous provenant de l'oxydation de la chalcopyrite est donc similaire d'un essai à l'autre. Par conséquent, la différence de rendement de dissolution en fer provient soit d'une dissolution plus rapide de la pyrite lorsque le pH est régulé, soit d'une consommation du fer en solution par une réaction annexe (précipitation) lorsque le pH n'est pas régulé.

Les rendements finaux de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite sont indiqués dans le Tableau 17 avec les pertes en cuivre et en fer. Ces rendements ainsi que les pertes ont été calculés comme précédemment (section 1.1.1 de ce chapitre).

Tableau 17 – Rendements de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite obtenus à la fin des essais de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec et sans régulation du pH. Pour chaque essai, les rendements et les pertes correspondent à la moyenne des résultats du réplicat. Les rendements ont été calculés à partir des analyses de la fraction 20-100 µm et des résidus.

	pH régulé	pH non-régulé
Rendements de dissolution de la chalcopyrite (%)	13 ± 2	12 ± 1
Rendements de dissolution de la pyrite (%)	50 ± 3	41 ± 3
Pertes en cuivre (%)	9 ± 2	6 ± 2
Pertes en fer (%)	6 ± 2	8 ± 2

A nouveau, les rendements de dissolution du cuivre (obtenus par analyse de la phase liquide) sont plus faibles que les rendements de dissolution de la chalcopyrite (obtenus par analyse des résidus). Cet écart pourrait être en partie dû aux pertes, aux incertitudes sur les mesures des concentrations dans la phase liquide et la phase solide, et à la variation de la masse de la pulpe entre l'instant initial et la fin de l'essai (entre 1 et 3% de la masse initiale), qui est due à l'évaporation de l'eau et la compensation approximative de cette évaporation.

Le rendement de dissolution de la pyrite est plus élevé lorsque le pH est régulé, ce qui est cohérent avec les rendements de dissolution du fer observés sur la Figure 68. La meilleure dissolution du fer provient donc d'une dissolution de pyrite plus importante lorsque le pH est régulé.

La Figure 69 présente le suivi du potentiel redox et du ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} au cours des essais. Le potentiel redox augmente exponentiellement avant de se stabiliser vers 850 mV vs. SHE lorsque le pH n'est pas régulé, et 880 mV vs. SHE lorsque le pH est régulé. Il en découle que le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} augmente plus rapidement et est plus élevé au cours de l'essai avec régulation du pH (à la fin de l'essai, le ratio est 3 fois plus élevé que celui obtenu sans régulation du pH). L'hypothèse la plus probable est que, le pH étant plus élevé en absence de régulation (Figure 67), la formation de jarosite est favorisée ce qui entraîne la précipitation de Fe^{3+}. Cette hypothèse n'a cependant pas pu être validée par analyse DRX des résidus.

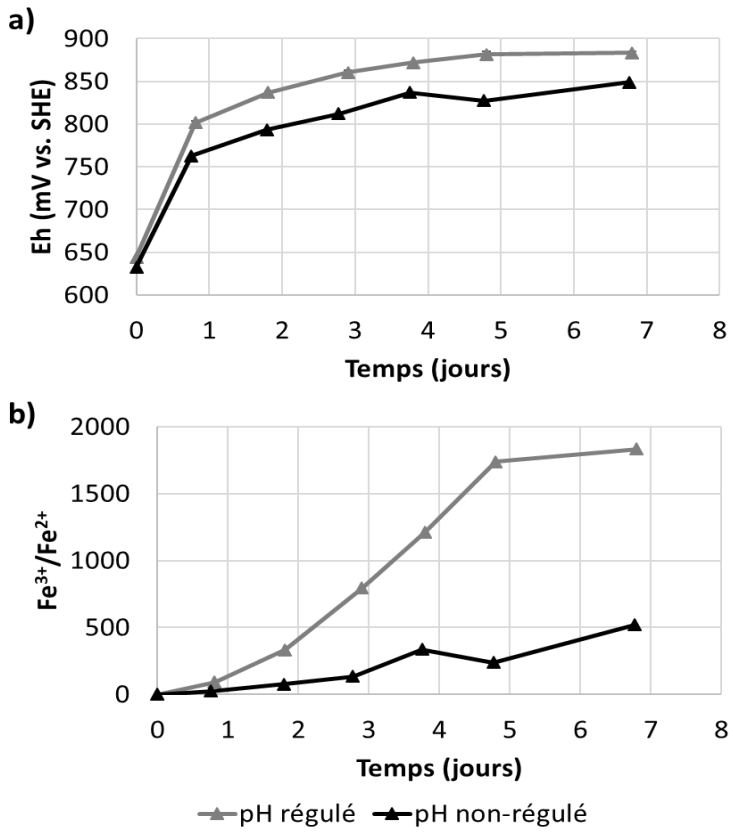


Figure 69 – (a) Potentiel redox (Eh) et (b) ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec et sans régulation du pH. Les résultats correspondent à la moyenne des résultats des réplicats respectifs de chaque essai et les barres d'erreur aux écarts-types obtenus à partir de ces résultats.

2.2. Influence de la régulation du pH sur les communautés bactériennes

2.2.1. Influence de la régulation du pH sur la croissance et la diversité bactérienne

La croissance bactérienne a été observée à travers le suivi de la biomasse au cours des essais avec et sans régulation du pH (Figure 70). La biomasse augmente au cours du temps de façon similaire d'un essai à l'autre. La régulation du pH n'impacte donc pas la croissance bactérienne.

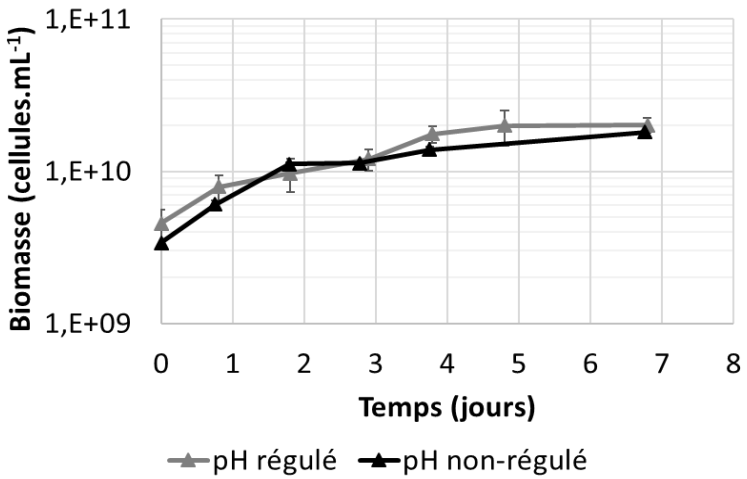


Figure 70 - Biomasse en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec et sans régulation du pH. Les mesures de biomasse ont été réalisées sur le surnageant d'échantillons de pulpe obtenu après 5 min de décantation. Les résultats correspondent à la moyenne des résultats des réplicats respectifs de chaque essai et les barres d'erreur aux écarts-types obtenus à partir de ces résultats.

La Figure 71 présente le profil de diversité de la communauté bactérienne au début (inoc), au milieu et à la fin de l'essai avec régulation du pH. De manière similaire, les trois espèces ferro- et/ou sulfo-oxydantes majoritaires du consortium AKL sont bien présentes lorsque le pH est régulé. Comme pour la communauté bactérienne observée en absence de régulation du pH (Figure 59), les espèces dominantes sont '*F. caldus*' et *L. ferriphilum*. La régulation du pH n'a donc pas d'impact sur la composition de la communauté bactérienne.

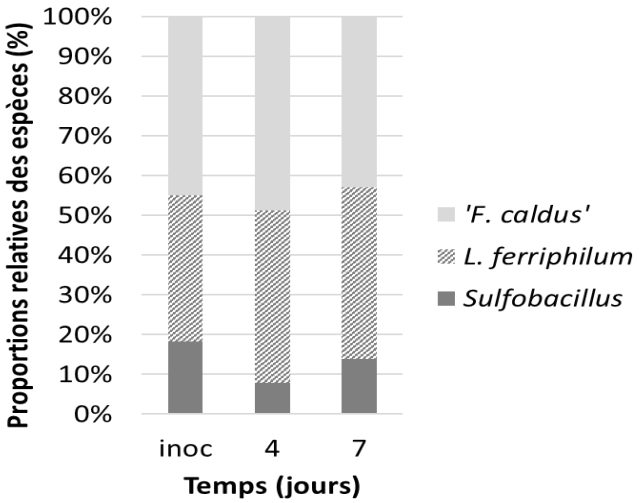


Figure 71 – Profils de diversité de la communauté bactérienne aux 4ème et 7ème jours d'un essai de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec régulation du pH et dans l'inoculum (inoc) de cet essai. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour un essai du réplicat et ont été acquis à partir d'échantillons de pulpe et par analyse T-RFLP (Chapitre II, section 5.2).

La répartition des espèces entre la phase solide et liquide a également été mesurée au cours du même essai (Figure 72).

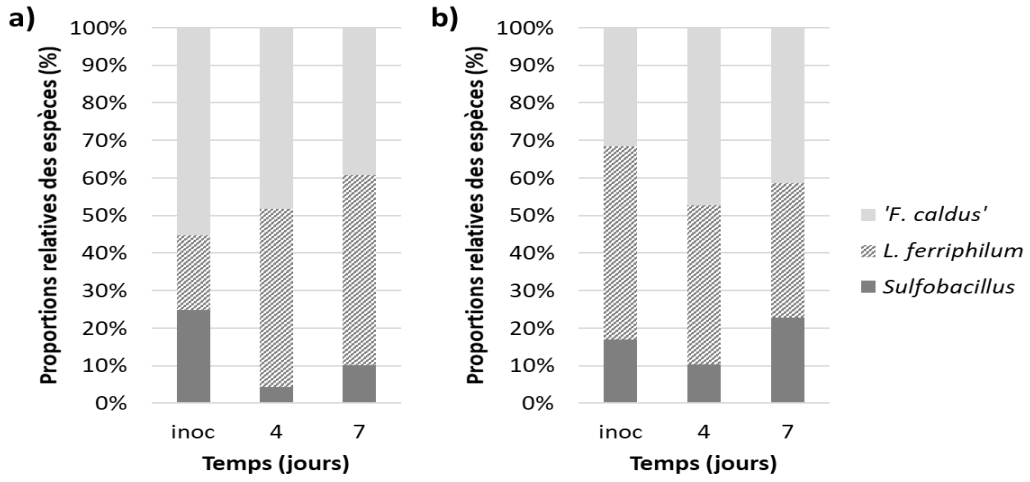


Figure 72 - Proportions relatives des espèces bactériennes dans (a) la phase liquide et (b) dans la phase solide aux 4ème et 7ème jours de l'essai de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec régulation du pH et de l'inoculum (inoc) de cet essai. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour un essai du réplicat et ont été acquis par analyse T-RFLP sur la phase liquide ou solide. Ces phases ont été séparées par centrifugation à 5000 rpm pendant 30 s (Chapitre II, sections 5.1.3 et 5.2).

L'espèce dominante dans la phase liquide de l'inoculum est *'F. caldus'*. Au cours de l'essai, la composition de la communauté bactérienne planctonique tend vers une codominance des espèces *'F. caldus'* et *L. ferriphilum*. De même la diversité de la communauté bactérienne dans la phase solide tend vers une codominance de ces deux espèces, alors que l'espèce dominante dans la phase solide de l'inoculum est *L. ferriphilum.*

2.2.2. Influence de la régulation du pH sur l'activité bactérienne

L'effet de la régulation du pH sur l'activité bactérienne a été étudié à partir de la production de Fe^{3+} et la production de protons (Figure 73 et Figure 74 respectivement). La quantité de Fe^{3+} produite est calculée de la même manière que précédemment, excepté que la quantité de jarosite précipitée n'a été prise en compte.

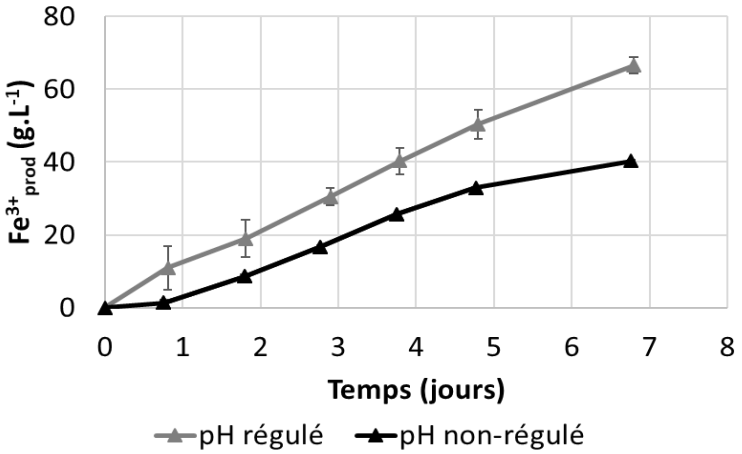


Figure 73 – Fe^{3+} produit en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec et sans régulation du pH. Les résultats correspondent à la moyenne des résultats des réplicats respectifs de chaque essai et les barres d'erreur aux écarts-types obtenus à partir de ces résultats.

Les données de la Figure 73 montre qu'une quantité sensiblement plus importante de Fe^{3+} a été produite dans l'essai régulé que dans l'essai non régulé (environ 65 g/L contre 40 g/L), ce qui traduit une activité ferro-oxydante plus efficace. La vitesse de production de Fe^{3+} est régulière tout au long de l'essai avec régulation du pH. Dans le cas où le pH n'est pas régulé, la cinétique de cette réaction est divisée en trois phases : dans un premier temps, peu de Fe^{3+} est produit, puis la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} augmente avant de ralentir. Ce ralentissement est cohérent avec l'hypothèse de la précipitation d'une partie du Fe^{3+} en solution.

Les vitesses maximales d'oxydation du Fe^{2+} ont été calculées comme précédemment (section 1.2.3.1 de ce chapitre) et sont indiquées dans le Tableau 18. La vitesse maximale de production du Fe^{3+} est un peu plus élevée lorsque le pH est régulé, ce qui est cohérent avec l'évolution des potentiels redox (Figure 69). Cette activité ferro-oxydante plus efficace induit une dissolution plus rapide de la pyrite.

Tableau 18 – Vitesses maximales d'oxydation du Fe^{2+} au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite avec et sans régulation du pH.

	pH régulé	pH non-régulé
Vitesse maximale d'oxydation du Fe^{2+} ($g.L^{-1}.j^{-1}$)	9,8	8,0

La quantité de protons produits a été calculée différemment selon l'essai. En absence de régulation du pH, elle a été calculée à partir des mesures de pH, tandis qu'elle a été déterminée à partir de la quantité d'acide et de base ajouté pour maintenir le pH à 1,3 lorsque le pH est régulé (Chapitre II, section 4.3). L'acidité (concentration en protons) calculée à partir du pH est une acidité apparente, qui ne prend en compte que de l'acidité liée aux ions H_3O^+ et non à celle liée aux ions HSO_4^- (Pakostova et Johnson, 2019). Autrement dit, la quantité de protons produits calculée dans le cas de l'essai sans régulation du pH est une quantité apparente, qui est éventuellement inférieure à la réelle quantité de protons produits. En revanche, le calcul réalisé à partir des quantités d'acide et de base ajoutées permet de tenir compte de l'acidité totale. Cette différence peut donc induire un biais lors de la comparaison des quantités de protons produites calculées. On ne s'intéressera par conséquent qu'à l'évolution de ces quantités en fonction du temps au cours des essais.

La Figure 74 indique les quantités de protons produits au cours des essais, obtenues à partir de ces calculs. Dans un premier temps, celles-ci sont négatives, ce qui indique que la consommation en protons par oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} (équation [71]) est supérieure à la production de protons par oxydation du S (équation [69]) et éventuellement par précipitation de jarosite (équation [65]). Après 2 jours, quel que soit l'essai, la quantité de protons produits augmente.

La régulation du pH ne semble donc pas impacter l'activité bactérienne sulfo-oxydante.

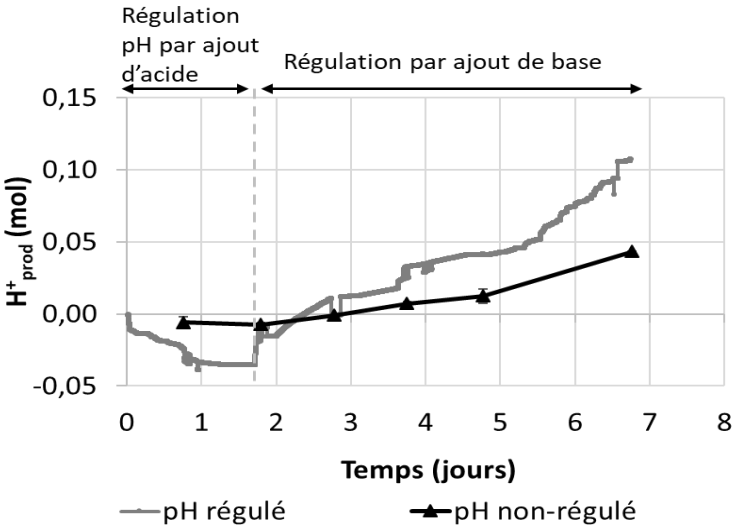


Figure 74 – Protons produits en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation conventionnelle de la fraction 20-100 µm avec et sans régulation du pH. Les résultats correspondent à la moyenne des résultats des réplicats respectifs de chaque essai et les barres d'erreur aux écarts-types obtenus à partir de ces résultats.

2.3. Discussion

D'après la littérature, lorsque le pH est inférieur à 2, plus le pH est faible, moins la dissolution de la chalcopyrite est efficace qu'il y ait présence ou non de microorganismes ferro- et/ou sulfo-oxydantes (Córdoba et al., 2008a, Peng et al., 2019). Toutefois, selon notre étude, que le pH soit maintenu à 1,3 de manière continue ou varie entre 1,34 et 1,7-1,8 (sans régulation du pH, Figure 64 et Figure 67), la dissolution de la chalcopyrite est peu affectée et reste faible et lente. Ces résultats rejoignent ceux de Nyembwe et al. (2021) qui ont obtenu des rendements de dissolution de la chalcopyrite similaires à pH 1,5 et 1,8 lors de la lixiviation chimique du minéral à 25°C. D'après les travaux de ces auteurs, la nature des espèces intermédiaires majeures produites lors de l'oxydation de la chalcopyrite dépend du pH. Par exemple, à pH inférieur ou égal à 1, les phases intermédiaires majeures sont la chalcocite et la nukundamite ($Cu_{3,39}Fe_{0,61}S_4$), tandis qu'à pH 1,5 et 1,8, la bornite est l'espèce intermédiaire majeure détectée, celle-ci étant ensuite oxydée en covellite avec une formation intermédiaire de chalcocite. Ainsi, il est possible que lorsque le pH est compris entre 1,3 et 1,7, les mécanismes réactionnels impliqués dans l'oxydation de la chalcopyrite ne varient pas avec le pH, tandis qu'ils peuvent être différents à des pH en dehors de cet intervalle. Cela pourrait expliquer la différence de dissolution de la chalcopyrite en fonction du pH dans les travaux de Córdoba et al. (2008a) et Peng et al. (2019), non observée dans notre étude.

D'autre part, Peng et al. (2019) ont montré qu'une variation du pH initial entre 1 et 3 a un impact sur la structure de la communauté bactérienne et peut influencer l'expression de gènes caractéristiques de l'oxydation du fer ou du soufre de certaines espèces. Il existe également des pH optimaux différents pour la croissance des bactéries selon l'espèce à laquelle elles appartiennent. Le pH peut ainsi avoir un effet sur la croissance bactérienne. Toutefois, comparé à un essai sans régulation du pH (où le pH varie entre 1,3 et 1,7-1,8), la régulation continue à pH 1,3 n'a pas d'effet sur la croissance, l'activité sulfo-oxydante et la composition de la communauté bactérienne, ainsi que sur la répartition des espèces entre la phase solide et liquide.

En revanche, la régulation du pH améliore l'activité ferro-oxydante. Cela est probablement dû à l'influence du pH sur la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+}. En effet, comme mentionné précédemment, en biolixiviation, la catalyse de cette réaction par l'activité bactérienne implique un

transport d'électrons et de protons entre le milieu intracellulaire des bactéries, à pH neutre, et le milieu extracellulaire acide (pH au plus égal à 1,7 au cours des essais (Figure 67)). Ainsi, plus le pH du milieu extracellulaire est faible, plus le gradient de protons existant entre l'intérieur et l'extérieur des cellules est grand, et plus le transport de protons vers l'intérieur des cellules bactériennes est rapide. Or, le pH intracellulaire doit être maintenu neutre pour la survie des microorganismes. Par conséquent, les protons doivent être consommés aussi rapidement qu'ils sont transportés à l'intérieur des cellules. Dans le cas des bactéries ferro-oxydantes, ces protons sont consommés lors de la réduction de l'oxygène, accepteur des électrons issus de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+}. Par conséquent, plus le pH est faible, plus les bactéries ont besoin d'oxyder du Fe^{2+} pour maintenir leur pH intracellulaire, ce qui favorise la production rapide de Fe^{3+}. Le pH étant plus faible lorsqu'il est régulé, l'oxydation du Fe^{2+} est plus rapide que lorsqu'il y a une régulation du pH. Cela expliquerait l'augmentation plus rapide du ratio Fe^{3+}/Fe^{2+}, et donc du potentiel redox. Ainsi, la limite de passivation est atteinte plus rapidement au cours de cet essai (avant 1 jour), ce qui contribue d'une part à la dissolution lente de la chalcopyrite, et d'autre part, à la dissolution plus rapide de la pyrite.

La régulation du pH à 1,3 n'a au final que peu d'effet sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite (fraction 20-100 µm). En effet, le rendement en chalcopyrite est faible et proche de celui observé lorsque le pH n'est pas régulé. Les cinétiques de dissolution de la chalcopyrite avec et sans régulation du pH sont aussi globalement similaires. D'autre part, la croissance et la composition de la communauté bactérienne sont peu impactées par cette régulation. Toutefois, lorsque le pH est régulé, l'oxydation du Fe^{2+} est plus rapide entraînant une passivation éventuellement plus précoce de la chalcopyrite.

3. Conclusion du chapitre

Les études menées dans ce chapitre ont permis de déterminer l'influence de la taille des particules et l'effet d'une régulation du pH à 1,3 sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite, et de décrire le phénomène de passivation de ce minéral dans ces conditions.

De manière générale, la présence de bactéries ferro-oxydantes permet d'avoir une oxydation rapide du Fe^{2+} en Fe^{3+}. L'oxydation de la chalcopyrite n'est donc pas limitée par le réactif. Toutefois, lorsque la taille des particules de l'échantillon est majoritairement supérieure à 20 µm, le minéral est rapidement passivé (en 24 h), ce qui limite le rendement de dissolution à 11% en environ deux semaines. Cette passivation pourrait être due à la formation d'une couche à la surface des particules composée de jarosite et de soufre élémentaire (deux phases ayant été mises en évidence par analyses DRX des résidus) qui entraverait la diffusion des réactifs et des produits réactionnels entre la surface des particules et la solution lixiviante. Ces résultats n'excluent pas la possibilité qu'une fine couche de sulfures de cuivre (covellite en particulier) non-détectés par DRX et issus de la dissolution préférentielle du fer contenu dans la chalcopyrite participe à la passivation du minéral, comme l'ont récemment proposé (Ren et al., 2022).

Lorsque l'échantillon contient majoritairement des particules fines, l'oxydation de la chalcopyrite est plus rapide. Cette meilleure dissolution est attribuée à une surface spécifique initiale plus élevée, qui permet une oxydation de la chalcopyrite telle que la consommation en Fe^{3+} maintient un potentiel redox, et donc un ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} favorable malgré une oxydation rapide du Fe^{2+}. Toutefois, la réduction de la taille des particules n'empêche pas la passivation du minéral, due à l'augmentation de la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} au cours du temps, mais ce phénomène apparaît plus tardivement. Ce retard n'a lieu que lorsque l'échantillon contient une proportion significative de particules fines. Par exemple, une augmentation de la quantité de particules fines (< 20 µm) de 12% à 23% du volume de l'échantillon, n'a aucun effet sur la passivation de la chalcopyrite.

Par ailleurs, la présence d'un grand nombre de particules fines n'inhibe pas la croissance et l'activité bactérienne. Au contraire, la présence de ces particules conduit à une meilleure dissolution de la chalcopyrite, et donc à une production plus élevée de Fe^{2+} et de S. Or, ces deux substrats sont nécessaires à la production de l'énergie, dont les bactéries ont besoin pour se développer, et à l'activité de ces microorganismes. Les particules fines favorisent ainsi la croissance et l'activité des bactéries mésophiles (*L. ferriphilum*) et thermophiles modérés (*'F. caldus'* et *Sulfobacillus*) contrairement aux microorganismes de type archée, et à ce qui est souvent supposée dans la littérature, notamment pour des granulométries avec un d_{80} < 10 µm. Elles n'ont également pas d'impact sur la composition de la communauté bactérienne. En revanche, la plus grande surface spécifique et la taille des particules pourrait influencer l'attachement des bactéries au solide, contribuant à la dissolution de la chalcopyrite. Des études plus approfondies sont toutefois nécessaires pour mieux déterminer l'effet de la taille des particules sur l'attachement des microorganismes au solide.

La régulation du pH à 1,3 a quant à elle un effet négligeable sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite, lorsque les particules ont une taille comprise entre 20 et 100 µm. En effet, la dissolution de la chalcopyrite (rendement et cinétique), la croissance l'activité sulfo-oxydante et la composition de la communauté bactérienne sont similaires à celles observées lorsque le pH n'est pas régulé. En revanche, le pH étant maintenu à un pH inférieur à celui obtenu lorsque le pH n'est pas régulé (variation du pH entre 1,34 et 1,7 ou 1,8), l'oxydation du Fe^{2+}, via l'activité des bactéries ferro-oxydante, est plus rapide. Il est possible que cela entraîne une passivation plus précoce de la

chalcopyrite. Ces résultats complètent ceux de la littérature portant sur l'effet du pH sur la biolixiviation de la chalcopyrite, en particulier sur l'activité ferro-oxydante dans le cas d'un consortium bactérien composé de bactéries mésophiles ou thermophiles modérés.

L'existence d'un potentiel redox, et donc d'un ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} limite, au-dessus duquel la passivation de la chalcopyrite a lieu, a clairement été démontrée dans la littérature. Au cours des essais de biolixiviation conventionnelle, l'oxydation rapide du Fe^{2+} en Fe^{3+} n'est donc favorable à la dissolution de la chalcopyrite que lorsque cette dernière est suffisamment rapide pour maintenir le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+}, et donc le potentiel redox inférieur à la limite de passivation.

Les résultats présentés dans ce chapitre seront utilisés comme référence pour l'étude du procédé de biolixiviation attritive dans le chapitre suivant.

4. Références

Basitere, M., Ntwampe, S.K.O., Sheldon, M.S., 2012. Optimal sulphuric acid production using Acidithiobacillus caldus (DSM 8584): Bioprocess design for application in ion-exchange. African Journal of Biotechnology 11, 14946–14955. https://doi.org/10.4314/ajb.v11i83

Bevilaqua, D., Leite, A.L.L.C., Garcia, O., Tuovinen, O.H., 2002. Oxidation of chalcopyrite by Acidithiobacillus ferrooxidans and Acidithiobacillus thiooxidans in shake flasks. *Process Biochemistry 38*, 587–592. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00169-3

Blight, K.R., Candy, R.M., Ralph, D.E., 2009. The preferential oxidation of orthorhombic sulfur during batch culture. *Hydrometallurgy 99*, 100–104. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2009.05.013

Christel, S., Herold, M., Bellenberg, S., Buetti-Dinh, A., El Hajjami, M., Pivkin, I.V., Sand, W., Wilmes, P., Poetsch, A., Vera, M., Dopson, M., 2018. Weak Iron Oxidation by Sulfobacillus thermosulfidooxidans Maintains a Favorable Redox Potential for Chalcopyrite Bioleaching. Front. Microbiol. 9, 3059. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03059

Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008a. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: General aspects. Hydrometallurgy 93, 81–87. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.015

Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008b. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part II: Effect of redox potential. Hydrometallurgy 93, 88–96. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.016

Deveci, H., 2004. Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. Hydrometallurgy 71, 385–396. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00112-9

Esmailbagi, M.R., Schaffie, M., Kamyabi, A., Ranjbar, M., 2018. Microbial assisted galvanic leaching of chalcopyrite concentrate in continuously stirred bioreactors. Hydrometallurgy 180, 139–143. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.07.020

Gericke, M., Govender, Y., Pinches, A., 2010. Tank bioleaching of low-grade chalcopyrite concentrates using redox control. *Hydrometallurgy 104*, 414–419. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.024

He, H., Xia, J., Hong, F., Tao, X., Leng, Y., Zhao, Y., 2012. Analysis of sulfur speciation on chalcopyrite surface bioleached with Acidithiobacillus ferrooxidans. *Minerals Engineering* 27–28, 60–64. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2011.12.012

Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., 2001. Enhancement of chalcopyrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions. Hydrometallurgy 60, 185–197. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00155-9

Hubau, A., 2019. Conception d'un procédé de biolixiviation pour la valorisation des métaux contenus dans les déchets de cartes électroniques. Thèse, Université Paris sciences et lettres.

Jonglertjunya, W., 2003. Bioleaching of chalcopyrite. Thèse, The University of Birmingham.

Jones, G.C., Corin, K.C., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L., 2011. The generation of toxic reactive oxygen species (ROS) from mechanically activated sulphide concentrates and its effect on thermophilic bioleaching. Minerals Engineering 24, 1198–1208. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2011.05.016

Jones, G.C., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L., 2012. Reactive oxygen species generated in the presence of fine pyrite particles and its implication in thermophilic mineral bioleaching. Appl Microbiol Biotechnol 97, 2735–2742. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4116-y

Klauber, C., 2008. A critical review of the surface chemistry of acidic ferric sulphate dissolution of chalcopyrite with regards to hindered dissolution. *International Journal of Mineral Processing 86*, 1–17. https://doi.org/10.1016/j.minpro.2007.09.003

Liu, C., Jia, Y., Sun, H., Tan, Q., Niu, X., Leng, X., Ruan, R., 2017. Limited role of sessile acidophiles in pyrite oxidation below redox potential of 650 mV. Sci Rep 7, 5032. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04420-2

Nemati, M., Lowenadler, J., Harrison, S.T.L., 2000. Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile Sulfolobus metallicus (BC). Applied Microbiology and Biotechnology 53, 173–179. https://doi.org/10.1007/s002530050005

Noël, N., Florian, B., Sand, W., 2010. AFM & EFM study on attachment of acidophilic leaching organisms. Hydrometallurgy 104, 370–375. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.021

Nyembwe, K.J., Fosso-Kankeu, E., Waanders, F., Mkandawire, M., 2021. pH-dependent leaching mechanism of carbonatitic chalcopyrite in ferric sulfate solution. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 31, 2139–2152. https://doi.org/10.1016/S1003-6326(21)65644-3

Manafi, Z., Kargar, M., Kafilzadeh, F., 2021. Tank bioleaching of a copper concentrate using the moderately thermophilic microorganisms Sulfobacillus thermosulfidoxidans KMM3 and Sulfobacillus acidophilus KMM26. Rev. Metal. 57(4): e207. https://doi.org/10.3989/revmetalm.207

Olubambi, P.A., Potgieter, J.H., Ndlovu, S., Borode, J.O., 2009. Electrochemical studies on interplay of mineralogical variation and particle size on bioleaching low grade complex sulphide ores. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 19, 1312–1325. https://doi.org/10.1016/S1003-6326(08)60443-4

Pakostova, E., Johnson, D.B., 2019. Microbial generation of sulfuric acid from granular elemental sulfur in laboratory-scale bioreactors. *Hydrometallurgy 190*, 105152. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.105152

Parker, A., Klauber, C., Kougianos, A., Watling, H.R., van Bronswijk, W., 2003. An X-ray photoelectron spectroscopy study of the mechanism of oxidative dissolution of chalcopyrite. *Hydrometallurgy 71*, 265–276. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00165-8

Peng, T., Zhou, D., Liu, Y., Yu, R., Qiu, G., Zeng, W., 2019. Effects of pH value on the expression of key iron/sulfur oxidation genes during bioleaching of chalcopyrite on thermophilic condition. Ann Microbiol 69, 627–635. https://doi.org/10.1007/s13213-019-01453-y

Plumb, J.J., Muddle, R., Franzmann, P.D., 2008. Effect of pH on rates of iron and sulfur oxidation by bioleaching organisms. Minerals Engineering 21, 76–82. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.08.018

Ren, Z., Chao, C., Krishnamoorthy, P., Asselin, E., Dixon, D.G., Mora, N., 2022. The overlooked mechanism of chalcopyrite passivation. Acta Materialia 236, 118111. https://doi.org/10.1016/j.actamat.2022.118111

Sasaki, K., Nakamuta, Y., Hirajima, T., Tuovinen, O.H., 2009. Raman characterization of secondary minerals formed during chalcopyrite leaching with Acidithiobacillus ferrooxidans. *Hydrometallurgy 95*, 153–158. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.009

Safar, C., Castro, C., Donati, E., 2020. Importance of Initial Interfacial Steps during Chalcopyrite Bioleaching by a Thermoacidophilic Archaeon. Microorganisms 8, 1009. https://doi.org/10.3390/microorganisms8071009

Stott, M.B., Watling, H.R., Franzmann, P.D., Sutton, D., 2000. The role of iron-hydroxy precipitates in the passivation of chalcopyrite during bioleaching. *Minerals Engineering 13*, 1117–1127. https://doi.org/10.1016/S0892-6875(00)00095-9

Yang, Y., Liu, W., Bhargava, S.K., Zeng, W., Chen, M., 2016. A XANES and XRD study of chalcopyrite bioleaching with pyrite. Minerals Engineering 89, 157–162. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.01.019

Zhao, H., Wang, J., Tao, L., Cao, P., Yang, C., Qin, W., Qiu, G., 2017. Roles of oxidants and reductants in bioleaching system of chalcopyrite at normal atmospheric pressure and 45 °C. International Journal of Mineral Processing 162, 81–91. https://doi.org/10.1016/j.minpro.2017.04.002

Zhao, S., Wang, G., Yang, H., Chen, G., Qiu, X., 2021. Agglomeration-aggregation and leaching properties of mechanically activated chalcopyrite. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 31, 1465–1474. https://doi.org/10.1016/S1003-6326(21)65590-5

Chapitre V - Biolixiviation attritive

Comme discuté dans le premier chapitre, l'origine du caractère réfractaire de la chalcopyrite à la lixiviation pourrait être liée à la formation d'une couche de passivation à la surface des particules. Afin d'améliorer les rendements de dissolution de ce minéral, la solution proposée et étudiée dans cette thèse est d'exfolier cette couche par phénomène d'attrition à l'aide d'un média broyant, et ainsi maintenir une « surface réactive » permettant une oxydation efficace de la chalcopyrite. L'effet de billes millimétriques a été caractérisé en milieu abiotique au LGC, au cours de travaux menés en parallèle de ce travail de thèse. Il a été montré que l'effet des billes sur la vitesse de lixiviation est très marqué. Le procédé étudié dans ce travail de thèse vise à réaliser l'exfoliation en parallèle de la biolixiviation de la chalcopyrite, en une étape unitaire, dans un réacteur agité et aéré. Autrement dit, il consiste à appliquer le procédé d'attrition lixiviante en présence de bactéries ferro- et sulfo-oxydantes pour lixivier la chalcopyrite. On nommera ce procédé « biolixiviation attritive ».

Ce chapitre, consacré à l'étude du procédé de biolixiviation attritive appliqué à la chalcopyrite, a pour objectif de :

- déterminer si les bactéries sont capables de se développer en présence d'un média broyant, malgré les contraintes mécaniques et hydrodynamiques ;
- étudier le couplage entre la biolixiviation et l'attrition lixiviante, et notamment comprendre son influence sur la dissolution de la chalcopyrite à travers l'étude des phénomènes physiques, chimiques et biologiques ayant lieu dans un système de biolixiviation attritive

Cette étude s'articule autour de trois parties. La première est consacrée à l'impact du média broyant sur la dissolution de la chalcopyrite lors de la lixiviation et de la biolixiviation de ce minéral. La seconde partie vise à étudier les phénomènes ayant lieu au cours des essais de biolixiviation attritive pouvant expliquer les résultats observés dans la première partie. Pour ces deux parties, des essais de biolixiviation attritive (biotique) et d'attrition lixiviante (abiotique) ont été étudiés séparément, puis comparés. Enfin, l'impact des contraintes mécaniques et hydrodynamiques générées par la présence du média broyant sur les bactéries est évalué dans une troisième partie.

Tous les essais de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante menés dans le cadre de la thèse ont été réalisés avec la fraction 20-100 µm. Le dispositif expérimental, ainsi que le protocole et les conditions opératoires sont décrits dans la section 3.2 du chapitre II.

Pour rappel, les différents essais réalisés et présentés dans ce chapitre sont indiqués dans le Tableau 19.

Tableau 19 - Conditions opératoires particulières des différents essais de lixiviation (42°C, pH 1,3, 556 rpm, 30 $nL.h^{-1}$ air, 0,3 $nL.h^{-1}$ CO_2). NA : non applicable.

Nom de l'essai	Matière utilisée	Taux de solide (% (m/m))	Inoculum	Durée des essais (jours)	Masse de billes (g)
20-100 µm	Fraction 20-100 µm	10	Culture sur le concentré de Lubin	15	0
< 20 µm	Fraction < 20 µm	10	Culture sur le concentré de Lubin	15	0
Test BA	Fraction 20-100 µm	10	Culture sur le concentré de Lubin	16	250
Test AL	Fraction 20-100 µm	10	NA	7	250
AL 5%	Fraction 20-100 µm	5	NA	16	250
BA 5% (1)	Fraction 20-100 µm	5	Culture sur le concentré de Lubin	14	250
BA 5% (2)	Fraction 20-100 µm	5	Culture sur le concentré de Lubin	14	250
BA 10%	Fraction 20-100 µm	10	Culture sur le concentré de Lubin	29	250
BA 5% rep	Fraction 20-100 µm	5	BA 5% (1)	14	250

1. Impact du média broyant sur la dissolution de la chalcopyrite

1.1. Analyses granulométriques

L'évolution de la granulométrie des particules au cours d'un test de biolixiviation attritive (test « BA ») et d'un test d'attrition lixiviante (test « AL ») est présentée sur la Figure 75. Les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions, avec la fraction 20-100 µm et 250 g de billes, lors de la mise au point du protocole opératoire des essais de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante.

Pour les deux tests BA et AL, la taille des particules diminue significativement au cours du 1er jour de l'essai (diminution du d_{50} d'environ 50 µm). Puis la réduction de taille est moins marquée entre le 1er et le 4ème jour (diminution du d_{50} de moins de 10 µm). On remarque également qu'à l'issue du premier jour, la taille des particules se rapproche de celle des particules de la fraction < 20 µm, également reportée sur la Figure 75.

Après 4 jours, près de 90% des particules sont inférieures ou égales à 10 µm (contre 80% dans la fraction < 20 µm). Au cours de cette deuxième phase, on observe donc la formation de particules très fines (< 5µm) qui n'existaient pas dans l'échantillon initial tandis que la quasi-totalité des particules supérieures à 10 µm qui constituaient plus de 95% de l'échantillon initial ont disparu. Ces résultats sont très différents de ceux obtenus lors des essais de biolixiviation conventionnelle menés avec la fraction 20-100 µm (Chapitre IV, section 1.1.2.1) au cours desquels la distribution granulométrique reste quasiment inchangée. Lors des essais de biolixiviation conventionnelle menés avec la fraction inférieure à 20 µm (Chapitre IV, section 1.1.2.1), la variation de la granulométrie des particules est également très différente de celle observée ici : le d50 varie peu, mais on observe une diminution du nombre de particules dans certaines classes de taille (en particulier entre 4 et 10 µm) qui a été attribuée à la dissolution des sulfures (chalcopyrite et pyrite).

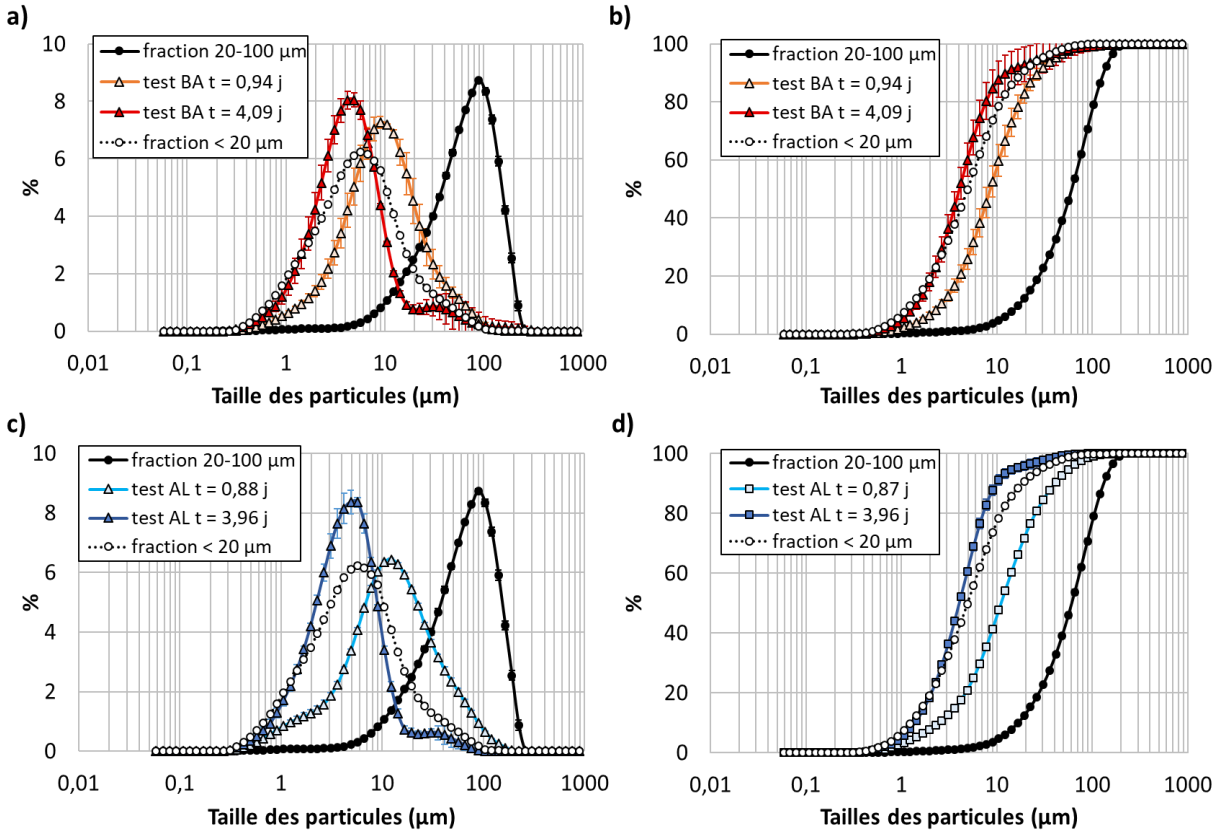


Figure 75 - (a) et (c) Distribution et (b) et (d) distribution cumulée de la taille des particules au sein des fractions 20-100 µm et < 20 µm, et dans la pulpe, à différents temps, au cours des tests de biolixiviation attritive (« test BA ») et d'attrition lixiviante (« test AL »).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors d'essais d'attrition lixiviante réalisés au LGC avec le même dispositif expérimental (mobile d'agitation, réacteur et billes) (Dakoune & Cassayre, données non publiées). Au cours d'un essai avec 250 g de billes et 3% (m/m) de solide, des mesures de granulométrie ont été réalisées à une fréquence plus rapide et ont permis de montrer que la taille des particules diminue rapidement au cours des premières minutes (diminution du d_{50} de 46 à 14 µm en 12 min). La taille des particules est ensuite réduite plus lentement (diminution du d_{50} de 14 à 11 µm en 5 h au cours du même essai). Les auteurs attribuent la diminution de taille très rapide observée dans les premières minutes à un phénomène de broyage, tandis que dans la phase suivante, la taille des particules diminue sous l'effet de l'attrition et de la dissolution des sulfures.

Dans le dispositif expérimental spécialement mis en place pour les essais de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante, le média broyant engendre donc un broyage initial du solide à lixivier (fraction 20-100 µm), produisant rapidement des particules fines. L'environnement attritif généré permet également une réduction de la taille des particules par attrition, qui est plus lente que par effet de broyage. De plus, ces analyses justifient l'intérêt de l'étude des particules < 20 µm (Chapitre IV), dont la distribution granulométrique est relativement proche de celle obtenue après la première phase rapide de broyage.

1.2. Attrition lixiviante en conditions abiotiques

L'effet de la quantité de média broyant sur la dissolution de la chalcopyrite au cours de la lixiviation abiotique du minéral a été étudié par des essais menés au LGC de Toulouse avec différentes masses de billes. Le dispositif expérimental, quasiment identique à celui du BRGM, est décrit dans les travaux

de Dakkoune et al., (2023). Les résultats présentés ci-dessous, concernent l'influence de la masse de billes sur le rendement de dissolution du cuivre, et n'ont pas encore été publiés. Ils ont été obtenus avec différentes quantités de billes, à 42°C, à un pH et un potentiel redox maintenus à 1,3 et 700 mV vs. SHE respectivement. La régulation du pH a été réalisée par ajout de H_2SO_4 (95%) et celle du potentiel redox par ajout de H_2O_2 (30%).

La Figure 76 présente les rendements de dissolution du cuivre au cours de ces essais d'une durée de 7 jours, et montre que la quantité de cuivre dissoute augmente avec la quantité de billes introduites dans le réacteur. Ainsi, en l'absence de bille, le rendement de dissolution du cuivre est faible (environ 10%), ce qui illustre la difficulté de dissoudre la chalcopyrite dans ces conditions. On peut noter que ce résultat est proche de celui obtenu lors de l'essai de biolixiviation conventionnelle réalisé avec le concentré brut (Chapitre IV, section 1.1.1). En revanche, l'utilisation du média broyant permet d'améliorer de manière notable la dissolution du cuivre : presque 90% du cuivre est dissous avec 2 kg de billes après 7 jours. Le rendement de dissolution du cuivre obtenu avec 1 kg de billes est proche de celui obtenu avec 2 kg de billes, tandis que dans les mêmes conditions opératoires avec 0,5 kg et 0,25 kg de billes, 59% et 54% du cuivre est dissous respectivement.

On peut également remarquer que, malgré une diminution de la vitesse de dissolution après 1 à 2 jours pour les essais avec des masses de billes importantes (> 0,5 kg), cette vitesse reste supérieure à celle obtenue en absence de média broyant. La diminution de la vitesse de dissolution au cours de ces essais pourrait être liée à la diminution de la taille des particules, entraînant une moindre efficacité de l'attrition.

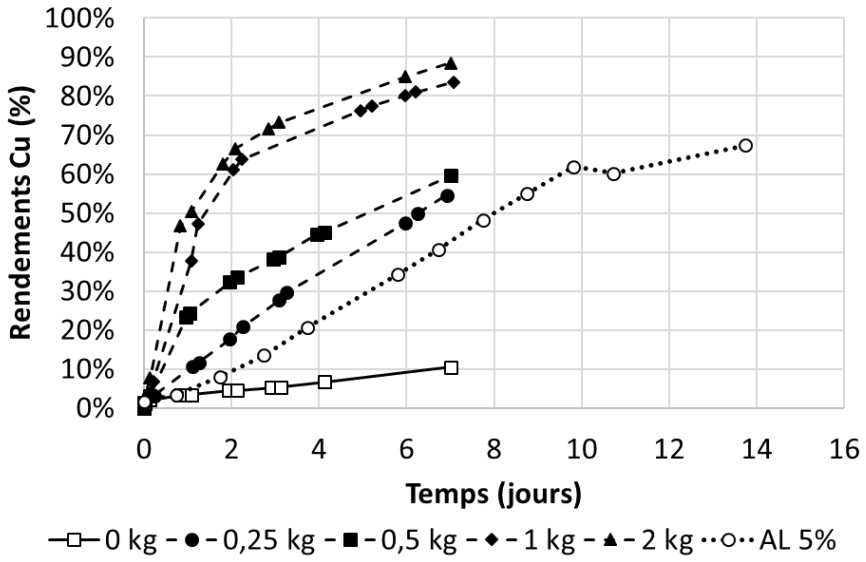


Figure 76 - Effet de la quantité de billes sur le rendement de dissolution du cuivre au cours des essais d'attrition lixiviante menés au LGC et comparaison à l'essai d'attrition mené au BRGM (« AL 5% »). Les essais menés au LGC ont été réalisés avec 3,25% (m/m) de solide, dans de l'eau, à 42°C, à un pH et un potentiel redox maintenus à 1,3 et 700 mV vs. SHE respectivement, sans aération, avec une agitation de 556 rpm. Les conditions opératoires de l'essai mené au BRGM sont décrites dans la section 3.2.2 du chapitre II.

En complément des essais menés au LGC, un essai d'attrition lixiviante de 14 jours avec 250 g de billes a été réalisé au BRGM dans des conditions proches de celles appliquées lors des opérations de biolixiviation (essai « AL 5% », voir Tableau 19). Dans cet essai, du Fe^{3+} et du milieu nutritif 0KM ont ainsi été ajouté dans la solution initiale, de l'air enrichi en CO_2 a été injecté tout au long de l'essai, et le potentiel redox n'a pas été régulé contrairement aux essais menés au LGC. Le taux de solide est par ailleurs plus élevé dans le cas de l'essai réalisé au BRGM (5% (m/m)) que ceux des essais du LGC (3,25%

(m/m)). La comparabilité des essais réalisés au BRGM et au LGC a préalablement été vérifiée lors d'un essai d'attrition lixiviante mené dans des conditions identiques dans les deux établissements et dont les résultats se sont avérés globalement reproductibles (Figure 77).

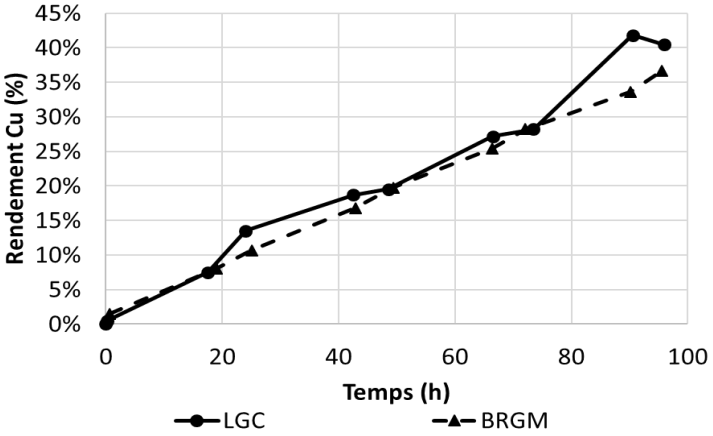


Figure 77 – Rendements de dissolution du cuivre en fonction du temps lors de deux essais d'attrition lixiviante menés au BRGM et au LGC dans des conditions opératoires identiques (42°C, 10% (m/m) de solide, 1,5 kg de billes, 556 rpm, 38 g de $Fe_2(SO_4)_3$, milieu 0KM, pH 1,3).

La vitesse de dissolution du cuivre au cours de l'essai « AL 5% », reporté sur la Figure 76, reste constante pendant 10 jours, avec une valeur légèrement plus faible que celle de l'essai réalisé au LGC avec 250 g de billes. Ceci mène à un rendement inférieur après 7 jours (41 % contre 54 %), qui pourrait être expliqué par un taux de solide plus élevé (5% dans l'essai LGC contre 3% dans l'essai BRGM), et donc un ratio bille/chalcopyrite plus faible (1,6 $g.g^{-1}$ contre 3 $g.g^{-1}$) susceptible de limiter l'impact du phénomène d'attrition. Lorsque le rendement atteint 60 %, la vitesse de dissolution du cuivre ralentit, mais reste supérieure à celle observée en absence de billes (0,2 $g.L^{-1}.j^{-1}$). Un rendement dissolution de 70 % est obtenu au bout de 14 jours.

Dans le cadre des essais de biolixiviation attritive, il a été décidé d'utiliser 250 g de billes pour des taux de solides de 5% et 10 % (m/m). Cette configuration ne permet pas d'obtenir l'effet d'attrition le plus important, mais elle vise à ne pas appliquer de contraintes (cisaillement et attrition) trop fortes sur les cellules bactériennes tout en ayant un effet significatif des billes.

1.3. Biolixiviation attritive : influence de l'attrition sur le rendement de dissolution

1.3.1. Biolixiviation attritive à 5% (m/m) de solide et 250 g de billes

La Figure 78 présente l'évolution des rendements de dissolution du cuivre et du fer lors des essais de biolixiviation attritive avec un taux solide de 5% (m/m) (« BA 5% (1) » et « BA 5% (2) », voir Tableau 19). Ces rendements sont comparés avec ceux obtenus lors de l'essai de biolixiviation conventionnelle de référence (essai « 20-100 µm », voir Tableau 19) : au cours des essais de biolixiviation attritive, les rendements de dissolution du cuivre sont largement supérieurs à ceux de l'essai de biolixiviation conventionnelle, et la dissolution du cuivre est beaucoup plus rapide en présence du média broyant. On observe ainsi une première phase de dissolution rapide du cuivre avec une accélération de la dissolution entre 2 et 4 jours ou 4 et 6 jours (essais « BA 5% (1) » et « BA 5% (2) » respectivement), suivie d'une diminution de la vitesse de dissolution.

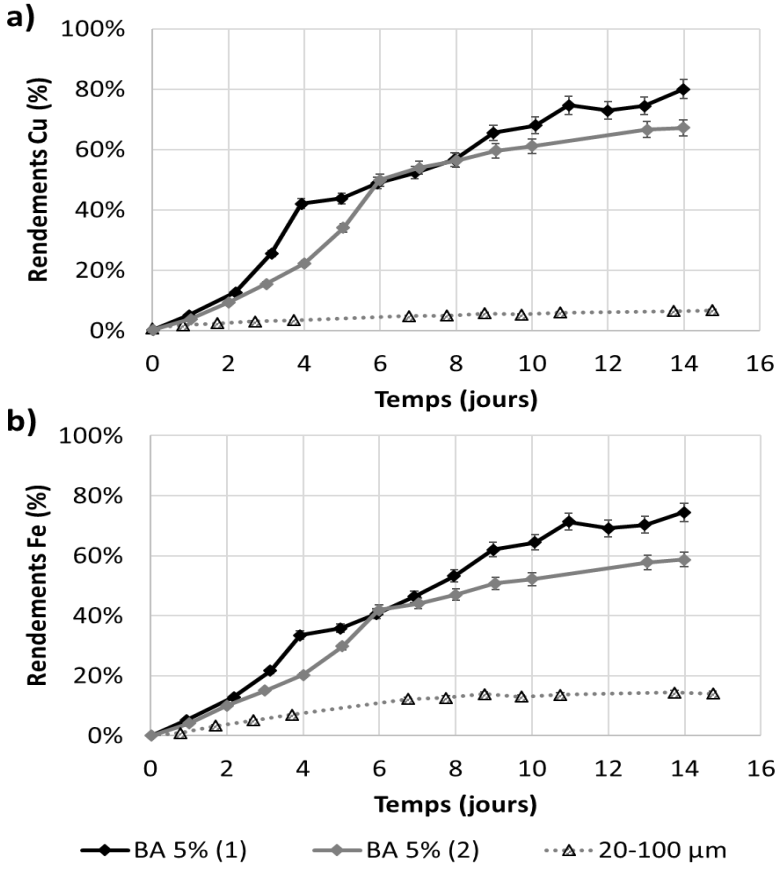


Figure 78 – Rendements de dissolution (a) du cuivre et (b) du fer au cours des essais de biolixiviation attritive réalisés avec 5% (m/m) de solide, 250 g de billes, à pH 1,3 (« BA 5% (1) » et « BA 5% (2) »), et d'un essai de biolixiviation conventionnelle mené avec la fraction 20-100 µm, 10% (m/m) de solide, sans régulation du pH (« 20-100 µm »).

Le Tableau 20 présente la composition chimique des résidus des deux essais de biolixiviation attritive, ainsi que celle du matériau initial. Les concentrations en cuivre, en fer et en sulfures sont plus faibles dans les résidus, attestant de la dissolution de la chalcopyrite et éventuellement de la pyrite. Au contraire, la concentration en soufre élémentaire est bien plus importante dans les résidus que dans le matériau de départ. Une partie du soufre élémentaire produit lors de l'oxydation des sulfures n'a donc pas été oxydée. La concentration en silice est également plus élevée dans les résidus. Cette différence est en partie attribuée à des résidus de billes de verre récupérés dans les résidus. Les concentrations en potassium et en sulfates dans les résidus sont un peu plus élevées que celles dans la fraction 20-100 µm, indiquant une faible accumulation de ces espèces dans le résidu (au maximum 0,3 g de potassium et 0,6 g et de sulfate accumulés), potentiellement liée à la précipitation de jarosites.

Tableau 20 – Compositions chimiques (en % (m/m)) de la fraction 20-100 µm (échantillon initial de 155 g) et des résidus obtenus à la fin des essais de biolixiviation attritive « BA 5% (1) » et « BA 5% (2) » (masses des résidus : 80 g et 100g respectivement). S_{total} : soufre total, S_{SO4} : soufre correspondant aux sulfates, $S_{sulfures}$: soufre correspondant aux sulfures, $S_{élémentaire}$: soufre élémentaire.

Essais	Cu	Fe	Si	K	Mo	S_{total}	S_{SO4}	$S_{sulfures}$	$S_{élémentaire}$
Fraction 20-100 µm	23,5	28,1	5,4	0,8	0,3	30,2	0,1	29,2	0,02
BA 5% (1)	10,0	14,5	16,1	1,7	0,4	15,3	0,8	12,6	1,9
BA 5% (2)	9,6	14,6	16,3	1,5	0,4	16,3	1,1	13,9	1,2

Le Tableau 21 indique les rendements de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite, calculés selon les équations [80] et [81]. Un bilan de matière a également été réalisé à la fin des essais sur l'ensemble de la pulpe (phase liquide et phase solide) pour calculer les pertes en cuivre et en fer (Chapitre II, section 4.3), qui sont comprises entre 5% et 10%.

$$Rendement\ en\ chalcopyrite\ (\%) = \frac{C_{CuFeS2_init} \times m_{init} - C_{CuFeS2_résidu} \times m_{résidu}}{C_{CuFeS2_init} \times m_{init}} \quad [80]$$

$$Rendement\ en\ pyrite\ (\%) = \frac{C_{FeS2_init} \times m_{init} - C_{FeS2_résidu} \times m_{résidu}}{C_{FeS2_init} \times m_{init}} \quad [81]$$

Où C_{CuFeS2_init} et C_{FeS2_init} les concentrations en chalcopyrite et en pyrite dans le matériau de départ (en % (m/m)), $C_{CuFeS2_résidu}$ et $C_{FeS2_résidu}$ les concentrations en chalcopyrite et en pyrite dans le résidu (en % (m/m)), m_{init} la masse du matériau initial (en g) et $m_{résidu}$ la masse du résidu (en g). Les concentrations en chalcopyrite et pyrite sont calculées selon la méthodologie décrite dans la section 1.1 du Chapitre III.

Tableau 21 – Rendements de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite obtenus à la fin des essais de biolixiviation attritive réalisés avec 5% (m/m) de solide et 250 g de billes (« BA 5% (1) » et « BA 5% (2) »).

	BA 5% (1)	Ba 5% (2)
Rendement de dissolution de la chalcopyrite (%)	75	74
Rendement de dissolution de la pyrite (%)	89	85

A la fin des essais de biolixiviation attritive, le rendement de dissolution de la chalcopyrite est légèrement plus faible que le rendement final de dissolution du cuivre (Figure 78a) obtenus à partir de la concentration en cuivre dans la phase liquide de la pulpe (méthode de calcul décrite dans la section 4.1 du chapitre II). Les rendements de dissolution des sulfures restent néanmoins cohérents avec ceux du cuivre et du fer, avec des pertes relativement faibles pouvant être attribuées aux différents prélèvements effectués au cours des essais.

Les résultats de dissolution des sulfures (ou de dissolution du cuivre et du fer) obtenus lors des essais de biolixiviation attritive sont globalement les mêmes, à l'exception d'une différence notable : lors de l'essai « BA 5% (2) », l'accélération de la dissolution du cuivre a lieu avec 2 jours de retard par rapport à l'essai « BA 5% (1) ». Il se pourrait que cela soit lié à une divergence au niveau des phénomènes biologiques ayant lieu au cours de ces deux essais. Ce décalage temporel sera investigué via l'étude de la communauté bactérienne.

1.3.2. Effet de la taille des particules vs. effet de l'attrition

La comparaison avec un essai de biolixiviation conventionnelle mené avec la fraction <20 µm (essai « <20 µm », voir Tableau 19) est présentée sur la Figure 79. Il nous a paru intéressant de comparer ces résultats avec ceux obtenus en biolixiviation attritive dans la mesure où l'on a démontré dans la section 1.1 que la présence du média broyant entraînait, en plus du phénomène d'attrition, le broyage des particules et la disparition de la quasi-totalité des particules supérieures à 20 µm en 24h (Dakoune & Cassayre, données non publiées).

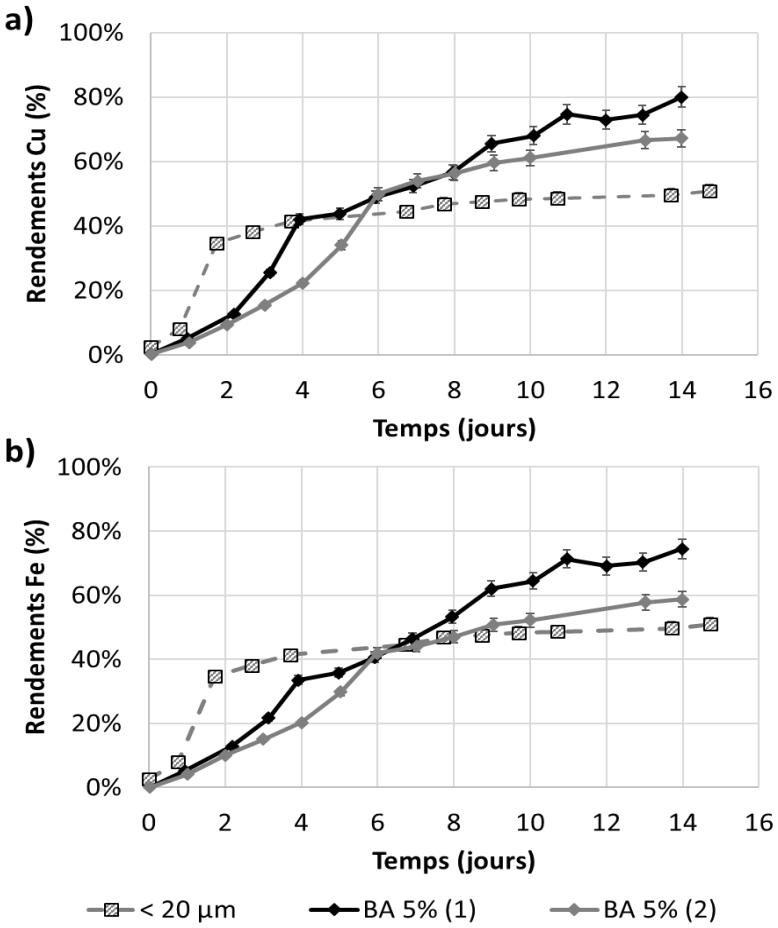


Figure 79 - Rendements de dissolution (a) du cuivre et (b) du fer au cours des essais de biolixiviation attritive réalisés avec 5% (m/m) de solide, 250 g de billes, à pH 1,3 (« BA 5% (1) » et « BA 5% (2) »), et d'un essai de biolixiviation conventionnelle mené avec la fraction < 20 µm, 10% (m/m) de solide, et sans régulation du pH (« < 20 µm »).

Lors de l'essai de biolixiviation conventionnelle réalisé avec la fraction < 20 µm, la cinétique de dissolution du cuivre comporte également une phase de dissolution rapide du cuivre, suivi d'une phase de dissolution plus lente du métal. Toutefois, au cours de la première phase, la vitesse de dissolution est deux fois plus élevée qu'en biolixiviation attritive (environ 6 $g.L^{-1}.j^{-1}$ contre environ 2 $g.L^{-1}.j^{-1}$). A l'inverse, lors de la seconde phase, la dissolution est bien plus lente (vitesse de dissolution quasi-nulle) que celle observée au cours des essais de biolixiviation attritive, ce qui résulte en un rendement de dissolution plus faible. Contrairement à une simple réduction de la taille des particules, l'attrition permet donc de maintenir une réactivité de la chalcopyrite tout au long de l'opération, qui se traduit par une meilleure dissolution du minéral. En revanche, la phase d'accélération de la dissolution du cuivre a lieu plus tôt en biolixiviation conventionnelle, ce qui laisse à penser que la présence de billes retarde l'arrivée de cette phase.

1.3.3. Influence du taux de solide

Un essai à un taux de solide plus élevé (10% (m/m)) (essai « BA 10% », voir Tableau 19), correspondant à celui utilisé lors des essais de biolixiviation conventionnelle, a également été testé. La Figure 80 compare les rendements obtenus lors des essais de biolixiviation attritive avec 5 et 10% (m/m) de solide.

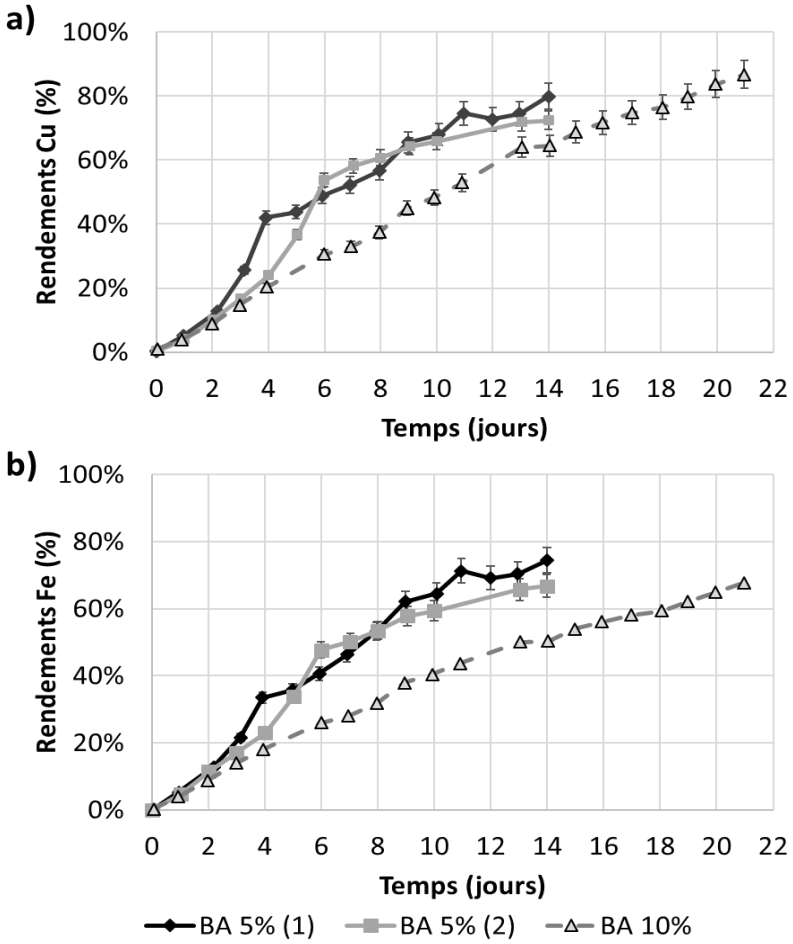


Figure 80 - Rendements de dissolution (a) du cuivre et (b) du fer au cours des essais de biolixiviation attritive réalisés avec 250 g de billes, à pH 1,3 et 5% (m/m) de solide (« BA 5% (1) » et « BA 5% (2) ») ou 10% (m/m) de solide (« BA 10% »).

Au cours de l'essai de biolixiviation attritive à 10% (m/m) de solide, la vitesse de dissolution des métaux est égale à la vitesse de dissolution initiale observée lors des essais à 5% (m/m) de solide. Cela confirme que la meilleure vitesse de dissolution de la chalcopyrite en biolixiviation attritive à 5% (m/m) de solide n'est pas due à un taux de solide plus faible que celui utilisé lors des essais de biolixiviation conventionnelle, mais bien au phénomène d'attrition.

D'autre part, contrairement aux essais à 5% (m/m), la vitesse de dissolution du cuivre et du fer est quasi-constante sur toute la durée de l'essai et ralentit lorsque le rendement de dissolution du cuivre est proche de 100%. Au bout de 21 jours, 87% du cuivre est dissous. Toutefois, au 9ème jour de l'essai une variation du volume de pulpe a été observée résultant en une augmentation du volume de pulpe d'environ 5% à la fin de l'essai. Cette augmentation de volume a été identifiée comme provenant de la condensation de l'eau dans l'air au niveau du réfrigérent. A partir du 9ème jour, les rendement observés sur la Figure 80 sont donc sous-estimés, ce qui est confirmé par les rendements de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite calculés selon les équations [80] et [81] à partir de la composition chimique du matériau initial (échantillon initial de 313 g issu de la fraction 20-100 µm) (Tableau 20) et du résidu (Tableau 22). En effet, à la fin de l'essai à 10% (m/m) de solide la quasi-totalité de la chalcopyrite a été dissoute (Tableau 23) et la majorité de la pyrite a également été oxydée. Le bilan de matière réalisé à la fin de l'essai sur l'ensemble de la pulpe (Chapitre II, section 4.3) indique des pertes en cuivre et en fer de 5% et 3% respectivement.

Tableau 22 - Compositions chimiques (en % (m/m)) du résidu obtenu à la fin de l'essai de biolixiviation attritive réalisé avec 10% (m/m) de solide et 250 g de billes (« BA 10% ») (masse du résidu 295 g). S_{total} : soufre total, S_{SO4} : soufre correspondant aux sulfates, $S_{sulfures}$: soufre correspondant aux sulfures, $S_{élémentaire}$: soufre élémentaire

Essai	Cu	Fe	Si	K	Mo	S_{total}	S_{SO4}	$S_{sulfures}$	$S_{élémentaire}$
BA 10%	0,7	16,1	10,4	2,2	0,3	30,5	5,2	5,6	19,8

Tableau 23 - Rendements de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite obtenus à la fin des essais de biolixiviation attritive réalisés avec 10% (m/m) de solide et 250 g de billes (« BA 10% »).

	BA 10%
Rendement de dissolution de la chalcopyrite (%)	97
Rendement de dissolution de la pyrite (%)	74

Dans la section précédente, il a été montré que la phase d'accélération de la dissolution était retardée en présence du média broyant, tandis qu'elle n'est pas observée pour un taux de solide de 10% (m/m). D'autre part, un taux de solide plus élevé augmente la probabilité de collision entre particules. L'environnement attritif est ainsi plus intense avec un taux de solide de 10% (m/m) qu'avec un taux de 5% (m/m). Il semblerait donc que la phase d'accélération de la dissolution dépend de l'intensité de l'attrition appliquée dans le système. Or il est connu que le phénomène d'attrition peut engendrer la lyse des cellules bactériennes. Le lien entre l'accélération de la dissolution de la chalcopyrite et la présence des microorganismes doit donc être étudié.

1.4. Influence des microorganismes

Afin de déterminer l'influence des microorganismes sur la dissolution des sulfures en présence d'un média broyant, les rendements de dissolution du cuivre et du fer des deux essais de biolixiviation attritive « BA 5% (1) » et « BA 5% (2) » sont cette fois comparés sur la Figure 81 à ceux obtenus lors d'un essai d'attrition lixiviante abiotique (« AL 5% »).

D'après la Figure 81a, le rendement final de dissolution du cuivre obtenu lors des essais de biolixiviation attritive est compris entre 72% et 80% contre 73% lors de l'essai d'attrition lixiviante. Le rendement final de dissolution du fer est quant à lui compris entre 67% et 74% dans le cas des essais de biolixiviation attritive et est égal à 58% dans le cas de l'essai d'attrition lixiviante (Figure 81b). Les rendements finaux de dissolution du cuivre obtenus en conditions biotiques et abiotiques sont donc proches, tandis que le rendement de dissolution en fer est un peu plus faible en conditions abiotiques.

Un point important mis en évidence par ces essais est que, lors de des essais de biolixiviation attritive, la vitesse de dissolution du cuivre est tout d'abord identique à celle observée en conditions abiotiques, puis accélère après quelques jours. Lors d'une troisième phase, la vitesse de dissolution devient inférieure à celle observée au début de l'essai.

Dans les conditions opératoires étudiés (5% (m/m) de solide et 250 g de billes), l'introduction de bactéries ferro-oxydantes et sulfo-oxydantes dans le système n'améliore pas le rendement de dissolution du cuivre, et donc de la chalcopyrite, après 7 jours de lixiviation dans des conditions équivalentes. Toutefois, en conditions biotiques, nos essais ont permis de mettre en évidence une phase au cours de laquelle la vitesse de dissolution de la chalcopyrite est plus rapide qu'en conditions abiotiques. Afin de déterminer les phénomènes ayant pu conduire à ces résultats, la partie suivante sera consacrée à l'analyse et l'interprétation de l'ensemble des résultats obtenus au cours du suivi de ces essais.

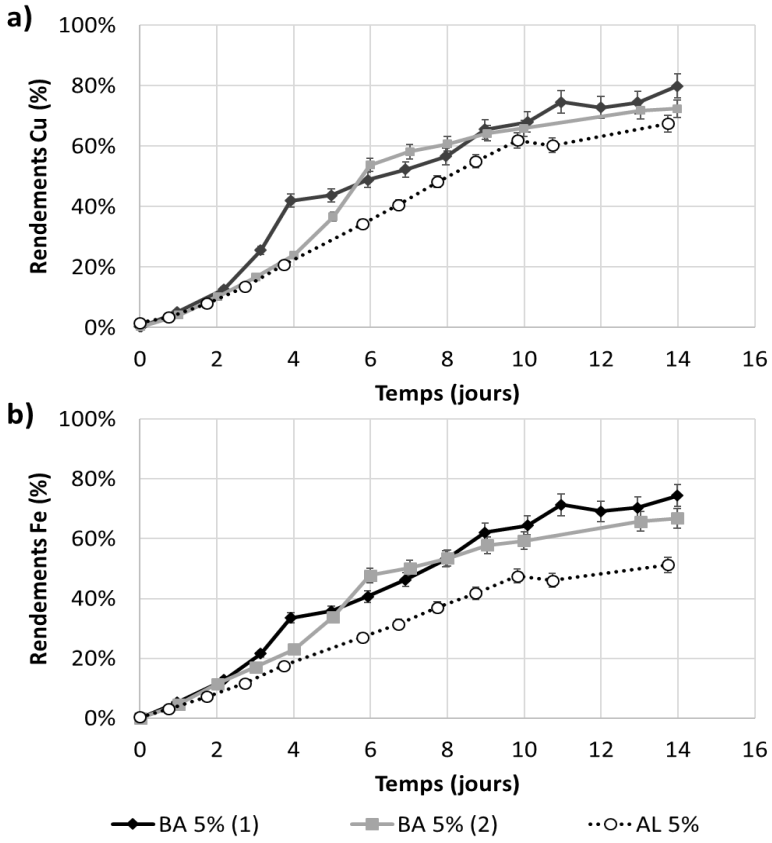


Figure 81 - Rendements de dissolution (a) du cuivre et (b) du fer en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation attritive (« BA 5% (1) » et « BA 5% (2) »), et de l'essai d'attrition lixiviante abiotique (« AL 5% »).

2. Analyses et interprétation des essais de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante

2.1. Evolution du potentiel redox

Le potentiel redox et la concentration en Fe^{3+}, qui en est déduite, lors des essais de biolixiviation attritive à 5 et 10% (m/m) de solide (« BA 5% (1) », « BA 5% (2) » et « BA 10% » respectivement, voir Tableau 19) et d'attrition lixiviante (« AL 5% », voir Tableau 19) sont présentés sur la Figure 82.

La Figure 82a montre qu'au cours du premier essai de biolixiviation attritive à 5% (m/m) de solide (« BA 5% (1) »), le potentiel redox diminue rapidement pendant les premières 24 h, passant de plus de 700 mV vs. SHE à environ 550 mV vs. SHE. Puis, le potentiel redox augmente lentement tout en restant inférieur à 600 mV vs. SHE jusqu'à environ 4 jours, où il augmente exponentiellement (phase exponentielle). Au cours de cette phase exponentielle, le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} devient supérieur à 1. Ensuite, le potentiel redox augmente à nouveau lentement jusqu'à atteindre environ 830 mV vs. SHE à la fin de l'essai. A noter qu'après la phase exponentielle, les diminutions du potentiel redox entre chaque suivi sont dues aux manipulations réalisées pendant les suivis qui affectent l'alimentation de la pulpe en oxygène. L'évolution du potentiel redox au cours du second essai de biolixiviation attritive à 5% (m/m) de solide (« BA 5% (2) »), réalisé dans les mêmes conditions que le premier, est globalement identique, excepté que la phase exponentielle a lieu à environ 6 jours, soit avec 2 jours de retard par rapport au premier essai, comme cela avait déjà été remarqué pour l'évolution du rendement de dissolution du cuivre (Figure 78).

Dans le cas des essais de biolixiviation attritive à 10% (m/m) de solide et d'attrition lixiviante abiotique, le potentiel redox diminue également au cours du 1er jour, puis augmente lentement jusqu'à la fin des essais où il atteint 635 et 602 mV vs. SHE respectivement. Le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} reste inférieur à 1 pendant toute la durée des essais.

D'après la Figure 82b, qui présente l'évolution de la concentration en fer ferrique, lors des mêmes essais, la concentration en Fe^{3+} reste proche de zéro au cours des 4 ou 6 premiers jours des essais biotiques à 5% (m/m) de solide. Puis, à partir de la phase exponentielle, la concentration en Fe^{3+} augmente jusqu'à se stabiliser aux environs de 9 $g.L^{-1}$. En revanche, lors de l'essai de biolixiviation attritive à 10% (m/m), la concentration en Fe^{3+} reste faible (inférieure à 1 $g.L^{-1}$) pendant les 15 premiers jours, puis augmente jusqu'à une concentration de presque 4 $g.L^{-1}$. L'évolution de la concentration en Fe^{3+} au cours de l'essai abiotique, dont la durée est de 14 jours, est similaire à celle observée au cours des 15 premiers jours de l'essai à 10% (m/m), avec une teneur en Fe^{3+} inférieure à 1$g.L^{-1}$ tout au long de l'essai.

D'après la Figure 78a, le ralentissement de la dissolution du cuivre lors des essais de biolixiviation attritive à 5% (m/m) de solide coïncide avec le moment où le potentiel redox devient supérieur à la limite de passivation (Figure 82a). L'oxydation de la chalcopyrite n'étant pas limitée par le Fe^{3+} (concentration en augmentation), il est probable que la chalcopyrite soit passivée. Au contraire, dans le cas des deux autres essais, le potentiel redox reste en dessous de la limite de passivation, tandis que la concentration en Fe^{3+} reste faible tant que la quasi-totalité du cuivre n'est pas dissous. Ainsi, pour ces deux essais l'oxydation de la chalcopyrite est probablement limitée par le réactif.

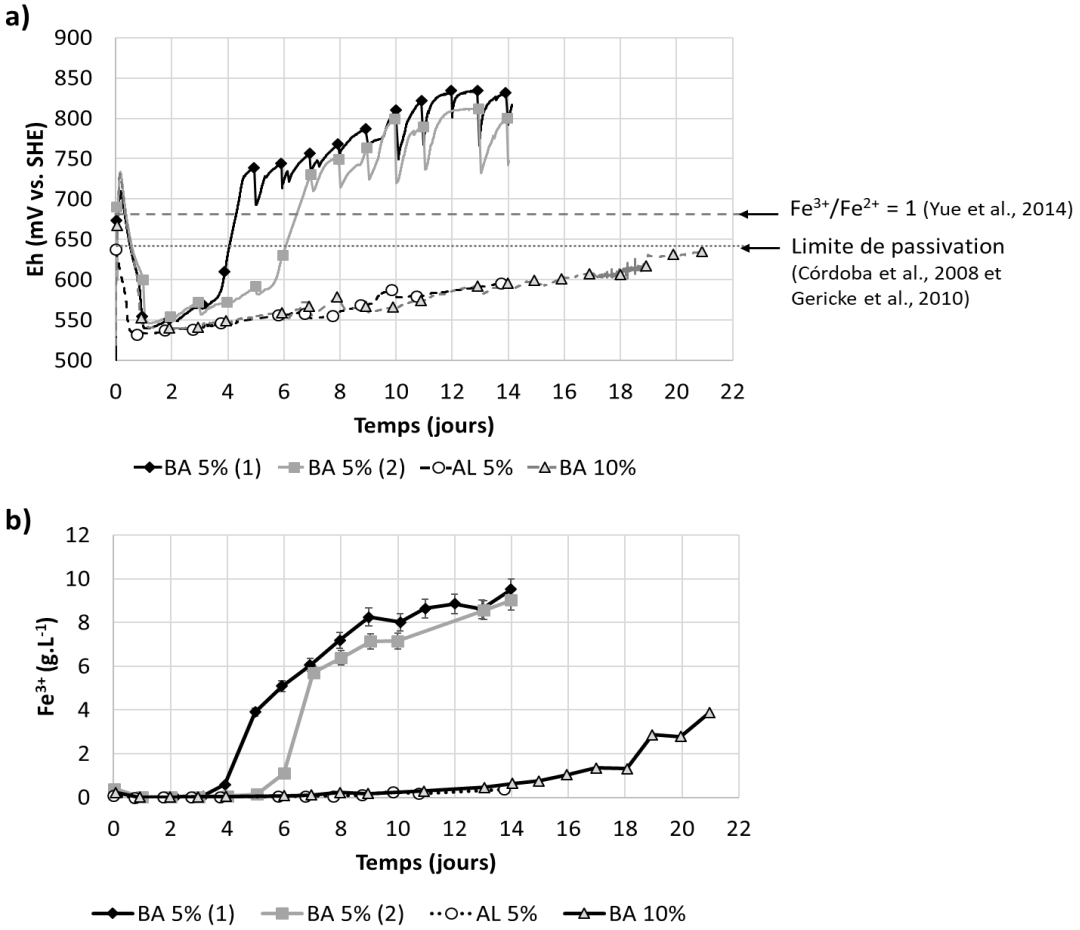


Figure 82 – (a) Potentiel redox (Eh) et (b) concentration en Fe^{3+} en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation attritive (« BA 5% (1) », « BA 5% (2) » et « BA 10% »), et de l'essai d'attrition lixiviante (« AL 5% »).

Pour expliquer les différences observées entre les essais inoculés et menés à 5% (m/m) de solide et l'essai abiotique, il faut rappeler que la chalcopyrite est oxydée par Fe^{3+} (équation [82]), ou par l'oxygène (équation [83]) en l'absence de Fe^{3+}. En l'absence de microorganisme ferro-oxydant dans le milieu, le fer est essentiellement présent sous forme de Fe^{2+} (oxydation du Fe^{2+} très lente en conditions abiotiques (Balci et al., 2007, et Mahmoud et al., 2017)) et le principal réactif disponible pour oxyder la chalcopyrite est l'oxygène. C'est ce qu'on observe dans l'essai abiotique où la concentration en oxygène dissout est élevée (de l'ordre de 5 $mg.L^{-1}$, soit proche de la saturation) et la concentration en Fe^{3+} reste quasi-nulle. On peut donc considérer que les vitesses de dissolution du cuivre et du fer correspondent approximativement à la vitesse d'oxydation de la chalcopyrite par l'oxygène.

En présence de microorganismes ferro-oxydants, la concentration en Fe^{3+} dépend de la vitesse de bio-oxydation du Fe^{2+} (équation [84]) et de la vitesse de consommation du Fe^{3+} par l'oxydation de la chalcopyrite (et de la pyrite). Lors de l'essai de biolixiviation attritive, on observe trois phases distinctes. Dans la première phase, le potentiel redox est faible, la teneur en Fe^{3+} est nulle et la vitesse d'oxydation de la chalcopyrite est la même que dans l'essai abiotique. On en déduit que l'activité microbienne est nulle et la chalcopyrite est oxydée par l'oxygène. Puis dans une deuxième phase, le potentiel redox augmente ainsi que la vitesse de dissolution de la chalcopyrite alors que la teneur en Fe^{3+} reste quasiment nulle. On peut donc en déduire que lors de cette deuxième phase, l'activité des microorganismes ferro-oxydants démarre ce qui entraîne une production de Fe^{3+} qui est rapidement consommée par la réaction de dissolution de la chalcopyrite. Lors de cette phase, le réactif n'est plus l'oxygène mais le fer ferrique ce qui se traduit par une accélération de la vitesse de dissolution de la chalcopyrite. En effet, la vitesse d'oxydation de la chalcopyrite par Fe^{3+} est supérieure à la vitesse d'oxydation par l'oxygène (Zhao et al., 2017). Cependant, la vitesse de bio-oxydation du Fe^{2+} est inférieure à la vitesse de consommation du Fe^{3+} par la chalcopyrite, comme le montre la faible augmentation du redox et la teneur en Fe^{3+}. Dans un troisième temps, on observe une augmentation très rapide du potentiel redox (et de la teneur en Fe^{3+}) et une diminution de la vitesse de dissolution de la chalcopyrite. L'augmentation du potentiel redox traduit une augmentation de la vitesse d'oxydation du Fe^{2+} telle que la quantité de Fe^{3+} produite est supérieure à celle consommée par l'oxydation des sulfures. La diminution de la vitesse de dissolution de la chalcopyrite s'explique probablement par l'augmentation du redox au-delà de la limite de passivation identifiée dans la littérature (aux environs de 640 mV vs. SHE (Córdoba et al., 2008 et Gericke et al., 2010)). Cependant, la dissolution de la chalcopyrite reste tout à fait significative notamment lorsqu'on la compare à celle obtenue en biolixiviation conventionnelle. En effet, lorsque le potentiel redox franchit la limite de passivation, la vitesse de dissolution de la chalcopyrite devient quasiment nulle en l'absence de média broyant (Chapitre IV, section 1.1.1). Ainsi, contrairement à la biolixiviation conventionnelle, l'attrition générée par les 250 g de billes permet de maintenir la dissolution de la chalcopyrite même si elle ne permet probablement pas d'éliminer complétement les couches de passivation. Il pourrait alors s'agir d'une « passivation partielle » de la chalcopyrite.

$$CuFeS_2 + 4Fe^{3+} \longrightarrow Cu^{2+} + 5Fe^{2+} + 2S \quad [82]$$

$$CuFeS_2 + 4H^+ + O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + Fe^{2+} + 2S + 2H_2O \quad [83]$$

$$4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{Bactéries Fe-ox}} 5Fe^{3+} + 2H_2O \quad [84]$$

$$FeS_2 + 14Fe^{3+} + 8H_2O \longrightarrow 2SO_4^{2-} + 15Fe^{2+} + 16H^+ \quad [85]$$

La Figure 83 présente les quantités de Fe dissous en fonction des quantités de cuivre dissous. Lors de l'essai abiotique, le rapport fer dissous/cuivre dissous (Fe/Cu) est tout d'abord légèrement supérieur

à 1 puis diminue pour atteindre 1 et n'évolue plus ensuite. Ainsi, il est probable que dans un premier temps, la pyrite est oxydée en parallèle de la chalcopyrite sur une courte période (1 jour), puis seule la chalcopyrite est oxydée. Ce résultat est cohérent avec les mesures de potentiel redox présentées en Figure 82a. Celui-ci décroît très rapidement lors des premières 24h et reste ensuite inférieur à 600mV ; or, la pyrite ne peut pas être oxydée lorsque le potentiel redox est inférieur à 650 mV vs. SHE (Liu et al., 2017).

Lors de l'essai « BA 5% (1) », le rapport Fe/Cu est de l'ordre de 1,4 au début de l'essai. Il est donc supérieur au ratio Fe/Cu de l'échantillon initial dont la valeur est proche de 1,2. Puis, ce ratio diminue pour atteindre 1. Enfin, il augmente à nouveau à partir du 4ème jour pour tendre vers 1,3. Autrement dit, lors d'une première phase la pyrite (FeS_2) est oxydée plus rapidement que la chalcopyrite ($CuFeS_2$). Dans une seconde phase, seule la chalcopyrite est dissoute, puis lors d'une dernière phase, la pyrite est à nouveau oxydée avec la chalcopyrite. Là aussi, ces résultats sont cohérents avec les mesures de potentiel redox. Les mêmes phases de dissolution ont été obtenues lors de l'essai « BA 5% (2) » toujours avec un décalage de 2 jours (résultats non-montrés ici). On peut également souligner que les essais menés au LGC à un potentiel régulé de 700 mV vs. SHE ont donné lieu à une dissolution importante de la pyrite (Dakkoune et al., 2023).

Dans le cas de l'essai de biolixiviation attritive à 10% (m/m) de solide (Figure 84), le rapport Fe/Cu est compris entre 1,3 et 1,4 au cours des deux premiers jours, puis diminue et tend vers 1 jusqu'à la fin de l'essai. Ainsi, comme lors de l'essai abiotique, la pyrite est tout d'abord oxydée en parallèle de la chalcopyrite, puis seule la chalcopyrite est oxydée. C'est résultats sont cohérents avec l'évolution du potentiel redox qui est similaire à celle observée en conditions abiotiques. Il est donc possible qu'à un taux de solide de 10% (m/m) les contraintes mécaniques et hydrodynamiques générées par l'attrition impactent la communauté bactérienne, de telle manière que le système s'apparente à celui en conditions abiotiques.

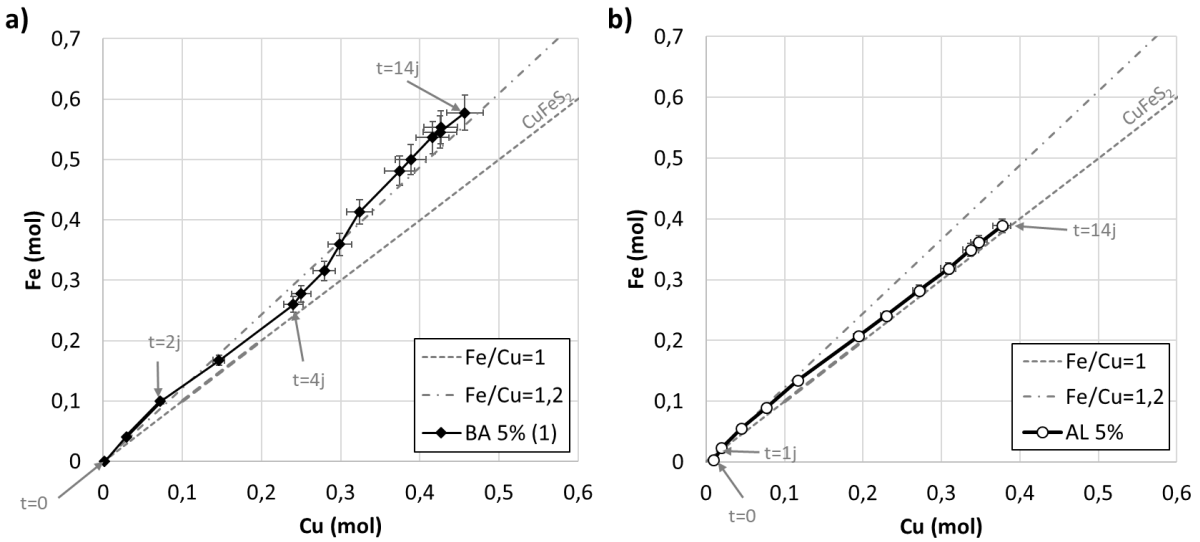


Figure 83 – Quantité de fer dissous en fonction de la quantité de cuivre dissous au cours (a) de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% (1) », (b) de l'essai d'attrition lixiviante réalisé dans les mêmes conditions (« AL 5% »). Le ratio Fe/Cu de 1,2 correspond au ratio Fe/Cu dans le matériau de départ à lixivier.

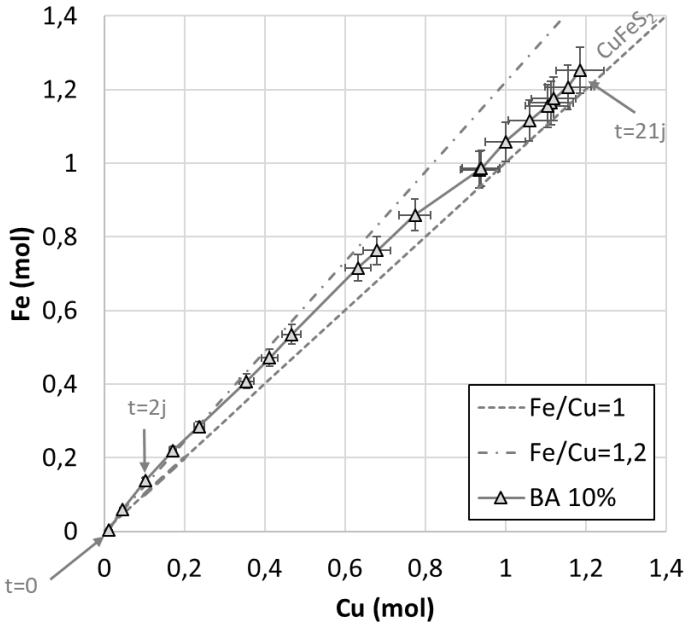


Figure 84 - Quantité de fer dissous en fonction de la quantité de cuivre dissous au cours de l'essai de biolixiviation attritive « BA 10% ». Le ratio Fe/Cu de 1,2 correspond au ratio Fe/Cu dans le matériau de départ à lixivier.

2.2. Croissance, diversité et activité bactérienne

Dans cette partie, on cherchera d'abord à déterminer s'il y a une croissance bactérienne lors des essais de biolixiviation attritive. L'évolution de la communauté bactérienne a également été étudiée afin de mieux comprendre le rôle des différentes espèces microbiennes au cours de ces essais.

2.2.1. Evolution de la biomasse

Lors des essais de biolixiviation attritive, la présence d'un média broyant induit une production importante de particules fines par effet de broyage et d'attrition. La méthode de mesure de la biomasse par comptage de cellules au microscope optique (Chapitre II, section 5.1.1) n'est donc pas adaptée pour suivre cette grandeur au cours de ces essais (Chapitre II, section 5.1.4). Le suivi de la biomasse a donc été réalisé par comptage après marquage des cellules au DAPI (Chapitre II, section 5.1.2) et par quantification de l'ADN extrait à partir d'échantillons de pulpe (Chapitre II, section 5.1.3) lors d'un des deux essais de biolixiviation attritive à 5% (m/m) (« BA 5% (1) ») et de l'essai à 10% (m/m) (« BA 10% »). Les résultats sont présentés à la Figure 85.

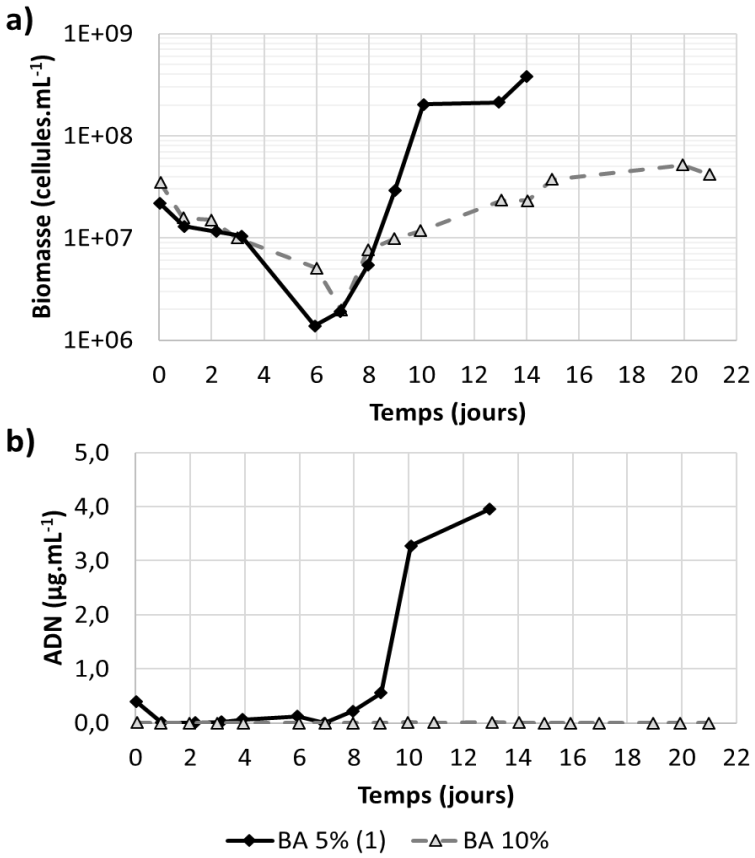


Figure 85 – (a) Biomasses et (b) concentrations en ADN extrait en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation attritive « BA 5% (1) » et « BA 10% ». L'ADN a été extrait à partir d'échantillons de pulpe et la biomasse a été mesurée par comptage de cellules au microscope à épifluorescence après marquage au DAPI du surnageant obtenu après 2 h ou 30 min de décantation d'échantillons de pulpe respectivement. Lorsque la concentration en ADN extrait est en dessous de la limite de détection, la mesure a été considérée égale à 0 $\mu g.mL^{-1}$ pour la représentation graphique.

Au cours des 6 premiers jours de l'essai « BA 5% (1) », la biomasse diminue et la concentration en ADN extrait est faible. Il n'y a donc pas de croissance bactérienne pendant ce laps de temps (phase de latence. D'après les résultats présentés dans la section 1.2 du chapitre IV, les particules fines (inférieures à 20 µm) n'inhibent pas la croissance et l'activité bactérienne, mais au contraire les favorisent. Cette phase de latence n'est donc pas due à la taille des particules, mais probablement aux contraintes induites par l'environnement attritif. Au-delà de 6 jours, la biomasse augmente, puis tend à se stabiliser. En parallèle, la concentration en ADN extrait augmente à partir de 7 jours jusqu'à la fin de l'essai. Une même tendance a été observée lors du second essai à 5% (m/m) (Annexe 7). Dans le cas d'un taux de solide de 10% (m/m), on observe également une baisse suivi d'une augmentation de la biomasse par comptage avec la méthode de marquage au DAPI. Cependant ce résultat n'est pas corrélé par les extractions d'ADN puisque la concentration en ADN extrait est la plupart du temps en dessous de la limite de détection. D'après la Figure 82a, contrairement à l'essai à 5% (m/m) de solide, aucune augmentation exponentielle du potentiel redox n'est observée avec 10% (m/m) de solide, indiquant une inhibition de l'activité bactérienne ferro-oxydante. Par ailleurs, de l'acide est ajouté à vitesse constante tout au long de ce dernier essai (résultats non-montrés ici), traduisant une inhibition possible de l'activité sulfo-oxydante. Aucune activité bactérienne n'étant observée, il est fort probable qu'il n'y ait pas de croissance bactérienne au cours de l'essai à 10% (m/m). Au cours, des essais de biolixiviation attritive, des fragments fins de billes sont produits. L'auto-fluorescence de ces fragments n'ayant pas été testée, il se pourrait que la mesure de biomasse par comptage avec marquage au DAPI

soit en partie biaisée par la présence de ces fragments, dont le nombre augmente avec le temps d'opération.

Dans le cas de l'essai à 5% (m/m) de solide, les mesures de biomasse et de concentration en ADN mettent donc en évidence un phénomène important, puisqu'une croissance bactérienne se produit après une phase de latence d'environ une semaine. Ce temps de latence correspond probablement au temps dont les bactéries ont besoin pour s'adapter aux conditions opératoires avant de pouvoir se développer. Cependant, l'augmentation du taux de solide de 5 à 10% (m/m) génère des contraintes plus importantes, qui inhibent la croissance et l'activité des bactéries.

D'autre part, lors de l'essai « BA (1) », la phase exponentielle du potentiel redox a lieu avant la phase de croissance bactérienne. Or cette dernière correspond à l'évolution de l'ensemble des bactéries sans distinction de l'espèce. Il est donc possible que l'évolution de la biomasse de chaque espèce diffère d'une espèce à l'autre. Ainsi, il se pourrait qu'au moins une des espèces ferro-oxydantes du consortium soit capable de se développer et d'être active au moment où la phase exponentielle du potentiel redox est observée, mais que cette croissance ne soit pas observable à l'échelle de la biomasse totale.

Par ailleurs, d'un point de vue méthodologique, les résultats obtenus par comptage de cellules après marquage au DAPI et par quantification de l'ADN extrait sont globalement cohérents dans le cas de l'essai à 5% (m/m). Cette cohérence n'est toutefois pas observée pour un taux de solide de 10% (m/m). Ainsi, selon les conditions opératoires appliquées lors d'un essai de biolixiviation attritive, l'évolution de la biomasse peut être suivie par comptage de cellules après marquage au DAPI, mais la quantification de l'ADN extrait semble préférable à la première technique.

2.2.2. Evolution de la communauté bactérienne

La composition de la communauté bactérienne (profil de diversité) a été analysée par T-RFLP à partir d'échantillons prélevés (Chapitre II, section 5.2) lors des essais « BA (1) » et « BA (2) ». Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 86 et la Figure 87.

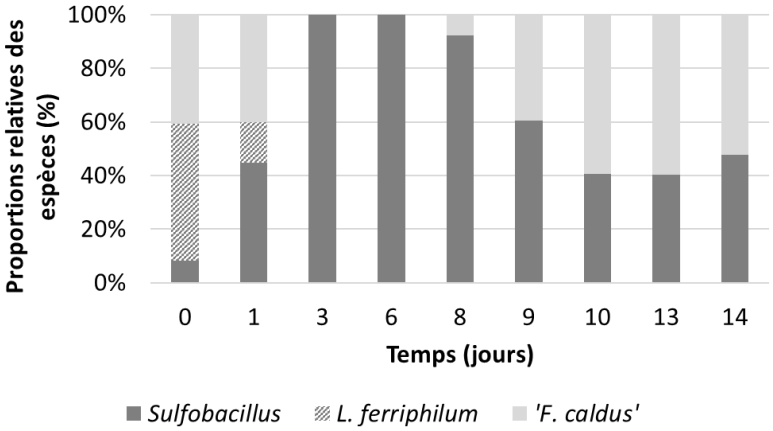


Figure 86 - Profil de diversité de la communauté bactérienne en fonction du temps lors de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% (1) ». Les résultats ont été obtenus à partir de d'échantillons de pulpe par analyse T-RFLP.

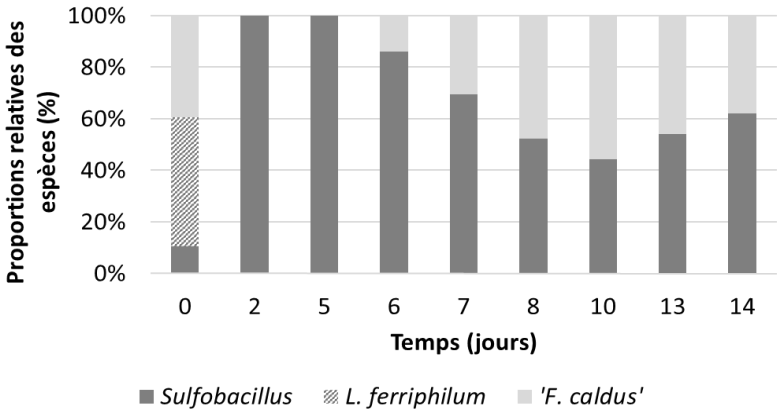


Figure 87 - Profil de diversité de la communauté bactérienne en fonction du temps lors de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% (2) ». Les résultats ont été obtenus à partir de d'échantillons de pulpe par analyse T-RFLP.

A l'instant initial les espèces majoritaires du consortium AKL (*Sulfobacilus* (ferro- et sulfo-oxydantes), *L. ferriphillum* (ferro-oxydante), et *'F. caldus'* (sulfo-oxydante)) sont présentes. Au-delà de 1 jour, les espèces *L. ferriphillum* et *'F. caldus'* ne sont plus détectées. Toutefois, l'espèce *'F. caldus'* l'est à nouveau après quelques jours. Les espèces du genre *Sulfobacillus* sont quant à elles présentes tout au long des essais. Or il a été montré lors des essais de biolixiviation conventionnelle (Chapitre IV, sections 1.2.2 et 2.2.1) que toutes les espèces sont présentes tout au long des essais. On en déduit que l'attrition générée par la présence du média broyant n'a pas le même effet selon l'espèce considérée :

- Elle inhibe/limite rapidement le développement de l'espèce *L. ferriphillum* ;
- Le développement des bactéries de l'espèce *'F. caldus'* est également inhibé dès les premiers jours de l'essai, mais après un temps de latence, ces bactéries arrivent à s'adapter à l'environnement attritif et à se développer ;
- Les espèces *Sulfobacillus* sont moins impactées par l'attrition, probablement grâce à leur capacité à produire des spores (forme inactive plus résistante aux contraintes), qui leur confère donc une meilleure résistance.

Lors des essais de biolixiviation conventionnelle, il a été montré que l'espèce *L. ferriphillum* est dominante dans la phase solide de la pulpe, et donc à la surface des particules. Il est donc possible qu'elle soit plus exposée aux chocs avec les billes, ce qui expliquerait sa vulnérabilité plus élevée face au phénomène d'attrition.

2.3. Consommation d'acide

Au cours des essais, l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} (équation [84]) et l'oxydation de la chalcopyrite selon l'équation [83] consomment des protons, tandis que l'oxydation du soufre élémentaire (équation [86]) (en conditions biotiques) et l'oxydation de la pyrite (équation [85]) en produisent. Par ailleurs, le système étant riche en ions SO_4^{2-}, lorsque la concentration en Fe^{3+} en solution est suffisante, une précipitation de jarosite peut avoir lieu et produit également des protons (équation [87]). Selon les vitesses relatives de ces réactions, il peut être nécessaire d'ajouter de l'acide ou de la base pour maintenir le pH à 1,3. La quantité de protons provenant de l'ajout d'acide, et celle consommée par ajout de la base ont été calculées selon la méthodologie décrite dans la section 4.3 du Chapitre II. La Figure 88 présente l'évolution de la différence entre ces deux quantités de protons ($\Delta H^+_{acide\text{-}base}$), depuis l'instant initial, lors des essais de biolixiviation attritive et d'attrition lixiviante.

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Bactéries S-ox}} 2SO_4^{2-} + 4H^+ \quad [86]$$

$$3Fe^{3+} + 2SO_4^{2-} + 6H_2O + M^+ \longrightarrow MFe_3(SO_4)_2(OH)_6 + 6H^+ \quad [87]$$

(avec M = K^+, Na^+, NH_4^+, ou H_3O^+)

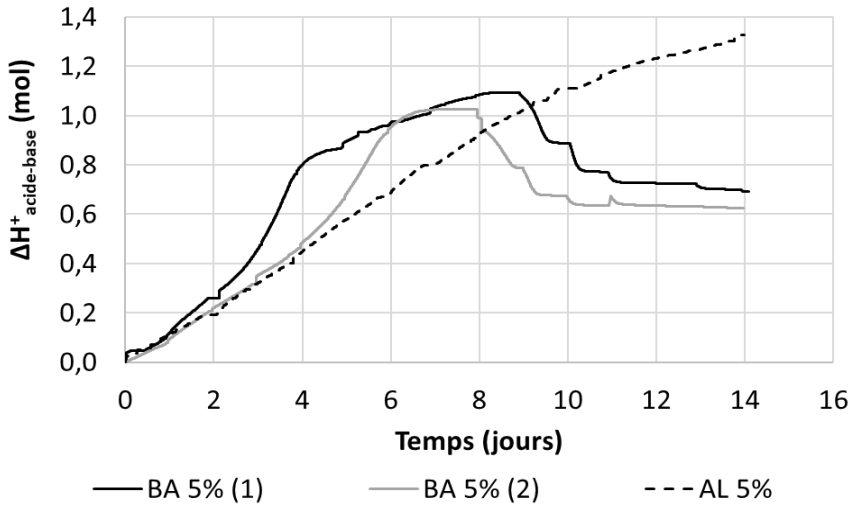


Figure 88 - Différence entre la quantité de protons ajoutée par ajout d'acide, et la quantité de protons consommée par ajout de base ($\Delta H^+_{acide\text{-}base}$), depuis l'instant initial, au cours des essais de biolixiviation attritive (« BA 5% (1) » et BA 5% (2) »), et d'attrition lixiviante (« AL 5% »).

Dans le cas de l'essai abiotique, $\Delta H^+_{acide\text{-}base}$ augmente à vitesse constante au cours des 10 premiers jours, puis cette augmentation ralentit, ce qui traduit une consommation régulière d'acide. Par ailleurs, l'évolution de la vitesse de consommation d'acide est cohérente avec les cinétiques de dissolution du cuivre et du fer observées sur la Figure 81.

Au début des essais de biolixiviation attritive, $\Delta H^+_{acide\text{-}base}$ augmente au même rythme que dans l'essai abiotique, ce qui est cohérent avec les vitesses de dissolution de la chalcopyrite. Puis, entre 2 et 4 jours, $\Delta H^+_{acide\text{-}base}$ augmente plus rapidement, traduisant une consommation en protons plus rapide, qui correspond précisément à la phase où la dissolution du cuivre et du fer est la plus rapide lors des essais « BA 5% (1) » et « BA 5% (2) » (Figure 81). Cela est cohérent avec les réactions d'oxydation des sulfures par Fe^{3+} (équation [82] et équation [85]) et la réaction d'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+}, qui consomment des protons (équation [84]).

A partie du 4ème jour (6ème pour l'essai (2)), $\Delta H^+_{acide\text{-}base}$ augmente plus lentement, pour finalement se stabiliser et décroitre. Ces phénomènes sont concomitants à l'augmentation de la concentration en Fe^{3+} en solution (Figure 82b), confirmant une production de protons plus rapide par l'oxydation du soufre et possiblement par la précipitation de jarosite comparée la consommation de protons associée à l'oxydation de Fe^{2+} et de la chalcopyrite.

Au-delà de 11 jours, $\Delta H^+_{acide\text{-}base}$ est stable, peu de cuivre et de fer sont dissous (Figure 81), et la concentration en Fe^{3+} augmente peu (Figure 82b) (faible consommation de protons). La production de protons par oxydation du soufre est donc faible, et le système évolue peu.

On peut également noter que la quantité d'acide utilisée dans l'essai de biolixiviation attritive est moins élevée que lors de l'essai abiotique (286 mL contre 235 mL). Dans ces essais, la production de protons via l'activité des bactéries sulfo-oxydantes permet donc de réduire la consommation en acide d'environ 20 %, tout en améliorant le rendement de lixiviation d'environ 10 %.

2.4. Conclusion

Comparé à la biolixiviation conventionnelle, la dissolution de la chalcopyrite est plus rapide en biolixiviation attritive grâce au broyage in-situ des particules et à l'attrition à la surface de celles-ci. En effet, ces phénomènes physiques permettent dans un premier temps de générer des particules fines puis de maintenir une surface réactive favorisant la dissolution de la chalcopyrite. L'attrition permet ainsi d'éviter la passivation complète de la chalcopyrite (vitesse de dissolution quasi-nulle) et de continuer à dissoudre ce minéral même à des potentiels redox, et donc à des ratios Fe^{3+}/Fe^{2+}, supérieurs à la limite de passivation identifiée dans la littérature. D'autre part, dans les conditions opératoires étudiées (250 g de billes et taux de solide à 5% (m/m)), les bactéries des espèces *'F. caldus'* et du genre *Sulfobacillus* sont capables de se développer et d'être actives, ce qui permet la catalyse de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} et l'oxydation des espèces intermédiaires soufrés réduites, en particulier le soufre élémentaire, produites lors de l'oxydation des sulfures. Dans les conditions opératoires étudiées, cela se traduit respectivement par une oxydation plus rapide de la chalcopyrite qu'en conditions abiotiques, tant que le potentiel redox est inférieur à la limite de passivation, et par une consommation en acide plus faible.

Par ailleurs, les résultats obtenus lors des deux essais de biolixiviation attritive sont globalement reproductibles, tant sur les aspects chimiques (rendement, consommation d'acide) que biologiques (évolution des populations bactériennes), mais avec un décalage temporel de la phase d'accélération de la lixiviation qui n'a pas pu être expliqué à ce stade. Il est possible que certains aspects techniques (bouchage de la canne d'alimentation en air, perturbation de l'alimentation en CO_2 par exemple) puissent expliquer ce décalage. Des essais supplémentaires seraient nécessaires pour approfondir ce point.

Les éléments positifs liés à l'utilisation des bactéries ferro- et sulfo-oxydantes dans le procédé d'attrition lixiviante mis en évidence par les premiers essais invitent à tenter de trouver des conditions opératoires plus propices au développement des bactéries tout en évitant la passivation, même partielle, de la chalcopyrite. En effet, cela permettrait éventuellement une oxydation plus rapide et plus sélective de la chalcopyrite, notamment si les vitesses de consommation et de production du Fe^{3+} sont telles que le potentiel redox est suffisamment faible pour limiter l'oxydation de la pyrite, mais suffisamment élevé pour l'oxydation de la chalcopyrite (pas de limitation par l'oxydant). Ainsi, l'activité bactérienne étant un point crucial dans le procédé de biolixiviation attritive, l'impact des contraintes induites par l'environnement attritif sur les bactéries a été étudié de manière plus approfondie dans la partie suivante.

3. Impact des contraintes mécaniques et hydrodynamique sur les bactéries

Il a été montré que la croissance bactérienne est, lors des premiers jours des essais, inhibée par l'environnement attritif généré par 250 g de billes et 5% (m/m) de solide. En parallèle, les contraintes induites par l'attrition endommagent les cellules, ce qui conduit à une diminution de la biomasse. A l'échelle des espèces bactériennes, l'attrition peut donc inhiber de façon permanente ou temporaire le développement d'une espèce, selon ses propriétés (capacité d'adaptation aux conditions opératoires et capacité à sporuler par exemple) et la répartition de cette espèce entre la phase solide et liquide de la pulpe. On peut notamment supposer que les bactéries qui ont tendance à s'attacher à la surface des particules sont plus exposées à l'attrition que les bactéries planctoniques.

Afin de mieux comprendre l'impact des contraintes induites par l'attrition sur les bactéries, deux pistes ont été explorées parmi les nombreuses options ouvertes par les différents questionnements et la multitude de paramètres opératoires.

Dans un premier temps, des tests de viabilité ont été réalisés à partir des échantillons de pulpe prélevés au cours d'un essai de biolixiviation attritive. Ces tests consistent à introduire les microorganismes présents dans la pulpe prélevée dans un milieu de culture propice à leur développement, afin de comparer la croissance et l'activité de ces microorganismes à celles de bactéries n'ayant jamais été exposées à l'attrition.

Dans un second temps, la capacité des microorganismes à s'habituer aux conditions d'attrition a été évaluée par repiquage d'un essai de biolixiviation attritive.

3.1. Biolixiviation attritive : Tests de viabilité

Les tests de viabilité ont été réalisés sur deux échantillons de pulpe prélevés au cours de l'essai « BA 5% (1) », l'un après 3 jours (« 3j ») et l'autre à la fin de l'essai (« tf »). Ces échantillons ont ensuite été ajoutés à du milieu nutritif frais contenant du Fe^{2+} et du soufre élémentaire, ce qui correspond à des conditions très favorable pour la croissance des bactéries sulfo et ferro-oxydantes (voir les conditions de ces tests au Chapitre II, section 3.2.3).

3.1.1. Evolution de la biomasse et diversité bactérienne

Au cours des tests de viabilité, la biomasse a été mesurée par comptage au microscope optique sur le surnageant obtenu après 5 min de décantation de l'échantillon de pulpe. Elle est donc exprimée en concentration de cellules par millilitre.

La Figure 89 présente l'évolution de la biomasse au cours de ces tests pour un échantillon témoin ainsi que les échantillons « 3j » et « tf ». Le test « témoin » correspond à des bactéries n'ayant pas été soumises à l'attrition, provenant de la même culture que l'inoculum de l'essai de biolixiviation attritive (sur le concentré de Lubin).

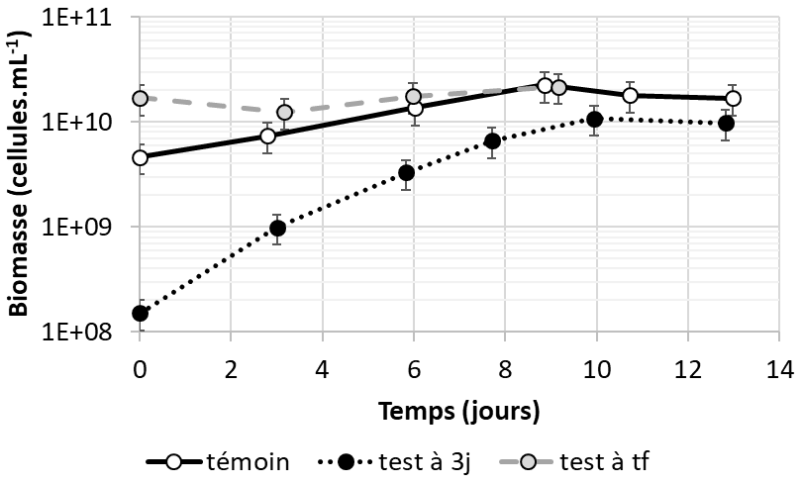


Figure 89 - Biomasse en fonction du temps lors de tests de viabilité inoculés avec l'inoculum de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% (1) » (témoin), ou de la pulpe prélevée au 3ème jour (test à 3j) ou à la fin (test à tf) de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% (1) ».

Au cours du test témoin, la biomasse augmente et se stabilise à partir de 9 jours, ce qui confirme que les bactéries introduites dans le réacteur de biolixiviation attritive sont capables de se développer. La biomasse obtenue à la fin de l'essai « BA 5% (1) » est inférieure à celle que l'on peut obtenir à la fin d'une culture avec le concentré de Lubin (Chapitre III, section 2.1.1), d'où la biomasse plus faible au départ du « test à 3j » comparé au test témoin. Cette biomasse se développe de manière importante

pendant les dix premiers jours avant de se stabiliser à une concentration du même ordre de grandeur que celle obtenue à la fin du test témoin. Les bactéries exposées à l'attrition pendant 3 jours sont donc toujours capables de se multiplier, sans phase de latence, lorsqu'elles sont à nouveau dans un milieu favorable à leur développement.

Lors du « test à tf », la biomasse reste globalement constante, avec une concentration initiale quasiment 10 fois supérieure à celle de l'échantillon témoin. Toutefois, l'inoculum de ce test ayant été prélevé à la fin d'un essai de biolixiviation attritive, il contient une proportion non-négligeable de particules fines qui pourrait être à l'origine d'un biais masquant la croissance des bactéries (plus de particules que de bactéries sont éventuellement comptés).

La composition de la communauté bactérienne à la fin des tests « à 3j » et « à tf » est indiquée sur la Figure 90. La composition de la communauté bactérienne n'a pas été analysée à la fin du test témoin, mais les conditions opératoires étant relativement proches de celles appliquées lors des cultures de l'inoculum avec le concentré de Lubin, il est probable que le profil de diversité à la fin de ce test soit similaire de ceux obtenus à la fin de ces cultures (voir Chapitre III, section 2.1.2).

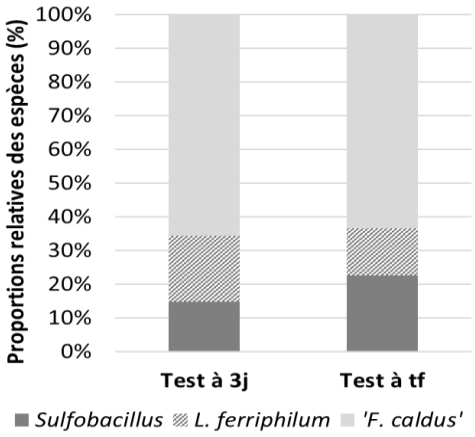


Figure 90 - Profils de diversité de la communauté bactérienne à la fin des tests de viabilité inoculés avec de la pulpe prélevée à 3 jours (test à 3j) ou à la fin (test à tf) de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% (1) ». Les profils de diversité ont été obtenus à partir d'échantillons de pulpe par analyse T-RFLP (Chapitre II, section 5.2).

Pour rappel (Figure 86a), au 3ème jour de l'essai de biolixiviation attritive, seules les espèces du genre *Sulfobacillus* sont détectées, tandis qu'au dernier jour de ce même essai, seules les espèces *'F. caldus'* et celles du genre *Sulfobacillus* sont détectées. Or, comme le montre la Figure 90, à la fin des deux tests de viabilité, les espèces *L. ferriphilum*, *'F. caldus'* et celles du genre *Sulfobacillus* sont présentes. Ainsi, malgré l'inhibition du développement des bactéries de l'espèce *L. ferriphilum* au cours de l'essai de biolixiviation attritive, ces microorganismes restent présents dans le système et se développent lorsqu'ils sont à nouveau dans un milieu favorable à leur développement. Il en est de même pour les bactéries de l'espèce *'F. caldus'* prélevées au 3ème jour de l'essai de biolixiviation attritive.

3.1.2. Evolution du potentiel redox et du pH

L'évolution du potentiel redox et du pH au cours des tests de viabilité permet de caractériser l'activité des bactéries ferro-oxydante d'une part (évolution du ratio Fe^{3+}/Fe^{2+}) et de comparer l'activité des bactéries sulfo-oxydante et ferro-oxydantes d'autre part (l'oxydation du soufre produit des protons tandis que l'oxydation de Fe^{2+} en consomme).

La Figure 91 indique l'évolution du potentiel redox et du ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} en solution au cours des tests de viabilité. Dans le cas des tests inoculés avec des bactéries issues de l'essai de biolixiviation attritive,

le potentiel redox augmente plus lentement que dans le cas du test témoin (Figure 91a). Les potentiels finaux des trois tests sont toutefois très proches, et atteignent 900 mV vs SHE. L'augmentation du potentiel redox s'accompagne d'une augmentation du ratio Fe^{3+}/Fe^{2+}, qui est particulièrement rapide dès le début du test témoin (Figure 91b). Dans le cas où les bactéries ont été exposées à l'attrition, l'augmentation rapide du ratio Fe^{3+}/Fe^{3+} est retardée.

Ainsi, lorsque les bactéries ont été exposées à l'attrition puis remise dans des conditions favorables à leur développement, leur activité est dans un premier temps plus faible que si elles n'avaient pas subi cette attrition. Cette phase de latence semble plus courte pour l'échantillon « tf », ce qui pourrait indiquer une adaptation des bactéries ferro-oxydantes à l'environnement attritif.

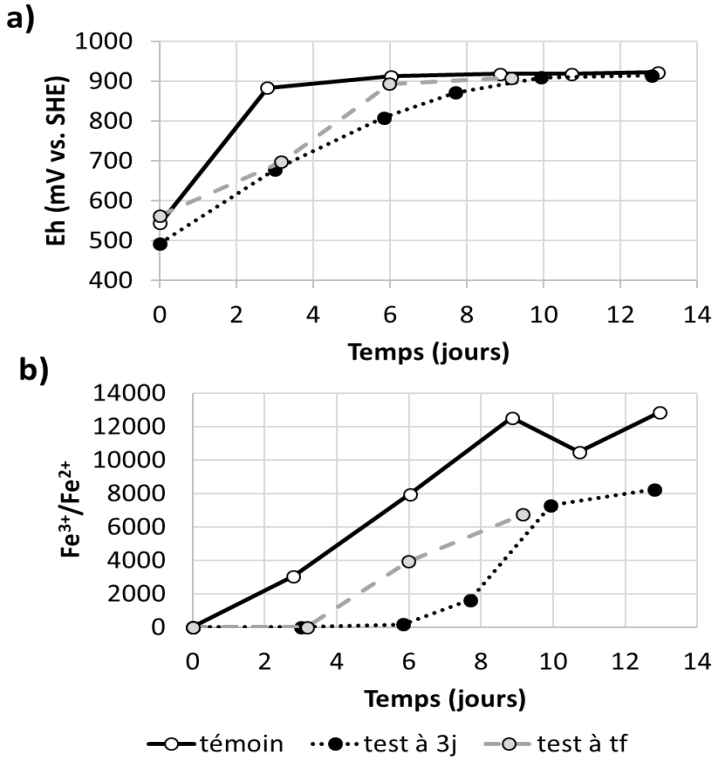


Figure 91 – (a) Potentiel redox (Eh) et (b) ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} en fonction du temps lors de tests de viabilité inoculés avec l'inoculum de l'essai de biolixiviation attritive (témoin), ou de la pulpe prélevée à 3 jours (test à 3j) ou à la fin (test à tf) de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% (1) ».

La Figure 92 présente l'évolution du pH en fonction du temps au cours des tests de viabilité.

Lors du test témoin, le pH diminue dès l'instant initial et se stabilise à partir de 6 jours environ. L'évolution du pH pour l'échantillon « tf » est quasi-identique à celle du test témoin, tandis que le pH diminue plus tardivement pour l'échantillon « 3j ». Quel que soit le test, la diminution du pH traduit une production de protons via l'oxydation du soufre élémentaire (équation [86]) plus rapide que la consommation de protons via la réaction d'oxydation du Fe^{2+} (équation [84]).

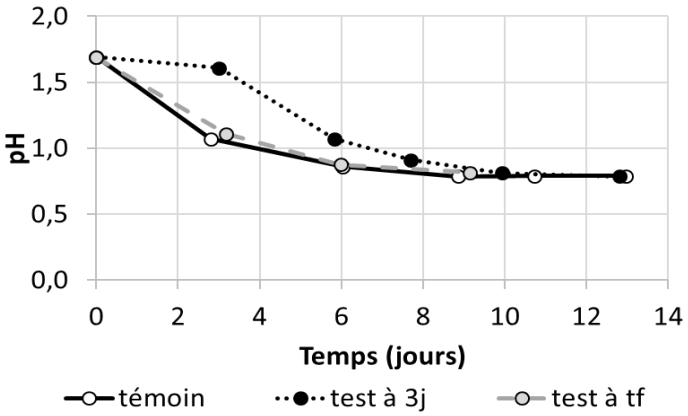


Figure 92 - pH en fonction du temps lors de tests de viabilité inoculés avec l'inoculum de l'essai biolixiviation attritive (témoin), ou de la pulpe prélevée à 3 jours (test à 3j) ou à la fin (test à tf) de l'essai biolixiviation attritive « BA 5% (1) ».

Les tests de viabilité montrent donc que l'environnement attritif généré avec 250 g de billes et 5% (m/m) de solide n'inhibe pas la capacité des bactéries à se développer, même si leur activité est fortement réduite, en particulier en début d'essai. Par ailleurs, les tests de viabilité montrent que les bactéries de l'espèce *L. ferriphilum* sont toujours présentes dans le système bien qu'elles ne soient plus détectées par nos analyses au cours de l'essai de biolixiviation attritive. Une hypothèse est que ces bactéries sont plus endommagées par le phénomène d'attrition, ce qui limite davantage leur croissance par rapport aux autres espèces.

3.2. Repiquage d'un essai de biolixiviation attritive

Une technique utilisée dans la littérature pour habituer les microorganismes aux conditions opératoires est de prélever de la pulpe à la fin d'une opération de biolixiviation et de l'utiliser comme inoculum pour l'opération suivante (repiquage) (Hedrich et al., 2016). Nous avons appliqué cette technique lors d'un essai exploratoire, pour évaluer si la croissance et l'activité bactérienne est meilleure lorsque l'essai est inoculé avec des bactéries ayant préalablement été exposées à l'environnement attritif.

Pour cette étude, un échantillon de pulpe a été prélevé à la fin de l'essai « BA 5% (1) » et utilisé en tant qu'inoculum d'un autre essai de biolixiviation attritive réalisé dans les mêmes conditions (essai « BA 5% rep », Tableau 19).

3.2.1. Rendement et cinétique d'oxydation de la chalcopyrite

La Figure 93 présente l'évolution des rendements de dissolution du cuivre et du fer au cours des essais « BA 5% (1) » et « BA 5% rep ». Les rendements de dissolution du cuivre et du fer obtenus lors de l'essai d'attrition lixiviante « AL 5% » sont également présentés sur cette figure.

Il apparaît que les rendements de dissolution du cuivre et du fer atteints à la fin de l'essai « BA 5% rep » sont inférieurs à ceux de l'essai « BA 5% (1) », avec un écart de 22 % dans le cas du cuivre et de 23 % dans le cas du fer. Par ailleurs, les cinétiques de dissolution du cuivre et du fer de l'essai « BA 5% rep » sont très proches de celles obtenues en conditions abiotiques. A aucun moment la dissolution des métaux n'est plus rapide qu'en conditions abiotiques, contrairement à ce qui a pu être observé dans tous les essais démarrés avec un inoculum « frais » (cultivé avec le concentré de Lubin).

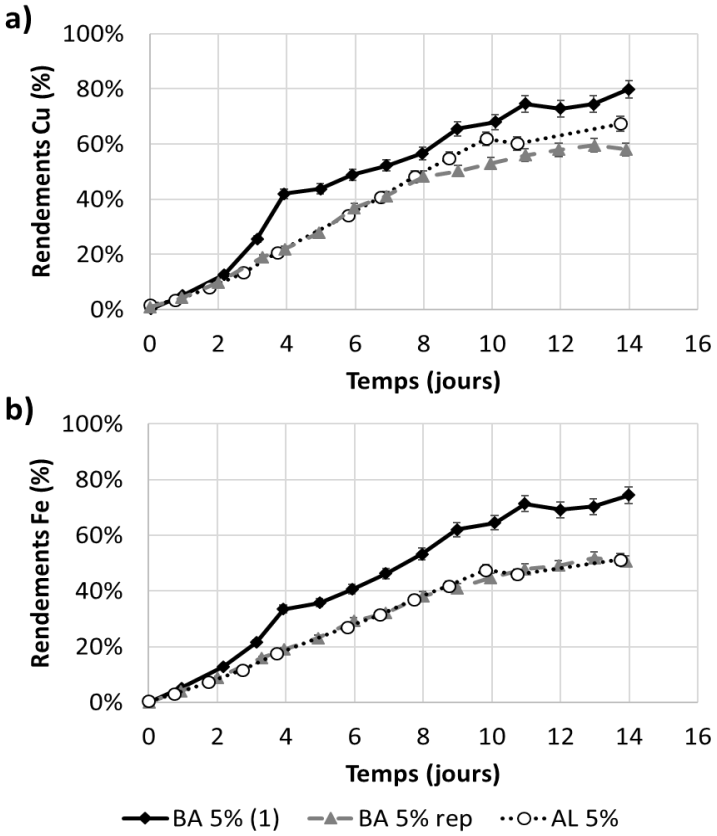


Figure 93 - Rendements de dissolution (a) du cuivre et (b) du fer en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation attritive inoculés avec un inoculum cultivé sur le concentré de Lubin (« BA 5% (1) ») ou avec de la pulpe prélevé à la fin de l'essai « BA 5% (1) » (« BA 5% rep ») et lors de l'essai d'attrition lixiviante (« Attrition lix »).

Les rendements de dissolution de la chalcopyrite et de la pyrite obtenus à la fin de l'essai « BA 5% rep », déterminés à partir de l'analyse des résidus, sont de 67% et 88%, respectivement. Par comparaison aux essais « BA 5% (1) et (2) » (Tableau 21), ceci confirme que le rendement de dissolution de la chalcopyrite est plus faible lorsque les bactéries ont préalablement été exposées à l'attrition au cours d'un premier essai de biolixiviation attritive.

L'évolution du potentiel redox et de la concentration en Fe^{3+} calculée à partir du potentiel en fonction du temps au cours des essais est représentée sur la Figure 94.

Comme pour l'essai « BA 5% (1) », au cours de l'essai « BA 5% rep », le potentiel redox diminue de manière importante au cours des premières 24 h, puis augmente lentement jusqu'à la phase exponentielle (Figure 94a). Le potentiel redox augmente ensuite à nouveau plus lentement jusqu'à atteindre 830 mV vs. SHE. La différence entre les deux essais de biolixiviation attritive est la durée de la phase où le potentiel redox reste inférieur à 600 mV vs. SHE. En effet, cette phase est plus longue dans le cas de l'essai « BA 5% rep », le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} reste donc plus longtemps inférieur à 1 lorsque l'essai est inoculé avec des bactéries ayant préalablement été exposées à l'attrition.

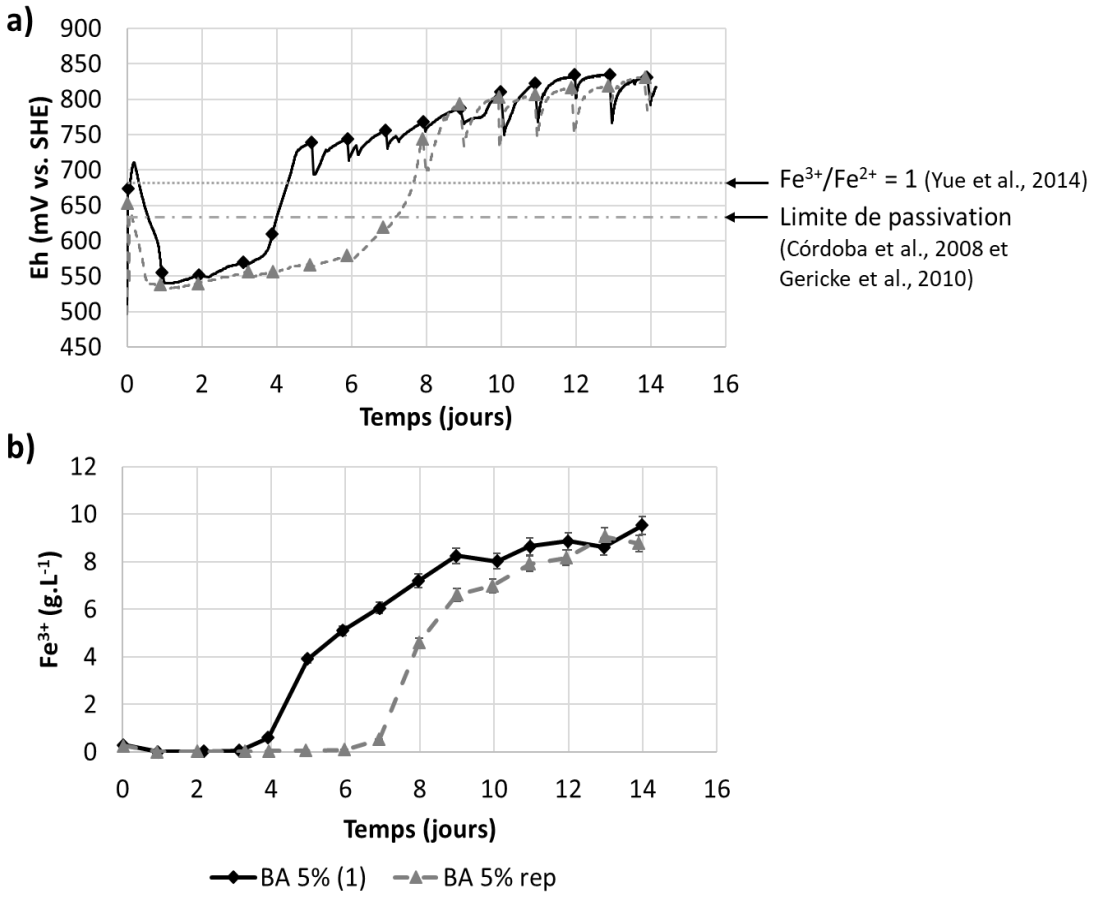


Figure 94 – (a) Potentiel redox (Eh) et (b) concentration en Fe^{3+} en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation attritive inoculés avec un inoculum cultivé sur le concentré de Lubin (« BA 5% (1) ») ou avec de la pulpe prélevé à la fin de l'essai « BA 5% (1) » (« BA 5% rep »).

D'après la Figure 94b, au cours de l'essai « BA 5% rep », la concentration en Fe^{3+} reste inférieure à 1 $g.L^{-1}$ au cours des 7 premiers jours. Elle augmente ensuite rapidement pendant la phase exponentielle du potentielle redox avant de tendre vers une concentration de 9 $g.L^{-1}$. Cette concentration est proche de la concentration finale de l'essai « BA 5% (1) ». L'oxydation de la chalcopyrite n'est donc pas limitée par Fe^{3+} au moins à partir de 7 jours.

Contrairement aux essais inoculés avec des bactéries non-exposées à l'attrition, la dissolution du cuivre et de la chalcopyrite n'est à aucun moment accélérée par une production plus rapide de Fe^{3+}, même lorsque le potentiel redox est en-dessous de la limite de passivation. Pour chercher des éléments de réponse à cette observation, la croissance et l'activité microbienne, ainsi que la composition de la communauté bactérienne ont été analysées.

3.2.2. Croissance, diversité et activité bactérienne

La Figure 95 présente l'évolution de la biomasse lors des essais « BA 5% (1) » et « BA 5% rep ». La biomasse a été déterminée par comptage après marquage des cellules au DAPI.

L'évolution de la biomasse en fonction du temps lors de l'essai « BA 5% rep » est similaire à celle observée lors de l'essai « BA 5% (1) », avec une croissance bactérienne précédé d'une phase de latence de presque une semaine (diminution de la biomasse). A noter que l'arrêt de croissance au 8ème jour lors de l'essai « BA 5% rep » est attribué à un bouchage au niveau de l'alimentation en gaz dans le réacteur (diminution de l'apport en CO_2 pour la croissance des bactéries), sans impact a priori sur l'effet

de lixiviation accélérée observé dans les autres essais à 5% (m/m) à des temps plus courts (aux 2ème et 4ème jours) pour lesquelles un bouchage avait été observé au 2ème jour des essais. Cette évolution temporelle confirme que l'exposition préalable à l'attrition n'a pas donné lieu à une réduction notable du temps de latence.

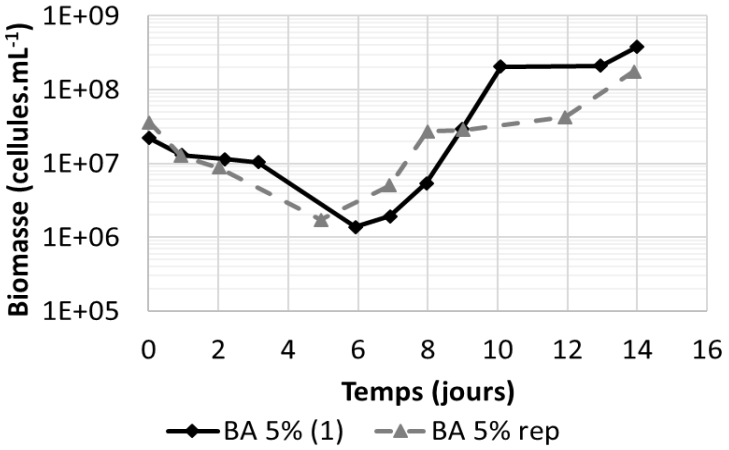


Figure 95 - Biomasse en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation attritive inoculés avec un inoculum cultivé sur le concentré de Lubin (« BA 5% (1) ») ou avec de la pulpe prélevé à la fin de l'essai « BA 5% (1) » (« BA 5% rep »). La biomasse a été mesurée par comptage de cellules au microscope à épifluorescence après marquage au DAPI d'échantillons de surnageant obtenu après 2 h de décantation d'échantillons de pulpe.

La Figure 96 indique les profils de diversité de la communauté bactérienne en parallèle de la biomasse en fonction du temps au cours de l'essai « BA 5% rep ». Les espèces ferro- et/ou sulfo-oxydantes détectées à la fin de l'essai « BA 5% (1) » (*'F. caldus'* et *Sulfobacillus*) (Figure 86) sont bien présentes à l'instant initial de l'essai « BA 5% rep », avec une dominance de l'espèce *'F. caldus'* (90%). Entre l'instant initial et 7 jours, la proportion relative de l'espèce *'F. caldus'* diminue, avant d'augmenter au cours de la phase de croissance bactérienne et devenir à nouveau dominante à la fin de l'essai. Il est donc probable que, comme lors de l'essai « BA 5% (1) », la croissance des bactéries de cette espèce soit dans un premier temps inhibée, puis l'adaptation de cette espèce aux conditions opératoires lui permet de se développer.

Par ailleurs, la diminution de la proportion en *'F. caldus'* sur la période où la biomasse est stable (entre le 8ème et 11ème jour) est cohérente avec le bouchage de l'alimentation en gaz. En effet, cette espèce est une espèce autotrophe strict et ne peut utiliser que le CO_2 comme source de carbone pour sa croissance, tandis que les espèces du genre *Sulfobacillus* sont mixotrophes, soit capables d'utiliser le CO_2 ou de la matière organique (débris cellulaires par exemple) pour se développer.

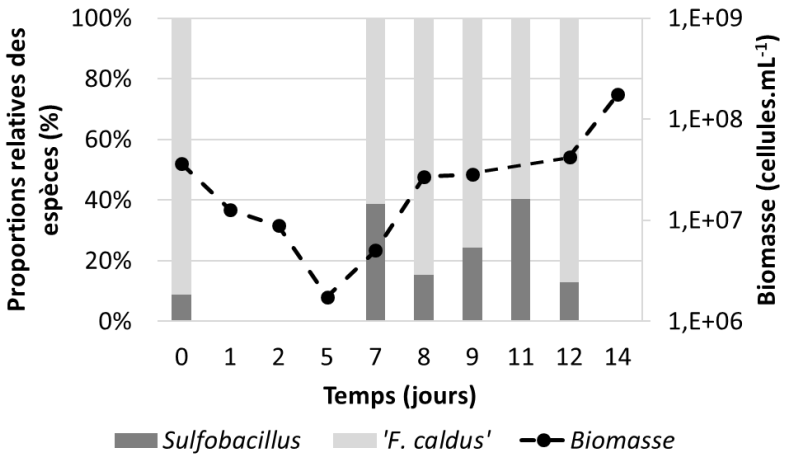


Figure 96 - Profils de diversité et biomasse en fonction du temps au cours de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% rep » inoculé avec de la pulpe prélevé à la fin de l'essai « BA 5% (1) ». La biomasse a été mesurée par comptage de cellules au microscope à épifluorescence après marquage au DAPI d'échantillons de surnageant obtenu après 2 h de décantation d'échantillons de pulpe.

On peut également souligner que la proportion de l'espèce *'F. caldus'* reste élevée (> 50%) tout au long de l'essai « BA 5% rep », alors que cette espèce n'était plus détectée entre le 2ème et 8ème jour lors des essais « BA 5% (1) et (2) » (Figure 86 et Figure 87).

La composition des communautés bactériennes à la fin de tests de viabilité réalisés au cours de l'essai « BA 5% rep » est présentée en Figure 97 (après vérification qu'il y a bien une croissance bactérienne au cours de ces tests).

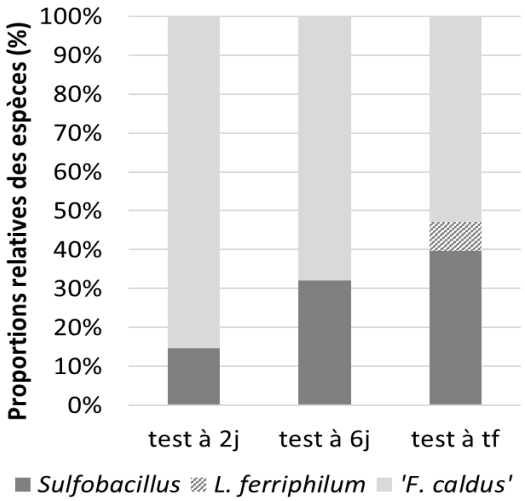


Figure 97 – Profils de diversité de la communauté bactérienne à la fin des tests de inoculés avec de la pulpe prélevée à 2 jours (test à 2j), à 6 jours (test à 6j) ou à la fin (test à tf) de l'essai « BA rep ».

Comme dans le cas de l'essai « BA 5% (1) » (Figure 90), la population bactérienne après culture est essentiellement composée des espèces *F. caldus* (majoritaire) et *Sulfobacillus*. Ces analyses montrent de plus que l'espèce *L. ferriphilum* est uniquement présente dans le « test à tf ». Elle est donc bien toujours présente dans le système. Toutefois, elle n'est pas détectée dans les tests à 2j et 6j, et la proportion relative de cette espèce à la fin du « test à tf » est plus faible que celles observées à la fin des tests de viabilité réalisés lors de l'essai « BA 5% (1) » (moins de 10% contre 14% et 20%). Ces résultats tendent à montrer que la proportion de bactéries appartenant à l'espèce *L. ferriphilum*

diminue après le repiquage d'un essai de biolixiviation et pourrait par conséquent, après plusieurs repiquages, disparaître totalement de la communauté bactérienne.

La Figure 98 indique la quantité de SO_4^{2-} produits au cours des essais « BA 5% (1) » et « BA 5% rep ». Cette quantité a été calculée selon l'équation [88] (voir Chapitre IV pour le détail du calcul).

$$SO_4^{2-}{}_{prod}[g.L^{-1}] = \frac{C_{SO4} \times V + m(SO4)_{prélèv} - C_{SO4_{inoc}} \times V_{inoc} - m(SO4)_{nutri} - (C_{ac} \times V_{ac}) \times M(SO_4^{2-})}{V} \quad [88]$$

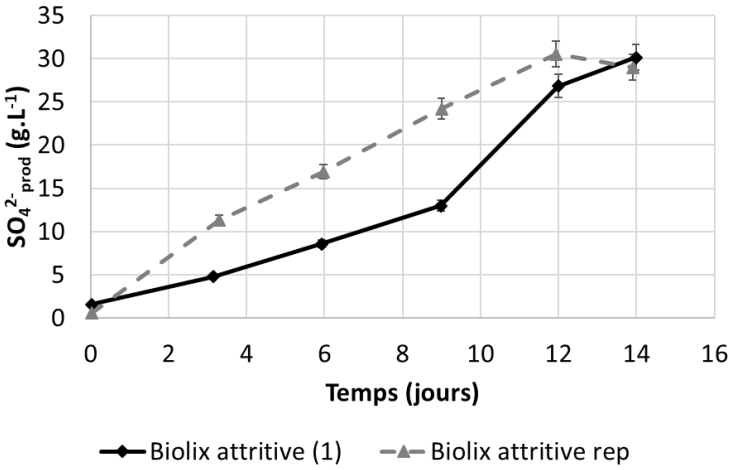


Figure 98 - SO_4^{2-} produits ($SO_4^{2-}{}_{prod}$) depuis l'instant initial en fonction du temps au cours des essais de biolixiviation attritive inoculés avec un inoculum cultivé sur le concentré de Lubin (« BA 5% (1) ») ou avec de la pulpe prélevé à la fin de l'essai « BA 5% (1) » (« BA 5% rep »).

La cinétique de production des SO_4^{2-} au cours de l'essai « BA 5% rep » est différente de celle observée au cours de l'essai « BA 5% (1) ». En effet, les SO_4^{2-} sont produits à vitesse constante, jusqu'à 12 jours où la concentration en SO_4^{2-} produit tend à se stabiliser. La vitesse initiale de production des SO_4^{2-} est plus élevée avec des bactéries issues d'un premier essai de biolixiviation attritive, mais les quantités finales de SO_4^{2-} produits sont similaires entre les deux essais. Toutefois, au cours des 9 premiers jours, plus de SO_4^{2-} sont produits lors de l'essai « BA 5% rep ». Ces résultats sont cohérents avec une présence plus importante de l'espèce sulfo-oxydante *'F. caldus'* dans le système (Figure 96).

Au final, le repiquage d'un essai de biolixiviation attritive n'améliore que légèrement la croissance bactérienne et la phase de latence reste longue. Celle-ci est attribuée aux contraintes générées l'environnement attritif, qui induit toujours une inhibition de la croissance bactérienne en début d'essai. Toutefois, l'activité sulfo-oxydante est initialement meilleure lorsque les bactéries ont été préalablement été exposées à l'attrition, ce qui permet une oxydation plus rapide du soufre et production d'acide plus importante au cours des premiers jours de l'essai. Enfin, le repiquage ne favorise pas l'activité ferro-oxydante.

3.2.3. Discussion

Les résultats obtenus vis-à-vis de la croissance, de l'activité et de la diversité bactérienne lors de l'essai avec repiquage ne permettent pas d'expliquer pourquoi la vitesse d'oxydation du cuivre est similaire à celle observée en conditions abiotiques. L'oxydation de la chalcopyrite étant une réaction ayant lieu à la surface des particules, une hypothèse est que le repiquage entraîne une diminution de la quantité de bactéries à la surface des particules. D'après la littérature, les substances polymériques extracellulaires (EPS) produit par les microorganismes pour s'attacher à la surface des particules forment un microenvironnement qui pourrait permettre une oxydation plus rapide et plus efficace de

la chalcopyrite qu'en solution (Rawlings, 2005). La phase d'oxydation rapide de la chalcopyrite observée lors des premiers essais de biolixiviation attritive (« BA 5% (1) » et « BA 5% (2) »), avant la phase exponentielle du potentiel redox, pourrait ainsi être plus liée à la production de Fe^{3+} catalysée par les bactéries ferro-oxydantes présentes à la surface des particules, que l'oxydation du Fe^{2+} par les bactéries ferro-oxydantes planctoniques.

D'autre part, il est généralement nécessaire de réaliser plusieurs repiquages (au moins 2 dans les mêmes conditions, Hedrich et al., 2016) pour améliorer les performances d'un consortium bactérien. Dans le cas de notre étude, un seul repiquage a été réalisé, ce qui n'est pas suffisant pour trancher de manière définitive quant à l'adaptation des bactéries à l'environnement attritif. Toutefois, cette étude donne de premiers résultats permettant de prévoir approximativement l'impact que pourrait avoir de multiples repiquages sur la communauté bactérienne, l'activité ferro- et sulfo-oxydante des bactéries, et la dissolution de la chalcopyrite. Ainsi, au fur et à mesure des repiquages l'espèce ferro-oxydante *L. ferriphilum* pourrait disparaître, au détriment de l'activité bactérienne ferro-oxydante. Une autre méthode, qui pourrait être appliquée afin d'habituer les microorganismes aux conditions opératoires et améliorer leur performances, serait de réaliser des cultures successives des bactéries avec une augmentation progressive de l'intensité de l'attrition (augmentation progressive de la quantité de billes ou de la masse de l'échantillon de chalcopyrite).

4. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, les effets du couplage entre la biolixiviation et l'attrition lixiviante sur la lixiviation de la chalcopyrite et la communauté bactérienne ont été étudiés. A notre connaissance, l'impact d'un tel couplage sur les microorganismes n'a pas été étudié dans la littérature.

L'utilisation d'un média broyant (billes) lors de la lixiviation abiotique de la chalcopyrite en réacteur agité génère un effet de broyage et d'attrition des particules permettant d'atténuer, voire d'éviter le phénomène de passivation du minéral. Cela se traduit par une dissolution plus rapide du cuivre qu'en lixiviation conventionnelle (sans média broyant) lorsque la limite de passivation est franchie.

Dans le cas de la biolixiviation attritive de la chalcopyrite, pour un ratio massique bille/chalcopyrite de 1,6 $g.g^{-1}$ (250 g de billes, taux de solide à 5% (m/m)), l'attrition ne permet pas d'éviter la passivation de la chalcopyrite, mais limite son effet (« passivation partielle »). La vitesse de dissolution du minéral reste ainsi suffisante pour atteindre un rendement entre 60 et 80% au bout de deux semaines, alors qu'un rendement inférieur à 10% est obtenu en biolixiviation conventionnelle. Par ailleurs, la cinétique de dissolution du minéral montre une phase où la vitesse d'oxydation de la chalcopyrite est plus rapide que celle observée en conditions abiotiques (attrition lixiviante). En absence de passivation partielle du minéral, un rendement de dissolution de la chalcopyrite plus élevé pourrait donc probablement être atteint en moins de temps.

L'environnement attritif généré au sein du réacteur a également un impact sur les bactéries, qui varie selon l'espèce bactérienne. Cela est probablement lié, d'une part, aux propriétés de chaque espèce, qui leur confèrent éventuellement une meilleure résistance aux contraintes hydrodynamiques et mécaniques (capacité des espèces du genre *Sulfobacillus* à sporuler par exemple), et, d'autre part, à la répartition des espèces entre la phase solide et liquide (les bactéries localisées sur les particules solides sont exposées à l'attrition et donc plus susceptibles d'être endommagées). Ainsi le développement de l'espèce *L. ferriphilum*, qui est probablement plutôt localisée à la surface des particules, est inhibé ou limitée, contrairement aux espèces du genre *Sulfobacillus* qui sont présentes tout au long des essais de biolixiviation attritive. L'espèce *'F. caldus'* est quant à elle capable de s'adapter aux conditions opératoires et de se développer après une phase de latence. Par ailleurs, la présence de billes n'empêche pas les bactéries ferro-oxydantes ou/et sulfo-oxydantes d'être actives après une phase de latence. La régénération du Fe^{3+} via l'activité bactérienne, permet ainsi une dissolution rapide de la chalcopyrite, avant passivation partielle du minéral. L'oxydation du soufre élémentaire grâce aux microorganismes permet également de produire de l'acide et par conséquent réduire la quantité d'acide consommé pour le maintien d'un pH favorisant l'activité bactérienne et limitant la précipitation des métaux.

En revanche, pour une même masse de bille mais un taux de solide plus élevé (10% (m/m)) (ratio massique billes/chalcopyrite de 0,8 $g.g^{-1}$), les contraintes générées sont plus importantes au point d'inhiber la croissance, et en conséquence l'activité bactérienne. La dissolution de la chalcopyrite est alors similaire à celle observée en conditions abiotique à 5% (m/m) et la quasi-totalité de la chalcopyrite est dissous en 21 jours.

D'autre part, le repiquage d'un essai de biolixiviation attritive, réalisé dans l'objectif d'évaluer l'adaptabilité des bactéries à l'environnement attritif, entraîne une diminution de la proportion de l'espèce *L. ferriphilum et* défavorise l'activité bactérienne ferro-oxydante. Ceci conduit à une diminution de la vitesse de lixiviation de la chalcopyrite. Au contraire, l'activité bactérienne sulfo-oxydante semble améliorée lorsque les bactéries ont préalablement été exposées à l'environnement attritif. Cette technique ne permet donc pas d'habituer l'ensemble du consortium bactérien aux

conditions opératoires. Les repiquages successifs pourraient même entraîner un changement de composition de la communauté bactérienne (perte de l'espèce ferro-oxydante *L. ferriphilum*) et une dégradation de l'activité ferro-oxydante des bactéries (phase de latence plus longue).

Les études présentées dans ce chapitre ont donc permis d'apporter de nombreux éléments de compréhension aux phénomènes ayant lieu dans un système de biolixiviation attritive et de mettre en lumière les effets bénéfiques que pourrait apporter ce procédé pour la dissolution de la chalcopyrite. L'optimisation des paramètres opératoires reste largement nécessaire en vue de permettre la croissance et l'activité bactérienne, potentiellement limiter la lyse des cellules attachées sur les particules solides et empêcher la passivation de la chalcopyrite.

5. Références

Bailey, A.D., Hansford, G.S., 1994. Oxygen mass transfer limitation of batch bio-oxidation at high solids concentration. Minerals Engineering 7, 293–303. https://doi.org/10.1016/0892-6875(94)90071-X

Balci, N., Shanks, W.C., Mayer, B., Mandernack, K.W., 2007. Oxygen and sulfur isotope systematics of sulfate produced by bacterial and abiotic oxidation of pyrite. Geochimica et Cosmochimica Acta 71, 3796–3811. https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.04.017

Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part IV: The role of redox potential in the presence of mesophilic and thermophilic bacteria. Hydrometallurgy 93, 106–115. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2007.11.005

Dakkoune, A., Bourgeois, F., Po, A., Joulian, C., Hubau, A., Touzé, S., Julcour, C., Guézennec, A.-G., Cassayre, L., 2023. Hydrometallurgical Processing of Chalcopyrite by Attrition-Aided Leaching. ACS Eng. Au. https://doi.org/10.1021/acsengineeringau.2c00051

Dixon, D.G., Mayne, D.D., Baxter, K.G., 2008. GALVANOX™ – A NOVEL GALVANICALLY-ASSISTED ATMOSPHERIC LEACHING TECHNOLOGY FOR COPPER CONCENTRATES. Canadian Metallurgical Quarterly 47, 327–336. https://doi.org/10.1179/cmq.2008.47.3.327

Dong, B., Jia, Y., Tan, Q., Sun, H., Ruan, R., 2020. Contributions of Microbial "Contact Leaching" to Pyrite Oxidation under Different Controlled Redox Potentials. Minerals 10, 856. https://doi.org/10.3390/min10100856

Gericke, M., Govender, Y., Pinches, A., 2010. Tank bioleaching of low-grade chalcopyrite concentrates using redox control. Hydrometallurgy 104, 414–419. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.024

Hedrich, S., Guézennec, A.-G., Charron, M., Schippers, A., Joulian, C., 2016. Quantitative Monitoring of Microbial Species during Bioleaching of a Copper Concentrate. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02044

Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., 2001. Enhancement of chalcopyrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions. Hydrometallurgy 60, 185–197. https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00155-9

Liu, C., Jia, Y., Sun, H., Tan, Q., Niu, X., Leng, X., Ruan, R., 2017. Limited role of sessile acidophiles in pyrite oxidation below redox potential of 650 mV. Sci Rep 7, 5032-5040. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04420-2

Mahmoud, A., Cézac, P., Hoadley, A.F.A., Contamine, F., D'Hugues, P., 2017. A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors. International Biodeterioration & Biodegradation 119, 118–146. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.015

Rawlings, D.E., 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories 4*, 13. https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-13

Yang, Y., Liu, W., Bhargava, S.K., Zeng, W., Chen, M., 2016. A XANES and XRD study of chalcopyrite bioleaching with pyrite. Minerals Engineering 89, 157–162. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.01.019

Zhao, H., Wang, J., Tao, L., Cao, P., Yang, C., Qin, W., Qiu, G., 2017. Roles of oxidants and reductants in bioleaching system of chalcopyrite at normal atmospheric pressure and 45 °C. International Journal of Mineral Processing 162, 81–91. https://doi.org/10.1016/j.minpro.2017.04.002

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de cette thèse concerne l'**étude d'un procédé hybride de lixiviation, nommé la biolixiviation attritive**. Ce concept consiste à coupler les avantages des procédés de biolixiviation (régénération des réactifs via l'utilisation de microorganismes et conditions opératoires relativement douces) et d'attrition par l'action de billes de taille millimétrique. La démarche de travail a été divisée en trois parties. Dans un premier temps, les échantillons de chalcopyrite et l'inoculum utilisés ont été caractérisés pour l'état initial du système. La caractérisation de l'inoculum a en particulier fait l'objet d'une étude de répétabilité pour valider la méthodologie de préparation de ce matériau. Cette méthodologie visait à limiter la variabilité de l'inoculum en termes de composition et de propriétés afin de faciliter la comparaison des résultats entre essais. Puis, les effets de la taille des particules et d'une régulation du pH à 1,3 sur la biolixiviation de la chalcopyrite en réacteur agité aéré et sans média broyant ont été étudiés. Cette étude préliminaire a notamment permis d'apporter de nouvelles connaissances quant à l'effet de la taille des particules sur la croissance et l'activité de bactéries thermophiles modérées ou mésophiles utilisées en biolixiviation. Enfin, le couplage entre la biolixiviation et l'attrition lixiviante a été étudié, et son influence sur la dissolution et la passivation de la chalcopyrite a été caractérisée, ainsi que l'impact de l'attrition sur la communauté bactérienne (croissance, activité, diversité).

Dans un premier temps, la revue de l'état de l'art a mis en évidence l'existence d'un lien fort entre le caractère réfractaire de la chalcopyrite et la formation d'espèces intermédiaires solides en surface des particules au cours de la lixiviation du minéral. D'autre part, les avantages du procédé de biolixiviation en font un procédé intéressant pour le traitement de la chalcopyrite sous réserve de remédier au caractère réfractaire du minéral lors du processus de lixiviation. Face à ce problème, **le couplage entre la biolixiviation et le procédé d'attrition lixiviante paraît prometteur mais n'a quasiment jamais été exploré**. Le travail de cette thèse a donc été orienté en vue d'apporter des éléments permettant une meilleure compréhension de l'effet de ce couplage sur la dissolution de la chalcopyrite et sur la communauté bactérienne dans le système hybride.

En amont des différents essais de biolixiviation, **différentes techniques de suivi de la biomasse** ont été comparées afin de déterminer l'adéquation de ces techniques **en fonction des paramètres opératoires**. Ces techniques reposent sur le comptage des bactéries au microscope en cellule de Thoma ou après marquage des cellules au DAPI, ou sur des analyses biomoléculaires (quantification de l'ADN extrait ou PCR quantitative). Les différentes techniques donnent des résultats cohérents mais présentent chacune leurs propres avantages. Le comptage en cellule de Thoma reste la méthode la plus rapide et la plus adaptée pour suivre la biomasse quotidiennement. Cependant, cette technique ne peut être utilisée lorsque le milieu contient une majorité de particules fines, comme c'est le cas lors des essais de biolixiviation attritive. Dans ce cas, les techniques biomoléculaire ou le marquage des cellules au DAPI permettent de quantifier la biomasse mais nécessitent un temps de préparation beaucoup plus long et ne peuvent être mises en œuvre quotidiennement. Par ailleurs, le marquage des cellules au DAPI comme le comptage en cellule de Thoma ne donnent qu'une biomasse dans la phase liquide. Au contraire, les techniques biomoléculaires permettent une mesure de biomasse dans la phase liquide, mais aussi dans la phase solide ou la pulpe.

Dans un second temps, **les échantillons de solide utilisés pour l'étude ont été préparés et analysés. Ils sont issus d'un concentré de chalcopyrite obtenu par flottation et présentent les caractéristiques suivantes** :

- Le concentré brut contient des particules dont la taille est comprise entre 0,3 et 350 µm (d_{50} de 58 µm, soit surface spécifique de 0,4 $m^2.g^{-1}$) ;

- Dans la fraction grossière préparée à partir du concentré brut, 68% des particules ont une taille comprise entre 20 et 100 µm, et seul 12% des particules sont inférieures à 20 µm contre 23% dans le concentré brut ;
- Dans la fraction fine préparée à partir du concentré brut, 91% des particules ont une taille inférieure à 20 µm ;
- Les surfaces spécifiques des fractions grossières et fines sont respectivement de 0,2 et 3,4 $m^2.g^{-1}$.
- La chalcopyrite est la phase majeure avec une concentration variant entre 70 et 80% selon la taille des particules (plus la proportion de particules fines est grande plus l'échantillon est concentré en chalcopyrite) et est la seule phase porteuse de cuivre dans les échantillons ;
- La teneur en pyrite est comprise entre 4 et 10% (augmentation de la teneur avec la taille des particules) et le reste de la gangue est constitué de phases silicatées ;
- La chalcopyrite et la pyrite contiennent la majorité du fer (au minimum 90% du fer total) ;

La méthodologie utilisée pour la préparation de l'inoculum consiste à repiquer successivement une culture du consortium en réacteur agité et aéré, sur un minerai contenant de la chalcopyrite (20%) et d'autres sulfures facilement oxydables, pour générer les substrats nécessaires à l'activité bactérienne et favoriser la croissance des microorganismes. Afin de toujours avoir à disposition un inoculum « actif » (dans lequel les bactéries oxydent le Fe^{2+} et le soufre dès le début de l'opération de biolixiviation), la durée des cultures est de 7 jours et correspond à un repiquage réalisé à la fin de la phase exponentielle de croissance et d'activité bactérienne. Un grand nombre d'inocula ayant été préparés au cours de la thèse (59), il a été possible de mener **une étude statistique sur la variabilité des caractéristiques de l'inoculum** (concentrations en cuivre, en fer, et en Fe^{3+}, biomasse, pH et potentiel redox) **au cours de sa préparation**. Cette étude a montré que malgré une **variation des principales caractéristiques liée à la variabilité intrinsèque du système**, la méthodologie permet in fine de limiter cette variabilité et d'obtenir une **bonne répétabilité de l'inoculum d'une culture à l'autre**.

Dans la partie suivante, l'**étude de l'effet de la taille des particules, et plus précisément de la proportion de particules fines (< 20 µm), sur la biolixiviation de la chalcopyrite** a démontré qu'une augmentation de proportion de 12 à 23% (en volume) a peu d'effet sur la dissolution et la passivation du minéral (augmentation du rendement de 11 à 21% et passivation en 24h pour ces proportions). Il en est de même pour la croissance et l'activité bactérienne. En revanche, **pour une proportion supérieure à 90% (en volume) et un d_{50} d'environ 5 µm, l'oxydation de la chalcopyrite est plus rapide** (rendement final 5 fois plus élevé). Cela s'explique d'une part par une surface spécifique initiale beaucoup plus élevée, favorisant la dissolution du minéral, et, d'autre part, par la bio-oxydation rapide du Fe^{2+} telle que le Fe^{3+} n'est pas limitant pour l'oxydation de la chalcopyrite. Dans ces conditions, le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} reste plus longtemps à une valeur favorable à la dissolution de la chalcopyrite (i.e. inférieure à environ 640mV vs SHE), retardant ainsi la passivation du minéral.

A l'inverse de ce qui est parfois supposé dans la littérature, **dans le cas de la biolixiviation d'un minerai sulfuré avec des bactéries thermophiles modérées ou mésophiles, nous avons pu montrer que les particules fines n'inhibent ni la croissance, ni l'activité bactérienne, mais au contraire les améliorent.** Ainsi, une quantité plus élevée de Fe^{2+} et de S est produit grâce à la meilleure dissolution des sulfures, ce qui favorise l'activité ferro-oxydante et sulfo-oxydante des bactéries et la production d'énergie nécessaire au développement bactérien. Ces particules fines n'impactent pas non plus la composition

de la communauté bactérienne, mais pourrait influencer l'attachement des bactéries au solide via la surface disponible et la taille des particules par rapport à celle des microorganismes.

Pour une taille de particules comprise entre 20 et 100 µm, l'effet de la régulation du pH à 1,3 est négligeable sur la dissolution de la chalcopyrite par rapport à un essai non régulé (le rendement reste faible et la cinétique lente). La régulation n'a pas non plus d'effet notable sur la croissance, l'activité sulfo-oxydante et la composition de la communauté bactérienne. **En revanche, elle influence l'activité ferro-oxydante des bactéries**. En effet, la régulation maintien le pH à une valeur plus faible qu'en absence de régulation. Dans le cas de l'activité bactérienne ferro-oxydante, cela favorise l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+}, qui est ainsi plus rapide et susceptible d'entraîner une passivation plus précoce de la chalcopyrite (limite de passivation atteinte plus rapidement).

Comme déjà montré dans la littérature, les études de cette seconde partie soulignent le fait que lors de la biolixiviation de la chalcopyrite, une **oxydation rapide du Fe^{2+} en Fe^{3+} n'est favorable à la dissolution du minéral que lorsque le ratio Fe^{3+}/Fe^{2+} (ou potentiel redox) peut être maintenu en dessous de la limite de passivation.**

Dans une dernière partie, les phénomènes physiques, chimiques et biologiques ayant lieu en biolixiviation attritive ont été étudiés afin de comprendre **l'influence de la présence d'un média broyant (billes) sur la dissolution de la chalcopyrite et sur la communauté bactérienne**. L'utilisation de billes lors de la lixiviation abiotique ou biotique de la chalcopyrite induit un effet de broyage et d'attrition des particules permettant d'une part la réduction de la taille des particules, et d'autre part de maintenir une surface réactive du minéral, soit **d'atténuer, voire d'éviter la passivation de la chalcopyrite selon la quantité de billes utilisée** (l'effet de la passivation diminue avec l'augmentation de la quantité de billes). Cela se traduit par une dissolution plus rapide du cuivre qu'en lixiviation ou biolixiviation conventionnelle en réacteur agité sans média broyant, même pour des potentiels redox (ou ratio Fe^{3+}/Fe^{2+}) supérieurs à la limite de passivation.

En conditions biotiques, un ratio massique bille/chalcopyrite de 0,8 $g.g^{-1}$ (250 g de billes, taux de solide à 10% (m/m)) inhibe la croissance et l'activité bactérienne, probablement du fait de trop fortes contraintes mécaniques et hydrodynamiques générées. La dissolution de la chalcopyrite peut alors être assimilée à une dissolution en conditions abiotiques. Pour **un ratio de 1,6 $g.g^{-1}$ (250 g de billes, taux de solide à 5% (m/m)),** l'attrition n'est pas suffisante pour éviter la passivation du minéral, mais atténue son effet (« passivation partielle »), et **permet la croissance et l'activité bactérienne après un temps de latence.** L'activité ferro-oxydante des bactéries permet notamment une **dissolution plus rapide de la chalcopyrite qu'en conditions abiotiques**, avant passivation partielle du minéral, tandis que l'activité sulfo-oxydante permet de réduire la consommation en acide utilisé pour le maintien d'un pH favorable à l'activité et au développement bactérien et limitant la précipitation des métaux en solution. La quantité de billes, mais aussi la concentration en solide, sont donc des paramètres importants conditionnant d'un côté la dissolution de la chalcopyrite, et de l'autre la croissance et l'activité bactérienne.

Par ailleurs, **la présence des billes dans le réacteur n'a pas le même impact selon l'espèce bactérienne, et plus précisément selon les propriétés et la localisation de chaque espèce**. Ainsi, la capacité des espèces du genre *Sulfobacillus* (ferro- et sulfo-oxydante) à sporuler leur confère probablement une résistance plus élevée à l'environnement attritif induit par le média broyant, leur permettant de persister dans le système tout au long d'une opération de biolixiviation attritive. Au contraire, le développement de l'espèce *L. ferriphilum* (ferro-oxydante), qui est probablement davantage localisée à la surface des particules, est inhibé ou au moins limité. L'espèce *'F. caldus'* (sulfo-

oxydante) est quant à elle capable de s'adapter aux conditions opératoires et de se développe après une phase de latence.

Les résultats obtenus à la suite du repiquage d'un essai de biolixiviation attritive ont également montré que la divergence de l'effet de l'attrition en fonction de l'espèce bactérienne est susceptible d'entraîner un changement de la communauté bactérienne dans le cas de repiquages successifs, notamment avec la disparition progressive de l'espèce ferro-oxydante *L. ferriphilum*. La diminution de la proportion de cette espèce pourrait être à l'origine d'une activité ferro-oxydante plus faible conduisant à une diminution de la vitesse d'oxydation de la chalcopyrite après seulement un repiquage. Au contraire, l'activité sulfo-oxydante des bactéries semble améliorée lorsque ces microorganismes ont préalablement été exposés à l'attrition. **Le repiquage d'un essai de biolixiviation n'a donc pas permis d'adapter l'ensemble du consortium bactérien aux conditions opératoires**. Par ailleurs, il est également possible qu'à la suite d'un repiquage, la quantité de bactéries, en particulier ferro-oxydantes (*L. ferriphilum*), présentes à la surface des particules (bactéries sessiles) diminue. Cela pourrait participer à la dégradation de la vitesse de dissolution de la chalcopyrite.

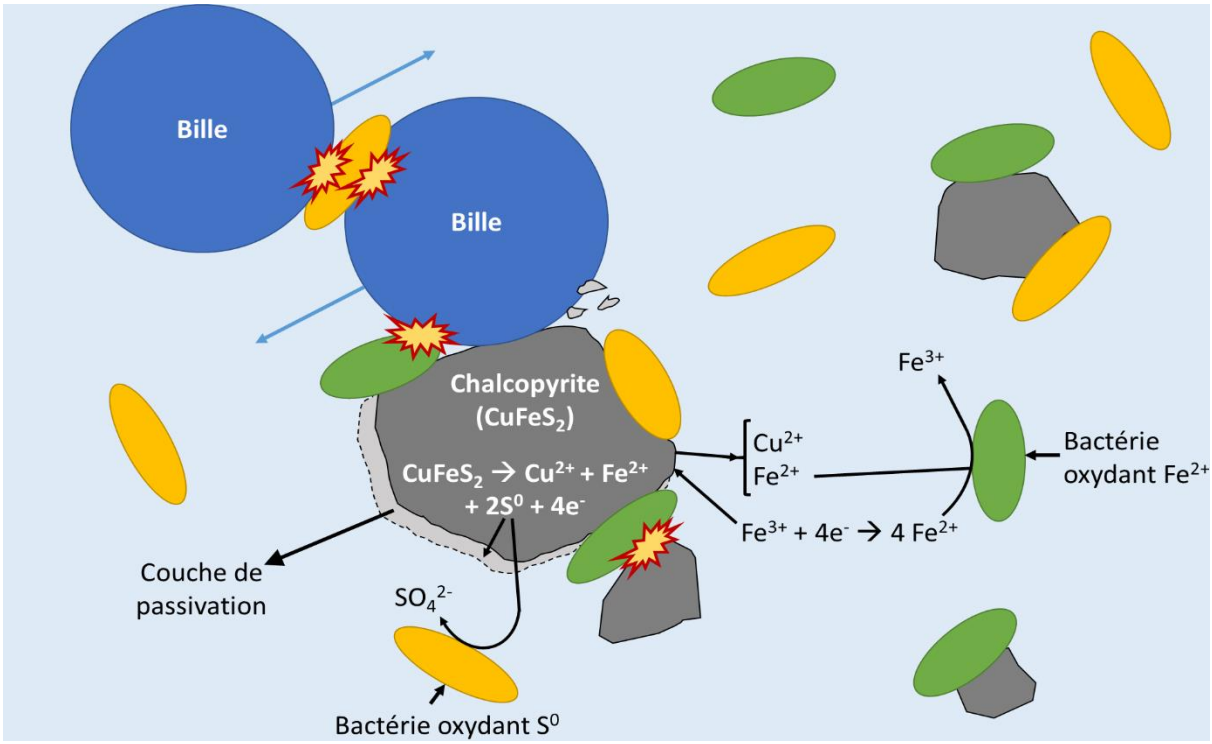


Figure 99 – Schéma récapitulatif de la biolixiviation attritive dans le cas d'une passivation partielle de la chalcopyrite.

Nos travaux ont donc permis de démontrer que le procédé de biolixiviation attritive présente des effets bénéfiques pour la dissolution de la chalcopyrite par voie hydrométallurgique, principalement du fait de l'accélération de la dissolution du cuivre à une certaine phase du processus. Toutefois, l'optimisation des paramètres opératoires reste amplement nécessaire afin de permettre à la fois la croissance et l'activité bactérienne tout en empêchant la passivation de la chalcopyrite et en limitant potentiellement la lyse des cellules sessiles. D'autre part, trouver une méthode permettant l'adaptation préalable des bactéries aux conditions opératoires pourrait s'avérer avantageux si elle permet d'optimiser la croissance et l'activité bactérienne (diminution du temps de latence, oxydation rapide du Fe^{2+} et du soufre) pour une meilleure dissolution de la chalcopyrite. Dans le cas où un point de fonctionnement optimal serait atteint, le procédé de biolixiviation attritive pourrait être une solution prometteuse pour la résolution du problème de passivation de la chalcopyrite.

L'ensemble des études réalisées dans le cadre de cette thèse met en lumière certains axes de recherches qu'il serait intéressant de mener ou d'approfondir :

- En pratique, l'adaptation des bactéries aux conditions opératoires nécessite de réaliser plusieurs repiquages afin d'améliorer les performances d'un consortium bactérien. Etudier le comportement du consortium (en particulier l'activité ferro-oxydante en fonction de la composition de la communauté bactérienne) suite à des repiquages successifs permettrait de déterminer si cette méthode ne permet effectivement pas d'obtenir de meilleurs rendements et une cinétique de dissolution plus rapide de la chalcopyrite.
- Une alternative aux repiquages serait de passer d'une opération en batch à une opération en continu. Cela permettrait en particulier de s'affranchr de la phase de latence en conservant dans le système des bactéries actives et qui se développent malgré l'environnement attritif. Il n'y aurait ainsi pas de limitation de l'oxydation de la chalcopyrite par le Fe^{3+}.
- Il est également commun d'adapter des microorganismes aux conditions opératoires en modifiant progressivement le paramètre induisant un effet défavorable sur la croissance et l'activité microbienne. Cette méthode pourrait être testée pour l'adaptation des bactéries aux contraintes induites par la présence de billes, en augmentant progressivement l'intensité de l'attrition (augmentation du taux de solide ou de la quantité de billes) à chaque repiquage ou au cours d'une opération de biolixiviation attritive en continu.
- Dans des conditions abiotiques, il a été montré qu'une quantité de 1 kg (soit une masse 4 fois plus élevée que celle utilisée lors de nos essais de biolixiviation attritive) permet une dissolution rapide, voire optimale, de la chalcopyrite à un potentiel redox élevé (700 mV vs. SHE). Toutefois en conditions biotiques, cette quantité de billes pourrait inhiber la croissance et l'activité bactérienne, notamment par la lyse des cellules. L'influence des paramètres opératoires, qui conditionnent l'attrition, en particulier la quantité de billes, sur les performances du procédé de biolixiviation attritive a donc besoin d'être davantage étudiée.
- Le rôle des bactéries sessiles sur la cinétique de dissolution de la chalcopyrite en biolixiviation attritive a également besoin d'être étudié afin de mieux identifier les paramètres opératoires majeurs à optimiser dans ce procédé.
- L'influence de la taille des particules sur l'attachement des bactéries au solide est un aussi sujet de recherche qui reste à approfondir et qui permettrait de mieux comprendre l'effet de cet attachement sur la dissolution des sulfures et de compléter les informations disponibles dans la littérature à ce sujet. Ceci pourrait également permettre de mieux comprendre et mieux piloter le procédé de biolixivation attritive.
- Il serait également intéressant de réaliser des essais de biolixiviation attritive avec d'autres espèces microbiennes, présentant des capacités d'oxydation du Fe^{2+} et/ou du soufre et une affinité pour le solide (attachement aux particules) différentes, et de comparer leur résistance à l'environnement attritif, ainsi que les performances de dissolution de la chalcopyrite obtenues avec ces espèces.
- Il a été montré qu'en présence d'un milieu nutritif (présence de monocations, en particulier K^+ et NH_4^+) plusieurs phases de jarosite peuvent être formées. En absence de nutriments, d'autres phases de jarosite pourraient être formées selon la composition du milieu. Or la précipitation de la jarosite présente des enjeux importants vis-à-vis de la passivation de la chalcopyrite, mais aussi de la disponibilité de l'oxydant (Fe^{3+}). Une étude approfondie sur la précipitation du fer en fonction des conditions de lixiviation permettrait ainsi une meilleure compréhension et un contrôle plus efficace de l'ensemble des phénomènes chimiques ayant lieu.

- L'étude de l'ensemble des mécanismes de passivation de la chalcopyrite en biolixiviation attritive présente également un intérêt pour la compréhension et l'optimisation de ce procédé hybride.
- Lors des cultures de l'inoculum, il est possible qu'une partie du fer en solution précipite, notamment en raison d'une grande concentration en sulfate issu de la bio-oxydation des intermédiaires soufrés réduits issus de l'oxydation des sulfures. Ce phénomène n'a pas été étudié dans le cadre de l'étude de répétabilité, et pourrait contribuer à la variabilité de l'inoculum. Il pourrait donc constituer un axe d'étude à approfondir. Cette étude pourrait aussi être affinée via l'analyse de paramètres plus précis (historique de l'inoculum de chaque culture par exemple) par une approche de type « data mining ». D'autre part, peu d'études ont été réalisées sur la répétabilité d'un inoculum préparé selon un protocole précis. Les résultats obtenus dans cette première partie donnent ainsi un ordre de grandeur possible sur la variabilité d'un inoculum, d'une culture à l'autre, mais celle-ci pourrait varier selon la méthodologie adoptée et les conditions opératoires appliquées.
- Enfin, les conditions opératoires en biolixiviation, notamment la taille des particules et la concentration en solide, peuvent affecter la précision des mesures de biomasse. Afin de déterminer le biais induit par ces conditions, une évaluation plus précise de l'influence des conditions opératoires sur la mesure de biomasse en fonction de la méthode de mesure est nécessaire et permettrait une analyse et une interprétation des résultats plus précises.

Annexes

Annexe 1

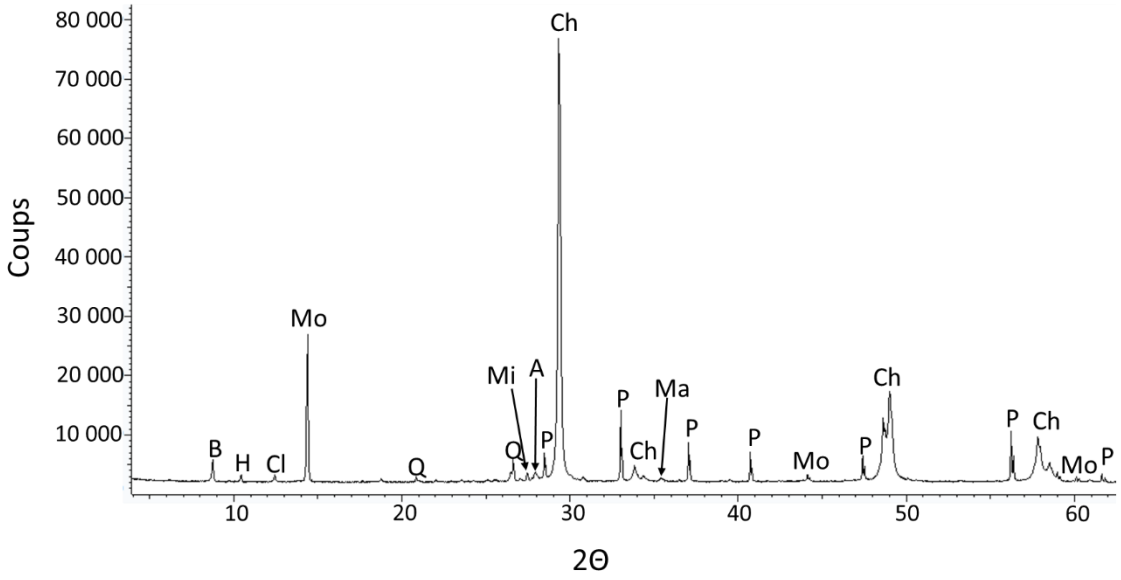


Figure 100 - Diffractogramme du Lots n°1 de concentré de chalcopyrite. A : Albite, B : Biotite, Ch : Chalcopyrite, Cl : Chlorite, H : Hornblende, Ma : Magnétite, Mi : Microcline, Mo : Molybdénite, P : Pyrite, Q : Quartz.

Tableau 24 - Concentrations (% (m/m)) en chalcopyrite, molybdénite et pyrite calculées à partir de la composition chimique des lots de concentré de chalcopyrite, et proportion du fer contenu dans les sulfures ($Fe_{sulfures}$) par rapport au fer total (Fe_{tot}).

Echantillons	Chalcopyrite	Molybdénite	Pyrite	$Fe_{sulfures}/Fe_{tot}$
Lot n°1	70,4	0,2	13,4	94 %

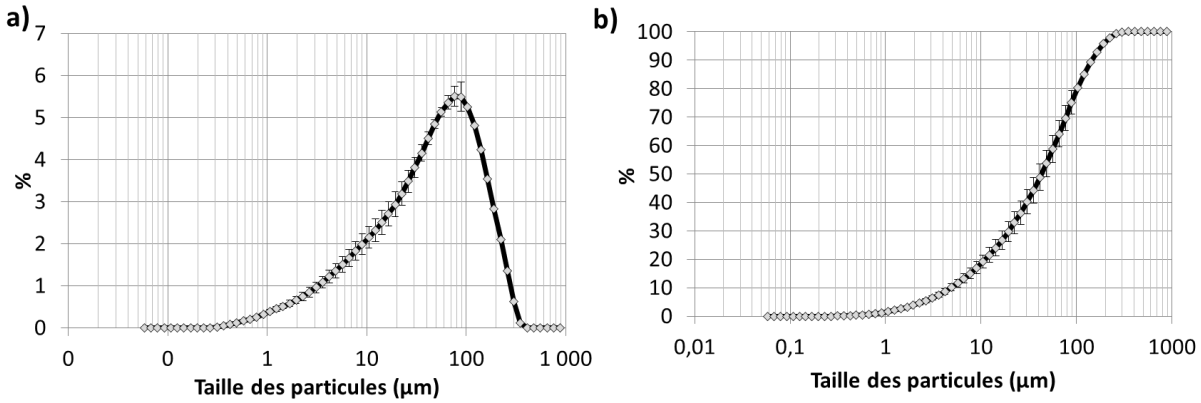


Figure 101 - Distribution (a) et distribution cumulée (b) de la taille des particules au sein du Lot n°1 de concentré brut de chalcopyrite.

Tableau 25 - Compositions chimiques (en % (m/m)) des fractions granulométriques issues du lot n°1 déterminées par analyses chimiques (voir Chapitre II section 4.2.1). *concentration en soufre mesurée par analyse ME-ICPORE au lieu de l'analyse ME-IR08 par manque d'échantillon. NA : non-analysé. S_{SO4} : soufre correspondant aux sulfates, $S_{sulfures}$: soufre correspondant aux sulfures.

Tailles des particules	Fe	Cu	S_{total}	S_{SO4}	$S_{sulfures}$	Al	K	Mo
> 160 µm	26,7	19,7	30,1	0,31	27,7	1,83	0,91	0,03
100 – 160 µm	27,7	21	29,7*	0,18	29,5	1,46	0,74	0,10
63 – 100 µm	29,6	21,5	33	0,20	30,9	1,14	0,56	0,20
40 – 63 µm	30,3	22,9	33,1	0,17	32,4	0,96	0,44	0,21
20- 40 µm	31	25,9	35,1	0,13	33,8	0,51	0,21	0,22
< 20 µm	29,1	28,5	32,2*	0,40	NA	0,42	0,19	0,19

Tableau 26 - Concentrations (% (m/m)) en chalcopyrite, molybdénite et pyrite calculées à partir des compositions chimiques des fractions granulométriques issues du lot n°1, proportions massiques, et proportions du fer contenu dans les sulfures ($Fe_{sulfures}$) par rapport au fer total (Fe_{tot}) de chaque fraction granulométrique.*Valeur calculée à partir de la concentration en soufre total moins la concentration en soufre correspondant aux sulfates et non à partir de la concentration en soufre correspondant aux sulfures.

Echantillons	Chalcopyrite	Molybdénite	Pyrite	% masse	$Fe_{sulfures}/Fe_{tot}$
> 160 µm	56,9	0,1	14,5	10,8	90%
100 – 160 µm	60,7	0,2	15,3	23,1	92%
63 – 100 µm	62,1	0,3	16,9	16,4	90%
40 – 63 µm	66,2	0,4	17,0	11,1	92%
20 - 40 µm	74,8	0,4	13,9	16,5	94%
< 20 µm	82,4	0,3	5,3*	22,2	96%

Annexe 2

La composition bactérienne du consortium AKL a été déterminée par analyse CE-SSCP (Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformational Polymorphism). Comme pour l'analyse T-RFLP, cette méthode permet d'obtenir des profils de diversité en ciblant le gène codant l'ARNr 16S.

Lors de cette analyse, un fragment de 200 pb du gène de l'ARNr 16S contenu dans l'ADN extrait est amplifié par PCR dans un thermocycleur (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad) en utilisant les amorces w49 et w34-FAM (Tableau 27) contenues dans un mélange réactionnel composé de 12,2 µL d'eau, 4 µL de TP 5x, 2 µL de $MgCl_2$, 0,2 µL de dNTP et 0,2 µL de GOTaq polymérase, auquel est ajouté 1 µL d'ADN extrait. Puis, le produit PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pour vérifier la qualité de l'amplification. Les échantillons sont ensuite préparés pour l'analyse en mélangeant 1 µL de produit PCR dilué 5 à 200 fois avec 0,4 µL d'ADN standard Genescan-600 LIZ (Applied Biosystems) et 18,6 µL de formamide HiDi (Applied Biosystems). Les ADN sont ensuite dénaturés à 95 °C pendant 5 min, puis immédiatement refroidit à 10°C et maintenu à cette température pendant 10 min. L'analyse des fragments d'ADN a été réalisée à l'aide d'un analyseur génétique ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Tableau 27 – Amorces et programme d'amplification utilisés lors de l'étape d'amplification de l'ADN par PCR pour l'analyse CE-SSCP.

	Amorces	Programmes d'amplification
CE-SSCP	w49 (0,2 µL) w34 FAM (0,2 µL) 0,5µM chacune	2 min à 95°C – 28 cycles: 30s à 95°C; 30s à 61°C; 30s à 72°C – 5 min à 72°C

Le profil de diversité obtenu pour le consortium AKL est présenté sur la Figure 102.

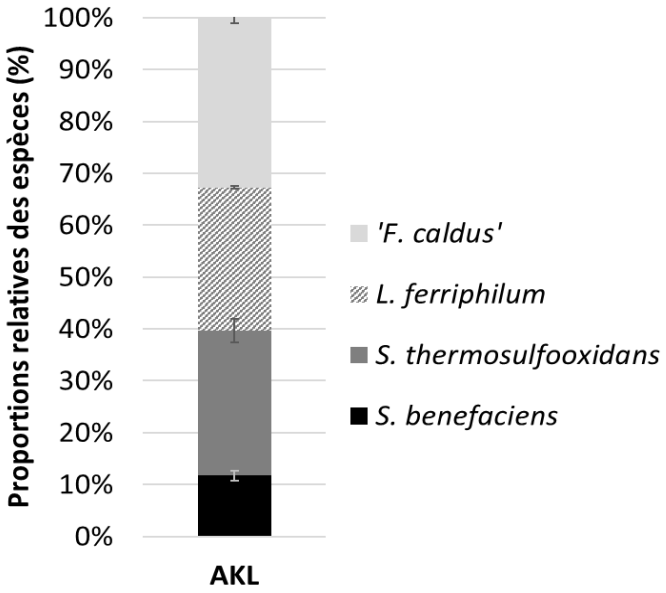


Figure 102 – Proportions relatives des espèces présentes dans le consortium AKL

Le consortium AKL est principalement composé des espèces *L. ferriphilum*, 'F. caldus', *S. thermosulfidooxidans* (espèces dominantes) et dans une moindre mesure de l'espèce *S. benefaciens*.

Annexe 3

Tableau 28 - Liste des phases présentes dans le concentré de Lubin dont la concentration a été déterminé par quantification par diffractométrie de rayons X (DRX) ou par analyse de la libération minérale (MLA). Les phases sont listées par ordre d'abondance relative (Rahfeld et al., 2018)

Groupe	Minéraux	Formule chimique	Teneur (%m/m)
Quartz	Quartz	SiO_2	DRX : 7,9 ± 0,1 MLA : 5,7 ± 0,1
Silicates	Mica blanc Chlorite Kaolinite Dickite	$KAl_2(Si_3Al)O_{10}(OH,F)_2$ $(Mg,Fe)_5Al(Si_3Al)O_{10}(OH)_8$ $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ $Al_2Si_2O_5(OH)_4$	DRX : 17,2 ± 0,6 MLA : 27,1 ± 0,3
Carbonates	Dolomite Calcite Ankerite	$CaMg(CO_3)_2$; $Ca(Ca_{0.08}Mg_{0.92})(CO_3)_2)$ $CaCO_3$ $Ca(FeMg)(CO_3)_2$	DRX : 13,2 ± 1,1 MLA : 11,7 ± 0,2
Minéraux porteur de cuivre	Chalcocite Djurleite Digenite Chalcopyrite Azurite Tennantite Bornite Roxbyite Covellite Atacamite Malachite	Cu_2S $Cu_{31}S_{16}$ Cu_9S_5 $CuFeS_2$ $Cu_3(CO_3)_2(OH)_2$ $Cu_{12}As_4S_{13}$ Cu_5FeS_4 $Cu_{1.78}S$ CuS $Cu_2Cl(OH)_3$ $Cu_2CO_3(OH)_2$	DRX : 24,8 ± 0,8 MLA : 31,7 ± 0,6
Autres sulfures	Pyrite Spharélite Galène Marcasite	FeS_2 ZnS PbS FeS_2	DRX : 13,3 ± 0,6 MLA : 20,5 ± 0,3 Pyrite : 15 %m/m
Minéraux secondaires	Albite Orthose Anhydrite Anglésite Célestine Enargite Titanite Zircon Microcline Barite Gypse Apatite Rutile/Anatase (Ni-)Cobaltite Stromeyerite Cerussite	$NaAlSi_3O_8$ $KAlSi_3O_8$ $CaSO_4$ $PbSO_4$ $SrSO_4$ Cu_3AsS_4 $CaTiSiO_5$ $ZrSiO_4$ $KAlSi_3O_8$ $BaSO_4$ $CaSO_4*2(H_2O)$ $Ca_5(PO_4)_3OH/Cl$ TiO_2 $(Co,Ni)AsS$ $AgCuS$ $PbCO_3$	DRX : 19,8 ± 1,5 MLA : 3,4 ± 0,3

Annexe 4

Incertitude de mesure de la concentration C_{ech} en cuivre et en fer

La concentration en cuivre et en fer en solution lors des cultures de l'inoculum résultent d'une mesure de concentration C_{SAA} par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) selon le protocole expérimental décrit par la Figure 103.

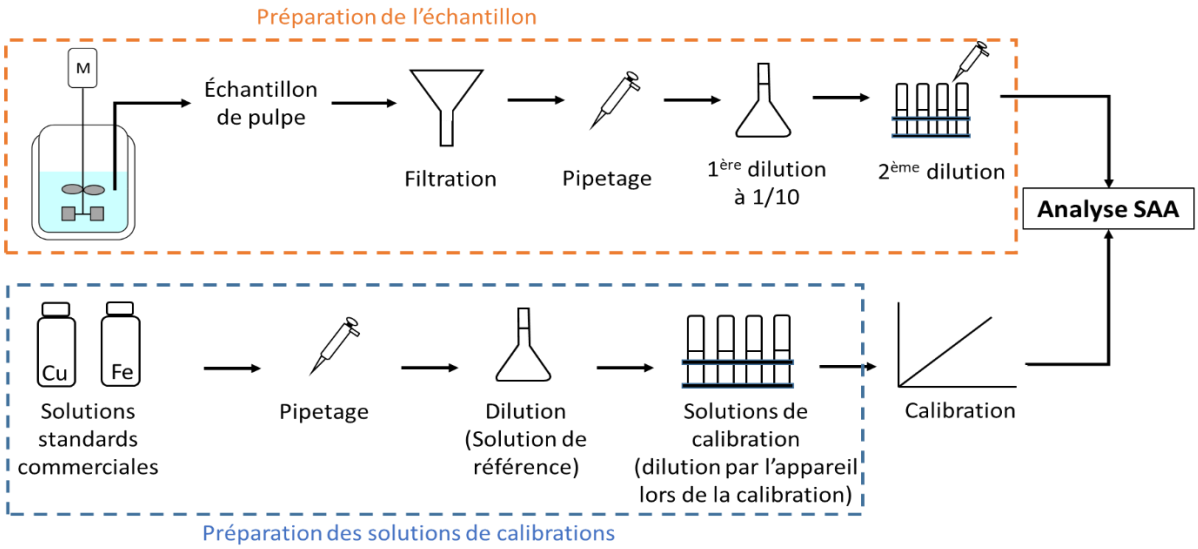


Figure 103 - Protocole de mesure de concentration par analyse SAA.

Cette procédure nécessite un protocole de calibrage de l'appareil de mesure et un protocole de préparation de l'échantillon d'inoculum pour l'analyse. Le réacteur dans lequel s'effectue le prélèvement est agité si bien que la variabilité liée au prélèvement de l'échantillon par pipetage est négligée.

La préparation de l'échantillon est décrite dans la partie 4.1 du chapitre II. La calibration de l'appareil est réalisée à partir de l'analyse de 4 solutions de calibration de concentration en cuivre et fer de 5, 10, 15 et 20 mg.L^{-1}. Les 3 premières concentrations sont préparées par dilution d'une solution de référence à 20 mg.L^{-1} en cuivre et en fer, elle-même obtenue par dilution de solutions standards commerciales de ces éléments à 1000 mg.L^{-1}. Les dilutions sont réalisées avec une solution d'acide nitrique (HNO_3) à 1% par l'appareil d'analyse lors de la calibration (préparation des solutions de calibration), ou dans une fiole jaugée (préparation de la solution de référence). Une solution de HNO_3 (1%) a également été utilisée en tant que blanc pour la calibration de l'appareil à 0 mg.L^{-1}.

D'après la procédure d'analyse (Figure 103), la concentration C_{ech} en cuivre ou en fer de la solution (en mg.L^{-1}) peut être décrite selon l'équation [89] en fonction du volume V_{ech} de l'échantillon, du volume V_{dil} après dilution, du facteur de dilution automatique du spectromètre d'absorption atomique f_{SAA} (égal à 1 si cette dilution n'a pas lieu) et de la concentration C_{SAA} en cuivre ou en fer (en mg.L^{-1}) mesurée par SAA.

$$C_{ech} = \frac{V_{dil}}{V_{ech}} f_{SAA} C_{SAA} \qquad [89]$$

La valeur de la concentration C_{SAA} s'obtient en convertissant la mesure d'absorption atomique en concentration au moyen de la courbe d'étalonnage du spectromètre d'absorption atomique.

La section suivante présente l'incertitude des variables de [89 pour arriver à l'incertitude de C_{SAA}.

- *Erreur de pipetage du volume d'échantillon à diluer* V_{ech}

Le volume d'échantillon à diluer est prélevé par pipetage avec des micropipettes de classe A de capacité 20-200 µL, 100-1000 µL et 500-5000 µL selon les dilutions à réaliser. Les incertitudes de cette mesure proviennent de la tolérance de la pipette, de la linéarité de la graduation, de la répétabilité du pipetage, et de la dilatation du liquide (supposée similaire à de l'eau) par variation de température (± 3°C). L'erreur relative de mesure $\Delta V_{ech}/V_{ech}$ est de 2,2% pour les volumes prélevés.

En supposant que la mesure du volume de pipetage suit une distribution uniforme, alors la variance du volume de pipetage s'écrit :

$$\sigma^2(V_{ech}) = \frac{(\Delta V_{ech})^2}{3} \qquad [90]$$

- *Erreur du volume de dilution manuelle* V_{dil}

Dans la procédure présentée sur la Figure 103, les dilutions ont été réalisées dans des fioles jaugées de classe A ou par pipetage dans des tubes de 5 mL (pipetage d'un volume d'échantillon et d'un volume de HNO_3 (1%)).

Dans le premier cas, les incertitudes proviennent de la tolérance de la fiole utilisée (± 0,04 pour une fiole de 25 mL), de l'opérateur (visualisation du niveau par rapport à la marque), qui est estimée à une goutte de liquide (± 0,05 mL), de la dilatation du liquide par variation de température (± 3°C), et du pipetage de l'échantillon à diluer. La dilution en fiole jaugée de 25 mL correspond à la première dilution au 1/10 au cours de la préparation de l'échantillon (Figure 103). Le Tableau 29 indique l'erreur obtenue pour cette dilution avec le volume de l'échantillon pipeté et le volume de dilution (volume obtenu après dilution).

Tableau 29 – Erreur associée à la dilution réalisée dans une fiole jaugé de 25 mL.

Facteur de dilution	10
Volume de l'échantillon à diluer pipeté (mL)	2,5
Volume de dilution (mL)	25
Erreur relative $\Delta V_{dil}/V_{dil}$ (%)	2,2

Les dilutions par pipetage (2ème dilution dans la partie préparation des échantillons (Figure 103) sont réalisées à partir de l'échantillon dilué au 1/10 dans une fiole jaugée de 25 mL. Au cours des cultures, selon le moment de prélèvement, les concentrations en cuivre et en fer attendues sont plus ou moins élevées. Trois facteurs finaux de dilution (200, 500 et 1000) ont donc été appliqués. Une dilution intermédiaire par 500 a été réalisée pour toute dilution par 1000. Le Tableau 30 résume les erreurs de mesure en fonction du facteur de dilution final appliqué en prenant en compte les erreurs liées à la dilution par 10 dans la fiole jaugée et aux pipetages.

Tableau 30 - Erreur sur le volume de dilution en fonction du facteur de dilution final obtenu suite à la seconde dilution lors de la préparation des échantillons (Figure 103).

Facteur de dilution final	200	500	1000
Facteur de la dilution intermédiaire	10	10	10 puis 500
Volume d'échantillon pipeté (mL)	0,25	0,1	2,5
Volume de dilution (mL)	5	5	5
Erreur relative $\Delta V_{dil}/V_{dil}$ (%)	3,3	3,3	3,8

Comme précédemment, nous supposons que la mesure du volume de dilution suit une distribution uniforme, d'où l'expression de sa variance à partir de son erreur :

$$\sigma^2(V_{dil}) = \frac{(\Delta V_{dil})^2}{3} \qquad [91]$$

- *Erreur du facteur de dilution automatique par l'appareil f_{SAA}*

Dans le cas où la concentration mesurée est au-dessus de la gamme de calibration, une dilution automatique est réalisée par l'appareil d'analyse. L'erreur relative sur le facteur de dilution est estimée à 2% par le constructeur.

Nous supposons ici aussi que le facteur de dilution suit une distribution uniforme, d'où l'expression de sa variance à partir de son erreur :

$$\sigma^2(f_{SAA}) = \frac{(\Delta f_{SAA})^2}{3} \qquad [92]$$

- Erreur de mesure de composition de la solution analysée C_{SAA}

Sur la gamme de concentration d'intérêt, l'étalonnage du spectromètre de masse, pour le Fe et le Cu, donne une erreur relative de mesure de concentration assimilable à une constante de valeur $\Delta C_{SAA}/C_{SAA}$ = 1%. On suppose que la mesure de concentration par SAA suit une distribution normale et que son incertitude est connue par la courbe d'étalonnage à une confiance de 99,73%, d'où :

$$\sigma^2(C_{SAA}) = \frac{(\Delta C_{SAA})^2}{9} \qquad [93]$$

Par propagation des variances des variables mesurées qui entrent dans l'équation [89], il vient la variance de la concentration C_{ech} de la solution en Fe et Cu, exprimées ici en termes des variables mesurées :

$$\begin{aligned}\sigma^2(C_{ech}) &= \left(\frac{V_{dil}}{V_{ech}} f_{SAA} C_{SAA}\right)^2 \times \left(\frac{\sigma^2(V_{ech})}{V_{ech}^{\,2}} + \frac{\sigma^2(V_{dil})}{V_{dil}^{\,2}} + \frac{\sigma^2(f_{SAA})}{f_{SAA}^{\,2}} + \frac{\sigma^2(C_{SAA})}{C_{SAA}^{\,2}}\right) \\ &= \left(\frac{V_{dil}}{V_{ech}} f_{SAA} C_{SAA}\right)^2 \times \left(\frac{(\Delta V_{ech})^2}{3V_{ech}^{\,2}} + \frac{(\Delta V_{dil})^2}{3V_{dil}^{\,2}} + \frac{(\Delta f_{SAA})^2}{3f_{SAA}^{\,2}} + \frac{(\Delta C_{SAA})^2}{9C_{SAA}^{\,2}}\right)\end{aligned} \qquad [94]$$

Où les erreurs des variables V_{ech}, V_{dil}, f_{SAA} et C_{SAA} sont celles des tableaux précédents.

L'[94 montre que la variance de la concentration n'est pas constante d'un essai à l'autre, puisque les valeurs des variables mesurées et celles de la variance de ces dernières, peuvent changer selon les protocoles expérimentaux. L'équation précédente de $\sigma^2(C_{ech})$ permet d'accéder à l'erreur ΔC_{ech}, elle-

même variable d'un essai à l'autre. Dans l'équation [95], l'erreur absolue est donnée à 95% de confiance en faisant une hypothèse de normalité :

$$\Delta(C_{ech}) = 1,96\left(\frac{V_{dil}}{V_{ech}} f_{SAA} C_{SAA}\right)\sqrt{\frac{\sigma^2(V_{ech})}{V_{ech}^{\ 2}} + \frac{\sigma^2(V_{dil})}{V_{dil}^{\ 2}} + \frac{\sigma^2(f_{SAA})}{f_{SAA}^{\ 2}} + \frac{\sigma^2(C_{SAA})}{C_{SAA}^{\ 2}}} \quad [95]$$

et l'erreur relative, à la même confiance de 95%, est :

$$\frac{\Delta(C_{ech})}{C_{ech}} = 1,96\sqrt{\frac{(\Delta V_{ech})^2}{3V_{ech}^{\ 2}} + \frac{(\Delta V_{dil})^2}{3V_{dil}^{\ 2}} + \frac{(\Delta f_{SAA})^2}{3\,f_{SAA}^{\ 2}} + \frac{(\Delta C_{SAA})^2}{9\,C_{SAA}^{\ 2}}} \quad [96]$$

L'erreur relative de la mesure de la concentration en cuivre et en fer est globalement de 5% au cours des essais.

La préparation des échantillons et des solutions de calibration sont similaires pour la technique d'analyse par spectrométrie d'émission atomique par plasma micro-ondes (MP-AES). Les erreurs sur les mesures de concentrations en cuivre et en fer obtenues par analyse MP-AES sont donc potentiellement au moins du même ordre de grandeur que celles calculées pour les mesures obtenues par SAA.

Incertitude de mesure de la biomasse

L'incertitude sur la mesure de la biomasse n'a été évaluée que pour celles réalisées par comptage au microscope optique, avec 5 min de décantation des échantillons de pulpe issu de cultures de l'inoculum.

Pour cela, deux échantillons ont été utilisés, l'un contenant en moyenne quatre fois plus de bactéries (comptées) que l'autre. Pour chaque échantillon, trois dépôts différents sur cellule de Thoma ont été réalisés, puis pour chaque dépôt quatre comptages ont été réalisés. Ces manipulations sont réalisées par un même opérateur. L'erreur pour chaque échantillon est considérée égale au rapport de l'écart-type sur la moyenne des comptages réalisés pour chaque échantillon (équation [97]).

$$erreur(biomasse) = \frac{écart - type(comptages)}{moyenne(comptages)} \quad [97]$$

Pour chaque échantillon, le Tableau 31 indique la moyenne, l'écart-type et l'erreur sur le comptage, que l'on supposera égale à l'incertitude sur la mesure de la biomasse.

Tableau 31 – Moyenne et écart-type du nombre de bactéries (cellules) comptées par comptage et erreur sur le comptage.

	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne (nombre de bactéries comptées)	28	88
Ecart-type (nombre de bactéries comptées)	8,9	10,2
Erreur (%)	32	12

Il est important de noter que l'incertitude lié à l'opérateur, qui n'a pas pu être calculée et prise en compte ici, pourrait être une composante non-négligeable de l'erreur globale. En effet, selon l'opérateur, plus ou moins de cellules sont comptés (le discernement des cellules et la distinction entre cellules et particules peut varier d'un opérateur à l'autre).

Annexe 5

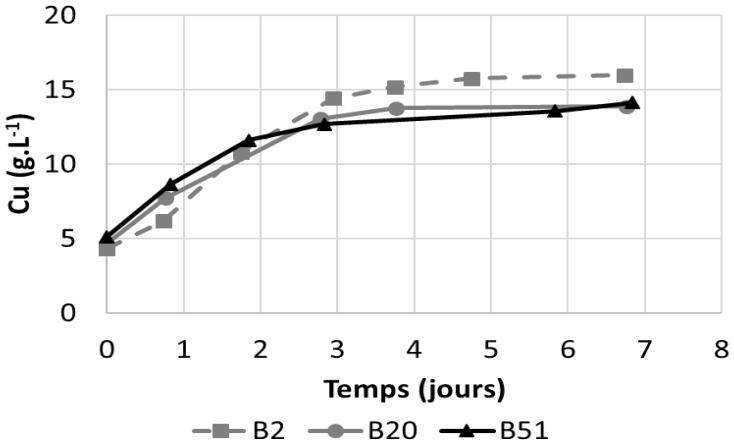


Figure 104 – Concentration en cuivre en fonction du temps au cours de trois cultures de l'inoculum (B2, B20 et B51). Les numéros correspondent aux numéros de la culture qui sont incrémentés de 1 à chaque repiquage.

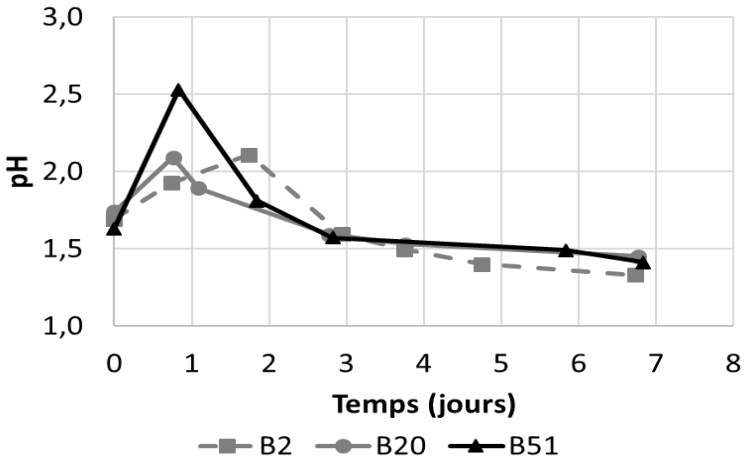


Figure 105 – pH en fonction du temps au cours de trois cultures de l'inoculum (B2, B20 et B51). Les numéros correspondent aux numéros de la culture qui sont incrémentés de 1 à chaque repiquage.

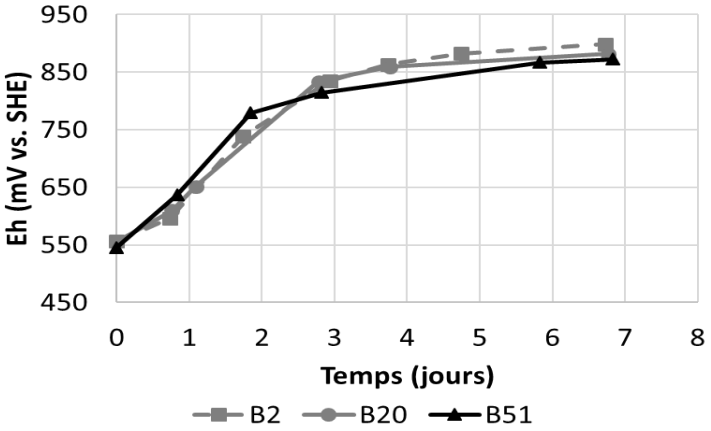


Figure 106 – Potentiel redox (Eh) en fonction du temps au cours de trois cultures de l'inoculum (B2, B20 et B51). Les numéros correspondent aux numéros de la culture qui sont incrémentés de 1 à chaque repiquage.

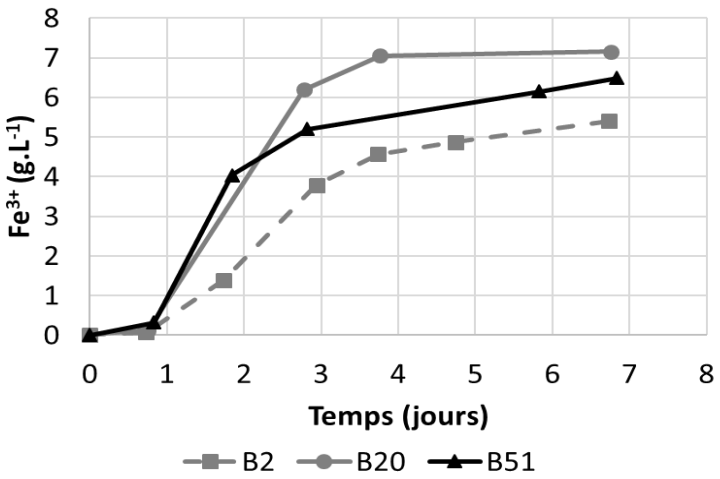


Figure 107 – Concentration en Fe^{3+} en fonction du temps au cours de trois cultures de l'inoculum (B2, B20 et B51). Les numéros correspondent aux numéros de la culture qui sont incrémentés de 1 à chaque repiquage.

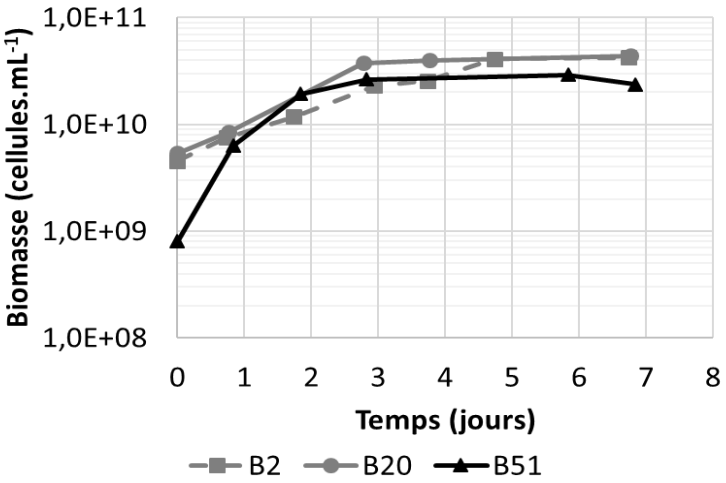


Figure 108 – Biomasse en fonction du temps au cours de trois cultures de l'inoculum (B2, B20 et B51). Les mesures de biomasse ont été réalisées sur le surnageant d'échantillons de pulpe obtenu après 5 min de décantation. Les numéros correspondent aux numéros de la culture qui sont incrémentés de 1 à chaque repiquage.

Annexe 6

Tableau 32 - Compositions chimiques (en % (m/m)) des résidus obtenus à la fin des essais de biolixiviation conventionnelle de chalcopyrite réalisés avec la fraction 20-100 µm, le concentré brut et la fraction < 20 µm (masses des résidus : 201 g, 191 et 158g respectivement). S_{total} : soufre total, S_{SO4} : soufre correspondant aux sulfates, $S_{sulfures}$: soufre correspondant aux sulfures, $S_{élémentaire}$: soufre élémentaire. NA : La quantité de fer dans cet échantillon n'a pas été déterminée.

Essais	Cu	Fe	K	Mo	S_{total}	S_{SO4}	$S_{sulfures}$	$S_{élémentaire}$
20-100 µm	23,5	24,6	1,1	0,2	25,9	0,6	25,5	0,2
Brut	22,4	NA	1,2	0,2	25,8	0,6	25,8	0,3
< 20 µm	17,9	23,5	1,3	0,3	22,2	3,4	17,2	0,8

Annexe 7

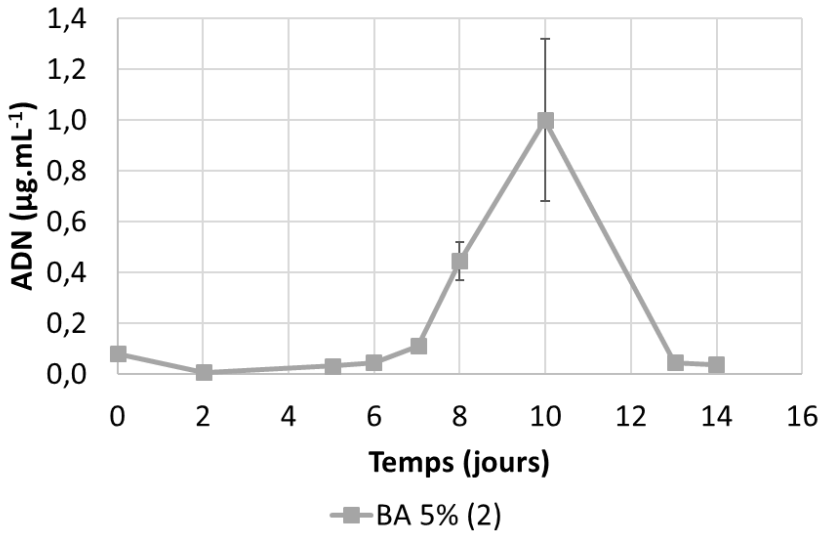


Figure 109 - Concentrations en ADN extrait en fonction du temps au cours de l'essai de biolixiviation attritive « BA 5% (2) ». L'ADN a été extrait à partir d'échantillons de pulpe.

Résumé

Dans le contexte de procédés dédiés à la récupération de métaux, la biolixiviation extractive, qui vise à dissoudre ou libérer les éléments métallifères contenus dans des minerais sulfurés à l'aide de microorganismes, présente de nombreux avantages dont la production des réactifs via l'activité microbienne. Cette technologie n'est cependant pas applicable pour l'extraction de cuivre à partir de chalcopyrite (principale ressource primaire de cuivre) du fait de phénomènes de passivation des surfaces des particules à lixivier. En parallèle, le procédé d'attrition lixiviante, qui consiste en l'abrasion *in situ* de couches de passivation par un média broyant (billes de taille millimétrique) en suspension dans le réacteur de lixiviation, accélère fortement la dissolution de la chalcopyrite. Le projet de thèse visait à évaluer les potentialités d'un nouveau concept de lixiviation hybride nommé « biolixiviation attritive », combinant les avantages de la biolixiviation et de l'attrition lixiviante. Plus spécifiquement, les objectifs étaient de caractériser les phénomènes induits par un tel couplage, dont en particulier la vitesse et la nature des réactions chimiques (dissolution, précipitation) ainsi que la croissance et l'activité bactérienne.

D'un point de vue méthodologique, la répétabilité du protocole de préparation de l'inoculum (solution contenant le consortium bactérien nécessitant une culture de 7 jours), très peu documentée jusqu'ici, a été démontrée. Puis, comme la présence du media broyant dans le réacteur induit une réduction rapide de la taille des particules, l'effet de la présence de particules fines sur la biolixiviation conventionnelle de la chalcopyrite a été considéré. Il s'est avéré qu'une proportion en particules fines (< 20 µm) supérieure à 90% améliore grandement le rendement de dissolution, mais n'empêche pas la passivation. Contrairement à ce qui est parfois avancé dans la littérature, les fines particules n'inhibent donc ni la croissance, ni l'activité de bactéries thermophiles modérés ou mésophiles, mais au contraire les favorisent, sans doute grâce à une plus forte teneur en fer ferreux et en soufre dans le milieu.

Des essais menés dans un réacteur de biolixiviation attritive de 2,7 L contenant 250 g de billes de verre ont ensuite été caractérisés. Pour un ratio initial bille/chalcopyrite de 0,8 $g.g^{-1}$, la croissance et l'activité bactérienne sont inhibées, du fait de trop fortes contraintes mécaniques et hydrodynamiques. En revanche, pour un ratio de 1,6 $g.g^{-1}$, la croissance et l'activité bactérienne ont été démontrées après un temps de latence. L'activité ferro-oxydante des bactéries induit alors une dissolution plus rapide qu'en conditions abiotiques tandis que l'activité sulfo-oxydante permet de réduire la consommation en acide. Un rendement de lixiviation du cuivre très élevé (80% en 14 jours contre 9% avec la biolixiviation conventionnelle) a ainsi été obtenu. Il a également été mis en évidence que l'effet des billes sur les espèces bactériennes diffère selon leurs propriétés et leur localisation. Ainsi, la capacité à sporuler des espèces du genre *Sulfobacillus* leur confère une résistance plus élevée à l'environnement attritif, tandis que le développement de l'espèce *Leptospirillum ferriphilum* (ferro-oxydante), davantage localisée à la surface des particules, est inhibé. L'espèce '*Fervidacidithiobacillus caldus*' (sulfo-oxydante) semble quant à elle capable de s'adapter aux conditions opératoires et se développe après une phase de latence.

La quantité de billes et la concentration en solide sont donc des paramètres majeurs conditionnant la dissolution de la chalcopyrite et l'exfoliation des couches de passivation, mais aussi la croissance et l'activité bactérienne. Les perspectives principales de ces travaux, en vue de mieux comprendre le procédé hybride de biolixiviation attritive, sont l'étude approfondie de l'effet de ces paramètres et la capacité d'adaptation des bactéries à l'environnement attritif.

Abstract

In the context of processes dedicated to metal recovery, extractive bioleaching, which aims at dissolving (or liberating) the metalliferous elements contained in sulfide ores using microorganisms, offers numerous advantages, including the production of reagents via microbial activity. However, this technology is not applicable to the extraction of copper from chalcopyrite (the main primary copper resource) due to passivation phenomena on the surfaces of the particles to be leached. At the same time, the attrition-leaching process, which consists in the in situ abrasion of passivation layers by a grinding media (millimeter-sized beads) suspended in the leaching reactor, greatly accelerates chalcopyrite dissolution. The aim of the thesis project was to evaluate the potential of a new hybrid leaching concept called "attrition-bioleaching", combining the advantages of bioleaching and attrition-leaching. More specifically, the objectives were to characterize the phenomena induced by such a coupling, including in particular the speed and nature of chemical reactions (dissolution, precipitation) as well as bacterial growth and activity.

From a methodological point of view, the repeatability of the protocol used to prepare the inoculum (solution containing the bacterial consortium requiring a 7-day culture), which is very little documented to date, was demonstrated. Then, as the presence of grinding media in the reactor causes a rapid reduction in particle size, the effect of the presence of fine particles on conventional chalcopyrite bioleaching was considered. It was found that a proportion of fine particles (< 20 µm) greater than 90% greatly improves dissolution yield, but does not prevent passivation. Contrary to what is sometimes claimed in the literature, fine particles therefore inhibit neither the growth nor the activity of moderate thermophilic or mesophilic bacteria, but on the contrary promote them, probably thanks to a higher ferrous iron and sulfur content in the medium.

Tests carried out in a 2.7 L attrition-bioleaching reactor containing 250 g of glass beads were then characterized. At an initial bead/chalcopyrite ratio of 0.8 $g.g^{-1}$, bacterial growth and activity were inhibited by excessive mechanical and hydrodynamic stress. On the other hand, for a ratio of 1.6 $g.g^{-1}$, growth and bacterial activity were demonstrated after a lag time. The bacteria's iron-oxidizing activity led to faster dissolution than under abiotic conditions, while their sulfur-oxidizing activity reduced acid consumption. A very high copper leaching efficiency (80% in 14 days versus 9% with conventional bioleaching) was thus obtained. It has also been shown that the effect of beads on bacterial species differs according to their properties and location. In that respect, species from the *Sulfobacillus* genus have a greater resistance to the conditions in the attrition-bioleaching reactor thanks to their ability to sporulate, while the growth of the *Leptospirillum ferriphilum* species (iron-oxidizing), which is more localized on the particle surface, is inhibited. The '*Fervidacidithiobacillus caldus*' species (sulfur-oxidizing) seems to be able to adapt to operating conditions, and grows after a latent phase.

The quantity of beads and the concentration of solids are therefore major parameters conditioning the dissolution of chalcopyrite and the exfoliation of passivation layers, on the one hand, and bacterial growth and activity, on the other. The main perspectives of this work, in order to better understand the hybrid attrition-bioleaching process, are the in-depth study of the effect of these parameters and the ability of bacteria to adapt to the conditions in the attrition-bioleaching reactor.