

R 1

Rp - 50210

DOCUMENT NUMÉRIQUE

Accès différé → 2003

*Étude de la biolixiviation de minerais sulfurés
dans une colonne à gaz et liquide porteurs*

novembre 2000
BRGM/RP-50210-FR



Mots clés : Colonne à gaz et liquide porteurs, Biolixiviation, Pyrite cobaltifère, Vitesse de libération du cobalt, Populations bactériennes mixtes, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Thiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, Biologie moléculaire.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Foucher S., Battaglia-Brunet F., avec la collaboration de D'Hugues P., Ignatiadis I. et Morin D. (2000) - Étude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs. BRGM/RP-50210-FR, 141 p., 61 fig., 18 tabl., 7 ann.

© BRGM, 2000, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

Dans le cadre du projet BIOPROC 2000, le BRGM a étudié la mise en œuvre de la biolixiviation de minerais sulfurés à l'aide d'un nouveau type de réacteur : la colonne à bulles ou encore colonne à gaz-liquide porteurs. Ce travail a aussi fait l'objet de travaux de caractérisation par biologie moléculaire des populations bactériennes mixtes utilisées pour les réactions de biolixiviation.

Sur la base de résultats préliminaires obtenus au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (ENSIC Nancy), un pilote de laboratoire a été conçu et monté dans la halle Procédés. L'objectif des expériences réalisées était de prouver la faisabilité de la biolixiviation dans ce type de réacteur. Le dispositif expérimental a fonctionné pendant quatre mois en mode discontinu. Dans un premier temps, des expériences dites en maquette froide ont permis de caractériser le réacteur en l'absence de réaction chimique ou biologique. Ensuite, plusieurs tests ont été réalisés en réacteur fermé avec variation des lots de pyrite, du taux de solide, du débit de gaz et du système de diffusion du gaz.

Les expériences en maquette froide dédiées à la caractérisation du réacteur en l'absence de réaction montrent que le liquide y circule comme dans un réacteur parfaitement agité. Aucune expérience n'a été entreprise pour déterminer le régime de fonctionnement du solide. Le volume occupé par le gaz ainsi que la perte de charge ont été mesurés pour différents débits gazeux. Enfin des expériences de mesure de concentrations en oxygène dissous lors de changement d'alimentation de gaz ont permis d'obtenir des ordres de grandeur du coefficient de transfert de matière en fonction de la vitesse superficielle de l'air.

Ensuite, quatre expériences de biolixiviation en mode discontinu ont été menées. Elles ont prouvé la faisabilité de la biolixiviation en réacteur fermé dans ce type de réacteur avec des rendements allant jusqu'à 90-95 % de libération du cobalt et d'oxydation du soufre. Il a été observé une augmentation de la vitesse de libération du cobalt lorsque la vitesse de gaz augmentait pour un même taux de solide. Une évolution de cette vitesse a été également enregistrée pour des taux de solide, des pourcentages de cobalt initiaux et des systèmes de diffusion du gaz différents.

Au cours de ces expériences, la composition de la population bactérienne permettant la biolixiviation de la pyrite cobaltifère a été suivie grâce à des techniques de biologie moléculaire. L'inventaire des espèces a révélé la présence de trois micro-organismes : *Leptospirillum ferrooxidans*, une souche apparentée à *Thiobacillus caldus*, et une bactérie apparentée à *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. L'évolution des proportions de ces trois espèces dans la phase liquide et sur la phase solide a été décrite grâce à la méthode SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). *L. ferrooxidans* et *T. caldus* sont toujours présents, et leur comportement global est reproductible au cours des batchs. Par contre, le développement de *Sulfobacillus* n'est pas toujours observé. Il semble être favorisé par l'utilisation du bio-réacteur colonne.

Sommaire

Introduction	7
1. Bibliographie	9
1.1. Introduction	9
1.2. Techniques de biolixiviation dynamique.....	10
1.2.1. Biolixiviation en réacteurs parfaitement agités (RPA).....	10
1.2.2. Les réacteurs air-lift.....	12
1.2.3. Les colonnes à bulles.....	14
1.3. Effet du taux de solide et de la concentration en oxygène	15
1.4. Conclusion	16
2. Matériel et méthodes	17
2.1. Inoculum.....	17
2.2. Dispositif expérimental.....	17
2.3. Conditions opératoires.....	19
2.3.1. Compositions.....	19
2.3.2. Conditions opératoires appliquées.....	21
2.4. Méthodes analytiques de suivi.....	22
2.5. Méthodes de suivi par analyse SSCP de l'évolution de la flore bactérienne.....	23
2.5.1. Inventaire moléculaire de la population bactérienne mixte.....	23
2.5.2. Principe de l'analyse SSCP	24
2.5.3. Stratégies d'amplification pour le séquençage et les analyses SSCP.....	25
2.5.4. Stabilisation des échantillons et extraction d'ADN total.....	26
2.6. Suivi de la population bactérienne par observation directe au microscope optique	30

3. Résultats	31
3.1. Introduction	31
3.2. Présentation des résultats en maquette froide	31
3.2.1. Hydrodynamique	31
3.2.2. Transfert de matière	35
3.3. Présentation des résultats du batch 2	37
3.3.1. Suivi des paramètres	37
3.3.2. Évolution des concentrations	39
3.3.3. Autres résultats	40
3.3.4. Suivi des populations bactériennes	41
3.4. Présentation des résultats du batch 3	46
3.4.1. Suivi des paramètres	46
3.4.2. Évolution des concentrations	49
3.4.3. Autres résultats	49
3.4.4. Suivi des populations bactériennes	52
3.5. Présentation des résultats du batch 4	57
3.5.1. Suivi des paramètres	57
3.5.2. Évolution des concentrations	59
3.5.3. Autres résultats	59
3.5.4. Suivi des populations bactériennes	61
3.6. Présentation des résultats du batch 5	65
3.6.1. Suivi des paramètres	65
3.6.2. Évolution des concentrations	67
3.6.3. Autres résultats	68
3.6.4. Suivi des populations bactériennes	69

3.7. Comparaison et synthèse des résultats.....	71
3.7.1. Rappel des principaux résultats.....	72
3.7.2. Obtention et comparaison des vitesses maximales de libération du cobalt.....	74
3.7.3. Suivi des populations bactériennes.....	76
Conclusion et perspectives	83
Bibliographie.....	85
Liste des figures	89
Liste des tableaux.....	92
Liste des annexes.....	93

Introduction

Depuis de nombreuses années maintenant, le BRGM travaille sur les bactéries liées au cycle du soufre et plus particulièrement sur celles capables de réaliser l'oxydation de ce dernier. La majeure partie des études entreprises dans ce domaine l'ont été dans le but de mettre au point des procédés dits de biolixiviation consistant à utiliser les capacités catalytiques de ces bactéries pour mettre en solution des métaux valorisables.

C'est notamment dans ce cadre qu'ont été menées des études de biolixiviation de minerais d'or réfractaires utilisant des populations bactériennes mésophiles (30-35 °C). En effet, il a été prouvé qu'une pré-étape de biolixiviation d'un minerai d'or réfractaire peut favoriser voire rendre possible la libération minérale du précieux métal. Voici une dizaine d'années, le même principe de biolixiviation a été envisagé sur un concentré de flottation de pyrite cobaltifère, provenant du site de Kasese en Ouganda, dans le but de récupérer le cobalt présent en forte teneur dans ce minerai (1,37 %). La recherche dans ce domaine s'est concentrée sur la définition et la mise au point d'un procédé en réacteur agité en vue de son application à l'échelle industrielle. Ces dernières années, la recherche du BRGM dans le domaine de la biolixiviation s'est principalement faite sur la définition d'un procédé innovant utilisant des bactéries thermophiles capables d'oxyder le principal porteur de cuivre dans les minerais de ce métal : la chalcopyrite.

Aujourd'hui, avec le retour de l'expérience industrielle sur le site de Kasese et grâce à l'émergence de nouvelles technologies dans le domaine de la biologie, la recherche s'est focalisée sur deux axes :

- la mise au point de procédés de biolixiviation dans une nouvelle configuration de réacteur,
- la caractérisation de la distribution des souches bactériennes qui composent les cultures mixtes utilisées.

Pour atteindre les objectifs fixés, une étude de biolixiviation de minerais sulfurés dans une **colonne à gaz et liquide porteurs** a été réalisée. L'un des buts de cette étude était de prouver la faisabilité de la biolixiviation dans ce type de réacteur qui pourrait trouver de nombreuses applications tant en biolixiviation des minerais qu'en traitement de décontamination de solide (sol ou sédiment pollué) grâce notamment à un excellent rapport efficacité/coût énergétique. L'autre but était de caractériser les populations mises en jeu. Pour ce faire, des prélèvements réguliers ont été effectués au cours des différentes expériences entreprises puis envoyés à une société sous-traitante BIO ID.

Le présent rapport présente en détail l'équipement utilisé ainsi que la méthodologie employée pour réaliser les expériences conduites sur une période de quatre mois, et enfin fournit l'essentiel des résultats acquis. Ces résultats constituent une première approche satisfaisante, mais restent à être confirmés et les expériences à être poursuivies pour atteindre les objectifs fixés.

1. Bibliographie

1.1. INTRODUCTION

La biolixiviation consiste à utiliser l'oxygène de l'air et des bactéries pour extraire des métaux dans leur forme élémentaire, emprisonnés dans les matrices sulfurées. Comme exemples de métaux de valeur présents dans des matrices sulfurées on peut citer l'or réfractaire dans la pyrite ou l'arsenopyrite (AsFeS_2), le cobalt et l'uranium dans la pyrite (FeS_2) ou bien présents sous forme de sulfure (le zinc dans la blende (ZnS), le cuivre dans la chalcopyrite (CuFeS_2). Ces bactéries sont en effet capables de catalyser l'oxydation du soufre des sulfures (*Thiobacillus thiooxidans*) mais également, pour certaines d'entre elles, le fer ferreux en fer ferrique (*Thiobacillus et Leptospirillum ferrooxidans*), lequel fer ferrique est en mesure d'oxyder chimiquement le soufre des sulfures, accélérant ainsi les étapes de libération métallique (Morin, 1995a).

Pour chaque minéral, la population bactérienne assurant la meilleure solubilisation des espèces est en fait une culture mixte contenant plusieurs espèces de bactéries en proportions différentes. Les rapports qualitatifs et quantitatifs entre les différentes espèces intervenant au cours de la biolixiviation sont encore mal connus mais tendent à être peu à peu décrits grâce à l'émergence de techniques nouvelles comme la biologie moléculaire. Il existe des bactéries dites mesophiles se développant entre 35 °C et 45 °C utilisées très souvent pour le traitement des minerais pyriteux et des bactéries thermophiles qui ont un optimum de croissance vers 70 °C récemment étudiées pour le traitement de la chalcopyrite (Barret *et al.*, 1994).

Il existe trois méthodes de mise en œuvre de la biolixiviation. La première consiste à déposer le minéral *en tas* sur des surfaces imperméabilisées aménagées pour recueillir les solutions de lixiviation et à arroser ce tas par pulvérisation de façon à favoriser l'oxygénation des solutions et l'activité bactérienne. Des conduites d'aération sont aussi disposées dans le minéral pour augmenter cette oxydation. Une autre méthode est le procédé *in situ* pour lequel le minéral est traité en place dans les couches géologiques elles-mêmes ; pour cela des galeries sont utilisées pour arroser les couches de minerais sous-jacentes et les métaux solubilisés recueillis dans les galeries inférieures. Enfin, la dernière méthode qui permet l'obtention de rendements de solubilisation très élevés dans des temps relativement courts, utilise des procédés dynamiques où le minéral préalablement broyé est mélangé avec la solution aqueuse pour faciliter le contact gaz-liquide-solide.

Plusieurs procédés dynamiques ont d'ores et déjà été testés à l'échelle pilote voire à l'échelle industrielle. Ces procédés diffèrent essentiellement par la conception des réacteurs à mettre en œuvre pour ce type d'opération : réacteur parfaitement agité, air-lift et colonnes à bulles. Cette variété de conception assure également la possibilité de tester et comparer l'influence de paramètres comme le taux de solide et la disponibilité de l'oxygène.

1.2. TECHNIQUES DE BIOLIXIVIATION DYNAMIQUE

1.2.1. Biolixiviation en réacteurs parfaitement agités (RPA)

Actuellement, ce type de procédé dynamique est le seul applicable à l'échelle industrielle. Les réacteurs utilisés en biolixiviation sont assez comparables à ceux utilisés dans les autres domaines de la biotechnologie.

Ces bio-réacteurs, à fond plat, sont équipés d'un arbre d'agitation portant un ou plusieurs mobiles d'agitation et sont munis de chicanes améliorant le mélange de la suspension. L'aération de la bio-pulpe est assurée par l'injection d'air comprimé en fond de cuve. Les méthodes de régulation de température sont classiques et dépendent des caractéristiques opérationnelles : serpentins, double enveloppe, échangeurs à plaques.

Dans ce type de réacteurs, l'agitation doit exercer à la fois, une action de pompage pour mettre en suspension les particules et assurer l'homogénéisation de la pulpe, et une action de cisaillement pour assurer la dispersion gazeuse dans le milieu de culture. Généralement, deux types de mobiles sont associés pour répondre à ces obligations (Leveau et Bouix, 1993) : un mobile radial en fond de réacteur pour le cisaillement et un mobile axial en milieu de réacteur pour le pompage. Des études spécifiques ont été menées au BRGM en collaboration avec un équipementier (ROBIN Industries) et ont abouti au dépôt d'une marque d'agitateur BROGIM[®] spécialement adapté à la biolixiviation en réacteurs parfaitement agités.

Néanmoins, d'autres types de bio-réacteurs ont été testés et sont cités dans la littérature utilisant un mobile pour l'agitation couplé à un système de pompage air-lift des solides de fond de cuve ainsi qu'un système de diffusion du gaz soit au travers de membrane (Griffin et Luinstra, 1989) ou par système venturi (Hoffman et coll., 1993). Ces réacteurs consomment beaucoup d'énergie et engendrent des coûts de fonctionnement très élevés (demande en air de 3 640 m³ par tonne de pyrite oxydée et seulement environ 30 % de l'oxygène utilisé). Leur conception conditionne totalement le transfert des gaz (oxygène et dioxyde de carbone) et donc ainsi l'efficacité des réactions biologiques mises en jeu. Il est à l'heure actuelle impossible de savoir si ce type de réacteurs assure un transfert de gaz optimal. De nombreux travaux concernant le développement de mobiles dans des réacteurs triphasiques ainsi que la détermination des coefficients de transfert de matière ont été entrepris (Neale et Pinches, 1994 ; Beenackers et Swaij, 1993 ; Boon et coll., 1992 ; Boogerd et coll., 1989). Le système d'agitation transmettant de l'énergie thermique à la suspension (Barret et coll., 1993) celle-ci vient s'ajouter à l'effet exothermique des réactions d'oxydation, d'où un effort de conception supplémentaire en matière de régulation de température et d'évacuation de la chaleur.

Trois sociétés sont actuellement en mesure de fournir une assistance technique sur ce type de procédés. La première est Billiton dont le procédé BIOX[®] est d'ores et déjà appliqué dans six usines d'extraction d'or et qui prévoit la commercialisation de ce

procédé dans trois nouvelles usines. Leurs caractéristiques techniques et opérationnelles sont résumées dans les tableaux 1 et 2.

	Fairview	Sao Bento	Harbour Lights	Wiluna	Ashanti	Tamboraque
Pays	Afrique du Sud	Brésil	Australie	Australie	Ghana	Pérou
Capacité (t/j)	40	150	40	115	720	60
V _{total} (m ³)	764	580	978	3 144	16 200	
V _{réacteur primaire} (m ³)	90	580	163	524	900	
N _{réacteurs}	10	1	6	6	18	
Coûts investissement (\$)			2,8 M	5,6 M	25 M	3 M
Taux de solide	≈ 20 %					
Température (°C)	35 - 45					

Tabl. 1 - Opérations commerciales en fonctionnement, utilisant le procédé BIOX[®].

	Amantaytau	Olympias	Fosterville
Pays	Ouzbékistan	Grèce	Australie
Capacité (t/j)	1 100	668	120
V _{total} (m ³)	23 376	20 678	3 186
V _{réacteur} (m ³)	974	1 477	531
N _{modules}	4	2	1
N _{réacteurs par module}	6	7	6
N _{réacteurs}	24	14	6
Taux de solide	≈ 20 %		
Température (°C)	35 - 45		

Tabl. 2 - Futures applications commerciales du procédé BIOX[®].

La deuxième société, australienne, Bactech a également développé et commercialisé un procédé, destiné au traitement d'un minerai aurifère en Australie, sur le site minier de Youanmi (Jordan et coll., 1996). Ce procédé est basé sur l'utilisation d'une population mixte thermotolérante 45-50 °C. Une autre usine, utilisant la technologie de Bactech est en cours de réalisation en Tasmanie pour l'exploitation d'un minerai d'or réfractaire.

	Youanmi	Beaconsfield
Pays	Australie	Tasmanie
Capacité (t/j)	110	50
V _{total} (m ³)	3 000	
V _{1er réacteur} (m ³)	500	
N _{réacteur}	6	
Taux de solide	≈ 20 %	
Température (°C)	45-50	
Coûts investissement (\$)	3,9 M	

Tabl. 3 - Applications des procédés développés par Bactech.

Enfin, Normandy mining, société australienne, utilise un procédé de biolixiviation à partir d'une technologie mise au point et développée par le BRGM, pour le traitement d'un résidu pyriteux contenant environ 1,37 % de cobalt (Morin, 1998). L'installation en cours est prévue pour produire, à son nominal, 1 000 t/an de cobalt.

	Kasese
Pays	Ouganda
Capacité (l/j)	275
V_{total} (m ³)	5 400
$N_{\text{réacteurs}}$	4
$N_{\text{réacteurs primaires}}$	3
$V_{\text{réacteur}}$ (m ³)	1 350
Taux de solide	≈ 20%
Température (°C)	40 - 45

Tabl. 4 - Application du procédé développé par le BRGM.

Les réacteurs parfaitement agités, bien qu'étant les plus utilisés, ne sont probablement pas les réacteurs les plus efficaces pour la biolixiviation et ce pour trois raisons principales. Tout d'abord, le débit de gaz est limité par les critères de dimensionnement des mobiles, ensuite le cisaillement nécessaire pour assurer un bon transfert d'oxygène réduit le degré d'adsorption des bactéries sur les solides et affecte l'intégrité des membranes cellulaires donnant lieu à un stress qui limite la croissance bactérienne. Enfin, l'énergie requise est très importante ainsi que la dissipation de celle-ci sous forme de chaleur. **Les limites de ces réacteurs ont conduit les chercheurs à envisager d'autres configurations.**

1.2.2. Les réacteurs air-lift

Les réacteurs air-lift ont été étudiés par plusieurs auteurs comme alternative aux réacteurs parfaitement agités, pour la mise en œuvre de la biolixiviation. Néanmoins, dans le domaine des biotechnologies, les données disponibles sur ce type de réacteurs sont très limitées (Chisti et Moo Young, 1987) et certaines configurations d'air-lift n'ont même pratiquement pas été étudiées. Le manque de connaissances, que ce soit pour les air-lift ou pour les colonnes à bulles, sur des tailles d'échelle raisonnables, fait que ces systèmes sont encore peu utilisés à grande échelle. Par exemple, il a été évalué en 1984 que sur l'ensemble des bio-réacteurs de l'industrie, 93 % étaient des réacteurs parfaitement agités et seulement 7 % sont des réacteurs non agités mécaniquement (Kossen, 1984).

Les réacteurs air-lift sont des réacteurs compartimentés en deux zones distinctes dont l'une est alimentée en gaz. La différence de rétention gazeuse entre la zone aérée et la zone non aérée cause une différence de densité entre ces régions, engendrant une circulation du fluide dans le réacteur. Dans ces réacteurs, le gaz est injecté par le bas ; le mouvement des bulles à travers le liquide, induit un mouvement du liquide vers le haut ; en haut de colonne, le gaz et le liquide se séparent et une partie du liquide redescend vers le bas de la colonne par un tube de recirculation qui peut être interne ou externe (fig. 1).

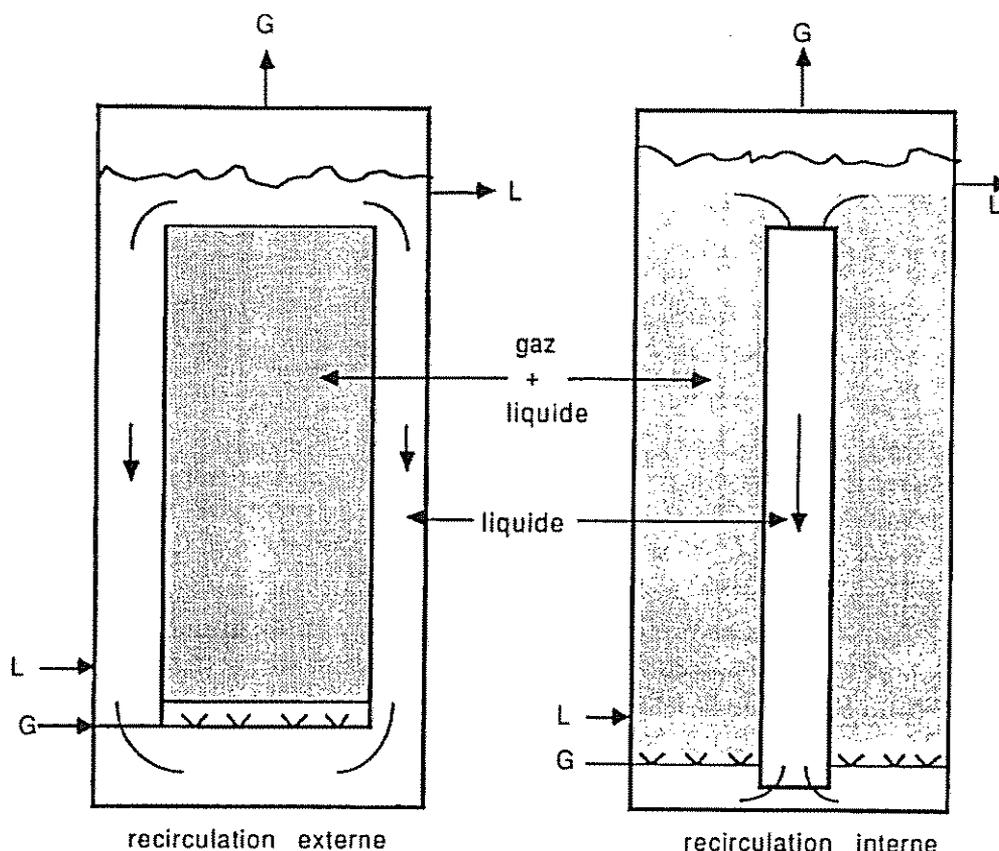


Fig. 1 - Principe de fonctionnement des réacteurs air-lift.

Outre le gain d'énergie, les forces de cisaillement étant beaucoup moins importantes dans ce type de réacteur, la désorption des cellules de la surface des particules est bien moins importante que dans les systèmes agités mécaniquement (Präve et coll., 1976).

Les études préliminaires de biolixiviation dans notre laboratoire sont généralement effectuées dans de petits air-lift de 200 ml (Battaglia, 1994) avant le passage dans des réacteurs de plus gros volumes.

Bavarian et coll. (1990) ont étudié le traitement de charbon contenant du soufre par désulfurisation microbologique, dans un réacteur air-lift de 1,2 l. Ils ont constaté que dans ce type de réacteur, l'oxydation biologique de la pyrite était plus importante que celle reportée dans la littérature.

Puhakka et Tuovinen (1986) ont comparé, à l'échelle du laboratoire, la biolixiviation de différents minerais dans des bouteilles agitées, des colonnes aérées, des réacteurs air-lift et par des techniques de percolation. Ils en ont conclu que les bouteilles agitées assuraient le temps de résidence le plus faible pour une solubilisation complète des métaux les plus lixiviables.

Helle et Onken (1988) ont réalisé la biolixiviation en continu d'une pyrite par une population mixte, dans un réacteur air-lift de 4,5 l.

Peu d'études comparatives de biolixiviation entre les différentes configurations de réacteurs sur des minerais identiques et avec des populations bactériennes initiales de même nature ont été menées. En ce qui concerne les air-lift, très peu de résultats sont référencés pour des réacteurs d'un volume supérieur à 5 l. L'un des principaux inconvénients de ce type de réacteur est la difficulté, lors de la phase de démarrage, à mettre en suspension les particules de solide à des concentrations de solide importantes (10 % massique).

1.2.3. Les colonnes à bulles

Dans le contexte précédemment décrit, les colonnes à bulles pourraient s'avérer une alternative intéressante pour le biotraitement des minerais. La principale différence entre les colonnes à bulles et les réacteurs air-lift est que dans ces derniers la vitesse de circulation du liquide est fonction du débit de gaz, alors que dans les premiers, la vitesse de liquide est indépendante de celle du gaz.

Le type de colonne à bulles, de loin le plus fréquent, consiste en un tube vide. Le liquide et le gaz s'écoulent de façon co-courante vers le haut, le gaz étant introduit par un distributeur qui joue un rôle majeur dans les phénomènes de transfert de matière. Souvent le tube s'élargit en haut de colonne pour favoriser la séparation gaz-liquide. La figure 2 présente le schéma d'une telle colonne.

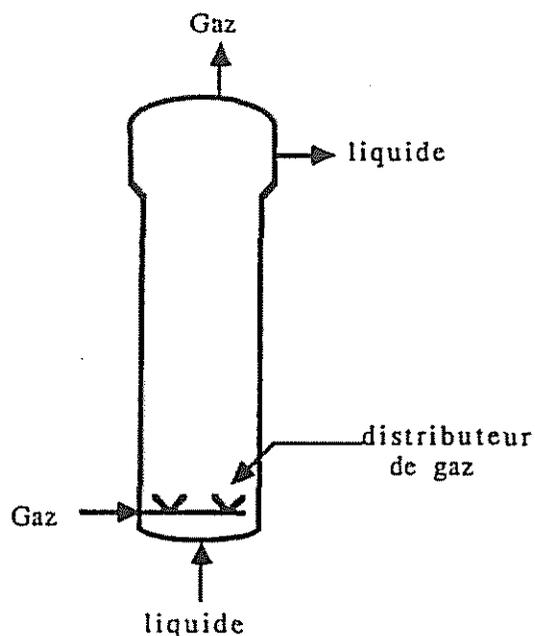


Fig. 2 - Principe de fonctionnement d'une colonne à bulles (ou colonne à gaz et liquide porteurs).

Alors que dans le cas des réacteurs air-lift, la mise en suspension des particules est assurée par le courant de liquide induit par le débit de gaz dans la jambe de montée, dans les colonnes à bulles, elle l'est par l'action conjuguée du pompage du liquide et de l'injection de gaz. Ces effets combinés éliminent les problèmes de mise en suspension au démarrage et assure, à priori, la possibilité de travailler à des taux de solide plus élevés. De plus, l'utilisation d'un débit de recirculation significatif et donc d'un débit de liquide important permet l'application des colonnes à bulles pour de longs temps de séjour.

Dans tout réacteur à gaz dispersé, la qualité de la dispersion initiale, qui correspond au choix du distributeur, joue un rôle considérable.

Peu d'études de biolixiviation ont été entreprises dans ce type de réacteur. Lizama et Suzuki (1989) ont réalisé des expériences de biolixiviation du cuivre et du zinc dans un système qui pourrait s'apparenter à une colonne à bulles. Ils ont travaillé dans une colonne de 59 cm de haut et 7,5 cm de diamètre pour une concentration en solide de 50 % (massique), à courant descendant de liquide et préalablement enrichi en air dans un autre récipient.

Khalfet (1995) a entrepris des études de faisabilité de la réaction de biolixiviation dans une colonne de 1,5 m de haut et 0,1 m de diamètre pour un taux de solide de 13,5 %. La moins bonne qualité du rendement comparée à celle du rendement obtenu en réacteur agité serait due à une inadaptation des conditions opératoires.

Garcia Ochoa (1998) a poursuivi ces travaux dans une colonne de 2 m de haut et 0,1 m de diamètre pour des taux de solide de 33 % (massique) avec un rendement de 80 % d'oxydation de la pyrite. **Ces expériences ont permis de constater et de quantifier une limitation par le transfert d'oxygène.**

1.3. EFFET DU TAUX DE SOLIDE ET DE LA CONCENTRATION EN OXYGÈNE

Le taux de solide est l'un des facteurs les plus importants dans le cadre d'une application à l'échelle industrielle. En effet l'augmentation du taux de solide diminue la taille des bio-réacteurs à mettre en œuvre pour traiter une même quantité de minerai.

Des études sur l'influence du taux de solide dans les procédés de biolixiviation en réacteurs agités ont été réalisées (Bailey et Hansford, 1993 ; et Morin, 1995 b). Pour des minerais à fortes teneurs en sulfures (> 30 %), il semble que, pour des taux de solide compris entre 10 et 15 %, la vitesse de biolixiviation augmente de façon proportionnelle au taux de solide. Entre 15 et 20 % de solide, apparaissent les premières limitations des cinétiques d'oxydation des sulfures avec diminution des vitesses. Enfin, au-delà de 20 % de solide, les performances de la biolixiviation sont fortement affectées par les taux de solide élevés (d'Hugues, 1996).

La vitesse de transfert de l'oxygène est un facteur critique de l'oxydation des sulfures en sulfate.

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de la concentration en oxygène dans la phase liquide, sur la limitation des réactions de biolixiviation. Liu et coll. (1988) ont publié que la concentration en oxygène dissous en dessous de laquelle la croissance des bactéries était stoppée est de 0,2 mg/l et celle en dessous de laquelle la disponibilité de l'oxygène est limitante est comprise entre 0,29 et 0,7 mg/l. Chapman et coll. (1993) ont observé une concentration en oxygène dissous critique pour maintenir l'oxydation, dans une gamme de 0,7 à 1,1 mg/l. Pinches et coll. (1988) indiquent que la concentration critique en oxygène dissous est inférieure à 0,5 mg/l et peut être aussi basse que 0,1 mg/l.

La concentration en oxygène dissous dépend à la fois des réactions de biolixiviation mais également du transfert de matière entre la phase gazeuse et la phase liquide. Plus ce transfert est rapide et moins la vitesse de réaction risque d'être limitée par celui-ci. Une partie de l'optimisation des réacteurs à mettre en œuvre réside dans la mise au point d'un système qui assure un transfert de matière suffisamment rapide et efficace pour que la seule limitation possible soit une limitation d'ordre cinétique au niveau de la réaction d'oxydation. **C'est pourquoi il est notamment essentiel d'étudier le mode de distribution et de dispersion du gaz dans la pulpe.**

1.4. CONCLUSION

Beaucoup d'études ont été réalisées en réacteurs parfaitement agités et peu l'ont été en air-lift et colonnes à bulles. Les seules applications industrielles concernent la première gamme de réacteurs. Néanmoins, les deux autres types constituent une alternative intéressante au réacteur agité gaz-liquide : ils ne comportent pas de pièces mobiles tout en permettant d'obtenir un mélange rapide du liquide. La colonne à bulles permet, de plus, de s'affranchir des problèmes de démarrage et de décantation du solide grâce au mouvement du liquide par pompage. Malheureusement, peu de données prouvent la faisabilité d'un tel système appliqué à la biolixiviation des minerais sulfurés.

Le choix du taux de solide dans ce type de réacteur est un paramètre important dans la mesure où il conditionne les investissements à l'échelle industrielle. L'autre paramètre crucial est le choix du diffuseur pour s'affranchir au mieux des limitations de transfert de l'oxygène.

2. Matériel et méthodes

2.1. INOCULUM

La population bactérienne utilisée au cours du présent projet a été initialement prélevée sur un site minier. Elle a été repiquée sur différents substrats sulfurés avant d'être cultivée avec la pyrite cobaltifère de Kasese (Ouganda). Elle a subi une pression de sélection lors des opérations de biolixiviation en continu de la pyrite cobaltifère en présence de cobalt (jusqu'à 5 g/l), à 20 % de solide, et à des températures s'élevant jusqu'à 42 °C. De plus, le concentré sulfuré lui-même apporte des micro-organismes qui ont pu faire évoluer la composition de la population bactérienne. Lors des essais de biolixiviation en continu à l'échelle du laboratoire, des souches de bactéries morphologiquement apparentées à *Leptospirillum ferrooxidans* ont été isolées à partir d'échantillons prélevés dans les réacteurs (Battaglia *et al.*, 1994). Une étude portant sur la morphologie des micro-organismes, observés au microscope optique, a révélé une augmentation de la quantité relative de spirilles par rapport aux bâtonnets au cours de l'avancement de la réaction d'oxydation de la pyrite en continu (Battaglia *et al.*, 1998). À cette date, il était supposé que les espèces *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans*, précédemment isolées au sein du consortium (Collinet et Morin, 1990) constituaient la population des bâtonnets associés à *Leptospirillum*. Cependant, en l'absence de méthode simple et rigoureuse d'identification des micro-organismes impliqués dans les procédés de biolixiviation, aucune certitude concernant l'identité des espèces en présence n'était acquise.

Afin de préparer l'inoculum de la colonne à gaz et liquide porteurs, deux réacteurs de deux litres ont été ensemencés avec une pulpe de biolixiviation de pyrite cobaltifère stockée dans un fût depuis 1 an. Ces cultures ont été réalisées sur pyrite cobaltifère. Le pH était réajusté quotidiennement à 1,2 lorsqu'il passait au-dessous de cette valeur. Le taux de solide a été augmenté de 5 % à 10 %, puis 20 %, au cours des repiquages successifs. Le réacteur colonne a été inoculé avec des cultures effectuées à 20 % de solide.

2.2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Les expériences sont réalisées dans les appareils schématisés sur la figure 3 dont une photographie est présentée en figure 4.

Le bio-réacteur est constitué d'une colonne à bulles ① (diamètre interne de 0,1 m, hauteur de 2,2 m, volume de 17 l) utilisée avec un bac de recirculation agité ② (volume 9,5 l). Les appareils sont faits en matière plastique et le bio-réacteur est maintenu à 35 °C par une circulation d'eau au travers d'une double enveloppe. Le biojus recirculé est pompé dans le système par une pompe péristaltique ③. Le débit de liquide est mesuré par un débitmètre électromagnétique ④. Le gaz utilisé pour le bio-réacteur est un mélange d'air et de CO₂ dont chaque débit partiel est régulé par un débitmètre

massique thermique ⑤ (le rapport entre le débit de CO₂ et le débit d'air étant de 1 %). Le gaz s'échappant du bio-réacteur ainsi que celui entrant sont échantillonnés et passent à travers deux analyseurs de gaz ⑥. Chaque jour, un lait de chaux est ajouté dans le bac de recirculation pour maintenir le pH ainsi que de l'eau pour compenser l'évaporation. Des prélèvements sont effectués en haut et bas de colonne. Les paramètres mesurés sont : pH, Eh, densités de pulpe, de solide et de liquide après séparation ainsi, que les concentrations en fer total, fer ferreux, cobalt et sulfate. Les concentrations en oxygène dissous ainsi que les températures sont mesurées en continu en haut et bas de colonne à l'aide de sondes.

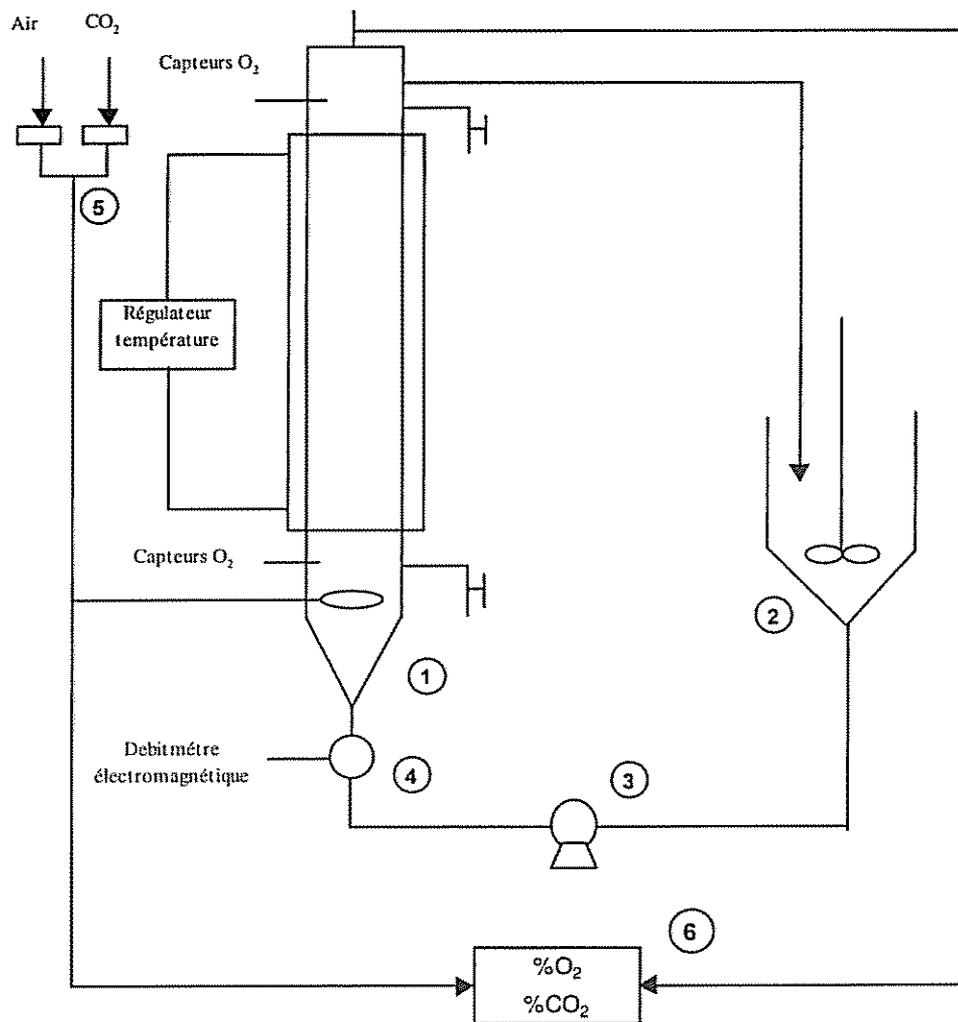


Fig. 3 - Schéma du principe de fonctionnement de l'installation pilote avec les principaux organes de réaction, de contrôle et de suivi.

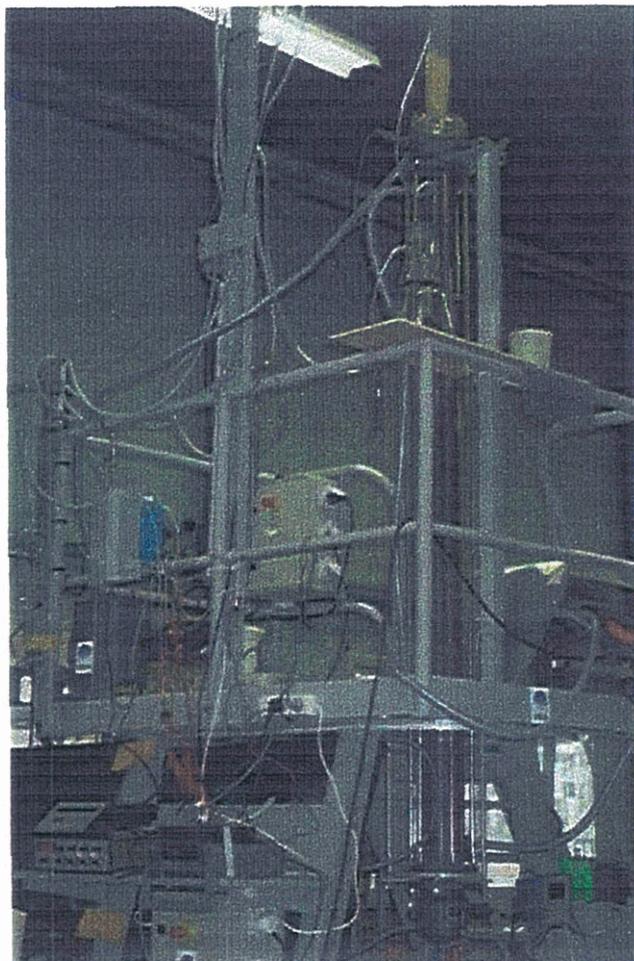


Fig. 4 - Photographie de l'installation pilote de biolixiviation dans une colonne à gaz et liquide porteurs.

2.3. CONDITIONS OPÉRATOIRES

2.3.1. Compositions

a) Lots de pyrite

Deux lots de pyrite provenant du site de Kasese en Ouganda de teneurs en pyrite et en cobalt sensiblement différentes ont été testés.

Une étude minéralogique au microscope électronique à balayage et au spectromètre d'émission X a permis de déterminer les espèces minérales présentes dans le premier échantillon de pyrite cobaltifère. L'analyse chimique des éléments a également été réalisée et les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Elément	Pourcentage massique
Cobalt	0,57 %
Fer	43,6 %
Soufre libre	< 0,05 %
Sulfates	1,65 %
Soufre total	49,9 %

Tabl. 5 - Analyse chimique du lot de pyrite n°1.

Les minéraux observés ont été les suivants :

- pyrite cobaltifère 90-95 % ;
- quartz 1 à 2 % ;
- feldspath 1 à 2 % ;
- gypse 0,5 à 1 % ;
- scheelite 0,5 à 1 % ;
- silicates indifférenciés (amphibole ou pyroxène) 0,5 %.

Ces observations concluent que la quasi totalité du fer présent dans l'échantillon est contenu dans la pyrite (43 % sur 43,6 %). Les minéraux porteurs de fer tels que la bornite, le talc, l'amphibole et la woframite n'existent qu'à l'état d'infratrace dans cet échantillon.



Fig. 5 - Observation au MEB du lot de pyrite n° 1.

Le deuxième échantillon a été caractérisé par diffractométrie des rayons X à partir de son diagramme de poudre. Les phases minérales cristallisées ont été mises en évidence. Une approche quantitative a été réalisée par exploitation croisée des résultats minéralogiques et des analyses chimiques quantitatives.

Elément	Pourcentage massique
Cobalt	1,37 %
Fer	35,2 %
Soufre libre	0,05 %
Sulfates	5,8 %
Soufre total	40,6 %

Tabl. 6 - Analyse chimique du lot de pyrite n° 2.

Le bilan final peut se définir comme suit:

- pyrite (seul sulfure identifié) 72 % ;
 - plagioclase (par l'intensité de son pic de diffraction à $\approx 3,19 \text{ \AA}$) 9 % ;
 - quartz (pic à $3,34 \text{ \AA}$) 1 % ;
 - bassanite (à partir du sulfate) 8 % ;
 - talc en infratrace ;
 - alunogène en infratrace
 - illite/Mica en infratrace } vraisemblablement avec le fer
 - amphibole en infratrace } en très léger excès
- } 10 % l'ensemble par différence

b) Solution nutritive

La solution nutritive utilisée dans le cadre des travaux de biolixiviation au BRGM est le milieu OK modifié. Sa composition a été déterminée pour le développement satisfaisant des bactéries en présence de pyrite (Battaglia et coll. (1994)).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,7 g/l
H_3PO_4 85%	0,81 g/l
KOH	0,48 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,52 g/l

Tabl. 7 - Composition de la solution nutritive OKm.

2.3.2. Conditions opératoires appliquées

Les deux lots de pyrite présentés dans le paragraphe précédent ont été testés. Deux pourcentages de solide (≈ 20 et 30%), deux débits d'air (650 l/h et 1 000 l/h) et deux diffuseurs (peigne, voir figure 6, mélangeur statique) ont été étudiés.

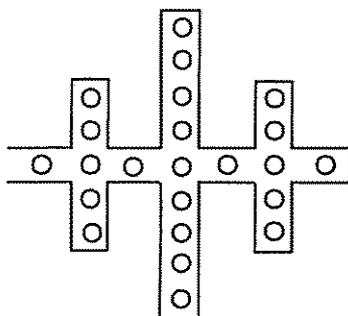


Fig. 6 - Schéma du diffuseur en forme de peigne.

Pour chaque expérience en réacteur fermé (batch), un lait de calcite à 200 mg/l ou 400 mg/l est ajouté pour maintenir le pH au-dessus de 1,2.

Batch	Lot de pyrite	Diffuseur	% solide	Débit d'air (l/h)	V total (l)	Durée (jours)	Débit recirculation (l/h)
2	N° 1	peigne	33	650	24,6	18	150
3	N° 2	peigne	20	650	24,6	24	150
4	N° 2	peigne	20	1 000	24	19	150
5	N° 2	mélangeur	20	1 000	20,9	18	150

Tabl. 8 - Conditions opératoires pour les expériences de biolixiviation en colonne.

2.4. MÉTHODES ANALYTIQUES DE SUIVI

L'oxygène dissous au sein de la pulpe est mesuré en haut et bas de colonne par des sondes polarographiques Metler-Toledo. Ces sondes sont régulièrement étalonnées dans l'eau saturée en oxygène. Un afficheur numérique indique à la fois la valeur de l'oxygène dissous et la température.

Le potentiel Redox et le pH sont mesurés ponctuellement grâce à des sondes classiques de marque Metler-Toledo avec lecture sur des appareils WTW.

Des échantillons sont prélevés régulièrement puis analysés après centrifugation. Le fer total et le cobalt sont dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique. Le fer ferreux est déterminé par titration au sulfate de cérium. Les concentrations en sulfate sont déterminées par turbidimétrie. Le sulfate forme un précipité blanc avec le baryum. Ce précipité génère un trouble, quantifié au spectrophotomètre UV-visible à 526 nm. L'absorbance augmente proportionnellement avec la concentration en sulfate quand cette dernière est comprise entre 0 et 100 mg.l⁻¹. Dans des fioles de 50 ml, la prise d'essai de 25 ml est additionnée de 2 ml de réactif de conditionnement, dont le rôle est de maintenir le précipité en suspension et dont la composition est la suivante : eau déminéralisée, 300 ml ; NaCl, 75 g ; HCl concentré 37 %, 30 ml ; éthanol, 100 ml ;

glycérol, 50 ml. Il est ajouté 5 ml de BaCl₂ 10 % à ce mélange réactionnel. Après 10 mn de réaction, le volume des fioles est ajusté à 50 ml et l'analyse de l'absorbance à 526 nm est effectuée.

La colonne est reliée à un système d'analyse de gaz. Les teneurs en oxygène et gaz carbonique sont mesurées dans les gaz entrant et sortant du réacteur de biolixiviation au moyen de deux analyseurs de la série ADC 7000. Le principe de détection de l'analyseur d'oxygène est basé sur les propriétés paramagnétiques de cette molécule. Quant au gaz carbonique, c'est l'absorption spécifique dans l'infrarouge qui permet la mesure. L'étalonnage des analyseurs est réalisé dans l'air ambiant (20,9 % d'O₂) pour l'oxygène et à l'aide d'un mélange à 4,5 % de CO₂ dans l'azote pour le gaz carbonique. Pour les deux analyseurs, l'étalonnage du zéro est effectué avec de l'azote. L'échantillon de gaz prélevé en sortie de colonne est chargé en vapeur d'eau. Il est séché avant toute analyse pour éviter les interférences spectrales de l'eau sur la mesure du CO₂. De plus la condensation au niveau des cellules provoquerait leur détérioration. Le traitement de l'échantillon gazeux vise également à éviter tout entraînement de corps solides ou liquides (mousses, poussières) qui sont susceptibles d'endommager les appareils de mesure. Pour éviter ces problèmes, le circuit d'analyse des gaz est équipé de diverses protections :

- une fiole de garde en sortie de colonne évite l'entraînement de particules grossières solides ou de liquide vers les appareils ;
- un piège à froid permet la déshydratation des gaz (entre 2 °C et 5 °C) ;
- un filtre hydrophobe 0,22 µm permet d'éviter la circulation de particules liquides ou solides à l'intérieur du circuit d'alimentation de l'analyseur.

2.5. MÉTHODES DE SUIVI PAR ANALYSE SSCP DE L'ÉVOLUTION DE LA FLORE BACTÉRIENNE

Les analyses de biologie moléculaire ont été réalisées par la société BIO-ID (Narbonne, Aude).

2.5.1. Inventaire moléculaire de la population bactérienne mixte

L'inventaire moléculaire permet d'identifier les espèces et souches bactériennes présentes dans la population mixte. Le principe de l'analyse repose sur le caractère conservé de la séquence de la petite sous-unité ribosomale bactérienne (ARNr 16S et de la séquence d'ADNr 16S dont il est transcrit). Cet élément est reconnu par la communauté scientifique pour être une base de comparaison efficace pour pouvoir différencier les bactéries entre elles. Un programme international RDP (*Ribosomal Data Project*) de collecte des séquences de l'ADNr 16S a d'ailleurs été mis en place. On considère qu'une divergence de 3 % correspond à la distinction phénotypique entre 2 espèces.

Après avoir été amplifié grâce à la technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) l'ADNr 16S de chaque bactérie présente est cloné dans *E. coli* pour pouvoir être séquencé individuellement (séquençage partiel 500 pb dans tous les cas et séquençage complet 1 500 pb si degré de diversité faible de la population analysée).

Les séquences obtenues sont d'abord comparées entre elles grâce à un logiciel informatique d'alignement et de comparaison pour distinguer chaque espèce présente sur la base du pourcentage de divergence.

Des banques de données sont ensuite interrogées pour connaître les micro-organismes répertoriés les plus apparentés aux séquences représentatives de chaque espèce inventoriée. Les deux banques de données interrogées sont :

- GenBank : banque de données contenant les séquences des gènes d'ADNr mais aussi des gènes de protéines qui a l'avantage d'être régulièrement mise à jour mais le désavantage d'utiliser des logiciels plus adaptés à la comparaison des gènes de protéines ;
- Ribosomal Data Project : banque de données dédiée uniquement à la collecte et la comparaison des séquences d'ADNr mais étant mise à jour moins régulièrement que GenBank.

Les séquences représentatives des espèces inventoriées sont enfin une nouvelle fois comparées avec celles des micro-organismes apparentés sur la base du pourcentage de divergence.

Contrairement aux techniques micro-biologiques classiques d'identification aucune étape d'isolement et de culture de souche pure ne sont requises avec les techniques d'identifications moléculaires. Compte tenu qu'un grand nombre de micro-organismes ne sont pas cultivables la technique moléculaire permet d'avoir un degré de fiabilité bien supérieur aux techniques classiques. La seule limite de la technique moléculaire qui est utilisée se situe au niveau de la proportion des espèces présentes entre elles. En effet, un rapport de 100 permet difficilement de détecter la ou les espèces minoritaires.

2.5.2. Principe de l'analyse SSCP

La technique SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) est basée sur la conformation secondaire qu'adopte un fragment d'ADN simple brin en conditions non-dénaturantes (grâce principalement à des attractions de type van der Waals) et qui est dépendante de sa structure primaire (séquence). Une région particulière de l'ADNr 16S (région V3 située environ entre la position 300 et 500) des micro-organismes présents est amplifiée, dénaturée pour séparer les brins d'ADN puis analysée par électrophorèse sur gel d'électrophorèse en conditions non-dénaturantes.

Le profil d'analyse SSCP de la population globale permet de déterminer sa complexité et de différencier chaque micro-organisme présent grâce à la vitesse migratoire de son fragment d'ADNr sur gel d'électrophorèse.

L'assignation de chaque pic peut ensuite être réalisée par comparaison avec les profils d'analyse SSCP individuels de chaque clone représentatif des espèces recensées lors de l'inventaire moléculaire.

2.5.3. Stratégies d'amplification pour le séquençage et les analyses SSCP

Les amorces « primer » utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S complet sont w18 et w02 situés à chacune des extrémités du gène.

Les amorces utilisées pour l'amplification et l'analyse en SSCP de la région V3 sont w49 et w34 et sont situées environ aux positions respectives de 300 et 500 paires de bases.

L'amorce utilisée pour le séquençage partiel de l'ADNr 16S est w31. Les amorces w07 et T7 ou P13 (selon l'orientation du fragment d'ADNr 16S dans le vecteur) sont utilisées pour le séquençage complet de l'ADNr 16S.

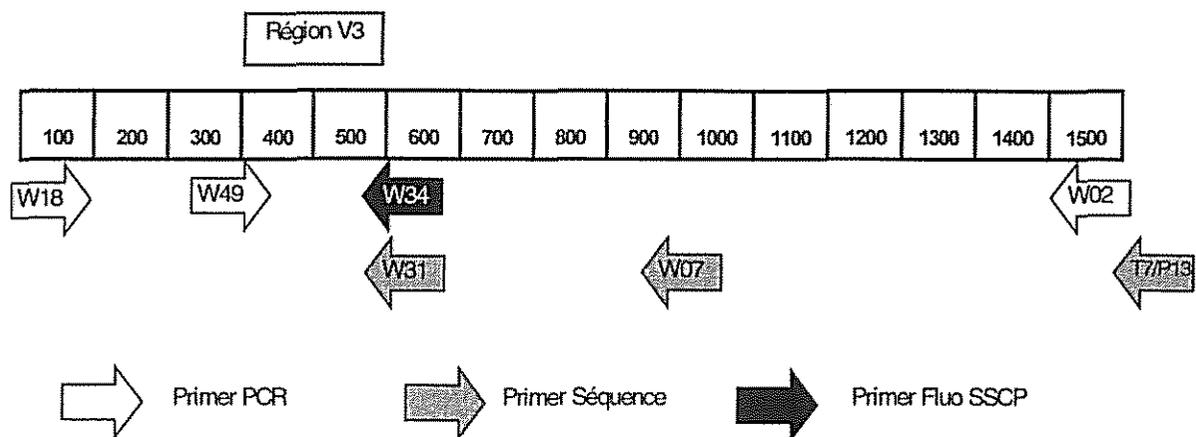


Fig. 7 - Positions et orientations des primers par rapport à l'ADNr 16S (1500 pb) pour le séquençage et les analyses SSCP.

2.5.4. Stabilisation des échantillons et extraction d'ADN total

Traitement des premiers échantillons

Les premiers échantillons prélevés le 15/11/1999 et reçus le 16/11/1999 avaient été directement stabilisés après centrifugation dans une solution de guanidine thiocyanate et N-lauroyl sarcosine. Il s'est avéré que l'extraction d'ADN total ultérieure était difficile tant sur le plan du rendement d'extraction que sur le plan de la qualité de la solution d'ADN obtenue qui ne pouvait être amplifiée correctement. Il est probable que les caractéristiques de l'échantillon et notamment son acidité (pH ~ 1,3) ainsi que la présence de fortes concentrations de fer (14,6 g/l) aient interféré au cours de l'extraction avec la guanidine thiocyanate et gêné l'amplification PCR.

Après réception le 08/12/1999 d'un nouvel échantillon ayant servi à inoculer un réacteur batch, un protocole de lavage de l'échantillon avant sa resuspension et sa stabilisation dans la guanidine thiocyanate a été utilisé. Le minerai colonisé a été ainsi lavé 3 fois avec une solution de H₂SO₄ 0,04N puis 2 fois avec une solution Tampon Tris-EDTA (TE) pH 8,0. Les vitesses de centrifugation utilisées étaient faibles (2 000 xg pendant 10 mn) pour récupérer essentiellement le minerai et laver les cellules en suspension. Le culot final correspondant à 20 ml d'échantillon de départ a ensuite été repris dans 250 µl de guanidine thiocyanate et 37,5 µl N-lauroyl sarcosine 10 % puis conservé à -20 °C.

Un protocole d'extraction normalisé a été ensuite effectué. Ce protocole fait intervenir brièvement une étape de lyse des cellules grâce à des billes de verre dans une solution détergente (N-lauroyl sarcosine), une étape d'élimination des substances humiques par absorption sur polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) puis des étapes successives de précipitation et de lavage avec de l'isopropanol et de l'éthanol.

Par mesure de sécurité une extraction d'ADN total selon le même protocole (lavage des cellules avec H₂SO₄ 0,04N et TE puis extraction normalisée ; centrifugation à 10 000 xg) a été effectuée sur 5 ml de suspension cellulaire de l'échantillon (surnageant de décantation du minerai). Il était en effet craint, malgré toutes les précautions de lavage du minerai prises, que des composés gênants soient encore présents ou bien « relargués » par le minerai et il était probable que la suspension cellulaire soit moins difficile à traiter.

Les étapes de lavages se sont finalement avérées bénéfiques puisqu'une quantité suffisante d'ADN a pu ainsi être extraite aussi bien à partir du minerai lavé que des cellules en suspension. Les étapes d'amplification de l'ADNr 16S ont cependant nécessité de diluer les extraits d'ADN du minerai (1/100^e) en raison de la persistance de composés inhibiteurs alors que des dilutions de 1/5^e à 1/10^e étaient seulement requises pour les suspensions cellulaires.

Traitement des échantillons prélevés pour le suivi des cultures en réacteur colonne

Les échantillons sont, dès leur réception, soumis à un lavage avec une solution de H_2SO_4 0,04N (3 lavages successifs) puis avec une solution tampon Tris-EDTA pH 8,0 (2 lavages) afin de permettre une extraction correcte de l'ADN Total.

Afin d'étudier la composition bactérienne de la phase liquide (Fraction Suspension) et celle fixée sur le minerai (Fraction Minerai) chacun des échantillons est traité différemment pour pouvoir analyser :

- la « Fraction Suspension » (phase liquide) ;
- la « Fraction Minerai » (phase solide) ;
- et enfin « l'Échantillon Total » sans séparer les phases liquide et solide.

Pour cela, les échantillons sont traités comme suit :

- Pour le traitement des Fractions Suspension et Minerai, 10 ml d'échantillon préalablement agité sont transférés dans un tube et laissés décanter.
Le surnageant (~ 8 ml) qui correspond à la « Fraction Suspension » est transféré dans un tube puis lavé avec les solutions de H_2SO_4 et de Tampon TE par centrifugation à 10 000 xg pendant 15 mn et par reprise au vortex du culot dans la solution de lavage (10 ml).
Le décantat (~ 2 ml) qui correspond à la « Fraction Minerai » est lavé de la même manière que la « Fraction Suspension » à la différence qu'une centrifugation de 1 000 x g pendant 1 mn et une reprise « douce » du culot dans la solution de lavage (5 ml) par retournement du tube sont effectuées afin d'essayer de laver le reste de cellules en suspension et d'éviter le mieux possible de détacher les bactéries fixées au minerai.
- Pour le traitement de « l'Échantillon Total », 5 ml d'échantillon préalablement agité sont transférés dans un tube et lavés exactement de la même manière que la « Fraction Suspension ».

Phase d'extraction

Compte tenu de la difficulté à extraire l'ADN de ce type d'échantillon, plusieurs techniques d'extraction ont été utilisées au cours de la période d'étude afin de s'assurer d'une part d'avoir des extraits d'ADN exploitables et d'autre part de tester l'efficacité des différentes techniques.

Les méthodes utilisées sont au nombre de trois :

Méthode 1

Extraction Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) avec purification à l'éthanol dénommée pour la suite de l'étude « **PVPP + Purification** » : extraction « classique » utilisée le plus souvent dans le laboratoire BioID avec l'emploi de PVPP pour absorber les

substances humiques et purifier l'ADN total. Cette méthode nécessite une quantité suffisante d'ADN pour qu'il puisse être précipité à l'éthanol. Bien que purifié, l'extrait nécessite d'être dilué au 1/100^e généralement pour pouvoir être amplifié.

Procédure d'extraction de l'ADN total

- 1 - reprendre le culot issu de la phase de lavage dans 500 µl de guanidine thiocyanate et 75 µl de N-lauroyl sarcosine et répartir dans des tubes de 2 ml à raison de 500 µl par tube (les tubes sont congelés à -20 °C jusqu'à réaliser l'extraction proprement dite),
- 2 - ajouter 500 µl d'une solution de lauroyl sarcosine 5 % et de tampon phosphate 0,1M pH 8,0,
- 3 - incuber 1 h à 70 °C,
- 4 - ajouter les billes de verre 0,1 mm,
- 5 - vibro-broyer 10 mn,
- 6 - ajouter 15 mg de polyvinyl polypyrrolidone (PVPP),
- 7 - Vortexer,
- 8 - centrifuger à 12 000 tpm pendant 3 mn,
- 9 - récupérer le surnageant,
- 10 - ajouter au culot 500 µl de solution Tris-EDTA-NaCl-PVPP,
- 11 - vortexer,
- 12 - centrifuger 12 000 tpm 3 mn,
- 13 - pooler le surnageant avec le premier,
- 14 - répéter les étapes 10 à 13,
- 15 - ajouter un volume d'isopropanol au pool,
- 16 - laisser 10 mn à température ambiante,
- 17 - centrifuger à 15 000 rpm pendant 15 mn,
- 18 - reprendre le culot dans 450 µl tampon phosphate 0,1M pH 8,0 et 50 µl acétate de potassium 5M
- 19 - laisser 1 h 30 dans de la glace,
- 20 - centrifuger à 16 000 tpm pendant 30 mn,
- 21 - récupérer le surnageant.

Procédure de purification de l'ADN total

- 1 - ajouter 20 µl RNase 1mg/l et incuber 30 mn à 37 °C,
- 2 - ajouter 50 µl acétate de sodium 3M pH 5,2 puis 1 ml éthanol 100 %,
- 3 - mélanger par retournement,
- 4 - transférer la pelote d'ADN dans 600 µl éthanol et 20 µl d'acétate de sodium 3M,
- 5 - vortexer et laisser 10 mn à température ambiante,
- 6 - centrifuger à 15 000 tpm pendant 15 mn,
- 7 - laver à l'éthanol 70 % et centrifuger 5 mn,
- 8 - sécher le culot et reprendre le culot dans 50 µl d'eau nanopure stérile,
- 9 - congeler à -20 °C jusqu'à la procédure d'amplification.

Méthode 2

Extraction PVPP sans purification à l'éthanol dénommée pour la suite de l'étude « PVPP ». Le PVPP est utilisé mais l'ADN n'est ensuite pas purifié. Cette méthode permet, lorsque l'ADN n'est pas en quantité suffisante pour pouvoir être précipité et purifié, d'amplifier l'ADN présent en faible quantité. Les extraits issus de cette technique sont en fait obtenus pendant la phase d'extraction citée précédemment en conservant 50 µl de l'extrait repris dans 450 µl tampon phosphate 0,1M pH 8,0 et 50 µl acétate de potassium 5M juste avant la digestion avec la RNase qui est le début de l'étape de purification. La conservation de cet extrait peut permettre éventuellement l'utilisation directe pour l'amplification dans le cas où il n'y a pas assez d'ADN présent pour pouvoir être précipité à l'éthanol et purifié. La solution d'ADN ainsi obtenue doit être diluée au 1/100^e pour pouvoir être amplifiée.

Méthode 3

Extraction SDS, extraction modifiée de Pizarro qui utilise du SDS pour lyser les cellules. Ici aussi aucune précipitation de l'ADN n'est effectuée et la solution d'ADN est composée d'un tampon Tris-EDTA-NaCl-SDS.

- 1 - reprendre la totalité du culot issu de la phase de lavage dans 750 µl d'une solution Tris-EDTA-NaCl-SDS (TENS) dans un tube de 2 ml,
- 2 - incuber 15 mn à 70 °C,
- 3 - ajouter des billes de verre 0,1 mm,
- 4 - vibro-broyer 10 mn,
- 5 - centrifuger à 8 000 tpm pendant 10 mn et récupérer le surnageant,
- 6 - reprendre en vortexant le culot dans 500 µl de TENS,
- 7 - incuber 15 mn à 70 °C,
- 8 - répéter les étapes 5 à 7 en poolant le surnageant,
- 9 - congeler le surnageant à -20 °C jusqu'à la procédure d'amplification.

La solution d'ADN ainsi obtenue doit être diluée au 1/100^e pour pouvoir être amplifiée.

Pour toutes les extractions, des billes de verre (0,1 mm Ø) ont été ajoutées avec la solution lysante (N-lauroyl sarcosine pour TENP et SDS pour TENS) pour s'assurer de lyser par vibro-broyage toutes les cellules y compris d'éventuelles Gram+.

Suivi dynamique par analyses SSCP

Chaque échantillon reçu est traité afin d'étudier par SSCP la composition bactérienne :

- de la phase liquide (Fraction Suspension),
- de la phase solide (Fraction Minerai),
- de l'ensemble des deux fractions (Echantillon Total).

L'analyse SSCP de la fraction liquide s'avère être la plus facile à réaliser. En effet l'ADN total extrait est généralement en plus grande quantité que celui extrait de la fraction solide et également que celui de l'ensemble des deux fractions.

Dans le cas de l'étude de la fraction solide, la présence en faible quantité de matériel biologique notamment en début d'essai rend la procédure d'extraction difficile voire même laborieuse. De plus, le culot de minerai obtenu après centrifugation montre une forte tendance à se détacher des parois du tube (spécialement les échantillons de début de batch) ce qui rend la procédure de lavage difficile avec une perte de matériel relativement importante lorsque le surnageant est retiré.

En ce qui concerne l'étude de l'ensemble des deux fractions, il est observé que l'extraction de l'ADN est plus difficile que pour la fraction liquide notamment pour les échantillons en début d'essai. Il semble que le minerai, en raison de sa mauvaise adhérence aux parois du tube de centrifugation, provoque une resuspension des cellules de la fraction liquide pendant le retrait du surnageant et ainsi une perte de matériel biologique.

2.6. SUIVI DE LA POPULATION BACTÉRIENNE PAR OBSERVATION DIRECTE AU MICROSCOPE OPTIQUE

La population bactérienne totale est dénombrée à l'état frais, sur cellule de Thoma. Les dilutions sont réalisées dans une solution d' H_2SO_4 à 2 g/l.

La proportion de bâtonnets et de spirilles est déterminée par observation au microscope optique de préparations fixées par inclusion dans l'agar. Des échantillons de pulpe de biolixiviation sont décantés pendant 15 mn afin d'éliminer les plus grosses particules de minerai. Un faible volume (20 μ l) de surnageant est déposé sur une lame de verre. Une solution à 1 % d'agar est préparée dans un tube à essai, porté à ébullition, puis refroidie à 60 °C. Une goutte d'agar en solution est ajoutée au dépôt de suspension bactérienne. L'ensemble est rapidement étalé et comprimé sur la lame de verre avec une lamelle. Les préparations sont observées au grossissement x 1 000. Les bâtonnets et les spirilles sont dénombrés dans 4 champs d'observation pour chaque lame. Les bactéries dont la forme ne correspond nettement à aucune de ces deux classes morphologiques (ovoïdes, coques) ne sont pas dénombrées. Deux lames sont préparées pour chaque échantillon à étudier.

3. Résultats

3.1. INTRODUCTION

L'ensemble des résultats des expériences réalisées à l'aide du dispositif expérimental pilote colonne à bulles sont présentés dans ce chapitre. Ils sont agencés de la façon suivante : une étude de caractérisation du réacteur, la présentation des résultats obtenus dans chacun des batchs et enfin une comparaison des résultats les plus significatifs.

3.2. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS EN MAQUETTE FROIDE

Des expériences préliminaires en maquette froide, c'est-à-dire en l'absence de réaction chimique, ont été menées de façon à mieux cerner l'écoulement au travers de la colonne.

Plusieurs débits de gaz (650, 850 et 1 000 l/h) ont été testés pour un seul débit de liquide (150 l/h). En effet, dans la gamme de débit utilisé pour nos expériences, il a été prouvé (Garcia Ochoa (1998)), que les paramètres hydrodynamiques et de transfert de matière étaient quasi-indépendants de la vitesse superficielle de liquide.

3.2.1. Hydrodynamique

a) Rétention gazeuse

La rétention gazeuse (ϵ_G) correspond au rapport entre le volume occupé par le gaz et le volume total. Ce paramètre est très important pour le dimensionnement dans la mesure où il conditionne les volumes des réacteurs. Cette rétention gazeuse a été mesurée dans un système biphasique ne contenant que de l'eau et de l'air. Dans un système triphasique, ces valeurs sont transposées en considérant le volume normalement occupé par le liquide comme étant celui de la pulpe.

Le volume opératoire total de la colonne est déduit du poids d'eau qu'il faut pour la remplir jusqu'au débordement. La rétention gazeuse est le rapport entre le volume occupé par le gaz à l'équilibre et le volume opératoire total de la colonne.

Les résultats sont présentés sur la figure 8. Une revue exhaustive de la littérature a été réalisée par plusieurs auteurs. Une sélection des corrélations trouvées dans la littérature est présentée dans la thèse de Garcia Ochoa (1998). Les valeurs obtenues dans le cadre de notre étude sont quasi-identiques à celles obtenues par cet auteur dans une colonne aux dimensions similaires et pour les débits de gaz testés, sauf pour les débits les plus élevés. Elles sont néanmoins inférieures à celles estimées globalement par les corrélations de la littérature et ceci est notamment dû au système de diffusion du gaz.

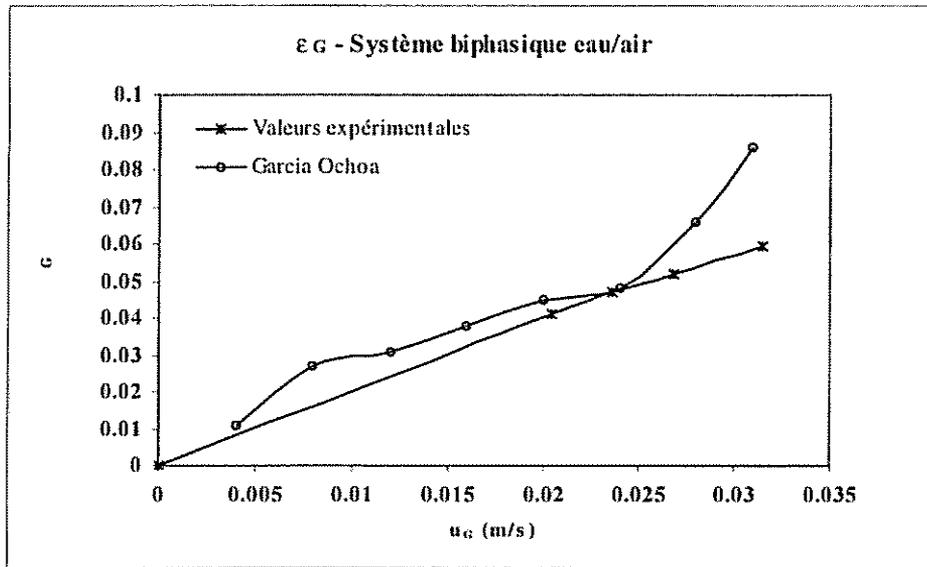


Fig. 8 - Valeurs de la rétention gazeuse globale en fonction de la vitesse ascensionnelle du gaz.

b) Perte de charge

La perte de charge de la colonne correspond à la différence de pression entre le bas et le haut de celle-ci et peut être représentée par l'équation:

$$\Delta P = (\epsilon_G \rho_G + \epsilon_S \rho_S + \epsilon_L \rho_L) gL + \Delta P_f$$

$\epsilon_{G,S,L}$ rétention de gaz, solide, liquide

$\rho_{G,S,L}$ densité de gaz, solide, liquide

ΔP_f perte de charge par frottements

L hauteur de colonne

Les termes qui ont le plus de « poids » dans cette équation sont $(\epsilon_S \rho_S + \epsilon_L \rho_L)$ compte tenu de la densité élevée du liquide et du solide par rapport à celle du gaz. Lorsque la vitesse de gaz augmente, dans le paragraphe précédent il a été observé que ϵ_G augmentait donc ϵ_S et ϵ_L diminuaient, faisant décroître $(\epsilon_S \rho_S + \epsilon_L \rho_L)$. De plus, en considérant le système homogène, la perte de charge est proportionnelle au coefficient de frottement C_{fG} qui s'exprime d'après la relation de Blasius:

$$C_{fG} = C_G \left(\frac{u_G D_{HG}}{\nu_G} \right)^{-m}$$

avec m valant 1 en régime laminaire et 0,2 en régime turbulent lisse. Donc lorsque la vitesse de gaz augmente la perte de charge par frottement diminue. D'où globalement une diminution de la perte de charge globale avec l'augmentation de la vitesse de gaz.

Les valeurs obtenues l'ont été à partir de la lecture sur un capteur de pression situé au bas de la colonne. Les mesures n'ont été réalisées que pour le seul mélange à 30 % de pyrite dans la mesure où la membrane du capteur de pression se trouve encrassée très vite par la pyrite broyée. Les résultats sont présentés en figure 9.

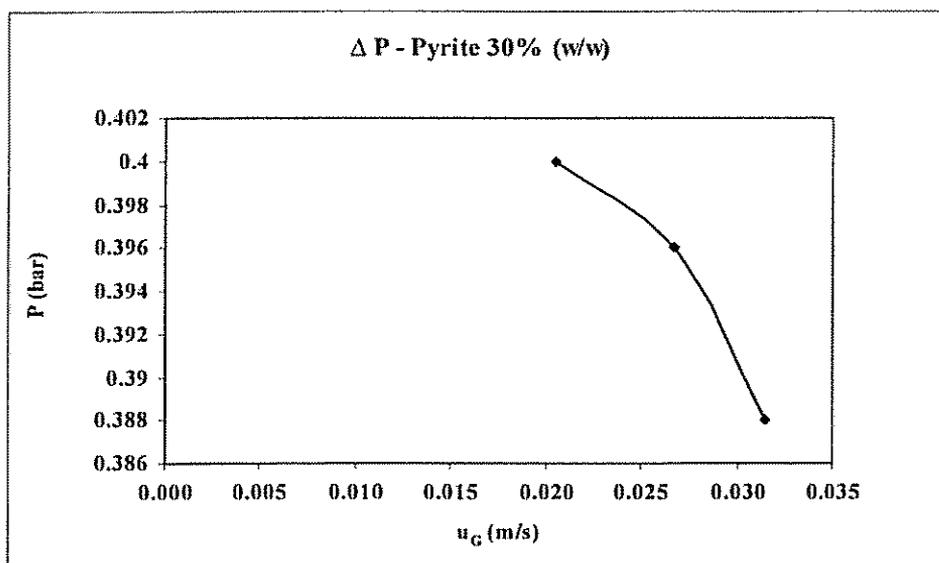


Fig. 9 - Évolution de la perte de charge en fonction de la vitesse superficielle de gaz.

c) Détermination du temps de séjour

Un traçage au chlorure de lithium (LiCl) a été effectué dans la colonne de façon à visualiser l'écoulement de la phase liquide et s'assurer qu'aucun court-circuit ni volume mort n'ont lieu. Pour ce faire, l'appareil expérimental présenté dans le paragraphe 2.2 a été légèrement modifié de façon à éviter la recirculation de la pulpe contenant du chlorure de lithium. Le système a été ouvert avant la pompe de recirculation et a fonctionné en alimentation et soutirage continus.

La méthode consiste à introduire sur un temps très court, une quantité donnée de chlorure de lithium puis à suivre en haut de colonne l'évolution de la concentration en lithium. Des prélèvements sont réalisés régulièrement et le lithium dosé au spectrophotomètre d'absorption atomique. Des expériences préliminaires, ont permis de démontrer que le lithium ne s'adsorbait pas sur la pyrite.

La détermination du temps de séjour est obtenue par normalisation du signal de sortie, soit :

$$E(t) = \frac{c(t)}{\int_0^{\infty} c(t) dt}$$

L'intégrale correspond à l'aire sous la courbe représentant les variations de la concentration de sortie en fonction du temps et est calculée par la méthode des trapèzes.

Une fois la distribution des temps de séjour (DTS) obtenue, on peut en déduire le temps de séjour moyen :

$$t_s = \frac{\int_0^{\infty} tc(t)dt}{\int_0^{\infty} c(t)dt}$$

Les résultats de DTS obtenus sont présentés dans la figure 10.

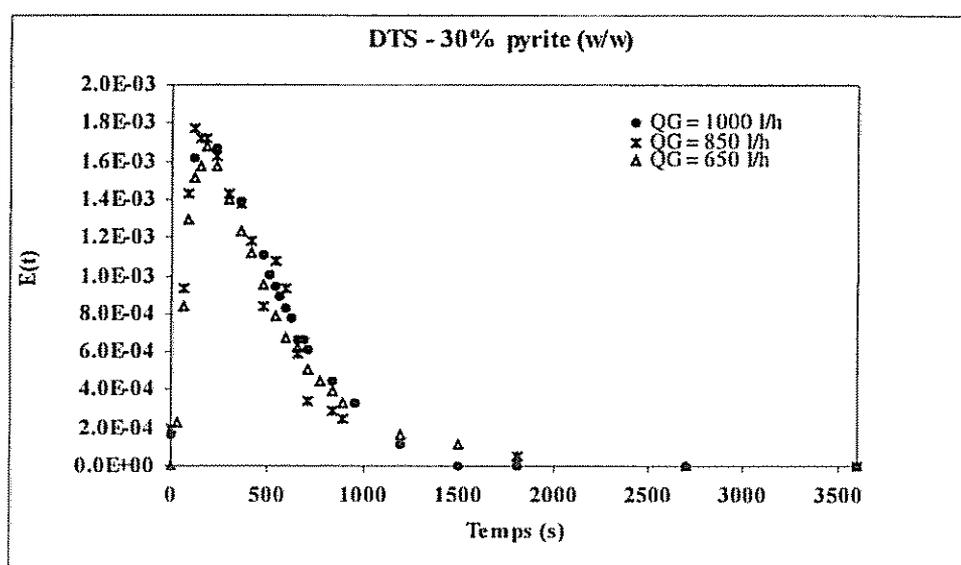


Fig. 10 - Distribution des temps de séjour dans la colonne.

Ces expériences prouvent que pour ce qui est de la phase liquide, la colonne se comporte quasiment comme un réacteur parfaitement agité puisque les DTS correspondent pratiquement à des exponentielles décroissantes.

Débit gaz (l/h)	t_s (min)	τ (min)
650	8,8	8,9
850	7,2	8,8
1 000	7,1	8,7

Tabl. 9 - Comparaison des temps de séjour et temps de passage.

Le temps de passage τ correspond au rapport du volume de liquide sur le débit de pulpe. Plus le débit de gaz est important et plus le temps de séjour est court puisque le volume de pulpe diminue (augmentation de la rétention gazeuse). Les valeurs de temps de séjour et temps de passage sont comparables dans la mesure où les différences ne dépassent pas 20 % ce qui correspond tout à fait à l'erreur expérimentale. Pour le reste des expériences, la phase liquide sera considérée comme parfaitement agitée.

3.2.2. Transfert de matière

La biolixiviation étant avant tout un enchaînement de réactions d'oxydation, la vitesse de transfert de l'oxygène est une des données primordiales dans la conception d'un nouveau réacteur de biolixiviation. En effet, celle-ci doit être suffisamment rapide devant la cinétique de réaction pour s'affranchir au maximum des problèmes de transfert de l'oxygène du gaz vers le liquide. L'un des paramètres permettant d'accéder à cette vitesse de transfert est le coefficient volumique de transfert de matière gaz-liquide : $k_L a$ (la solubilité de l'oxygène étant relativement faible, la résistance du film se trouve entièrement du côté du liquide).

Des mesures du coefficient $k_L a$ ont été menées à l'aide de la technique dite « dynamique » fondée sur le suivi de la concentration en oxygène lors de l'injection d' O_2 après désoxygénation du milieu par un autre gaz, en l'occurrence de l'azote.

Lors d'un basculement d'azote vers l'oxygène, la concentration en oxygène obéit à l'équation suivante :

$$\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{k_L a}{\epsilon_L} ([O_2]^* - [O_2])$$

$$\text{soit } [O_2] = [O_2]^* (1 - \exp(-\frac{k_L a}{\epsilon_L} t))$$

$$\text{en normant } f(t) = \frac{[O_2]}{[O_2]^*} = 1 - \exp(-\frac{k_L a}{\epsilon_L} t)$$

Des expériences préliminaires, consistant à plonger brusquement la sonde à oxygène dans un milieu qui ne contient pas du tout d'oxygène dissous, fournissent le temps de réponse de la sonde. L'expression mathématique du temps de réponse de la sonde est alors donnée par l'expression :

$$\frac{[O_2]}{[O_2]^p} = 1 - \exp(at)$$

$a = \text{temps de réponse de la sonde}$

Il s'agit ensuite de convoluer ces signaux pour obtenir une expression mathématique du phénomène observé normé ($g(t)$).

$$g(t) = \int_0^t f(\tau) h(t - \tau) d\tau$$

où $h(t)$ est la réponse de la sonde à un dirac et correspond à la dérivée de la réponse de la sonde à l'échelon.

$$h(t) = a \exp(at)$$

Une fois intégrée, l'expression de $g(t)$ est obtenue et une modélisation mathématique dans table curve donne la valeur de $k_L a$.

$$g(t) = 1 - \exp(-\frac{k_L a}{\epsilon_L} t) * \frac{a}{a - \frac{k_L a}{\epsilon_L}} + \frac{\frac{k_L a}{\epsilon_L}}{a - \frac{k_L a}{\epsilon_L}} \exp(at)$$

Pour la sonde utilisée, le temps de réponse obtenu est de 0,018 s⁻¹.

Il existe d'autres méthodes pour déterminer $k_L a$ à partir des courbes obtenues par la méthode dynamique dont celle employée par Mills et coll. (1987). Un bilan de matière sur l'oxygène en utilisant la théorie du film de Whitman donne les équations suivantes :

$$\text{Gaz} \quad \frac{d[O_2]_G}{dt} = \frac{([O_2]_G^o - [O_2]_G)}{\tau_G} - k_L a ([O_2]_L^* - [O_2]_L) \frac{V_L}{V_G} \quad [O_2]_L^* = \frac{RT}{H} [O_2]_G$$

$$\text{Liquide} \quad \frac{d[O_2]_L}{dt} = k_L a ([O_2]_L^* - [O_2]_L)$$

Diffusion au travers du film

$$\text{Film} \quad \frac{d[O_2]_F}{dt} = \frac{([O_2]_L - [O_2]_F)}{\tau_F}$$

$$\text{Membrane} \quad \frac{d[O_2]_E}{dt} = \frac{([O_2]_F - [O_2]_E)}{\tau_E}$$

D'après la méthode de Dang et coll. (1977) basée sur l'analyse des moments des quatre équations différentielles couplées, si α_0 est l'aire sous la courbe du signal normé obtenu par la méthode dynamique,

$$\alpha_0 = \frac{1}{k_L a} + \frac{RT}{H} \frac{V_L}{V_G} \tau_G + \tau_G + \tau_E + \tau_F$$

En faisant le même traitement pour la réponse de la sonde seule et avec $\alpha_{0,E}$ l'aire sous la courbe du signal normé obtenu,

$$\alpha_{0,E} = \tau_E + \tau_F$$

En soustrayant les deux valeurs il est obtenu :

$$\Delta\alpha = \frac{1}{k_L a} + \frac{RT}{H} \frac{V_L}{V_G} \tau_G + \tau_G$$

Lorsque τ_G est grand devant $k_L a$ ce qui signifie que la résistance au transfert se fait uniquement du côté du liquide (cas de l'oxygène qui est peu soluble) :

$$\Delta\alpha = \frac{1}{k_L a}$$

D'où la valeur de $k_L a$ en soustrayant les deux aires. Celles-ci sont calculées d'après la méthode des trapèzes.

Les résultats sont présentés dans le tableau 10 pour un taux de solide de 30 % de pyrite et un débit de pulpe de 100 l/h.

Débit de gaz (l/h)	Vitesse superficielle de gaz (m.s ⁻¹)	$k_L a$ (convolution mathématique) (s ⁻¹)	$k_L a$ (moments) (s ⁻¹)
650	0,023	4,3 10 ⁻²	4,0 10 ⁻²
850	0,030	2,6 10 ⁻²	2,9 10 ⁻²
1 000	0,035	3,8 10 ⁻²	3,2 10 ⁻²

Tabl. 10 - $k_L a$ en fonction du débit de gaz (30 % pyrite, 100 l/h de pulpe).

Ces valeurs sont assez disparates à cause des erreurs cumulées d'expérience et de calcul. Ce qu'il faut retenir c'est un ordre de grandeur entre 3 et $4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, ordre de grandeur tout à fait acceptable en se référant aux valeurs de la littérature regroupées dans la thèse de Garcia Ochoa (1998).

3.3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS DU BATCH 2

Les résultats sont présentés à partir du batch 2 puisque le batch 1 a dû être arrêté suite à un incident technique survenu au bout de quelques jours d'expérience.

3.3.1. Suivi des paramètres

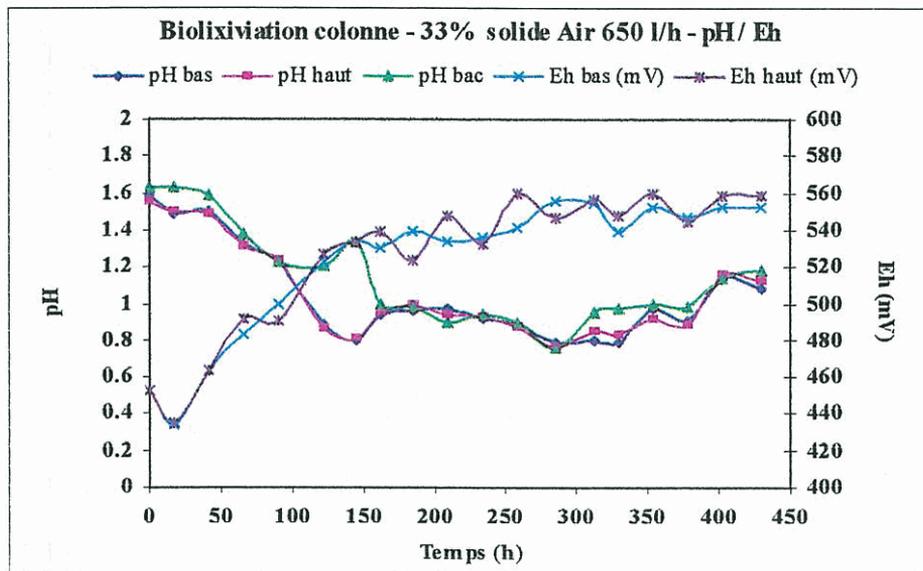


Fig. 11 - Évolution pH/Eh lors du batch 2.

Que ce soient les valeurs de pH ou bien de Eh (fig. 11), celles-ci sont quasiment identiques en haut et bas de colonne ce qui valide l'hypothèse de l'écoulement en milieu parfaitement agité. Le démarrage est rapide et après 2 ou 3 jours de latence, une acidification du milieu est observée. Le potentiel diminue le premier jour puis augmente rapidement et atteint une valeur presque asymptotique aux alentours de 550 mV (par rapport à l'électrode Ag/AgCl) après 6 jours de croissance.

La figure 12 montre une différence entre les concentrations en oxygène dissous en haut et bas de colonne qui n'est pas engendrée par une mauvaise agitation mais qui trouve ses explications dans d'autres causes. En début d'expérience, la biolixiviation n'ayant pas démarré, la concentration en bas de colonne est plus élevée car la pression partielle en oxygène est plus forte. Pour un temps relativement court de deux jours, les concentrations en oxygène chutent à cause de la consommation bactérienne et la concentration en haut de colonne est plus élevée que celle en bas. Deux hypothèses sont possibles pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, le bac de recirculation n'étant pas alimenté en gaz, les bactéries peuvent être affectées par ce manque d'oxygène et se

retrouver plus actives (en réaction à un phénomène d'asphyxie) à leur arrivée en bas de colonne. De plus, le pourcentage de solide est plus élevé en bas de colonne ce qui laisse supposer une activité plus importante des bactéries à ce niveau et donc une consommation d'oxygène plus rapide. La brusque descente de la concentration en haut de colonne, à compter du 13^e jour, reste encore inexpliquée, le seul paramètre ayant également évolué lors de cette période étant la perte de charge qui a légèrement diminué.

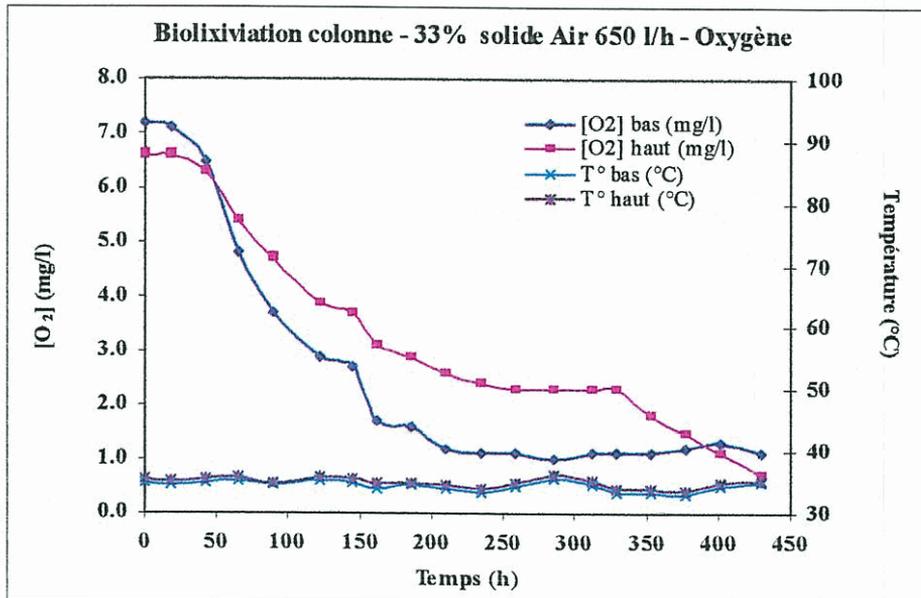


Fig. 12 - Évolution des concentrations en oxygène dissous lors du batch 2.

La densité en haut et bas de colonne est mesurée tous les jours dans des fioles de 500 ml (fig. 13).

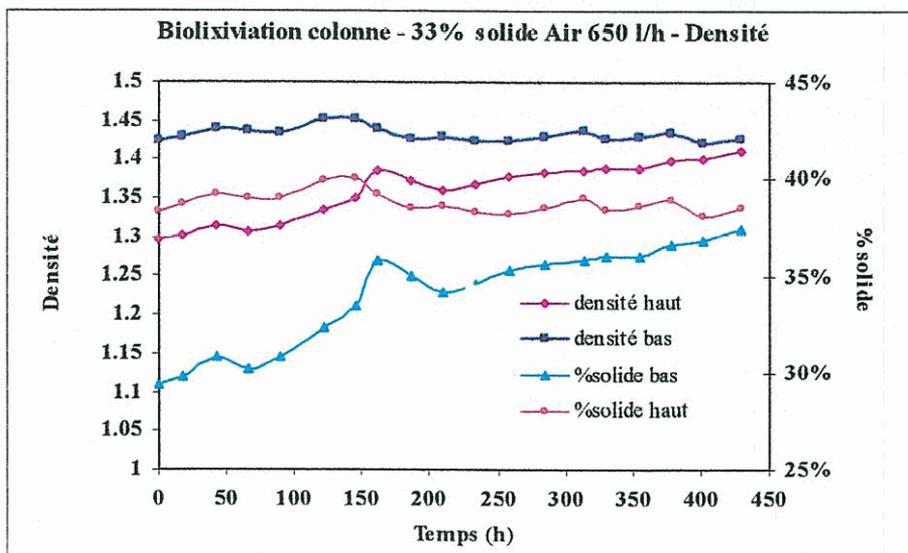


Fig. 13 - Évolution des densités lors du batch 2.

	Bas de colonne	Haut de colonne
Densité initiale	1,425	1,296
% solide initial	38,3	29,4
Densité finale	1,427	1,410

Tabl. 11 - Évolution des densités lors du batch 2

Le pourcentage final n'a pu être déterminé du fait d'un incident technique qui a empêché la récupération d'un échantillon représentatif en fin d'expérience.

La densité du bas est pratiquement constante alors que celle du haut augmente. Au cours de la biolixiviation, la densité du solide et le taux de solide diminuent alors que la densité de liquide augmente. En bas de colonne, l'augmentation de la densité de liquide compense la baisse mais en haut de colonne, la quantité de liquide étant plus importante (moins de solide), cette augmentation de densité du liquide l'emporte et engendre l'augmentation générale de la densité. Les courbes tendent vers une situation où les densités seraient égales en bas et haut de colonne ce qui signifierait une égalité des pourcentages de solide, le liquide étant homogène dans toute la colonne. En effet, en fin d'expérience, il y a moins de solide donc moins de gradient de concentration solide dans la colonne ce qui conduit à une homogénéisation du solide.

3.3.2. Évolution des concentrations

Comme pour les paramètres pH et Eh, les concentrations en cobalt, fer et sulfate sont identiques en haut et bas de colonne. Sont présentés ici, les résultats concernant le cobalt (fig. 14) et le fer (fig. 15), le sulfate est donné en annexe 1.

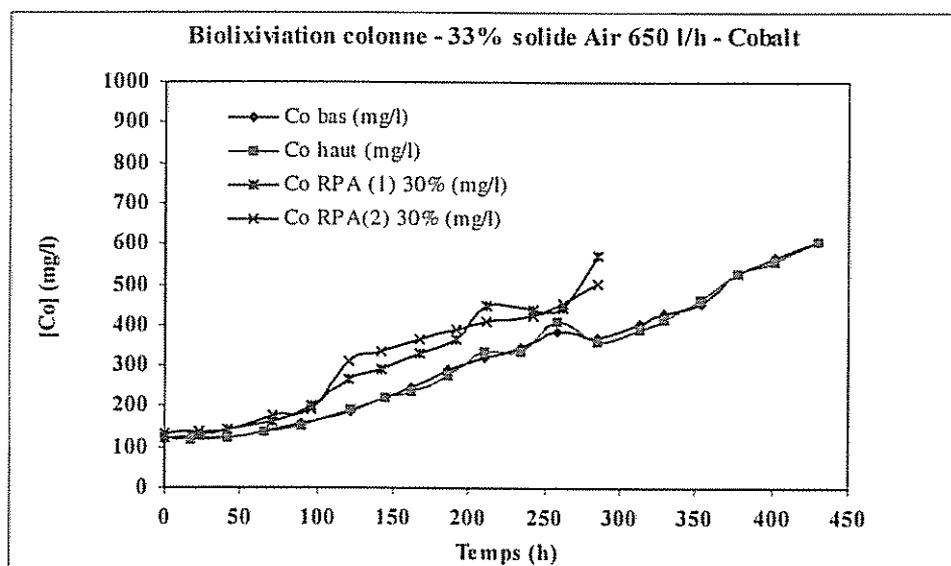


Fig. 14 - Évolution des concentrations en cobalt lors du batch 2.

L'augmentation rapide du cobalt est observée après 4 jours. Pour comparaison, il a été placé sur le même graphique, le suivi de l'inoculum dans des petits réacteurs de 2 l (noté Co RPA (1) et (2)). Les réacteurs agités semblent avoir démarré plus tôt (1 jour avant) mais les vitesses de libération sont très similaires à celle de la colonne. Elles restent néanmoins assez faibles et ce à cause de la faible teneur en cobalt du minerai de départ mais également à cause du taux de solide relativement important (33 %). La concentration maximale atteinte est d'environ 600 mg/l.

Pour le fer, il est observé une augmentation du fer ferreux en solution dès le premier jour (correspondant à la diminution du potentiel Redox) puis une diminution du fer ferreux et une augmentation du fer total en solution, après 5 jours. La concentration maximale atteinte est d'environ 60 g/l.

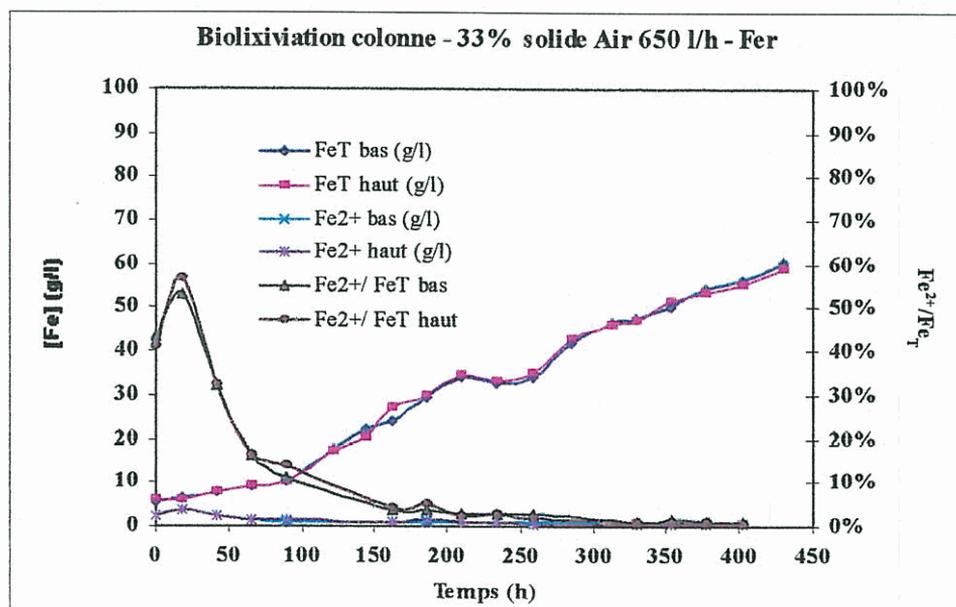


Fig. 15 - Évolution des concentrations en fer lors du batch 2.

3.3.3. Autres résultats

Il n'y a pas eu d'analyses de gaz pour le batch 2, une tentative d'estimation de l'OUR (consommation en oxygène) a été faite en faisant l'approximation que $k_L a$ était constant au cours de la biolixiviation et que la concentration en oxygène dissous à saturation l'était aussi. Autant la première approximation est plausible, autant la deuxième est fautive puisque la force ionique de la solution ne cessant d'augmenter au cours de la biolixiviation, la solubilité de l'oxygène diminue. L'OUR est ainsi estimée à partir des concentrations en oxygène en début d'expérience (qui correspondent à la saturation) et au cours de l'essai, à partir de la relation suivante :

$$\text{OUR} = k_L a ([O_2]^* - [O_2])$$

Un graphe en annexe présente les résultats obtenus par ce calcul « grossier » qui donne une idée à 20 - 25 % près des valeurs d'OUR, valeurs d'autant plus fausses que la réaction se trouve dans un état d'avancement important.

	Bas de colonne	Haut de colonne
OUR max (mg/l/h)	900	800

Aucun bilan global n'a été effectué puisque nous n'avons pu récupérer la pulpe finale suite à un incident technique. Une étude minéralogique donne 50 % de pyrite cobaltifère et 45 % de gypse présents dans l'échantillon final.

3.3.4. Suivi des populations bactériennes

a) Évolution de la concentration bactérienne dans la phase liquide

L'évolution de la concentration des bactéries en suspension dans la phase liquide est donnée par la figure 16.

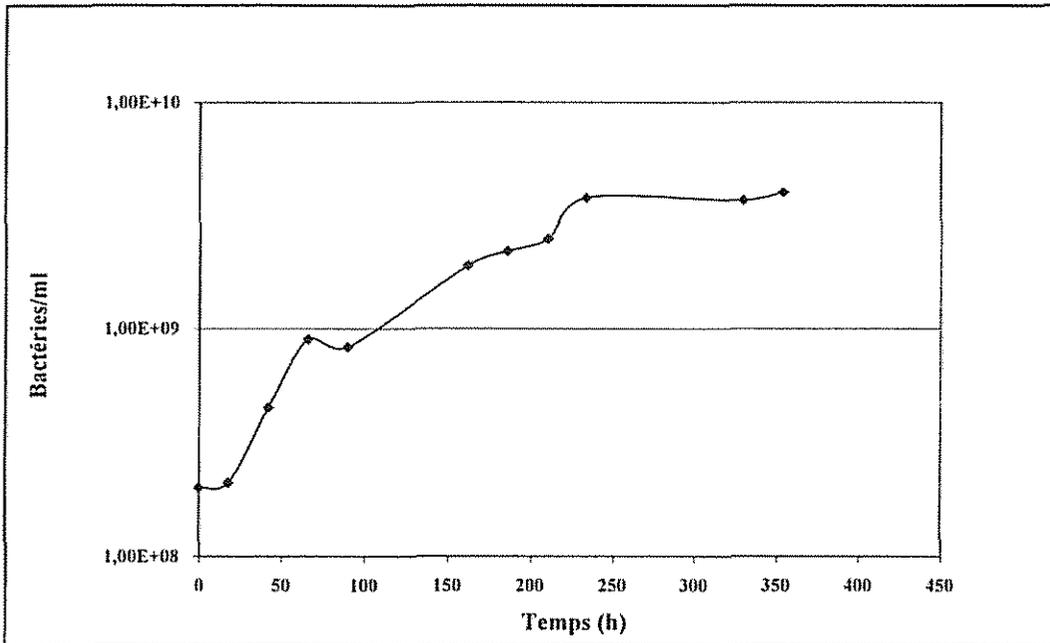


Fig. 16 - Batch 2 : évolution de la concentration en bactéries dans la phase liquide.

La phase de latence est très courte. Une phase de croissance rapide est observée entre 24 et 72 h. La concentration bactérienne croît par la suite plus lentement jusqu'à 4×10^9 bact/ml.

b) Inventaire de la population bactérienne

Pour effectuer l'inventaire, un échantillon d'extrait d'ADN issu de la pulpe utilisée pour inoculer le batch n° 2 a été utilisé. Une librairie de 53 clones a été constituée contenant chacun un fragment d'ADNr 16S bactérien. Un criblage pour différencier les différentes populations présentes a été réalisé grâce à une digestion avec l'enzyme de restriction *Hae* III du fragment d'ADNr 16S de chaque clone, suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose.

Deux profils de digestion différents (47 clones : groupe K01 et 6 clones : groupe K13) ont été observés, indiquant que 2 espèces différentes sont présentes selon une proportion d'environ 1/8 dans la librairie de clones constituée.

Les séquences d'ADNr 16S de 10 des 53 clones (8 du groupe K01 et 2 du groupe K13) ont été analysées partiellement (500 premières paires de bases sur les 1 500 constituant l'ADNr 16S) et comparées entre elles.

Les résultats montrent que sur les 8 clones appartenant au groupe K01, 7 clones sont strictement identiques entre eux en terme de séquence d'ADN et 1 clone (clone K16) présente une seule base différente (soit 0,2 % de divergence par rapport aux 7 autres clones). Le fait que le clone K16 ait le même profil de digestion *Hae* III que ceux restant du groupe K01 n'est pas étonnant car la base différente n'est pas localisée dans une séquence reconnue par *Hae* III (CCGG).

En ce qui concerne les 2 clones séquencés appartenant au groupe K13 (clones K13 et K29) les séquences sont strictement identiques entre elles.

Lorsqu'une différence de quelques bases est observée entre plusieurs clones, plusieurs raisons peuvent être la cause de ces divergences de séquences minimales :

- la présence de plusieurs copies d'ADNr 16S dans une même bactérie ;
- la présence effective de plusieurs bactéries dont les séquences sont très similaires mais pas complètement identiques ;
- une erreur de lecture de la part de l'enzyme polymérase (*Pfu* Turbo) lors de l'amplification initiale des fragments d'ADNr 16S avant leur clonage.

Dans les cas du clone K16 n'ayant qu'une seule base de différence avec les 7 autres clones du groupe K01, l'une ou l'autre des 2 dernières raisons serait la plus probable car l'éventualité de la présence de plusieurs copies d'ADN dans le même génome impliquerait qu'il y ait une proportion égale de clones contenant chacune des copies.

Les séquences partielles (500 premiers nucléotides) du groupe K01, du clone « variant » K16 et du groupe K13 ont été utilisées pour interroger les Banques de données (GenBank et RDP).

Concernant les séquences du groupe K01 et du clone K16, le classement selon la banque de données interrogée des bactéries les plus apparentées est légèrement différent mais fait apparaître le plus souvent le genre *Leptospirillum* (*Leptospirillum* sp. et *Leptospirillum ferrooxidans*) et des clones de bactéries non isolées (cOS17 et cOS7) présentes dans des environnements naturels acides.

En comparant après alignement les séquences partielles des clones inventoriés du batch 2 avec celles de ces bactéries les plus apparentées nous observons finalement que les séquences du clone cOS7 et de *Leptospirillum ferrooxidans* sont les plus proches avec seulement 0,2 et 0,7 % de divergence respectivement (fig. 17).

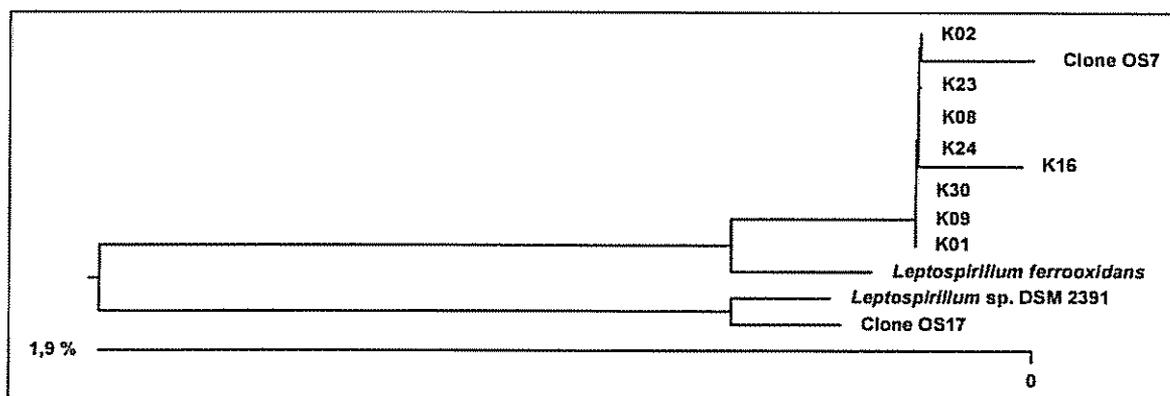


Fig. 17 - Arbre phylogénétique des clones analysés du groupe K01 et des micro-organismes les plus apparentés basé sur la divergence des 500 premiers nucléotides de l'ADNr 16S. La divergence en % entre chaque micro-organisme est représentée par la somme des barres horizontales à leur jonction.

L'analyse de la séquence du clone K13 a d'abord été réalisée sur les 1 000 premiers nucléotides (interrogation des banques et comparaison des séquences) et montre une divergence de séquence relativement importante avec la bactérie la plus apparentée *Thiobacillus caldus* str. GO-1 (4,2 %). La comparaison des séquences entières de l'ADNr 16S du clone K13 avec les espèces les plus apparentées indique une divergence légèrement inférieure à celle calculée avec les 1000 premiers nucléotides. La divergence de séquence entre K13 et les bactéries les plus apparentées est alors égale à 3,6 % avec *T. caldus* str. GO-1, 4,3 % avec *T. caldus* str. KU DSM 8584, 3,8 % avec *T. thiooxidans* et 5,2 % avec *T. ferrooxidans* DSM 9465.

Il est à noter, par ailleurs, la faible divergence phylogénétique des espèces *T. caldus* et *T. thiooxidans* entre elles, comprise entre 1,5 et 1,8 %, alors que la divergence entre ces 2 espèces et *T. ferrooxidans* est comprise entre 5,1 et 5,4 %. Il semble donc que d'un point de vue phylogénétique les 2 espèces *caldus* et *thiooxidans* soient très proches, mais relativement éloignées de *T. ferrooxidans* (fig. 18).

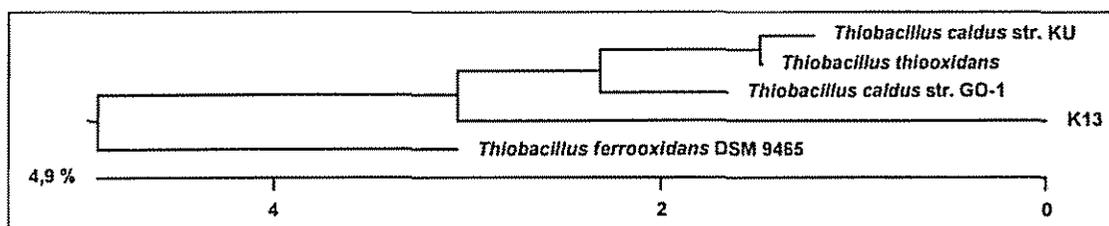


Fig. 18 - Arbre phylogénétique des clones analysés du groupe K13 et des micro-organismes les plus apparentés basé sur la divergence des séquences complètes de l'ADNr 16S. La divergence en % entre chaque micro-organisme est représentée par la somme des barres horizontales à leur jonction.

L'étude d'inventaire moléculaire réalisé sur la population fixée sur le minerai de l'échantillon batch 2 a donc montré la présence de 2 populations.

La première appartient d'un point de vue phylogénétique à l'espèce *Leptospirillum ferrooxidans* avec une très faible divergence de séquences (0,4 %). Les espèces les plus apparentées à la seconde population sont *Thiobacillus caldus* et *Thiobacillus thiooxidans* avec une divergence de séquence relativement importante (4,2 % dans le meilleur des cas avec *Thb. caldus* str. GO-1) qui place d'un point de vue phylogénétique la population inventoriée à la limite de distinction phylogénétique avec les espèces *caldus* et *thiooxidans*.

c) Analyses par SSCP

Deux échantillons issus du batch 2 ont d'abord été analysés :

- l'extrait d'ADN du minerai ;
- l'extrait d'ADN des cellules en suspension.

Les électrophorégrammes respectifs montrent un profil SSCP simple puisque 2 pics seulement apparaissent de manière distincte (valeurs d'abscisses : 6 880 et 6 965) et qu'un 3^e pic (6 930) est deviné entre les 2 autres (fig. 19), ce qui laisse présumer de la présence de 2 à 3 espèces.

Une analyse SSCP a ensuite été réalisée sur les 3 séquences différentes respectives des clones K01, K16 et K13.

Les profils SSCP individuels (fig. 20) montrent que les pics de l'analyse globale SSCP des échantillons de minerai et de cellules en suspension correspondant aux abscisses 6880 et 6965 (les 2 pics les plus importants) sont assignés aux clones K01 et K13 respectivement.

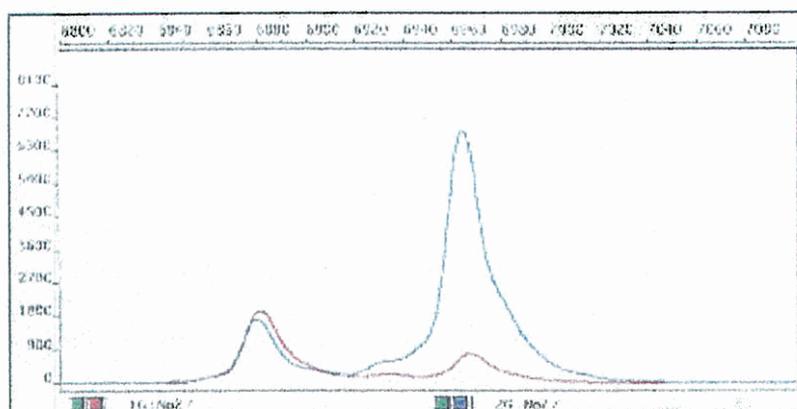


Fig. 19 - Électrophorégramme SSCP des ADN 16s issus de la population associée au minéral (en rouge) et de la population en suspension dans la phase liquide (en bleu).

En revanche le pic du clone K16 (qui possède un seul « mismatch » avec le clone K01) est légèrement décalé par rapport à celui de K01 et ne semble pas apparaître dans les profils SSCP globaux. Il est donc probable que le micro-organisme possédant cette séquence n'est représenté que de façon minoritaire dans les populations mixtes globales analysées et/ou soit masqué par le pic plus important de la bactérie du groupe K01.

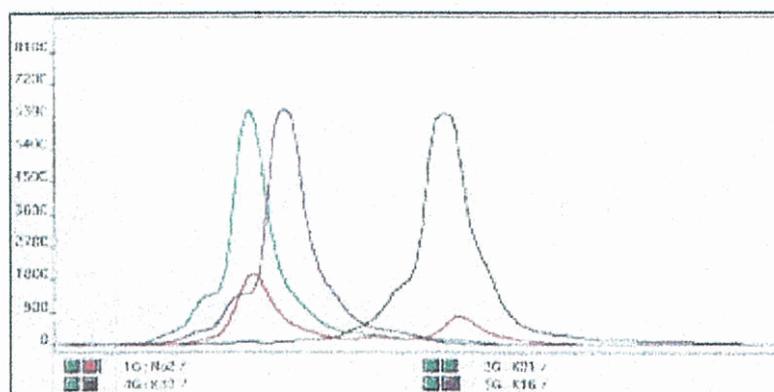


Fig. 20 - Électrophorégramme SSCP des clones : K01 (*L. ferrooxidans*) en vert, K16 (proche K01) en bleu, K13 (*T. caldus*) en noir, profil de la population associée au solide en rouge.

Par conséquent, aucune des 3 séquences des clones analysés n'a permis d'assigner le 3^e pic (abscisse 6 930) du profil SSCP global. Compte tenu de sa petite taille il est possible que ce soit un artefact résultant de la « traînée » de l'un ou l'autre des pics majoritaires ou bien que ce soit une bactérie effectivement présente mais encore non inventoriée. Dans cette dernière hypothèse, ce pourrait être une autre « variante » du

groupe K01 au même titre que le clone K16 (et qui est peut-être aussi dans la librairie des 53 clones) ou encore une autre espèce non inventoriée dans la librairie des 53 clones et ne possédant pas le même profil de digestion *Hae* III.

L'analyse comparée des profils SSCP de la population fixée sur le minerai avec celle en suspension semble indiquer que le rapport de dominance d'une espèce par rapport à l'autre est inversé. En effet, alors que *Leptospirillum ferrooxidans* est majoritaire sur le minerai (ce que confirme aussi la proportion de séquences clonées pour l'inventaire) celle-ci devient minoritaire dans la phase liquide. Il n'est cependant pas exclu que cette espèce soit mieux fixée que *Thiobacillus* et résiste mieux aux étapes de lavages du minerai avant de réaliser l'extraction de l'ADN total.

3.4. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS DU BATCH 3

3.4.1. Suivi des paramètres

Pour ce batch 3, le deuxième lot de pyrite a été utilisé. Sa teneur en cobalt est beaucoup plus élevée (1,37 %). La concentration en solide est abaissée à 20 % alors que le même débit de gaz est testé, à savoir 650 l/h.

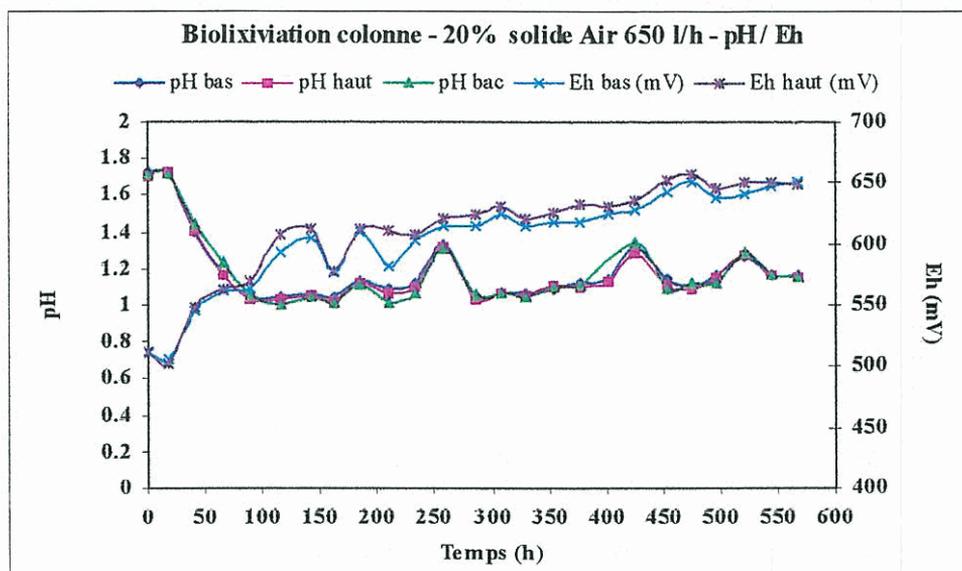


Fig. 21 - Évolution pH/Eh lors du batch 3.

Les commentaires à apporter à la figure 21 sont identiques à ceux faits pour le batch 2. La valeur du potentiel redox maximale est toutefois plus élevée puisqu'elle avoisine 650 mV (soit presque 90 mV de plus que le batch 2), signe d'une meilleure efficacité de la biolixiviation certainement due à la diminution du taux de solide.

Une décroissance beaucoup plus rapide des concentrations en oxygène dissous (fig. 22) est observée. En 5 jours, la concentration en bas de colonne devient inférieure à 1 mg/l alors qu'elle n'était jamais descendue en dessous de cette valeur lors du batch précédent. La chute initiale est très marquée puis il y a stagnation pendant 9 jours à environ 0,5 mg/l en bas et 2,2 mg/l en haut. La première valeur laisse supposer une limitation possible par le transfert d'oxygène. Cette limite pourrait être reculée par augmentation du transfert et donc de la vitesse de gaz. Après 19 jours, les concentrations en oxygène augmentent et tendent vers des limites qui semblent inférieures à celles de départ. Ceci s'explique par l'augmentation de la force ionique qui induit une diminution de la solubilité de l'oxygène dissous ce qui donne des valeurs asymptotiques, en fin de biolixiviation, lorsqu'il n'y a presque plus de consommation, inférieures aux initiales. De plus cela réduit la vitesse de consommation, d'où une remontée moins spectaculaire.

L'activité des bactéries est immédiatement sensible puisque la différence de concentration initiale entre le haut et le bas de la colonne, due à la différence de pression, n'est pas observée dans ce batch.

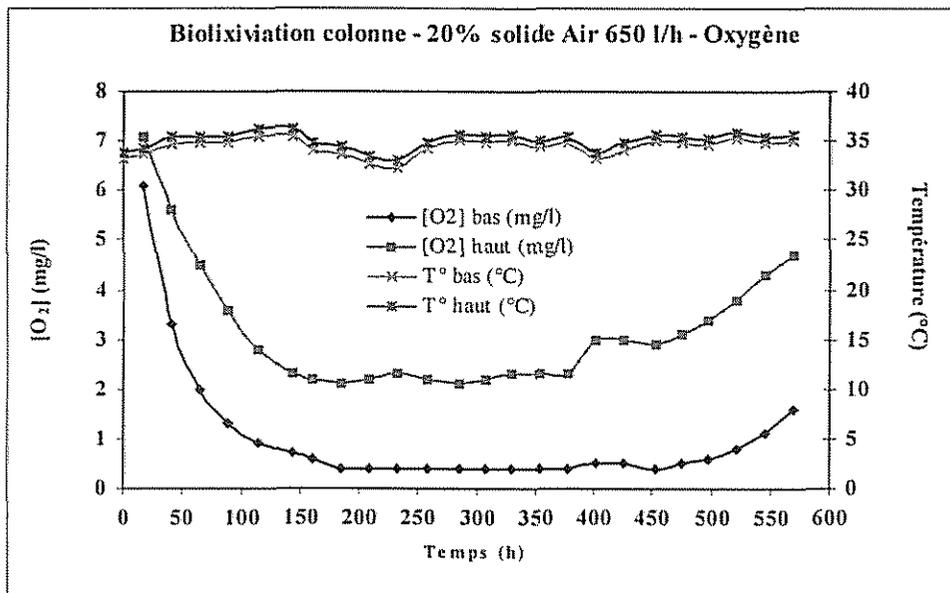


Fig. 22 - Évolution des concentrations en oxygène dissous lors du batch 3.

Chaque jour, les échantillons de pulpe du haut et du bas de la colonne sont filtrés et les densités de liquide et de solide mesurées par picnométrie. L'ensemble de ces résultats est présenté dans la figure 23.

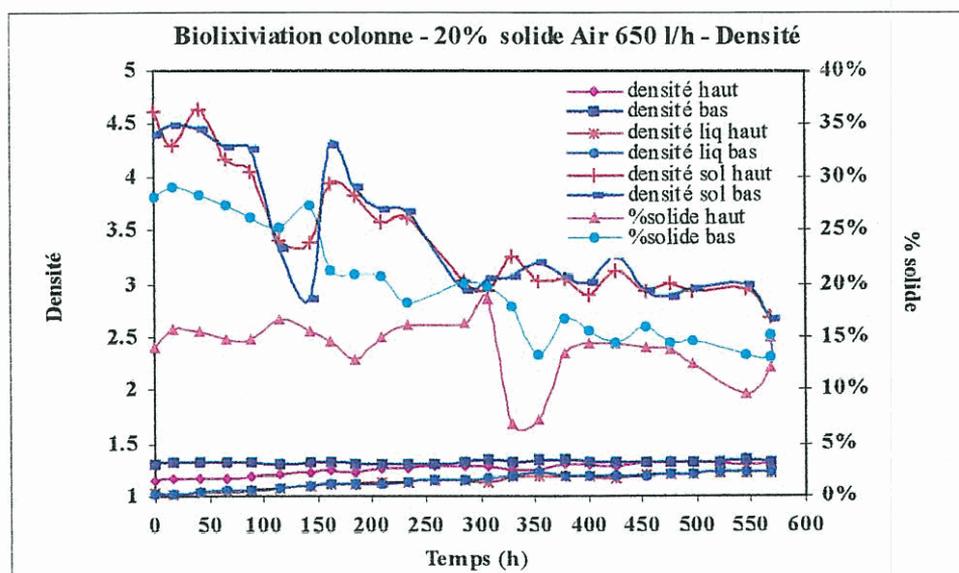


Fig. 23 - Évolution des densités lors du batch 3.

La densité du solide, à peu près identique en haut et bas de colonne, ne cesse de diminuer d'environ 4,5 à 2,7. Le pourcentage de solide est presque constant en haut de colonne (de 14,5 % à 13 %) et diminue fortement en bas de colonne (de 28 % à 13 %). La densité de pulpe augmente en haut de colonne (de 1,158 à 1,315) et légèrement en bas de colonne (de 1,309 à 1,325). Les densités de liquide sont quant à elles identiques en bas et haut de colonne et croissent de façon importante (de 1,03 à 1,23). Ces données confirment l'explication invoquée pour le batch 2 qui n'avait pu être vérifiée, les densités de solide et de liquide n'ayant pas été mesurées. Il est important de noter qu'après 16 jours de biolixiviation, le pourcentage de solide et la densité de pulpe sont égaux en haut et bas de colonne ce qui signifie une homogénéité du solide. Pour un taux de solide d'environ 13 %, le gradient axial de concentration de solide dans la colonne n'existe plus. En fait, le flux montant dispersif des particules est équivalent au flux descendant de sédimentation des particules dans le terme convectif.

	Bas de colonne	Haut de colonne
Densité pulpe initiale	1,309	1,158
Densité liquide initiale	1,027	1,031
Densité solide initiale	4,39	4,62
Taux de solide initial	28,1 %	14,1 %
Densité pulpe finale	1,325	1,315
Densité liquide finale	1,229	1,231
Densité solide finale	2,68	2,68
Taux de solide final	13,1 %	12,2 %

Tabl. 12 - Récapitulatif des taux de solide en début et fin de batch 3.

3.4.2. Évolution des concentrations

Seuls sont présentés ici (fig. 24) les résultats concernant le cobalt. Pour le fer et le sulfate les graphiques sont disponibles en annexe 2.

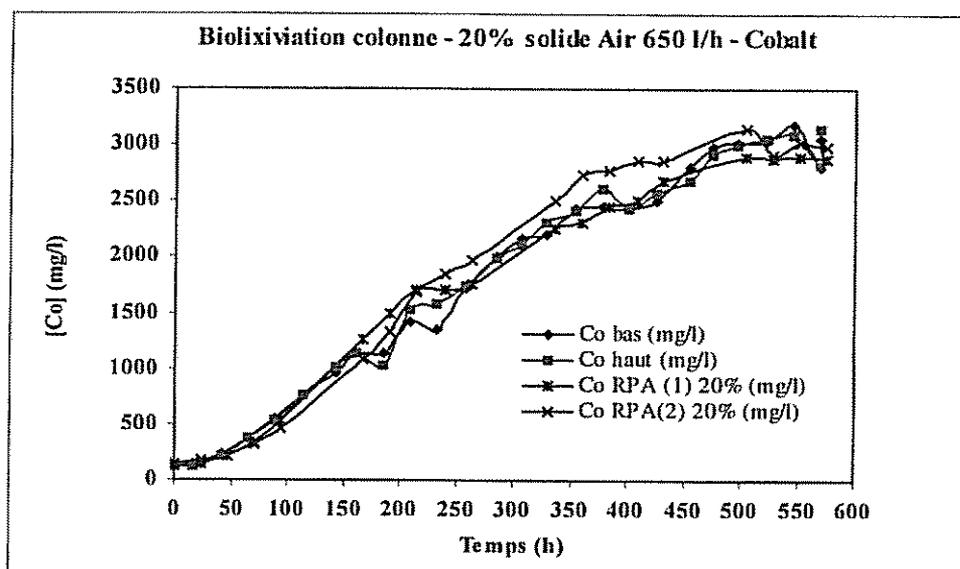


Fig. 24 - Évolution des concentrations en cobalt lors du batch 3.

Le démarrage est beaucoup plus rapide que lors du batch précédent, la montée du cobalt est observée après 2 jours de latence. Ceci est certainement lié à la diminution du taux de solide. Les pentes des concentrations en fonction du temps sont nettement plus importantes et les concentrations maximales obtenues de l'ordre de 3 100 mg/l pour le cobalt (soit 5 fois plus que lors du batch 2) et de 75 g/l pour le fer. Ces cinétiques de libération des métaux sont identiques à celles des petits réacteurs parfaitement agités de 2 l et leur croissance est due, outre à la diminution du taux de solide, également au changement de lot de pyrite (n° 2) qui contient beaucoup plus de cobalt.

3.4.3. Autres résultats

L'OUR a été également estimée en haut et bas de colonne selon la méthode explicitée pour le batch 2. Une moyenne de ces valeurs a également été faite. Des analyses de gaz ont pu être entreprises, malheureusement pas dans la phase de croissance maximale suite à un problème de cryothermostat. Ces analyses fournissent une valeur de l'OUR globale selon la formule:

$$\text{OUR}(\text{mg/l/h}) = \frac{32000}{V_u} \frac{Q^E P^E}{RT^E} (\%O_2^E - \%O_2^S)$$

- V_u volume utile de pulpe
- Q^E débit de gaz entrant
- P^E pression de gaz entrant
- T^E température de gaz entrant

Les hypothèses suivantes sont acceptées : la température d'entrée des gaz est la température ambiante, la pression d'entrée est mesurée avec le capteur de pression à 33 % de solide et 0 % de solide puis une régression linéaire donne la valeur pour 20 % de solide, enfin la différence de débits d'entrée/sortie est négligeable.

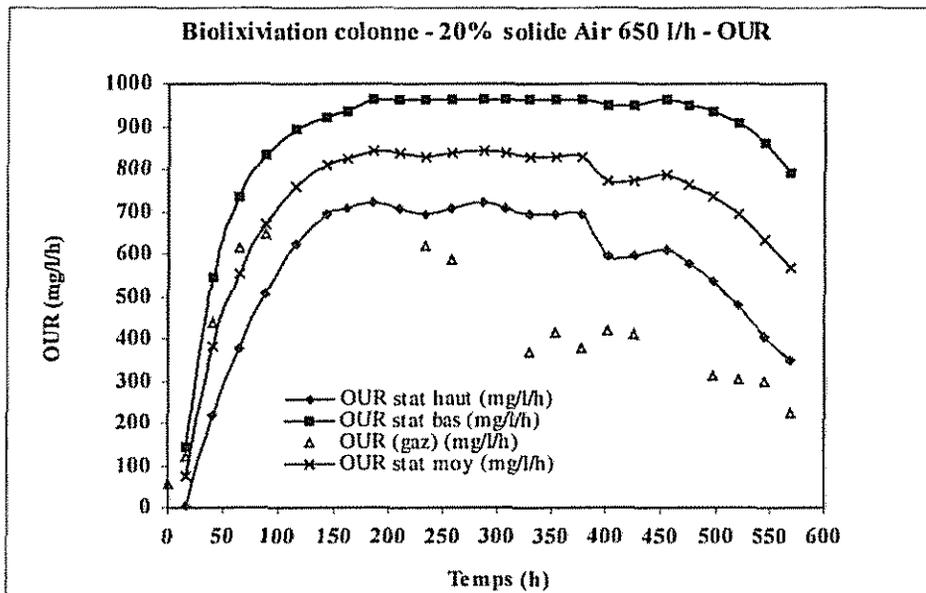


Fig. 25 - Évolution de l'OUR lors du batch 3.

La figure 25 montre qu'au début de l'expérience, les valeurs obtenues par l'analyse des gaz correspondent aux valeurs moyennes obtenues par le calcul en fonction des concentrations en oxygène. Par contre, en fin d'expérience de biolixiviation, l'OUR calculée selon la même méthode est largement surestimée ce qui confirme l'explication donnée pour le batch 2 sur la diminution de la solubilité de l'oxygène.

	Bas de colonne	Haut de colonne
OUR max (mg/l/h)	950	750

Des pourcentages de libération du cobalt ((quantité de cobalt libéré dans le liquide-quantité de cobalt initiale dans le liquide)/quantité de cobalt initiale dans le solide) ont été calculés à partir des valeurs des concentrations en cobalt et des densités de pulpe et de liquide, en raisonnant à volume constant. Ne sachant pas exactement les quantités de cobalt apportées par le solide de l'inoculum, deux valeurs sont données, l'une par excès c'est-à-dire en considérant que l'inoculum n'apporte pas de cobalt sous forme solide et l'autre par défaut en considérant que le solide de l'inoculum apporte proportionnellement la même quantité de cobalt que le minerai. Ces deux valeurs encadrent la vraie valeur inconnue du pourcentage de libération.

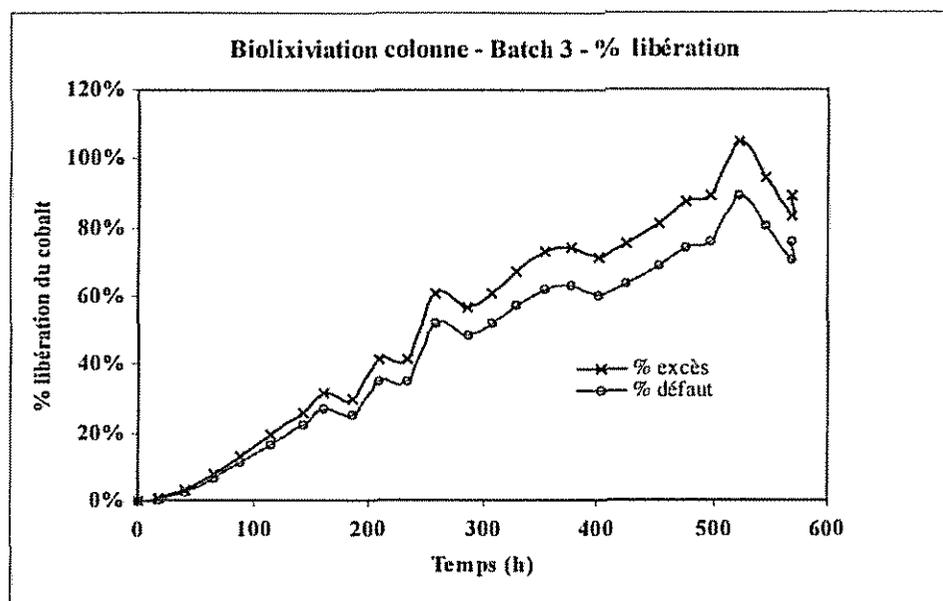


Fig. 26 - Pourcentage de libération du cobalt lors du batch 3.

D'après la figure 26, la valeur maximale se situerait entre 90 % et 95 %.

Un bilan de matière entre la pulpe initiale et la pulpe finale a été fait. Pour ce faire, un prélèvement de la bio-pulpe finale a été réalisé, filtré et le solide et le liquide envoyé à l'analyse pour dosage des principaux éléments (voir résultats en annexe). Le poids global de matière récupérée en fin de batch n'étant pas connu, le bilan a été calculé à partir du logiciel BILCO en raisonnant sur 1 litre de pulpe, ce qui permet d'obtenir des valeurs cohérentes qui satisfont aux bilans de matière sur les principaux éléments (cobalt, fer, soufre). Les calculs détaillés sont explicités en annexe et résumés dans le tableau 13.

	Initial	Final
Liquide		
Masse (kg)	1,01	1,24
Densité	1,031	1,230
Co (mg/l)	115	3 090
Fe (g/l)	7,07	75
SO ₄ (g/l)	22,2	177
Solide		
Solide (kg)	0,223	0,200
Co (%)	1,4	0,13
Fe (%)	33,5	4,8
SO ₄ (%)	5,8	50,2
S (%)	40,2	20,7

Tabl. 13 - Bilan de matière sur le batch 3 pour 1 l de pulpe.

Ces résultats correspondent à 92 % du cobalt initialement dans le solide libéré, 89 % du fer et 92 % du soufre oxydé.

Une étude minéralogique donne les pourcentages des espèces minérales suivants :

- Pyrite 10 % ;
- Gypse 81 % ;
- Quartz 1 % ;
- Illite/micas et hydroxydes de fer 5 %.

Le pourcentage de pyrite restant (correspondant à 90 % de pyrite dégradée) est en accord avec le pourcentage de soufre oxydé, la pyrite étant le seul sulfure de départ. Le fer libéré est peu précipité (5 %) mais ce pourcentage confirme la valeur moins élevée du pourcentage de libération du fer obtenu par le bilan de matière.

3.4.4. Suivi des populations bactériennes

a) *Évolution de la concentration bactérienne dans la phase liquide*

L'évolution de la concentration bactérienne totale en suspension est donnée par la figure 27.

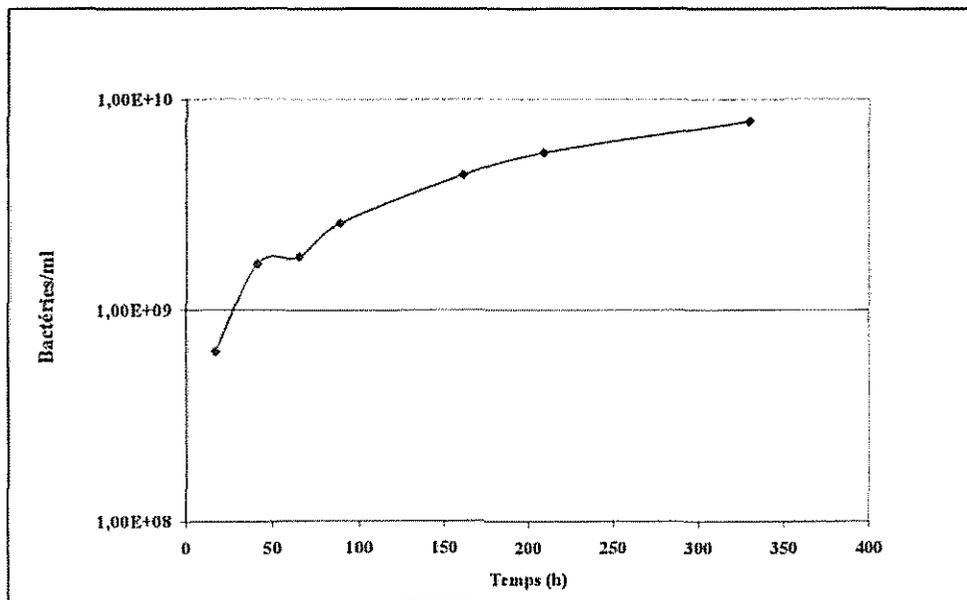


Fig. 27 - *Évolution de la concentration bactérienne totale en suspension dans la phase liquide lors du batch 3.*

De façon identique au batch 2, la phase de latence est très courte, voire inexistante. Cependant, en fin de batch 3, la concentration bactérienne est nettement plus élevée que lors du batch 2.

b) *Inventaire moléculaire des espèces bactériennes en présence*

Une troisième espèce, qui était absente dans les échantillons du batch 2, a été détectée en analyse SSCP dans les prélèvements du batch 3. Un clonage de produits d'amplification de l'ADNr 16S a été réalisé à partir de l'extrait d'ADN de l'échantillon

total prélevé le dernier jour de culture du batch 3, où cette espèce inconnue représente environ 30 % de la population.

Le séquençage des 500 premiers nucléotides de l'un des clones contenant l'ADNr 16S, dont l'analyse SSCP a révélé qu'il représentait bien l'espèce inconnue, a été effectué. La comparaison de cette séquence avec celles des banques de données Genbank et RDP montre que 3 bactéries (BU138, Os77 et A70) non-cultivées sont très proches puisqu'elles n'ont qu'une divergence respective de 0,2 %, 0,7 % et 1,1 %. Ces bactéries proviennent d'environnements acides rencontrés à proximité de mines. Après ces 3 bactéries non-cultivées, viennent en 4^e et 5^e position des bactéries appartenant à l'espèce *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* et ayant une divergence de 4,0 à 4,5 % avec notre espèce inconnue.

L'analyse complète de l'ADNr 16S cloné de cette espèce inconnue est en cours. Les résultats permettront sans doute de confirmer les résultats de comparaison des séquences partielles.

La population bactérienne du batch 3 contient donc trois espèces : *Leptospirillum ferrooxidans*, une espèce proche de *T. caldus* qui sera nommée *T. caldus* par la suite, et une espèce proche de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* qui sera nommée *Sulfobacillus* par la suite.

c) Suivi qualitatif et semi-quantitatif de la population du batch 3

L'analyse SSCP permet de suivre l'évolution des proportions des différentes espèces présentes dans le milieu de façon semi-quantitative. En effet, les phases d'extraction, de purification et d'amplification de l'ADN sont susceptibles d'introduire une légère modification des proportions déterminées ensuite par SSCP. D'autre part, une espèce très minoritaire par rapport aux organismes majeurs peut ne pas être détectée. Cependant, l'analyse SSCP représente un progrès significatif par rapport au dénombrement classique par microscopie optique, car elle fournit des informations sur les bactéries associées à la phase solide, et les organismes en présence sont formellement identifiés.

Phase liquide

L'évolution des proportions de chacune des trois espèces en suspension dans la phase liquide est donnée par la figure 28. L'analyse SSCP n'a détecté qu'une seule espèce, *L. ferrooxidans*, dans l'inoculum du batch 3. Les autres organismes sont certainement présents, mais en quantité trop faible pour être analysés. *Thiobacillus caldus* se développe très rapidement et représente 98 % de la population en suspension dans la phase liquide, au bout de 24 h. Puis, la proportion de *L. ferrooxidans* augmente progressivement, aux dépens de *T. caldus*, et devient majoritaire après 15 jours d'expérience. *Sulfobacillus* demeure minoritaire dans la phase liquide, et représente au plus 10 % de la population bactérienne.

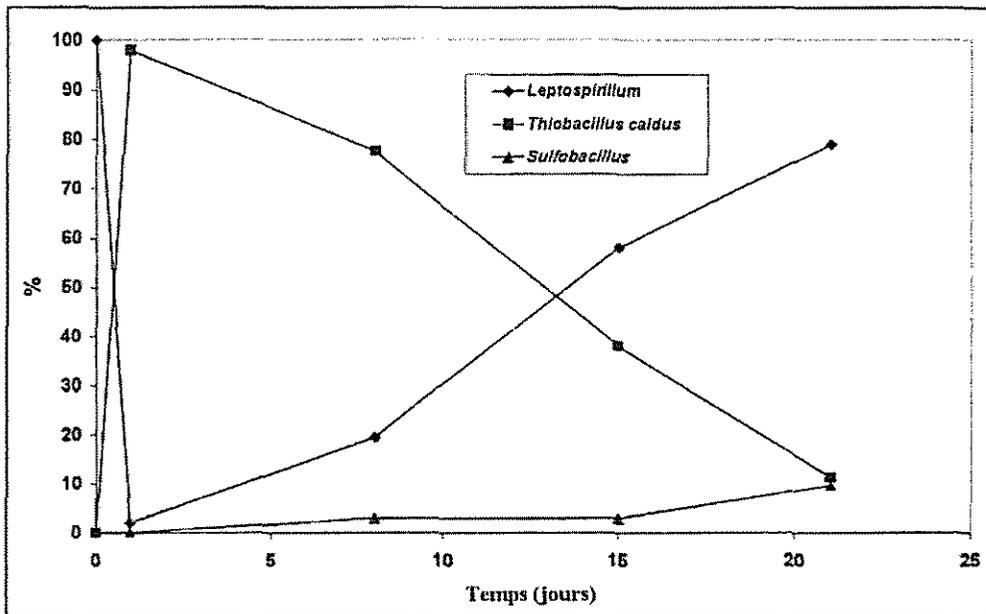


Fig. 28 - Batch 3 : suivi par SSCP de la population bactérienne dans la phase liquide.

Phase solide

En début d'expérience, il n'a pas été possible d'extraire ou amplifier de l'ADN des bactéries associées à la phase solide. Cette population n'a pu donc être analysée qu'à partir du 7^e jour de batch (fig. 29). L'espèce majoritaire, dans la population bactérienne associée au solide, est *L. ferrooxidans*. *Sulfo bacillus* représente 15 % de la population dans la phase de biolixiviation active, puis 30 % au cours de la phase de ralentissement. *T. caldus* représente moins de 10 % de la population associée au solide.

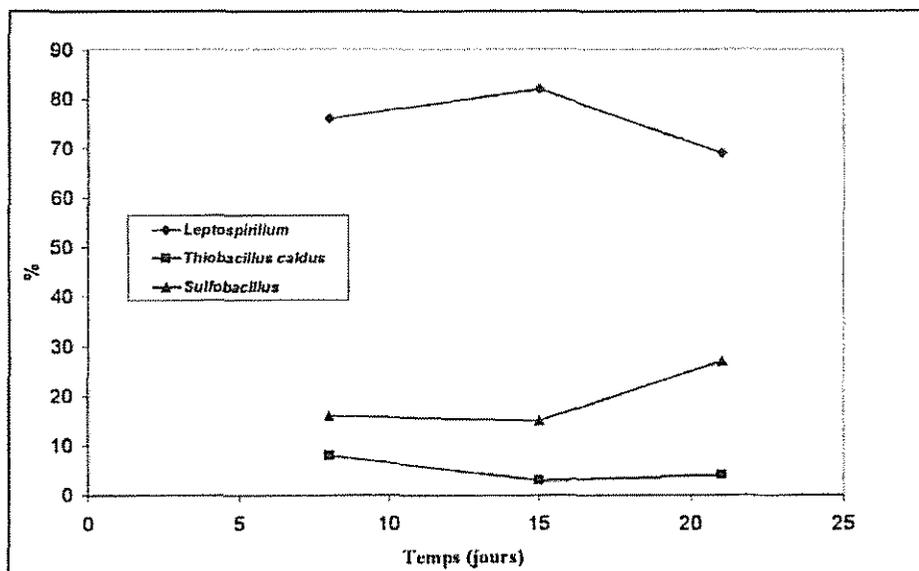


Fig. 29 - Suivi par SSCP de la population bactérienne associée au solide lors du batch 3.

Population totale

L'évolution des proportions des espèces en présence dans la pulpe totale montre que les contributions respectives de la phase liquide et de la phase solide à la population bactérienne totale sont du même ordre de grandeur (fig. 30). En d'autres termes, pour chaque échantillon analysé, les proportions déterminées dans la pulpe totale sont proches des valeurs obtenues en calculant les moyennes des proportions dans la phase liquide et sur la phase solide. *L. ferrooxidans* est la seule espèce détectée dans l'inoculum. Sa contribution diminue en début de batch au profit des deux autres espèces, puis augmente aux dépens de *T. caldus*.

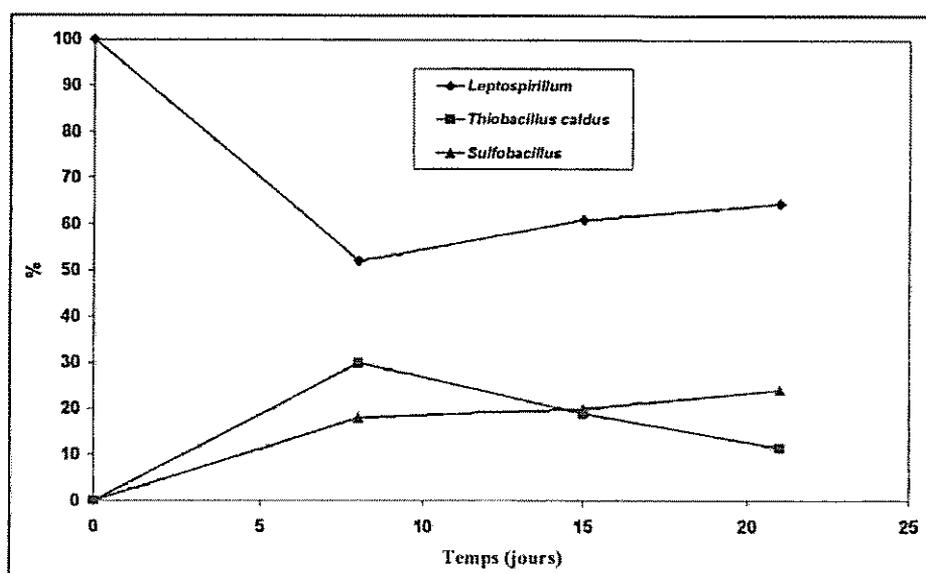


Fig. 30 - Suivi par SSCP de la population bactérienne totale lors du batch 3.

Comparaison analyse SSCP-microscope optique

Les résultats du suivi par SSCP de la population dans la phase liquide sont comparés aux analyses morphologiques effectuées en microscopie optique (fig. 31).

La microscopie permet de distinguer les spirilles des bâtonnets. *L. ferrooxidans* peut se présenter sous la forme de spirilles, de vibrios ou de coques, en fonction des conditions de culture. *T. caldus* et *Sulfobacillus* sont des bâtonnets plus ou moins caractéristiques. Cependant, les bâtonnets courts peuvent être confondus avec des coques. Au cours de l'observation au microscope optique, les spirilles et les vibrios sont placés dans l'ensemble « *Leptospirillum* », alors que les bâtonnets typiques sont dénombrés en tant que bâtonnets, *T. caldus* et *Sulfobacillus* étant indiscernables par cette méthode. Il serait sans doute possible de les distinguer par une coloration de GRAM, mais il faudrait mettre au point une méthode de dénombrement associée à la technique de coloration. Les coques ne sont pas dénombrées.

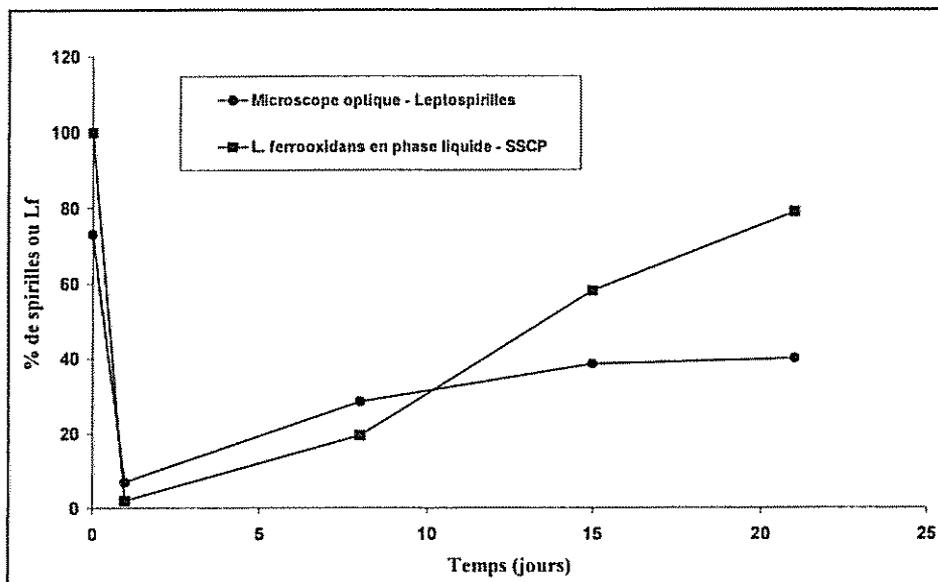


Fig. 31 - Évolution de la proportion de Leptospirilles analysée par SSCP ou microscopie optique dans la phase liquide lors du batch 3.

En début de batch n° 3, les résultats des deux méthodes, SSCP et microscopie optique, sont assez proches. À partir du 15^e jour de batch, la méthode SSCP donne des valeurs plus élevées que le microscope optique. En fait, les résultats obtenus par SSCP sont cohérents avec les conclusions d'une étude antérieure (F. Battaglia *et al.*, 1998) effectuée sur un pilote de biolixiviation en réacteurs parfaitement agités fonctionnant en continu. Lors de cette expérience, la proportion de spirilles augmentait avec la concentration en fer ferrique, et atteignait 80 % pour une concentration en Fe^{3+} proche de celle obtenue à la fin du batch 3 (70 g/l). Plusieurs auteurs ont montré que les thiobacilles sont plus sensibles au fer ferrique que *Leptospirillum* et que cette dernière espèce est favorisée par la présence de pyrite dans le milieu de biolixiviation (Helle et Onken, 1988 ; Johnson, 1991).

Les deux méthodes, SSCP et microscopie optique, indiquent la même tendance correspondant à une augmentation de la proportion de cellules de *Leptospirillum* en suspension dans la phase liquide au long du temps. La divergence des valeurs données par les deux méthodes, en fin de batch 3, peut avoir diverses origines : modification de la morphologie de *Leptospirillum*, qui deviendrait moins typique à l'observation directe, modification de la proportion de bactéries libres ou fixées au cours de la conservation des échantillons, agrégation des cellules de *Leptospirillum* dans une gangue de mucus, qui favoriserait la décantation de ces cellules.

3.5. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS DU BATCH 4

3.5.1. Suivi des paramètres

Pour ce batch 4, le lot de pyrite utilisé est le même que pour le batch 3. La concentration en solide est toujours de 20 % mais le débit de gaz testé est augmenté de 650 à 1 000 l/h. Un réacteur parfaitement agité de 21 l est démarré en parallèle pour comparaison (air 360 l/h, 1 % CO₂, agitation 390 tr/mn).

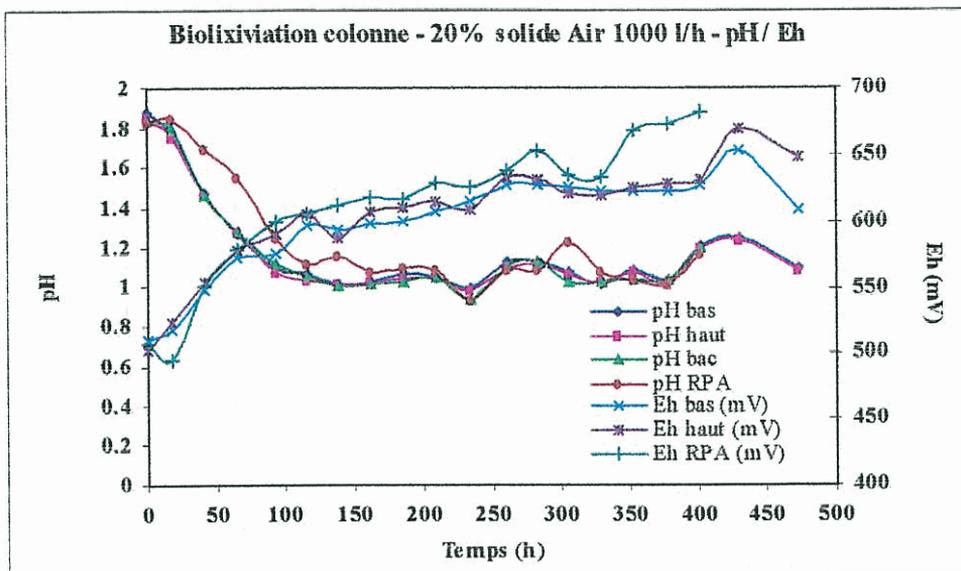


Fig. 32 - Évolution pH/Eh lors du batch 4.

Les commentaires de la figure 32 sont identiques à ceux du batch précédent. Il n'est pas observé de phase de latence puisque le pH décroît dès le premier jour. Les courbes sont similaires pour la colonne et pour le réacteur parfaitement agité mis à part en fin d'expérience pour le potentiel redox. La valeur maximale atteinte pour celui-ci est de 650 mV, comme pour le batch 3.

La diminution de la concentration en oxygène dissous est moins rapide que pour le batch précédent (fig. 33). En 9 jours la concentration en bas de colonne devient inférieure à 1 mg/l contre 5 jours lors du batch 3. Ensuite, une légère stagnation à 3,5 mg/l est observée en haut de colonne alors qu'il n'y a pratiquement pas de stagnation en bas de colonne mais une descente à 0,5 mg/l après 13 jours de biolixiviation puis une remontée. Cette remontée est plus faible que la descente, ceci est dû à l'augmentation de la force ionique. Ce profil d'oxygène indique moins de limitation par le transfert d'oxygène puisque la décroissance est moins importante et que la stagnation à des valeurs potentiellement limitantes n'est que de faible durée.

En ce qui concerne les densités, les courbes obtenues ont la même allure que lors du batch 3 à la différence de la cinétique près. En effet, les phénomènes observés lors du batch précédent se retrouvent ici mais sont accélérés. Les résultats sont exposés dans la figure 34 et récapitulés dans le tableau 14.

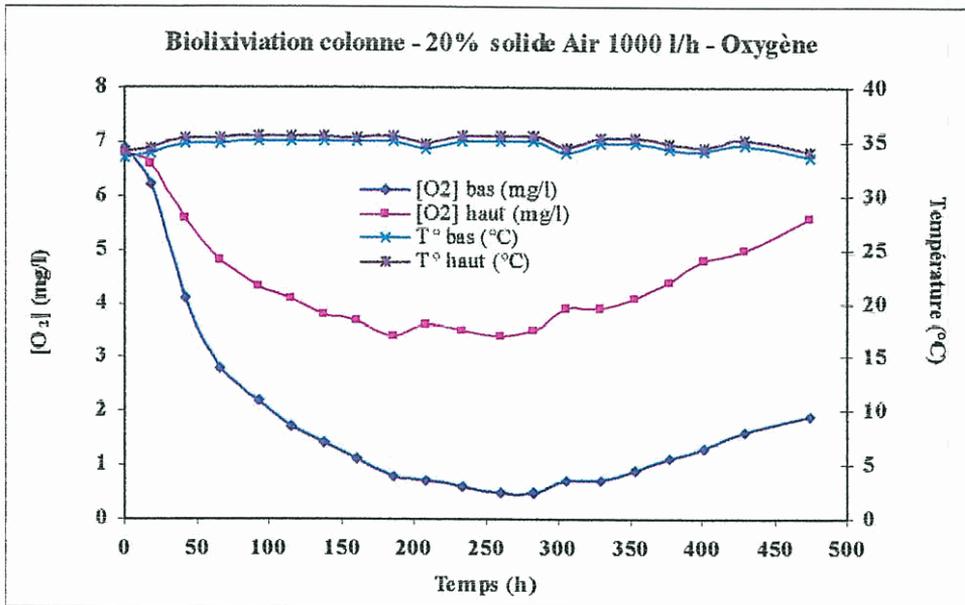


Fig. 33 - Évolution des concentrations en oxygène dissous dans la colonne lors du batch 4.

	Bas de colonne	Haut de colonne
Densité pulpe initiale	1,272	1,146
Densité liquide initiale	1,031	1,032
Densité solide initiale	4,26	4,05
Taux de solide initial	27,8 %	17,8 %
Densité pulpe finale	1,332	1,325
Densité liquide finale	1,238	1,238
Densité solide finale	2,58	2,78
Taux de solide final	13,0 %	12,0 %

Tabl. 14 - Récapitulatif des taux de solide en début et fin de batch 4

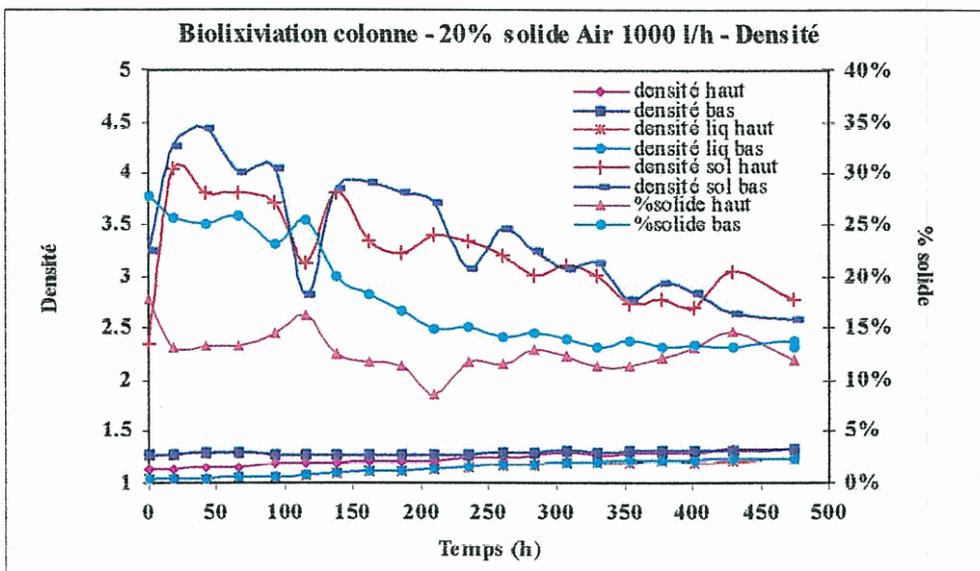


Fig. 34 - Évolution des densités lors du batch 4.

3.5.2. Évolution des concentrations

Comme précédemment, les résultats concernant le cobalt sont présentés dans la figure 35 alors que les autres (fer, sulfate) le sont en annexe 3.

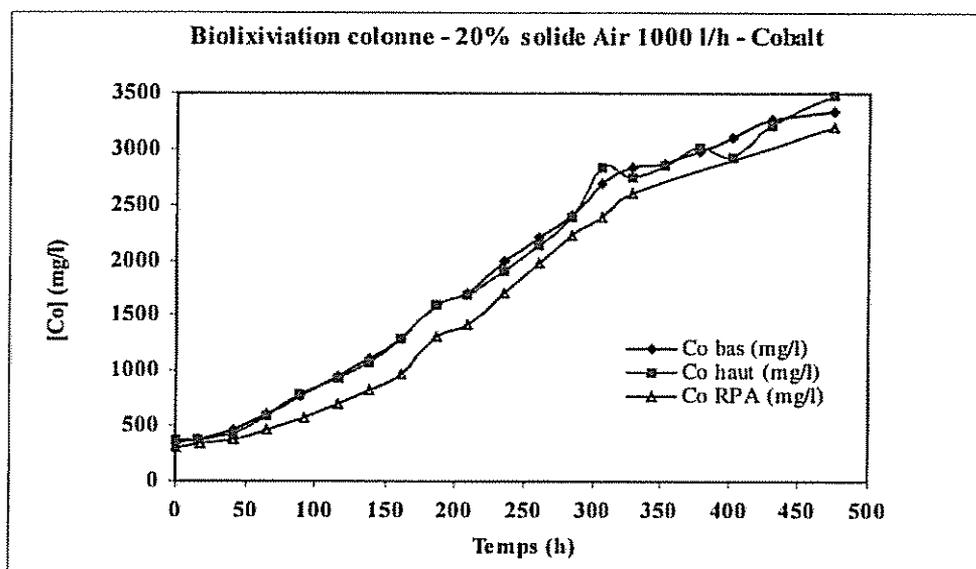


Fig. 35 - Évolution des concentrations en cobalt lors du batch 4.

Le démarrage est très rapide et les concentrations maximales atteintes sont de l'ordre de 3 250 mg/l pour le cobalt et 75 g/l pour le fer. Les cinétiques de libération des métaux sont légèrement supérieures à celles d'un réacteur parfaitement agité de 21 l, évoluant en parallèle à la même concentration et avec le même minerai. Les valeurs maximales pour le réacteur parfaitement agité sont légèrement inférieures (3 100 mg/l pour le cobalt) et ceci est peut être dû à une légère différence de taux de solide, la colonne se trouvant en moyenne aux alentours de 23 %.

3.5.3. Autres résultats

L'OUR est mesurée à partir de l'analyse des gaz et des hypothèses explicitées au paragraphe 3.4.3. et comparée à celles calculées à partir des concentrations en oxygène dissous (fig. 36). Ces valeurs sont cohérentes entre elles jusqu'au milieu du batch, après la méthode de calcul par les concentrations en oxygène surestime l'OUR. Les valeurs obtenues pour le réacteur parfaitement agité semblent plus hautes que celles de la colonne mais également plus disparates ce qui laisse supposer une assez grande incertitude sur ces mesures. Les OUR maximales semblent assez faibles et devraient être plus hautes que celles du batch précédent dans la mesure où les cinétiques de libération des métaux sont plus rapides. Ceci est peut être dû à une sous-estimation du k_{La} pour ce débit de gaz.

	Bas de colonne	Haut de colonne
OUR max (mg/l/h)	910	450

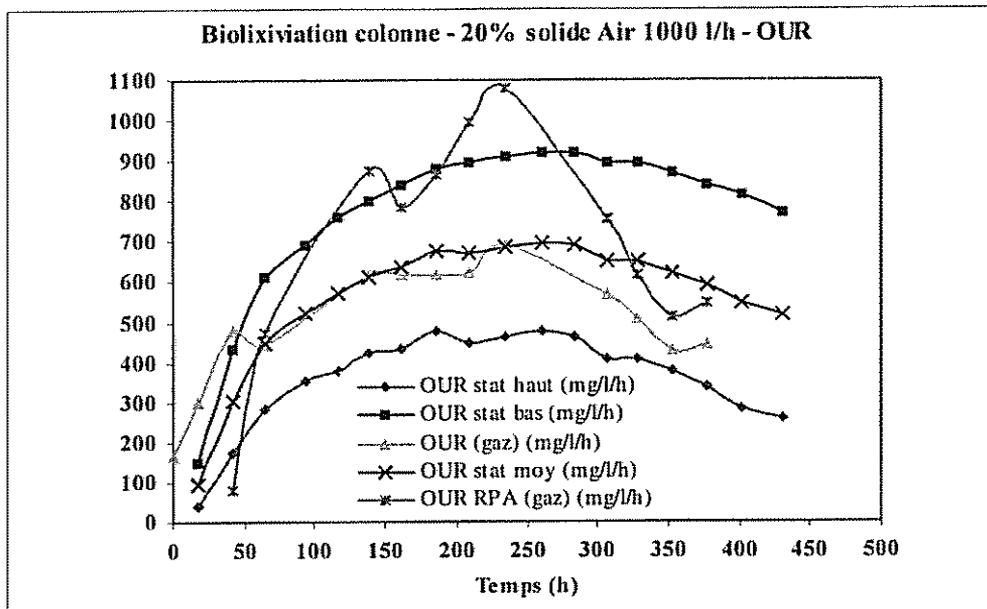


Fig. 36 - Évolution de l'OUR lors du batch 4.

Un bilan de matière a été réalisé au moyen du logiciel BILCO en prenant en compte la totalité de la pulpe initiale et la totalité de la pulpe finale. La reconstitution des données et les bilans cohérents fournissent les résultats finaux exposés dans le tableau 15 ainsi que les résultats détaillés en annexe 6.

	Initial	Final
Liquide		
Masse (kg)	24,31	29,62
Densité	1,029	1,240
Co (mg/l)	343	3 200
Fe (g/l)	8,7	82,8
SO ₄ (g/l)	22,8	131
Solide		
Solide (kg)	5,32	4,24
Co (%)	1,40	0,145
Fe (%)	37,2	4,9
SO ₄ (%)	7,9	55,4
S (%)	36,0	24,8

Tabl. 15 - Bilan de matière sur le batch 4 pour la totalité de la pulpe.

Ces résultats correspondent à 92 % du cobalt initialement dans le solide libéré, 90 % du fer et 85 % du soufre oxydé.

Une étude minéralogique donne les pourcentages des espèces minérales suivants :

- Pyrite 11 % ;
- Bassanite 83 % ;
- Quartz 1 % ;
- Feldspath 4 % ;
- Illite/micas 0,6 %.

Le pourcentage de pyrite restant (correspondant à 89 % de pyrite dégradée) est en accord avec le pourcentage de soufre oxydé. Contrairement aux batchs précédents, le minéral porteur de CaO n'est pas le gypse (32,5 % CaO) mais la bassanite (40,65 % CaO). Le fer ne semble pas présent sous une autre forme cristalline que celle de la pyrite.

3.5.4. Suivi des populations bactériennes

a) Évolution de la concentration bactérienne dans la phase liquide

L'évolution de la concentration bactérienne totale en suspension dans la phase liquide de la colonne et du RPA est donnée par la figure 37.

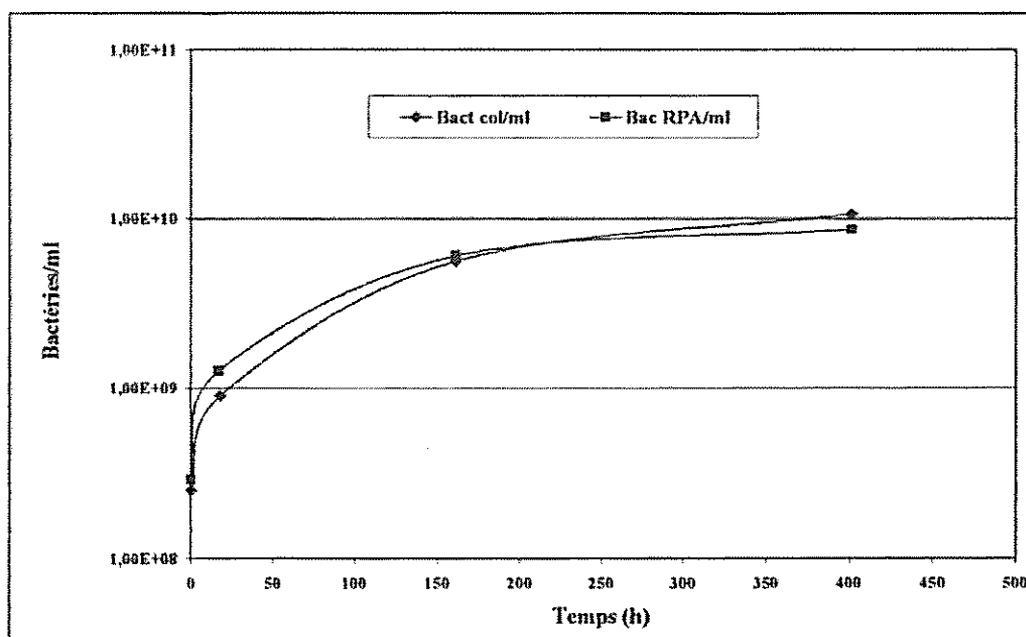


Fig. 37 - Batch 4 : évolution de la concentration bactérienne totale dans la phase liquide.

La croissance bactérienne démarre sans phase de latence, et demeure équivalente dans les deux réacteurs au cours du batch. La concentration finale en bactéries en suspension dans la phase liquide est un peu plus élevée que lors du batch 3, et nettement plus que celle du batch 2.

b) Suivi qualitatif et semi-quantitatif des espèces en présence

Les populations bactériennes de la colonne et du RPA ont été suivies par analyse SSCP. Dans les deux réacteurs, une évolution comparable à celle du batch 3 a été obtenue. Dans la phase liquide (fig. 38), *T. caldus* devient l'espèce majoritaire en début de batch, puis son importance décroît au profit de *Leptospirillum*. La principale différence entre la colonne et le RPA est l'évolution de la proportion de *Sulfobacillus*. Cette espèce est présente en plus grande proportion dans la colonne que dans le RPA en fin de batch. Cette augmentation de la quantité de *Sulfobacillus* se fait aux dépens des deux autres espèces.

L'espèce bactérienne la plus présente dans la population associée à la phase solide est toujours *Leptospirillum* (fig. 39). Au niveau des populations associées au solide, la principale différence entre la colonne et le RPA réside encore dans la proportion de Sulfobacilles, plus nombreux dans la colonne que dans le RPA en fin de batch. Cet accroissement de la quantité de cellules de *Sulfobacillus* se fait principalement aux dépens de *Leptospirillum*, dont la proportion diminue dans la colonne alors qu'elle augmente dans le RPA.

De la même façon que lors du batch précédent, les proportions des espèces en présence dans la population bactérienne totale sont peu différentes des moyennes (% en phase liquide + % sur la phase solide)/2. Les contributions de ces deux phases à la population bactérienne globale sont donc du même ordre de grandeur (fig. 40). Contrairement au batch 3, *Leptospirillum* n'est pas toujours majoritaire dans la population totale. En effet, après 8 jours, *T. caldus* est l'espèce majoritaire. Ce phénomène est plus marqué dans la colonne que dans le RPA. En fin de batch, *Leptospirillum* est très largement majoritaire dans le RPA, alors qu'il est sérieusement concurrencé par *Sulfobacillus* dans la colonne. Il est possible que la différence de mode d'agitation entre la colonne et le RPA ait une influence sur les proportions des espèces en présence. Le développement de *Sulfobacillus* semble favorisé dans la colonne, au niveau de laquelle les contraintes de cisaillement sont plus faibles que dans le RPA. Les résultats des dénombrements de *Leptospirillum* par SSCP ou par observation directe au microscope optique donne des résultats très proches (fig. 41).

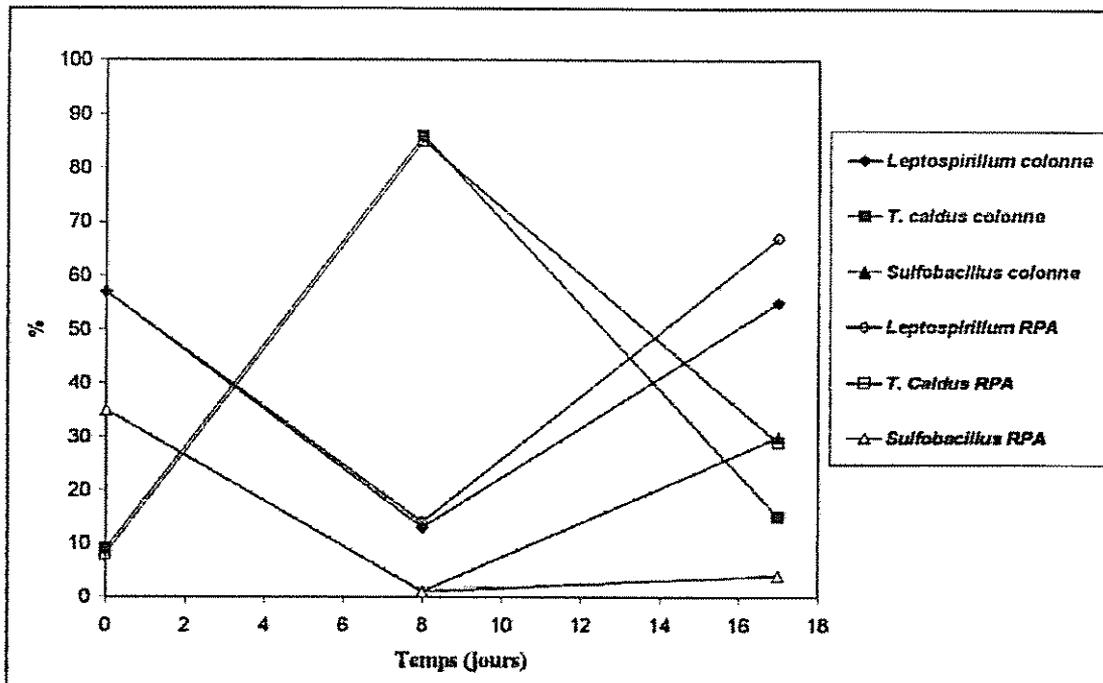


Fig. 38 - Batch 4 : suivi par SSCP de la population bactérienne en suspension dans la phase liquide.

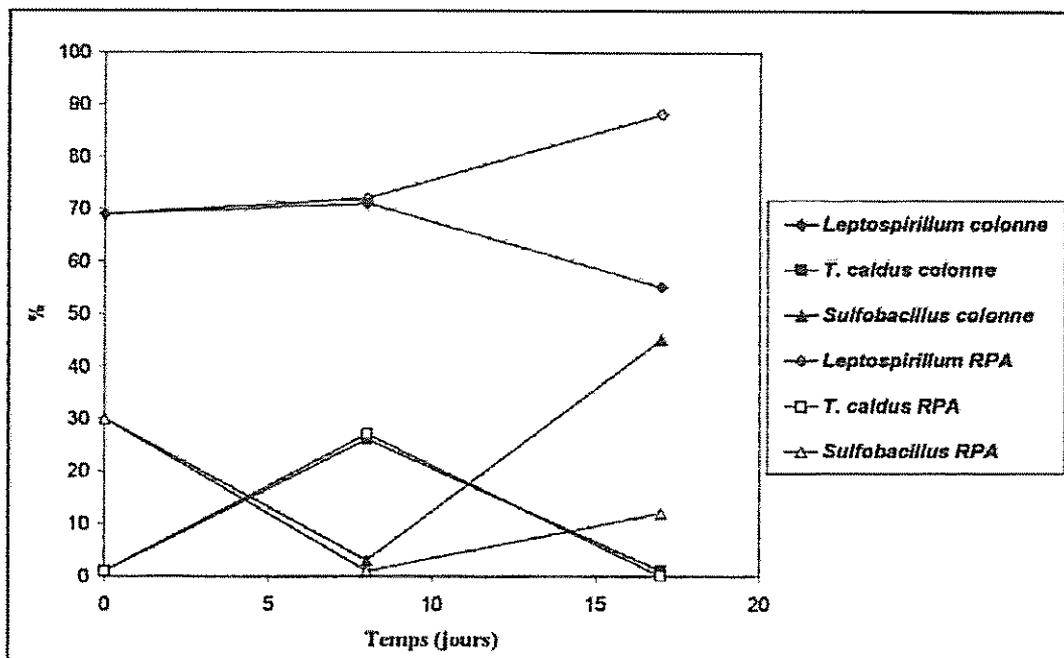


Fig. 39 - Batch 4 : suivi par SSCP de la population bactérienne associée au solide.

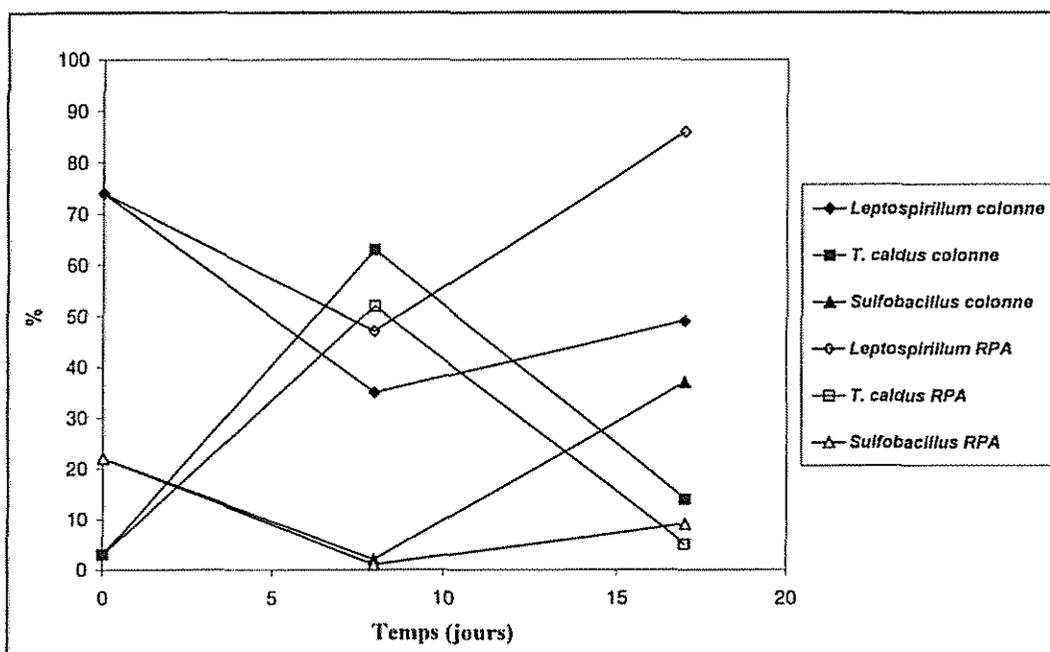


Fig. 40 - Batch 4 : suivi par SSCP de la population bactérienne totale.

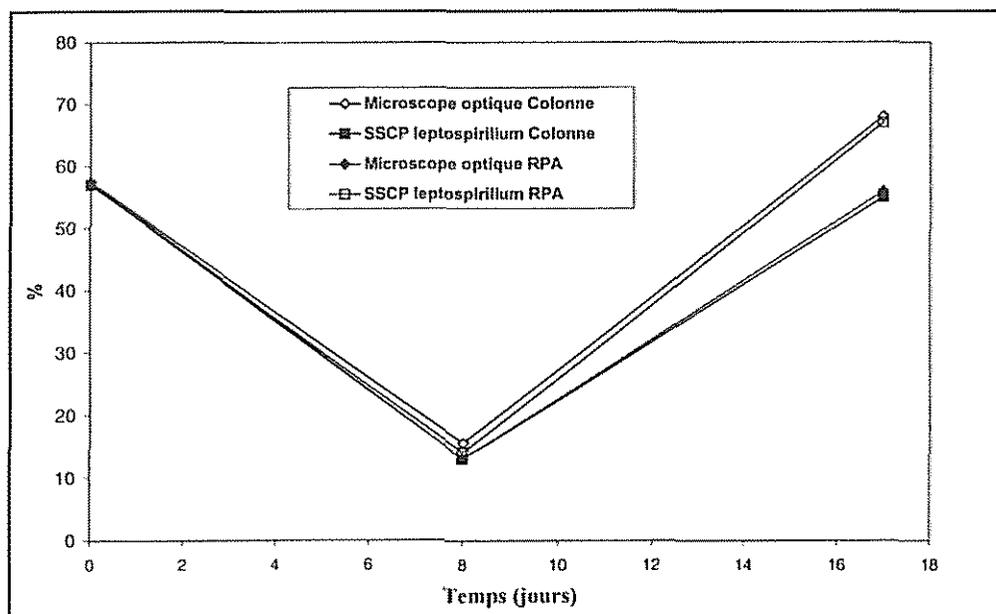


Fig. 41 - Batch 4 : évolution de la proportion de Leptospirilles analysée par SSCP et microscopie optique dans la phase liquide.

3.6. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS DU BATCH 5

3.6.1. Suivi des paramètres

Pour ce batch 5, le lot de pyrite utilisé est le même que pour les batch 3 et 4. La concentration en solide est toujours de 20 %, le débit de gaz est de 1 000 l/h mais le diffuseur de gaz en forme de peigne a été remplacé par un mélangeur statique.

Les résultats sont présentés dans la figure 42. Contrairement aux courbes précédentes, le pH décroît de façon plus lente et ceci est dû à une phase de latence (*cf.* résultats suivants). En effet, le changement de diffuseur a nécessité plusieurs jours d'arrêt de la colonne, laissant la pulpe en fin de croissance donc avec moins de bactéries, or c'est cette pulpe qui a servi d'inoculum pour le batch 5. Peu de changements néanmoins sur la courbe donnant le potentiel Redox sont observés. La valeur initiale est un peu plus faible et la valeur finale est aux alentours de 610 mV.

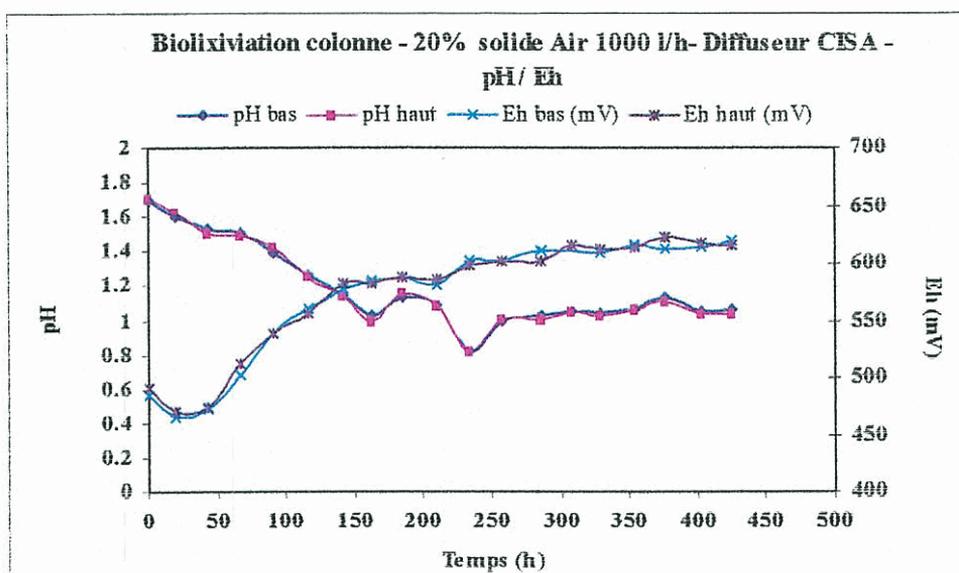


Fig. 42 - Évolution pH/Eh lors du batch 5.

Les profils des concentrations en oxygène dissous (fig. 43) sont totalement différents des précédents. Tout d'abord, la valeur en bas de colonne est très élevée en début d'expérience (10,5 mg/l), ceci peut être expliqué par le fait que le milieu est fortement oxygéné à l'intérieur du mélangeur, et que la sonde oxygène est placée juste au-dessus de ce mélangeur. En d'autres termes, lorsqu'un diffuseur classique était utilisé, le milieu était oxygéné lors de son passage à travers la colonne (O_2 bas < O_2 haut), alors qu'avec le mélangeur, le milieu est oxygéné avant d'arriver dans la colonne (O_2 bas > O_2 haut).

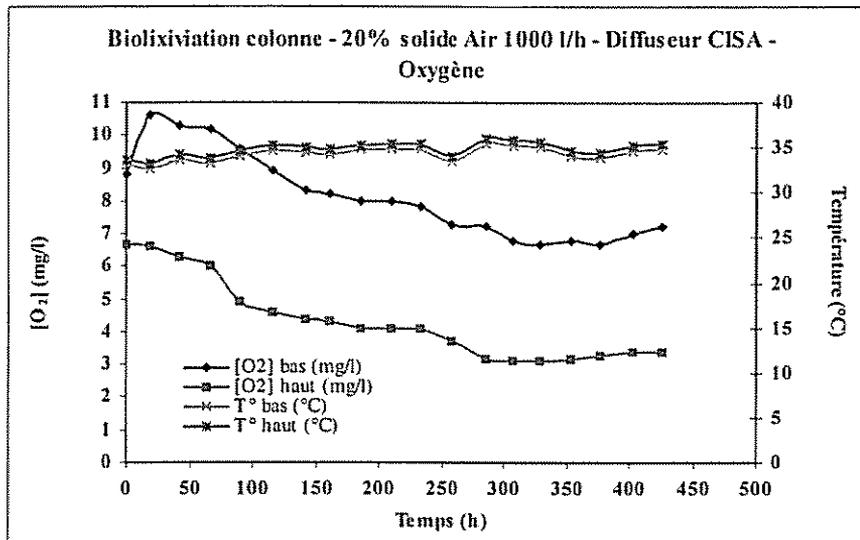


Fig. 43 - Évolution des concentrations en oxygène dissous lors du batch 5.

La concentration en haut de colonne est quant à elle légèrement inférieure à 7 mg/l ce qui coïncide avec le batch 4. Les diminutions des valeurs sont très inférieures à celles déjà notées, celle du bas restant très forte et jamais inférieure à celle du haut contrairement aux observations précédentes (minimum de 6,8 mg/l comparé à 0,5 mg/l pour le batch précédent). La valeur minimale en haut de colonne est légèrement supérieure à 3 mg/l, valeur correspondant approximativement à la valeur minimale du batch 4 (3,5 mg/l). Une très légère stagnation est observée en haut de colonne après 13 jours de biolixiviation. Un changement de pente après 5 jours de biolixiviation laisse supposer une phase de latence. Ces différences de profils peuvent avoir deux explications possibles. Soit le diffuseur assure un meilleur transfert de gaz et donc permet de s'affranchir de la limitation par l'apport d'oxygène d'où des concentrations en oxygène plus élevées et des pentes plus faibles, soit le transfert est moins bon et/ou les bactéries moins actives, ce qui engendre une consommation d'oxygène moins importante aboutissant au même résultat.

Les courbes de densité (fig. 44) ont la même allure que celles des batchs précédents mais les cinétiques sont moins rapides. Notamment en ce qui concerne les pourcentages de solide, la différence entre le bas et le haut reste assez marquée même au-delà de 16 jours ce qui n'était pas le cas pour les batchs précédents. Cette différence est liée à la faible diminution du taux de solide en bas de colonne durant les premiers jours, pouvant être expliquée soit par un défaut d'homogénéisation du solide soit par une croissance bactérienne plus faible. Le tableau 16 récapitule les valeurs des taux de solide en début et fin de batch.

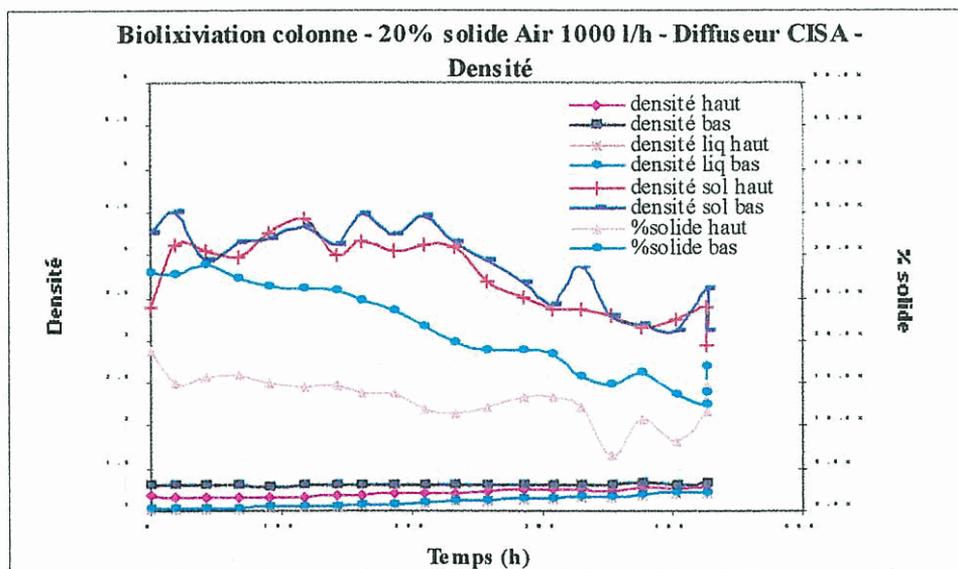


Fig. 44 - Évolution des densités lors du batch 5.

	Bas de colonne	Haut de colonne
Densité pulpe initiale	1,307	1,188
Densité liquide initiale	1,031	1,032
Densité solide initiale	4,486	4,112
Taux de solide initial	27,6 %	15,1 %
Densité pulpe finale	1,324	1,317
Densité liquide finale	1,213	1,214
Densité solide finale	3,107	2,96
Taux de solide final	13,8 %	13,3 %

Tabl. 16 - Récapitulatif des taux de solide en début et fin de batch 5

En fin de batch, les densités de solide sont plus élevées et celles de liquides le sont moins que pour les batchs 3 et 4. Ceci laisse supposer une moins bonne oxydation du solide et confirme les cinétiques plus lentes déjà observées dues en majeure partie à la phase de latence initiale.

3.6.2. Évolution des concentrations

Seuls sont présentés dans la figure 45, les résultats concernant le cobalt ; les autres se trouvant en annexe 4. Contrairement au batch précédent, une phase de latence de 5 à 6 jours précède l'augmentation de la concentration de cobalt. Cette phase de latence est expliquée par la « fraîcheur » de l'inoculum (cf. paragraphe 3.6.1).

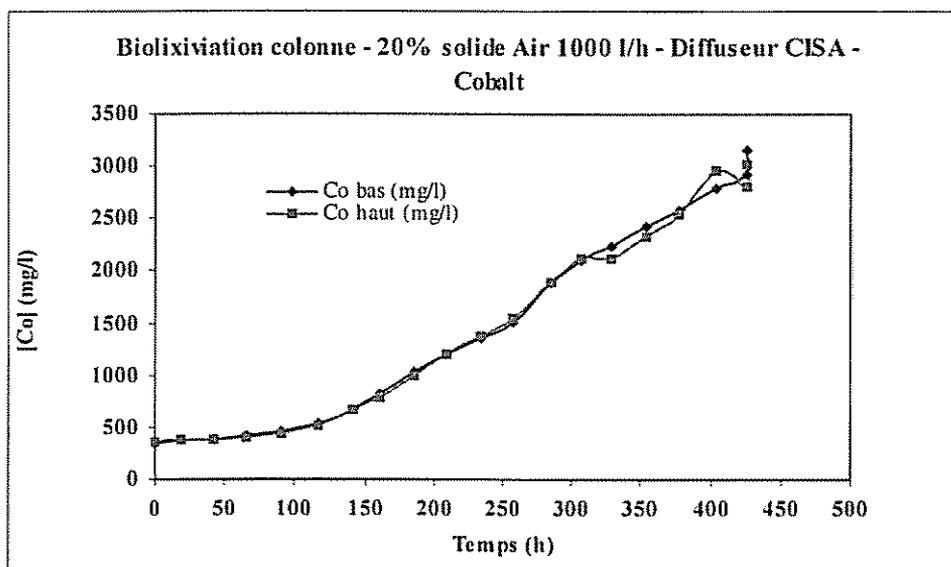


Fig. 45 - Évolution des concentrations en cobalt lors du batch 5.

3.6.3. Autres résultats

L'OUR a été mesurée à partir de l'analyse des gaz (fig. 46). Ne possédant pas la valeur de la pression en bas de colonne, celle-ci a été estimée égale à celle du batch précédent (mêmes débits de gaz et de liquide). Néanmoins les valeurs obtenues sont assez faibles et peu représentatives de la réalité (maximum de 500 mg/l/h voire des valeurs plus faibles) explicables par une sous-estimation de la perte de charge certainement plus grande au travers du mélangeur statique. Les valeurs n'ont pu être comparées à celles calculées avec les concentrations en oxygène dissous dans la mesure où le $k_L a$ n'avait pas été déterminé au préalable.

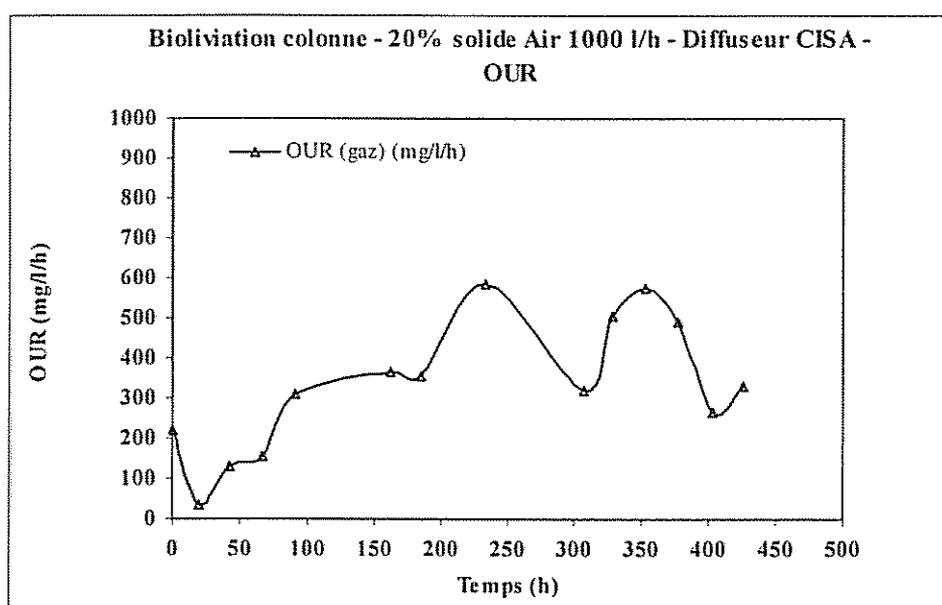


Fig. 46 - Évolution de l'OUR lors du batch 5.

Un bilan de matière a été réalisé au moyen du logiciel BILCO en prenant en compte la totalité de la pulpe initiale et la totalité de la pulpe finale. La reconstitution des données et les bilans cohérents fournissent les résultats finaux exposés dans le tableau 17 ainsi que les résultats détaillés en annexe 6.

	Initial	Final
Liquide		
Masse (kg)	22,56	27,54
Densité	1,031	1,213
Co (mg/l)	368	3 072
Fe (g/l)	10,2	82,1
SO ₄ (g/l)	27,6	114
Solide		
Solide (kg)	6,38	5,92
Co (%)	1,38	0,45
Fe (%)	38,2	13,4
SO ₄ (%)	3,6	37,3
S (%)	36,6	27,8

Tabl. 17 - Bilan de matière sur le batch 5 pour la totalité de la pulpe.

Ces résultats correspondent à **69 % du cobalt** initialement dans le solide libéré, **67 % du fer** et **59 % du soufre oxydé**.

Une étude minéralogique donne les pourcentages des espèces minérales suivants :

- Pyrite 27 % ;
- Gypse 71 % ;
- Quartz, feldspath, jarosite 2 % ;
- Illite/micas infratracés.

Le pourcentage de pyrite restant (correspondant à 73 % de pyrite oxydée) est supérieur au pourcentage de soufre oxydé. Le principal porteur de fer est toujours la pyrite, d'autres espèces minérales en contiennent également comme la jarosite et les minéraux comme l'amphibole ou illite/micas.

3.6.4. Suivi des populations bactériennes

a) Évolution de la concentration bactérienne dans la phase liquide

L'évolution de la population bactérienne totale en suspension dans la phase liquide est donnée par la figure 47.

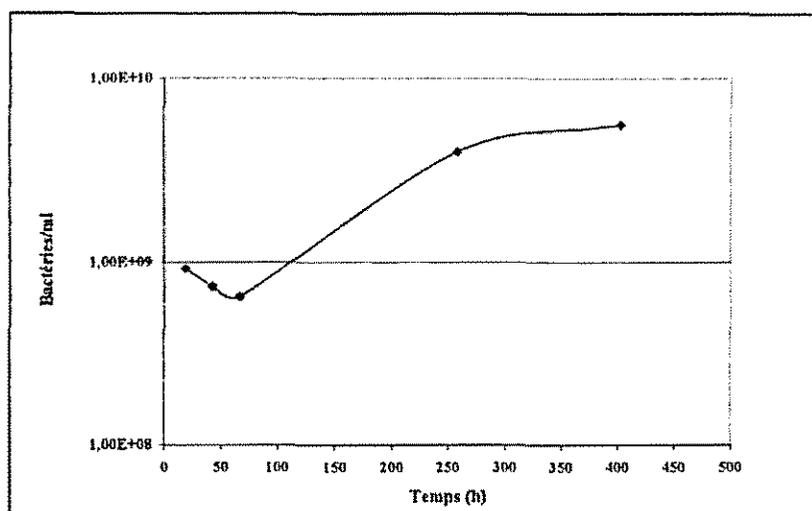


Fig. 47 - Batch 5 : évolution de la concentration bactérienne totale dans la phase liquide.

Une phase de latence de 4-5 jours, due à un mauvais état physiologique de l'inoculum, précède la croissance bactérienne. Les effets de cette latence sur les autres paramètres du batch ont déjà été décrits. La concentration bactérienne maximale est plus faible que lors des batchs 3 et 4.

b) Suivi qualitatif et semi-quantitatif des espèces en présence

Seul *Leptospirillum* a été détecté dans l'inoculum par analyse SSCP. Ce phénomène a déjà été observé lors du batch 3. Il semble que *Leptospirillum* résiste mieux que les autres espèces à la conservation en conditions non favorables. L'évolution des proportions de *Leptospirillum* et *T. caldus* dans la phase liquide est comparable à celle des batchs précédents (fig. 48) : un développement rapide et important de *T. caldus* est observé en début d'expérience, puis la proportion de *T. caldus* diminue au profit de *Leptospirillum*.

La population associée à la phase solide est presque en totalité constituée de *Leptospirillum*. *Sulfobacillus* n'a pas du tout été détecté au cours du batch 5. Ce phénomène est certainement lié à deux facteurs :

- le batch 5 en colonne a été inoculé avec le RPA batch 4. Or, *Sulfobacillus* s'était moins bien développé dans ce réacteur que dans la colonne ;
- l'inoculum du batch 5 a été conservé une semaine dans le RPA, dans une phase stationnaire de fin de croissance. Les contraintes de cisaillement ont pu achever d'éliminer les *Sulfobacilles* qui étaient déjà dans un mauvais état physiologique.

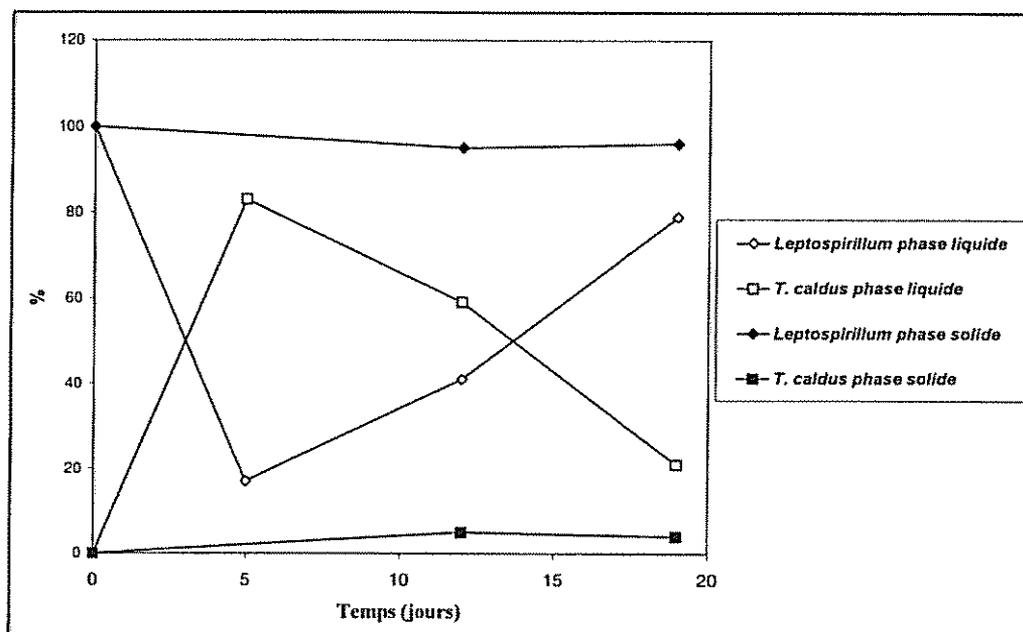


Fig. 48 - Batch 5 : suivi par SSCP des populations bactériennes en suspension dans la phase liquide ou associées au solide.

Cependant, il faut rappeler que l'analyse SSCP ne détecte pas les espèces très minoritaires : à deux reprises *T. caldus* n'a pas été mis en évidence dans l'inoculum, alors que son développement en début de batch a toujours été rapide. Il est donc possible que *Sulfobacillus* ait été présent durant le batch 5, mais en très faible proportion.

La comparaison des deux méthodes de quantification de *Leptospirillum* dans la phase liquide (fig. 49) révèle des divergences notables dans les échantillons de « fin de croissance » : inoculum et fin de batch 5. Ces divergences sont certainement liées aux propriétés de *Leptospirillum* dans un milieu très oxydé : cette bactérie présente alors une morphologie atypique ou produit beaucoup de mucus. Les cellules forment alors des agrégats.

3.7. COMPARAISON ET SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

Les comparaisons ont été réalisées entre les batchs 3, 4 et 5 qui correspondent à l'utilisation d'un même lot de pyrite et approximativement d'un même taux de solide. Les valeurs les plus intéressantes à comparer concernent les vitesses maximales de libération du cobalt. Néanmoins, ces vitesses peuvent être obtenues par des méthodes différentes fournissant des valeurs différentes. L'important reste l'ordre de grandeur et le positionnement de ces valeurs les unes par rapport aux autres.

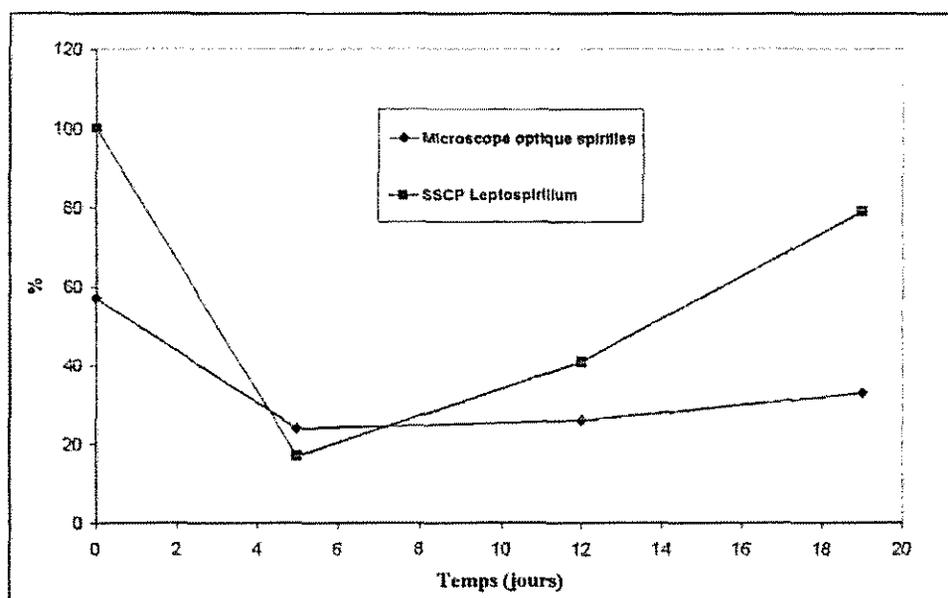


Fig. 49 – Batch 5 : évolution de la proportion de Leptospirilles analysée par SSCP ou microscopie optique dans la phase liquide.

3.7.1. Rappel des principaux résultats

Dans le tableau 18 sont reportés les principaux résultats expérimentaux acquis lors des batchs 3, 4 et 5 ; à savoir : la durée de l'expérience, le taux de solide moyen, le pourcentage de cobalt libéré en fin de batch, la concentration minimale d'oxygène dissous obtenue et la valeur maximale de l'OUR. Ces valeurs permettent de comparer les évolutions de la biolixiviation selon le batch.

Batch	Durée (jours)	Taux de solide moyen (%)	% Co libéré	[O ₂] dissous minimale (mg/l)		OUR maximale (mg/l/h)
				Bas	Haut	
Batch 3	24	21 %	92 %	0,4	2,1	650
Batch 4	19	23 %	92 %	0,5	3,4	690
Batch 5	18	21 %	69 %	6,7	3,1	590

Tabl. 18 - Récapitulatif des principaux résultats des batchs 3, 4 et 5.

Le pourcentage de libération du cobalt en fin de batch est plus faible pour le batch 5 à cause de la phase de latence importante (5 jours) et de la courte durée de l'expérience (18 jours). Les valeurs de l'OUR sont approximatives à cause du problème de la mesure de la perte de charge mais donne une bonne idée de l'activité bactérienne.

Les deux graphiques suivants présentent une comparaison des concentrations en cobalt (fig. 50) et en oxygène dissous (fig. 51) pour les batchs 3, 4 et 5.

Une observation frappante est la quasi-similitude des cinétiques, les courbes ne sont que légèrement décalées. Cela tendrait à dire que les principes de mise en œuvre sont peu déterminants. Une limitation d'un autre ordre que l'agitation est prépondérante en batch.

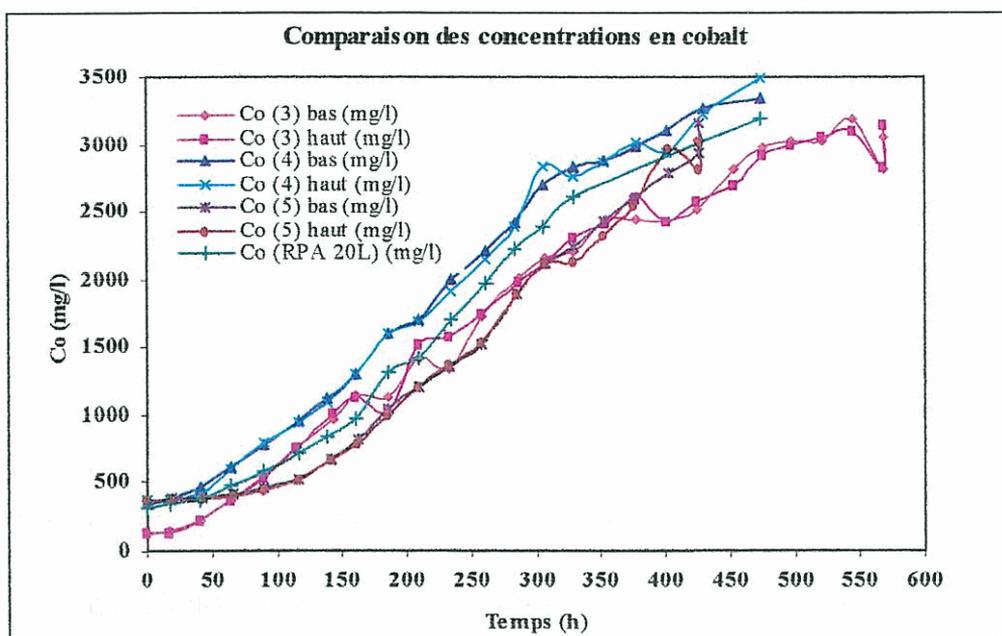


Fig. 50 - Comparaison des concentrations en cobalt des batchs 3, 4 et 5.

La phase de latence est nettement plus marquée sur les courbes du batch 5. La concentration initiale en cobalt est plus faible pour le batch 3 (inoculation avec le batch 2 qui contenait beaucoup moins de cobalt contrairement aux autres qui sont inoculés avec des lots contenant plus de cobalt). Les cinétiques de libération du cobalt des batchs 3 et 5 semblent quasi-identiques après la phase de latence du batch 5 et le rattrapage du batch 3. Celles du batch 4 et du réacteur parfaitement agité également semblent légèrement supérieures aux précédentes (ceci sera confirmé dans le paragraphe ultérieur).

Les profils d'oxygène dissous sont quant à eux similaires pour les batchs 3 et 4 avec des concentrations légèrement inférieures pour le batch 3, laissant supposer une limitation par le transfert d'oxygène. En ce qui concerne le batch 5, la courbe de la concentration d'oxygène dissous en haut de colonne est similaire aux autres ce qui n'est pas le cas pour celle du bas. Cette observation prouve l'influence du distributeur de gaz sur la diffusion de l'oxygène et sur la perte de charge. Au cours de la montée dans la colonne, la coalescence des bulles jouant un rôle important sur la diffusion et la pression étant identique en haut de colonne (pression atmosphérique), il est compréhensible d'avoir des courbes relativement similaires.

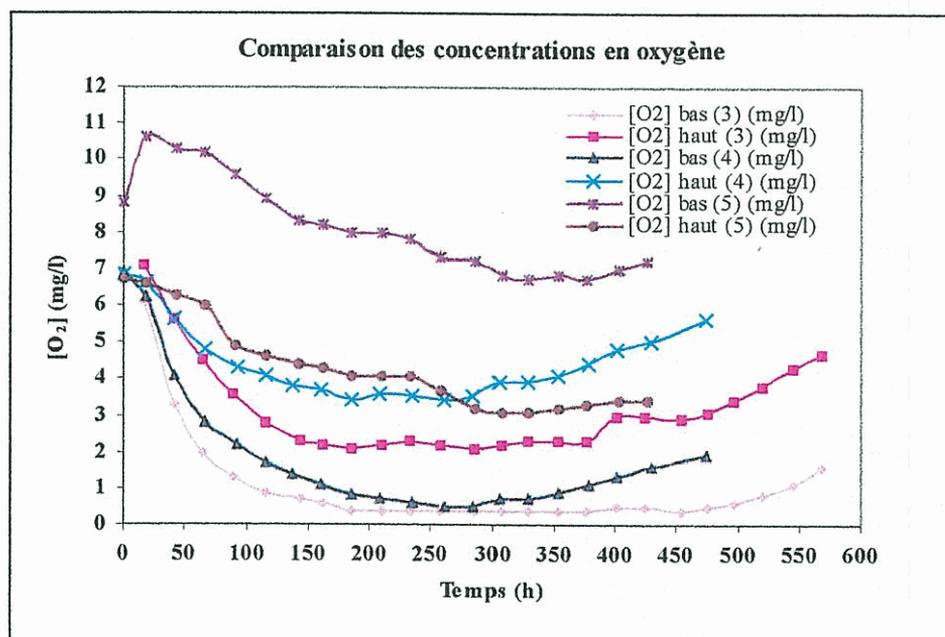


Fig. 51 - Comparaison des concentrations en oxygène dissous des batchs 3, 4 et 5.

3.7.2. Obtention et comparaison des vitesses maximales de libération du cobalt

Trois méthodes pour déterminer la vitesse maximale de libération du cobalt ont été utilisées dans cette étude, ces méthodes sont explicitées ci-après. Les valeurs obtenues sont comparées méthode par méthode et pour une même méthode batch par batch.

La première méthode consiste à enlever les points du début et de la fin du batch des graphes fournissant la concentration en cobalt en fonction du temps, puis à linéariser les points restants. La pente de la droite fournit alors la vitesse de libération du cobalt qui est supposée constante sur cette partie de courbe et correspondant à la vitesse maximale. Ces linéarisations sont exposées en annexe 7.

La deuxième méthode est basée sur la forme des courbes donnant le pourcentage de cobalt libéré en fonction du temps. Ces courbes sont des sigmoïdes. En se basant sur les équations de Pinches et coll. (1988) et en considérant le rapport du pourcentage de cobalt libéré sur le pourcentage de pyrite oxydée constant (fig. 52) on en déduit :

$$r = \frac{R}{MCo_I} = \frac{d(\%Co)}{dt} = k(\%Co) \left[1 - \frac{(\%Co)}{(\%Co)_M} \right]$$

avec r la vitesse de libération du cobalt en h^{-1} , R la vitesse en g/h , MCo_I la masse de cobalt initial dans le solide, $\%Co$ le pourcentage de cobalt libéré à chaque instant et $\%Co_M$ celui maximal. En résolvant cette équation différentielle, on obtient:

$$(\%Co) = \frac{(\%Co)^o \exp(kt)}{1 - \frac{(\%Co)^o}{(\%Co)_M} [1 - \exp(kt)]}$$

où $(\%Co)^0$ représente le pourcentage de cobalt libéré initial. En modifiant cette équation, il vient :

$$\ln\left(\frac{(\%Co)}{(\%Co)_M - (\%Co)}\right) = kt - \ln\left(\frac{(\%Co)_M}{(\%Co)^0} - 1\right)$$

dont la représentation graphique est une droite de pente k. La vitesse maximale est obtenue lorsque le pourcentage de cobalt libéré vaut le pourcentage de cobalt maximal divisé par 2, soit :

$$r_{\max} = \left. \frac{d(\%Co)}{dt} \right|_{\max} = \frac{(\%Co)_M}{4} k$$

Pour avoir la vitesse en mg/l/h il faut multiplier par la masse de cobalt initial dans le solide et diviser par le volume de liquide à ce point maximal d'où

$$R_{\max} = MCo_1 * \rho_{\text{pulpe}} * (1 - \%solide) * r_{\max}$$

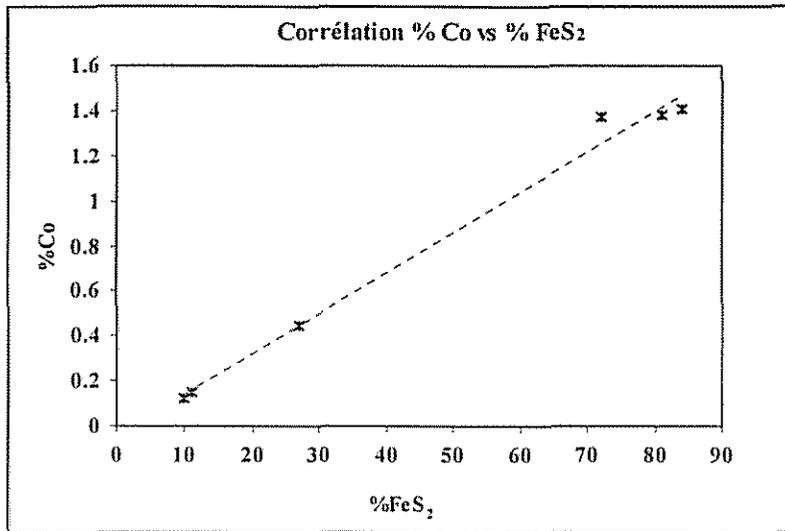


Fig. 52 - Pourcentage de cobalt présent en fonction du pourcentage de pyrite dans le solide.

En ce qui concerne la troisième méthode, il s'agit de dériver expérimentalement point par point la courbe donnant la concentration en cobalt en fonction du temps et de prendre la valeur maximale. Néanmoins, les points étant très souvent disparates, il a été choisi d'éliminer la plus grande valeur (bien souvent largement au-dessus des autres) et de ne prendre que la deuxième valeur la plus importante. L'ensemble des résultats est présenté en annexe 7.

La figure 53 récapitule les vitesses maximales obtenues par les différentes méthodes pour les batch 3, 4 et 5 ainsi que pour les réacteurs parfaitement agités de 2 et 20 l.

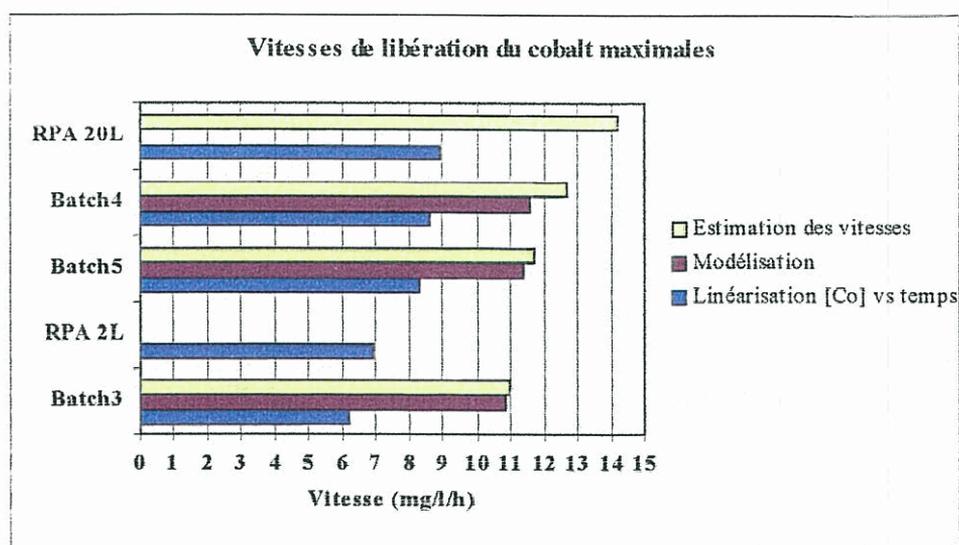


Fig. 53 - Comparaison des vitesses maximales de libération du cobalt.

Pour chaque batch, les vitesses obtenues par la troisième méthode sont supérieures à celles de la deuxième méthode, ces dernières étant supérieures à celles de la première méthode. Néanmoins, pour chacune des méthodes, les vitesses obtenues pour le batch 4 sont plus importantes que celles du batch 5 qui le sont plus que celles du batch 3. Les vitesses du réacteur parfaitement agité de 20 l sont quasi identiques à celles du batch 4.

Pour conclure, lorsque la vitesse de gaz est augmentée dans la colonne à bulles (passage de 650 l/h à 1000 l/h), la vitesse de libération du cobalt est augmentée. Les conclusions quant à l'utilisation du mélangeur statique sont difficiles à énoncer dans la mesure où l'inoculum ayant servi pour cette expérience n'était pas de bonne qualité. Les résultats sont toutefois encourageants (valeurs de vitesses presque identiques aux valeurs maximales obtenues pour le batch 4) et laissent supposer des vitesses de libération du cobalt relativement importantes en utilisant un inoculum de bonne qualité.

3.7.3. Suivi des populations bactériennes

a) Populations bactériennes totales en suspension dans la phase liquide

L'évolution des populations bactériennes totales en suspension dans la phase liquide est donnée par la figure 54. La meilleure croissance bactérienne a été obtenue au cours du batch 4. Le développement des bactéries a été nettement plus lent et quantitativement plus faible lors du batch 5 que pour les batchs 3 et 4. Cependant, si la phase de latence observée au début du batch 5 a sensiblement retardé la libération du cobalt en solution, la vitesse de lixiviation ne semble pas avoir été fortement affectée (cf. chapitre 3.7.2).

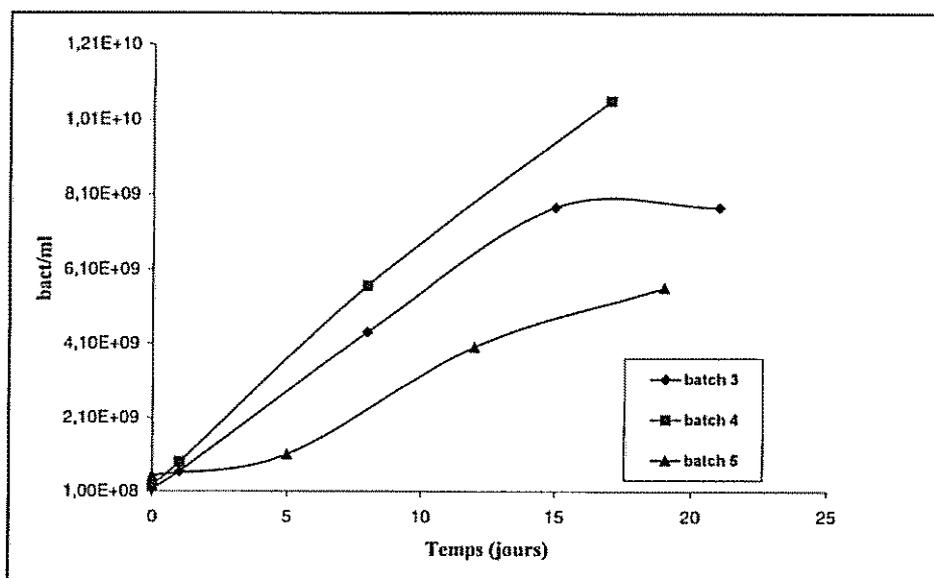


Fig. 54 - Comparaison de trois batches en colonne : évolution des concentrations bactériennes totales en suspension dans la phase liquide.

b) Suivi qualitatif et semi-quantitatif des espèces en présence

L'analyse SSCP des espèces en présence au cours des batches 3, 4 et 5 a mis en évidence certains phénomènes reproductibles ou persistants, et d'autres plus versatiles. Les deux processus les plus constants sont l'évolution des pourcentages de *Leptospirillum* et *T. caldus* en suspension dans la phase liquide. En effet, toutes les valeurs de pourcentage obtenues pour ces deux paramètres constituent deux courbes cohérentes (fig. 55 et 56). *Leptospirillum* est majoritaire dans l'inoculum. Au cours des premiers jours du batch, *Leptospirillum* devient très minoritaire et *T. caldus* représente plus de 80 % de la population en suspension dans la phase liquide. Par la suite, le pourcentage de *Leptospirillum* augmente jusqu'à représenter environ 80 % de la population, et la proportion de *T. caldus* diminue. Ce phénomène est en parfaite cohérence avec les résultats obtenus lors de précédentes études (Battaglia-Brunet *et al.*, 1998) et qui avaient montré que le pourcentage de leptospires, dans la phase liquide, augmentait avec le taux d'oxydation de la pyrite.

Les pourcentages de *Leptospirillum* et *T. caldus* associés au solide évoluent peu au cours des batches (fig. 57). *Leptospirillum* est la principale espèce fixée sur les particules solides (minerai et précipités). *T. caldus* n'est généralement présent qu'en faible quantité dans la population associée au solide. Norris *et al.* (1987) ont observé que 87 % des cellules de *L. ferrooxidans* en culture pure sur pyrite sont associées au solide. Dans les mêmes conditions expérimentales, seulement 7 % des cellules de *Thiobacillus ferrooxidans* sont fixées.

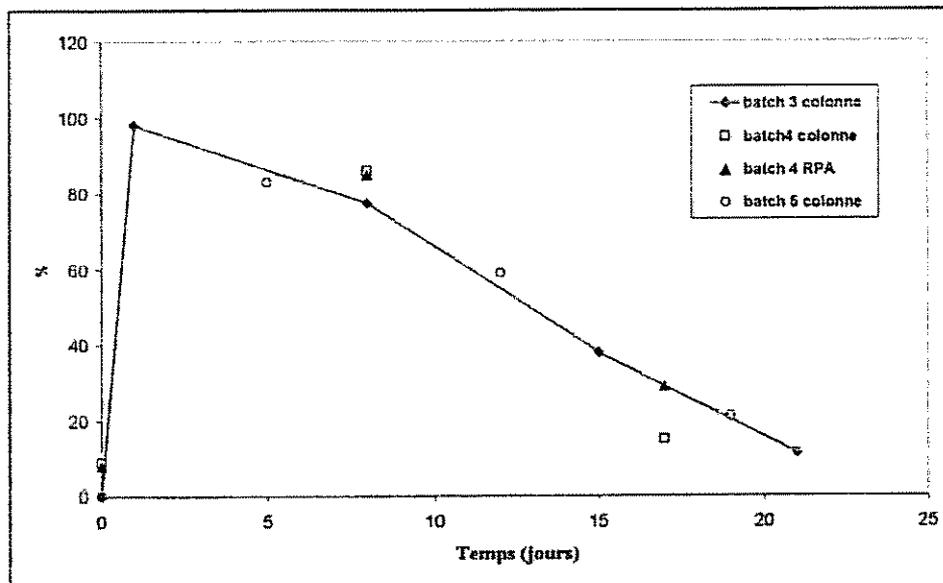


Fig. 55 - Évolution du pourcentage de *Leptospirillum* en suspension dans la phase liquide au cours des batchs.

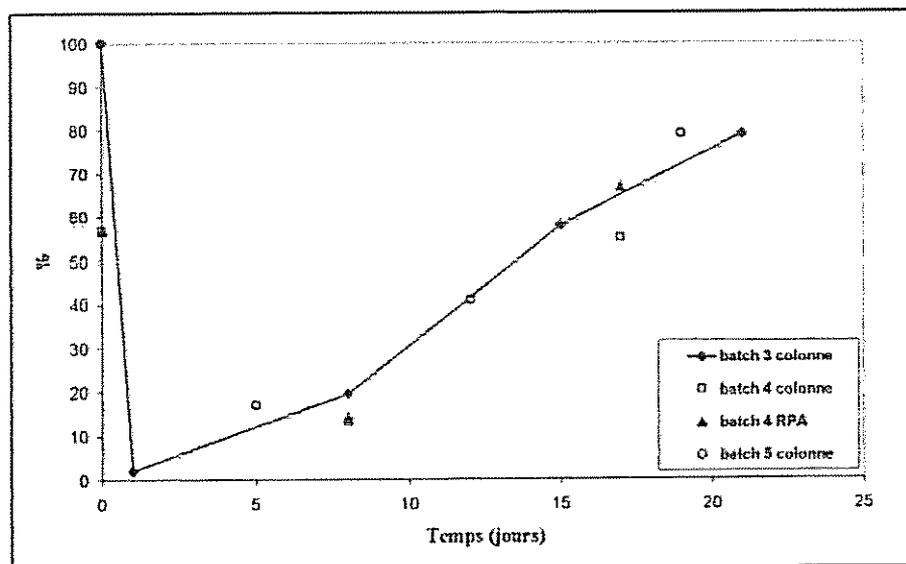


Fig. 56 - Évolution du pourcentage de *T. caldus* en suspension dans la phase liquide au cours des batchs.

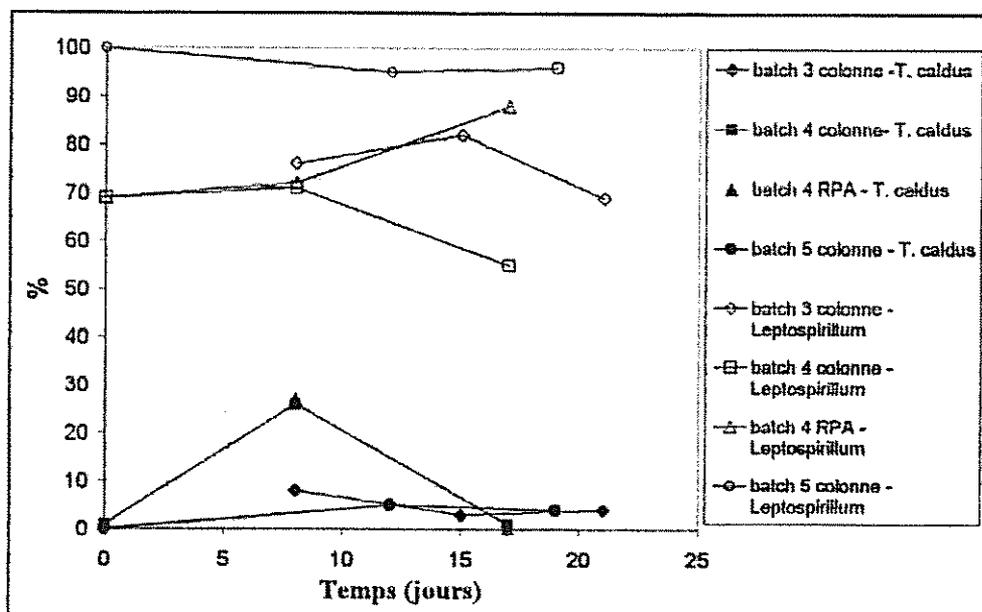


Fig. 57 - Évolution des proportions de *Leptospirillum* et *T. caldus* associés à la phase solide au cours des batchs.

Le comportement de *Sulfobacillus* est beaucoup plus versatile que celui des deux autres espèces. Absent dans le batch 2, il apparaît au cours du batch 3, et n'est plus détecté dans le batch 5. Toutes les données concernant les proportions de *Sulfobacillus* dans la phase liquide et associé à la phase solide sont rassemblées dans la figure 58. Cette représentation révèle deux tendances :

- la proportion de *Sulfobacillus* augmente en fin de batch ;
- cette espèce est généralement moins présente dans la phase liquide que sur la phase solide.

Il a déjà été remarqué (p. 62) que le développement de *Sulfobacillus* est plus important dans le réacteur colonne que dans le RPA. Il est possible que cette espèce soit sensible aux forces de cisaillement imposées par le mobile d'agitation du RPA.

Les représentants du genre *Sulfobacillus*, au même titre que *Thiobacillus ferrooxidans*, utilisent à la fois le soufre et le fer ferreux comme sources d'énergie (Barret *et al.*, 1993). Cette espèce est donc en compétition avec *T. caldus* pour le soufre, et avec *Leptospirillum* pour le fer. Certains indices suggèrent que, dans le cas de la présente expérience, elle soit davantage en compétition avec *Leptospirillum* qu'avec *T. caldus*. En effet, comme *Leptospirillum*, elle est plus présente sur le solide que dans la phase liquide et semble se développer en fin de batch. Par ailleurs, durant le batch 5, sa disparition semble avoir été compensée (en terme de proportion) par un accroissement de la quantité de *Leptospirillum*.

Les proportions des différentes espèces dans la pulpe totale, au cours des différents batchs, sont rassemblées dans les figures 59, 60 et 61. Les tendances révélées par ces figures sont le reflet des contributions respectives des phases liquide et solide :

- la proportion de *Leptospirillum* diminue en début de batch, puis augmente ;
- la proportion de *T. caldus* croît rapidement en début de batch, puis diminue ;
- la proportion de *Sulfobacillus* augmente au cours des batchs 3 et 4, mais nettement plus dans le réacteur colonne que dans le RPA.

En valeurs absolues, les proportions de *Leptospirillum* les plus élevées (en excluant les valeurs des inocula) sont obtenues lors du batch 4 en RPA et lors du batch 5, c'est-à-dire quand *Sulfobacillus* est peu présent (fig. 59). En contrepartie, les proportions de *Leptospirillum* les plus faibles correspondent au batch 4 en colonne, qui a été particulièrement favorable pour *Sulfobacillus*. Ces résultats semblent consolider l'hypothèse selon laquelle *Leptospirillum* et *Sulfobacillus* seraient en compétition pour le substrat Fe^{2+} .

Il est aussi intéressant de noter que les proportions les plus élevées de *T. caldus* ont été obtenues au cours du batch 4, particulièrement performant en terme de vitesse de biolixiviation (fig. 60).

De façon générale, les analyses SSCP effectuées sur la population totale fournissent moins d'information que celles portant respectivement sur les phases liquide et solide.

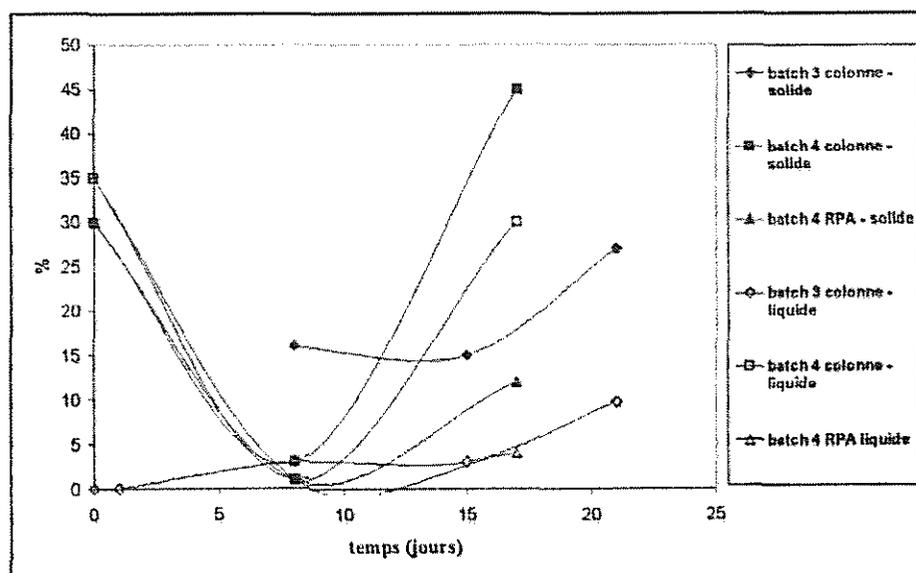


Fig. 58 - Évolution des proportions de *Sulfobacillus* en suspension dans la phase solide ou associé au solide au cours des batchs.

Les comptages par microscopie optique sont généralement en concordance avec les évaluations semi-quantitatives obtenues par SSCP, ce qui renforce la validité de cette dernière méthode.

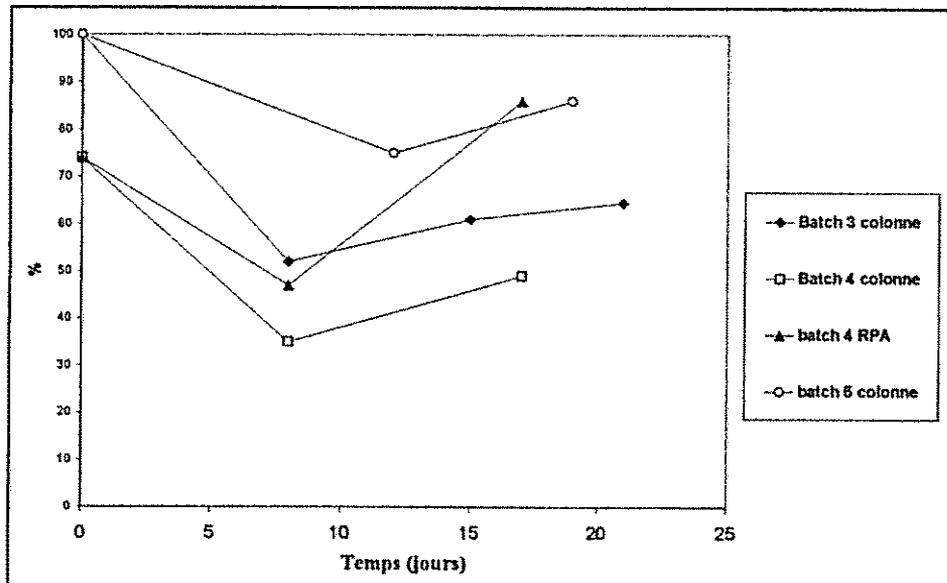


Fig. 59 - Évolution des proportions de *Leptospirillum* dans la pulpe totale au cours des batchs.

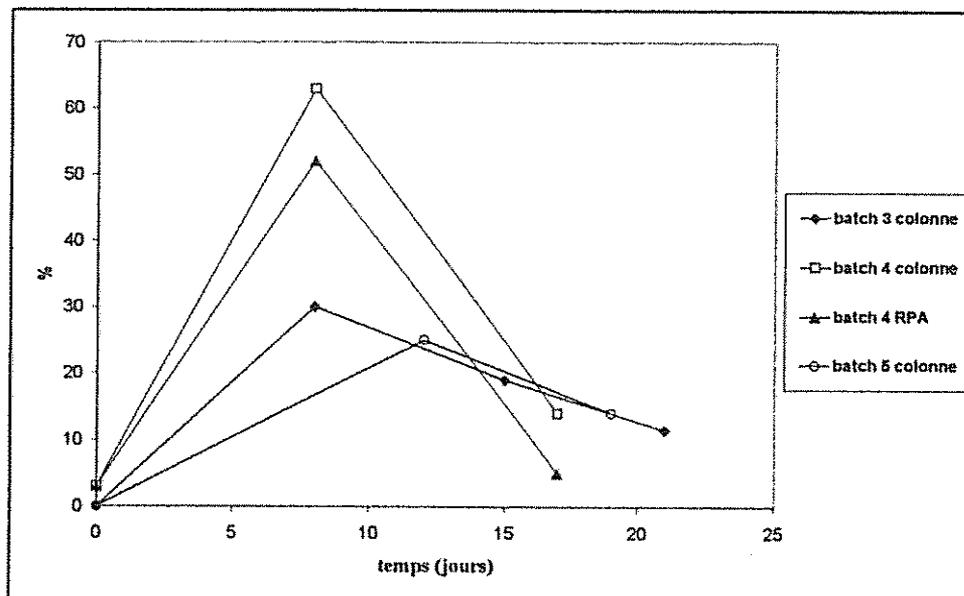


Fig. 60 - Évolution des proportions de *T. caldus* dans la pulpe totale au cours des batchs.

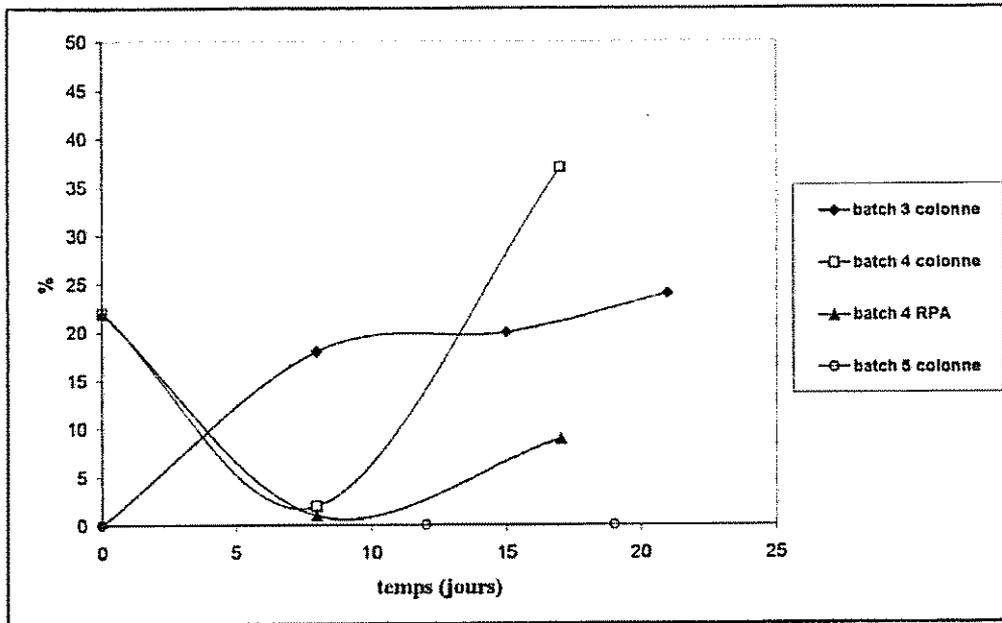


Fig. 61 - Évolution des proportions de Sulfobacillus dans la pulpe totale au cours des batchs.

Conclusion et perspectives

L'un des buts de cette étude était de montrer la faisabilité de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs.

Dans un premier temps, une étude du réacteur en l'absence de réaction a permis de déterminer un certain nombre de paramètres utiles pour l'interprétation des résultats. Les rétentions gazeuses ainsi que les pertes de charge ont été mesurées pour différents débits de gaz. En ce qui concerne l'écoulement des phases, des expériences de traçage au chlorure de lithium ont démontré que le liquide circulait comme dans un réacteur parfaitement agité (temps de séjour = temps de passage). Les distributions axiale et radiale du solide le long de la colonne n'ont malheureusement pas été étudiées. Quelques études ont permis de trouver l'ordre de grandeur du coefficient de transfert de l'oxygène dans ce type de réacteur (entre 3 et $4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour des vitesses superficielles de gaz comprises entre $0,02$ et $0,035 \text{ m.s}^{-1}$).

Les expériences menées lors des batchs successifs ont ensuite prouvé qu'il était possible d'envisager la biolixiviation dans ce type de réacteur. Les vitesses de libération du cobalt, utilisées comme indicateurs des cinétiques de réactions, ont été calculées pour les différents batchs. Ces vitesses sont d'autant plus grandes que la vitesse superficielle de gaz est élevée ce qui laisse supposer une limitation par le transfert d'oxygène. Des expériences avec des débits d'air plus grands devraient être menées pour déterminer la vitesse de gaz à partir de laquelle le transfert ne semble plus limitant. L'utilisation d'un système constitué d'un mélangeur statique pour la distribution du gaz est très encourageante puisque, malgré la faiblesse de l'inoculum utilisé, la vitesse de libération du cobalt dans le dernier batch est du même ordre de grandeur que sans mélangeur. D'autres campagnes de mesures en discontinu sont à faire pour déterminer les meilleures conditions opératoires applicables en mode continu. Enfin le passage du régime batch au continu permettra une évaluation plus proche des conditions réelles d'utilisation de ce procédé.

Au cours du présent projet, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire a révélé pour la première fois la composition exacte de la population mixte utilisée au BRGM depuis plus de dix ans pour la biolixiviation de la pyrite cobaltifère. L'inventaire et le séquençage de l'ADN 16s issu des échantillons de biolixiviation montre que trois espèces sont présentes dans cette population : *Leptospirillum ferrooxidans*, une souche apparentée à *Thiobacillus caldus* et une bactérie apparentée à *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

Par ailleurs, la technique SSCP, relativement peu coûteuse, permet de suivre l'évolution des proportions des différents organismes composant la population bactérienne au cours des expériences. Avec cette méthode, il a enfin été possible d'accéder de façon semi-quantitative et qualitative (distinction entre espèces) aux proportions de bactéries fixées ou en suspension dans la phase liquide. Il s'agit d'un progrès très significatif pour le suivi microbiologique des opérations de biolixiviation.

Les résultats obtenus en quelques mois d'expérience décrivent l'évolution de la population bactérienne au cours du processus d'oxydation de la pyrite cobaltifère. Les deux espèces *Leptospirillum ferrooxidans* et *T. caldus* sont toujours présentes dans les échantillons. Leur comportement est approximativement le même au cours des batchs successifs. Dans la phase liquide, *T. caldus* se développe rapidement en début de batch, avant d'être progressivement supplanté par *Leptospirillum*. Au niveau de la phase solide, l'espèce majoritaire est *Leptospirillum*, alors que *T. caldus* représente moins de 20 % de la population fixée. L'espèce apparentée à *Sulfobacillus* est plus versatile que les deux autres. Cette bactérie semble se développer plutôt en fin de batch, et pourrait être davantage en compétition avec *Leptospirillum* qu'avec *T. caldus*. Son développement est plus important dans le réacteur colonne que dans le réacteur parfaitement agité (RPA), au niveau duquel les contraintes de cisaillement sont fortes. Le type de réacteur utilisé pour la biolixiviation pourrait donc avoir une influence non négligeable sur la composition de la population bactérienne réalisant la biolixiviation.

Bibliographie

- Bailey A.D. et Hansford G.S. (1993) - Factors affecting bio-oxidation of sulfide minerals at high concentrations of solids: a review. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, p. 1164-1174.
- Barret J., Hugues M.N., Karavaiko G.I. et Spencer P.A. (1993) - Metal extraction by bacterial oxidation of minerals, Ellis Herwood Series dans *Inorganic chemistry*, ed. Simon et Schuster International group, p. 191, Angleterre.
- Battaglia F. (1994) - Optimisation de la lixiviation bactérienne d'un concentré de pyrite cobaltifère. Thèse de doctorat, Université de Provence, Marseille.
- Battaglia F., Morin D., Garcia J.L. and Ollivier P. (1994) - Isolation and study of two strains of leptospirillum-like bacteria from a natural mixed population cultured on a cobaltiferous pyrite substrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66, p. 295-302.
- Battaglia-Brunet F., D'Hugues P., Cabral T., Cezac P., Garcia J.L. and Morin D. (1998) - The mutual effect of mixed Thiobacilli and Leptospirilli populations on pyrite bioleaching. *Minerals Engineering*, 11 (2), p. 195-205.
- Bavarian F., Liang-Shih F., Elzeky M. et Attia A. (1990) - Treatment of high-sulfur coal using selective flocculation and microbial desulfurization in a draft-tube slurry bubble column. *Separations Technology*, 1, p. 46-54.
- Beenackers A.A.C.M. et Van Swaaij. (1993) - Mass transfer in gas-liquid slurry reactors. *Chemical Engineering Science*, 48 (18), p. 3109-3139.
- Boogerd F.C., Bo P., Kuenen J.G., Heijnen J.J. et Vand der Lans R.G.J.M. (1990) Oxygen and carbon dioxide mass transfer and the aerobic, autotrophic cultivation of moderate and extreme thermophiles: A case study related to the microbial desulfurization of coal. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, p. 1111-1119.
- Boon M., Meeder T.A., Heijnen J.J. et Luyben K.Ch.A.M. (1992) - Influence of oxygen adsorption on the dynamic k_La measurement in three-phase slurry reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, p. 1097-1106.
- Chapman J.T., Marchant P.B., Lawrence R.W. et Knopp R. (1993) - Bio-oxidation of a refractory gold bearing high arsenic sulphide concentrate: A pilot study. *FEMS Microbiology Review*, 11, p. 243-252.
- Chisti M.Y. et Moo-Young M. (1987) - Airlift reactors: Characteristics, applications and design considerations. *Chemical Engineering Communication*, 60, p. 195-242.

- Collinet M.N. and Morin D. (1990) - Characterization of arsenopyrite oxidizing *Thiobacillus*. Tolerance to arsenite, arsenate, ferrous and ferric iron. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57, p. 237-244
- Dang N.D.P., Karrer D.A. et Dunn I.J. - Oxygen transfer coefficients by dynamic model moment analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 853.
- Garcia Ochoa J. (1998) - Hydrodynamique, transferts et réaction biochimique dans une colonne à bulles à solide suspendu destinée à la biolixiviation de pyrite. Thèse, Institut National polytechnique de Lorraine.
- Griffin E.A., et Luinstra L. (1989) - Bioreactor scale-up: practical considerations for biologically assisted gold recovery, dans *Biohydrometallurgy*, Proceedings of the International Symposium, Jackson Hole, Wyoming, USA, 1989, ed. Salley J., McCready R.G.L. & Wichlacz p.L., p. 221-230, Canmet SP89-10, Canada.
- Helle U. et Onken U. (1988) - Continuous microbial leaching of a pyritic concentrate by *Leptospirillum*-like bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, p. 553-558.
- Hoffman W., Katsikaros N. et Davis G. (1993) - Design of a reactor bioleach process for refractory gold treatment. *FEMS Microbial Reviews*, 11, p. 221-230.
- d'Hugues P. (1996) - Biolixiviation d'une pyrite cobaltifère - Optimisation des conditions de culture et bilan gazeux. Thèse, Université de provence Aix-Marseille I.
- Johnson D. B. (1991) - Biological desulfurization of coal using mixed populations of mesophilic and moderately acidophilic bacteria. In « Processing and Utilization of High-Sulfur Coals, IV, eds. P. R. Dugan, D. R. Quigley and Y. A. Attia, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, p. 567-577.
- Jordan M.A., McGuinness S. et Philips C.V. (1996) - Acidophilic bacteria - their mining and environmental applications. *Mineral Engineering*, 9, p. 169-181.
- Khalfed R. (1985) - Étude d'une colonne à bulles à solide suspendu destinée à la biolixiviation de matières minérales. Thèse, Institut National polytechnique de Lorraine.
- Kossen N.W.F. (1984) - Bioreactors consolidation and innovation. 3rd EFB Conference, Munich 10-14 Septembre.
- Leveau J.Y. et Bouix M. (1993) - Bioingénierie. Dans *Biotechnologies*, ed. Scriban R. Coord., pp 211-279, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.
- Liu M.S., Branion R.M.R. et Duncan D.W. (1988) - The effects of ferrous iron, dissolved oxygen, and inert solids concentrations on the growth of thiobacillus ferrooxidans. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 66, p. 445-451.

- Lizama H.M. et Suzuki I. (1989) - Bacterial leaching of a sulfide ore by thiobacillus ferrooxidans and thiobacillus thiooxidans Part II: Column leaching studies, *Hydrometallurgy*, 22, p. 301-310.
- Mills D.B., Bar Raphael., Kirwan D.J. (1987) - Effect of solids on oxygen transfer in agitated three-phase systems. *AIChE Journal*, 33 (9), p. 1542-1549.
- Morin D. (1995a) - Biotechnologie dans la métallurgie extractive. Dans *Techniques de l'Ingénieur*, M2238, p. 1-11, Paris.
- Morin D. (1995b) - Bacterial leaching of refractory gold sulfide ores. Dans *Bioextraction and Biodeterioration of metals*, ed. Scheiner, B.J., Doyle, F.M. et Kawatra, S.K., pp 25-62, university Press, Cambridge, UK.
- Morin D. (1998) - Des bactéries vont extraire du cobalt. *Recherche*, mensuel n° 312, p. 38-40.
- Neale J.W. et Pinches A. (1994) - Determination of gas liquid mass transfer and solids-suspension parameters in mechanically-agitated three phase slurry reactors. *Minerals Engineering*, 7(2/3), p. 389-403.
- Norris P.R., Barr D.W., and Hinson D. (1987) - Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria: affinities for iron and attachment to pyrite. In « Biohydrometallurgy », Proceedings of the international symposium, Eds P. R. Norris and D. P. Kelly, Warwick, Antny Rowe Ltd., p. 43-61.
- Pinches A., Chapman J.T., Riele W.A.M. et Van Staden M. (1988) - The performance of bacterial leach reactors for the pre-oxidation of refractory gold-bearing sulphide concentrates, dans *Biohydrometallurgy*, Proceedings of the International Symposium, Warwil, U.K., USA, 1987, ed. Norris, P.R. and Kelly, D.P., p. 329-334, Science and Technology Letters, Kew Surrey, U.K.
- Präve P., Sukatsch D.A. et Faust U. (1976) - The industrial production of natural substances. *Interdisciplinary Science Reviews*, 1, p. 85.
- Puhakka J. et Tuovinen O.H. (1986) - Biological leaching of sulfide minerals with the use of shake flask, aerated column, air-lift reactor, and percolation techniques. *Acta Biotechnology*, 6 (4), p. 345-354.

Liste des figures

Fig. 1 - Principe de fonctionnement des réacteurs air-lift.....	13
Fig. 2 - Principe de fonctionnement d'une colonne à bulles (ou colonne à gaz et liquide porteurs)	14
Fig. 3 - Schéma du principe de fonctionnement de l'installation pilote avec les principaux organes de réaction, de contrôle et de suivi.....	18
Fig. 4 - Photographie de l'installation pilote de biolixiviation dans une colonne à gaz et liquide porteurs	19
Fig. 5 - Observation au MEB du lot de pyrite n° 1	20
Fig. 6 - Schéma du diffuseur en forme de peigne.	22
Fig. 7 - Positions et orientations des primers par rapport à l'ADNr 16S (1 500 pb) pour le séquençage et les analyses SSCP.	25
Fig. 8 - Valeurs de la rétention gazeuse globale en fonction de la vitesse ascensionnelle du gaz.	32
Fig. 9 - Évolution de la perte de charge en fonction de la vitesse superficielle de gaz.	33
Fig. 10 - Distribution des temps de séjour dans la colonne.	34
Fig. 11 - Évolution pH/Eh lors du batch 2.	37
Fig. 12 - Évolution des concentrations en oxygène dissous lors du batch 2.....	38
Fig. 13 - Évolution des densités lors du batch 2.	38
Fig. 14 - Évolution des concentrations en cobalt lors du batch 2.	39
Fig. 15 - Évolution des concentrations en fer lors du batch 2.....	40
Fig. 16 - Batch 2 : évolution de la concentration en bactéries dans la phase liquide.....	41
Fig. 17 - Arbre phylogénétique des clones analysés du groupe K01 et des micro- organismes les plus apparentés basé sur la divergence des 500 premiers nucléotides de l'ADNr 16S.	43

Fig. 18 - Arbre phylogénétique des clones analysés du groupe K13 et des micro-organismes les plus apparentés basé sur la divergence des séquences complètes de l'ADNr 16S.....	44
Fig. 19 - Electrophorégramme SSCP des ADN 16s issus de la population associée au minerai (en rouge) et de la population en suspension dans la phase liquide (en bleu).	45
Fig. 20 - Électrophorégramme SSCP des clones : K01 (<i>L. ferrooxidans</i>) en vert, K16 (proche K01) en bleu, K13 (<i>T. caldus</i>) en noir, profil de la population associée au solide en rouge.....	45
Fig. 21 - Évolution pH/Eh lors du batch 3.	46
Fig. 22 - Évolution des concentrations en oxygène dissous lors du batch 3.....	47
Fig. 23 - Évolution des densités lors du batch 3.	48
Fig. 24 - Évolution des concentrations en cobalt lors du batch 3.	49
Fig. 25 - Évolution de l'OUR lors du batch 3.....	50
Fig. 26 - Pourcentage de libération du cobalt lors du batch 3.....	51
Fig. 27 - Évolution de la concentration bactérienne totale en suspension dans la phase liquide lors du batch 3.	52
Fig. 28 - Batch 3 : suivi par SSCP de la population bactérienne dans la phase liquide.....	54
Fig. 29 - Suivi par SSCP de la population bactérienne associée au solide lors du batch 3.	54
Fig. 30 - Suivi par SSCP de la population bactérienne totale lors du batch 3.	55
Fig. 31 - Évolution de la proportion de Leptospirilles analysée par SSCP ou microscopie optique dans la phase liquide lors du batch 3.	56
Fig. 32 - Évolution pH/Eh lors du batch 4.	57
Fig. 33 - Évolution des concentrations en oxygène dissous dans la colonne lors du batch 4.	58
Fig. 34 - Évolution des densités lors du batch 4.	58
Fig. 35 - Évolution des concentrations en cobalt lors du batch 4.	59

Fig. 36 - Évolution de l'OUR lors du batch 4.....	60
Fig. 37 - Batch 4 : évolution de la concentration bactérienne totale dans la phase liquide.....	61
Fig. 38 - Batch 4 : suivi par SSCP de la population bactérienne en suspension dans la phase liquide.	63
Fig. 39 - Batch 4 : suivi par SSCP de la population bactérienne associée au solide.....	63
Fig. 40 - Batch 4 : suivi par SSCP de la population bactérienne totale.	64
Fig. 41 - Batch 4 : évolution de la proportion de Leptospirilles analysée par SSCP et microscopie optique dans la phase liquide.....	64
Fig. 42 - Évolution pH/Eh lors du batch 5.	65
Fig. 43 - Évolution des concentrations en oxygène dissous lors du batch 5.....	66
Fig. 44 - Évolution des densités lors du batch 5.	67
Fig. 45 - Évolution des concentrations en cobalt lors du batch 5.	68
Fig. 46 - Évolution de l'OUR lors du batch 5.....	68
Fig. 47 - Batch 5 : évolution de la concentration bactérienne totale dans la phase liquide.....	70
Fig. 48 - Batch 5 : suivi par SSCP des populations bactériennes en suspension dans la phase liquide ou associées au solide.	71
Fig. 49 - Batch 5 : évolution de la proportion de Leptospirilles analysée par SSCP ou microscopie optique dans la phase liquide.....	72
Fig. 50 - Comparaison des concentrations en cobalt des batchs 3, 4 et 5.	73
Fig. 51 - Comparaison des concentrations en oxygène dissous des batchs 3, 4 et 5.....	74
Fig. 52 - Pourcentage de cobalt présent en fonction du pourcentage de pyrite dans le solide.	75
Fig. 53 - Comparaison des vitesses maximales de libération du cobalt.....	76
Fig. 54 - Comparaison de trois batchs en colonne : évolution des concentrations bactériennes totales en suspension dans la phase liquide.....	77

Fig. 55 - Évolution du pourcentage de <i>Leptospirillum</i> en suspension dans la phase liquide au cours des batchs.....	78
Fig. 56 - Évolution du pourcentage de <i>T. caldus</i> en suspension dans la phase liquide au cours des batchs.....	78
Fig. 57 - Évolution des proportions de <i>Leptospirillum</i> et <i>T. caldus</i> associés à la phase solide au cours des batchs.....	79
Fig. 58 - Évolution des proportions de <i>Sulfobacillus</i> en suspension dans la phase solide ou associé au solide au cours des batchs.	80
Fig. 59 - Évolution des proportions de <i>Leptospirillum</i> dans la pulpe totale au cours des batchs.	81
Fig. 60 - Évolution des proportions de <i>T. caldus</i> dans la pulpe totale au cours des batchs.	81
Fig. 61 - Évolution des proportions de <i>Sulfobacillus</i> dans la pulpe totale au cours des batchs.	82

Liste des tableaux

Tabl. 1 - Opérations commerciales en fonctionnement, utilisant le procédé BIOX [®] ...	11
Tabl. 2 - Futures applications commerciales du procédé BIOX [®]	11
Tabl. 3 - Applications des procédés développés par Bactech.....	11
Tabl. 4 - Application du procédé développé par le BRGM.....	12
Tabl. 5 - Analyse chimique du lot de pyrite n° 1.....	20
Tabl. 6 - Analyse chimique du lot de pyrite n° 2.....	21
Tabl. 7 - Composition de la solution nutritive OKm.....	21
Tabl. 8 - Conditions opératoires pour les expériences de biolixiviation en colonne....	22
Tabl. 9 - Comparaison des temps de séjour et temps de passage.	34
Tabl. 10 - k_{LA} en fonction du débit de gaz (30 % pyrite, 100 l/h de pulpe).....	36
Tabl. 11 - Évolution des densités lors du batch 2.....	39

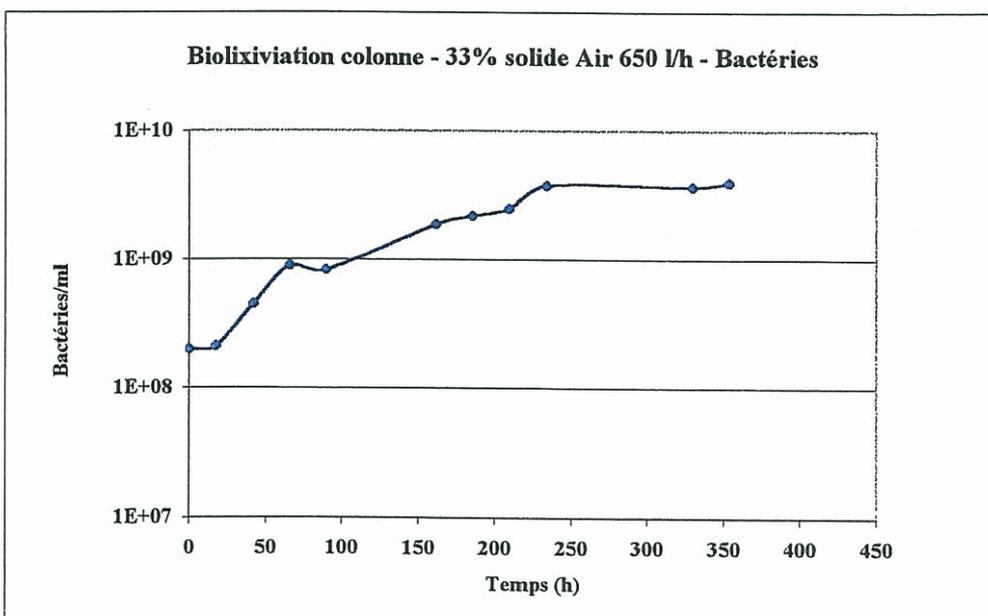
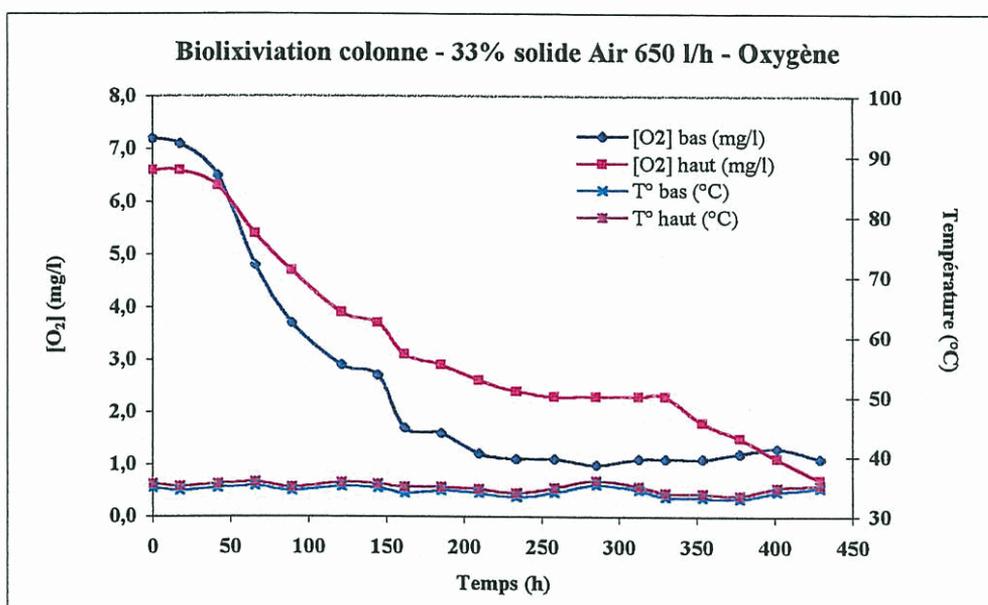
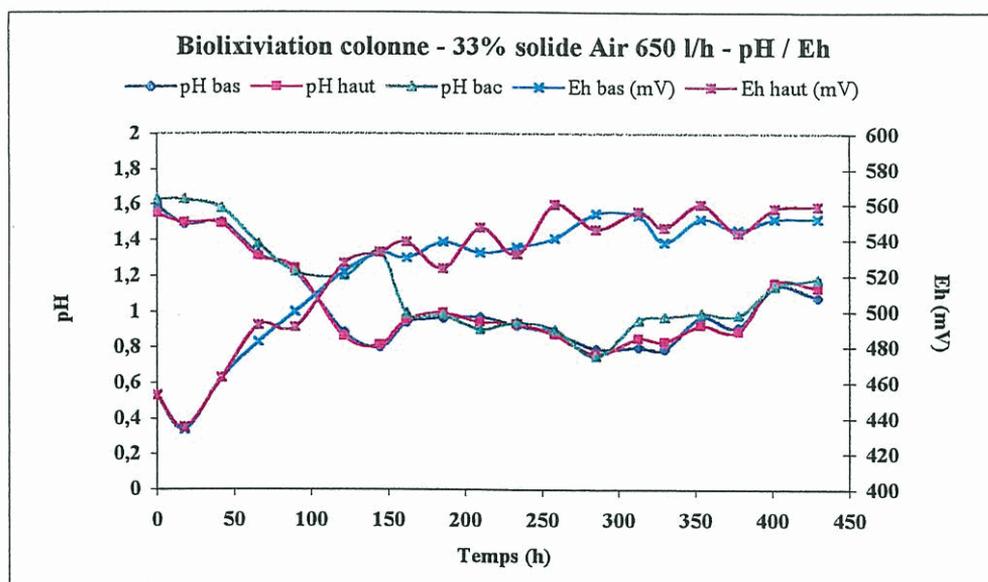
Tabl. 12 - Récapitulatif des taux de solide en début et fin de batch 3.....	48
Tabl. 13 - Bilan de matière sur le batch 3 pour 1 litre de pulpe.....	51
Tabl. 14 - Récapitulatif des taux de solide en début et fin de batch 4.....	58
Tabl. 15 - Bilan de matière sur le batch 4 pour la totalité de la pulpe.....	60
Tabl. 16 - Récapitulatif des taux de solide en début et fin de batch 5.....	67
Tabl. 17 - Bilan de matière sur le batch 5 pour la totalité de la pulpe.....	69
Tabl. 18 - Récapitulatif des principaux résultats des batchs 3, 4 et 5.....	72

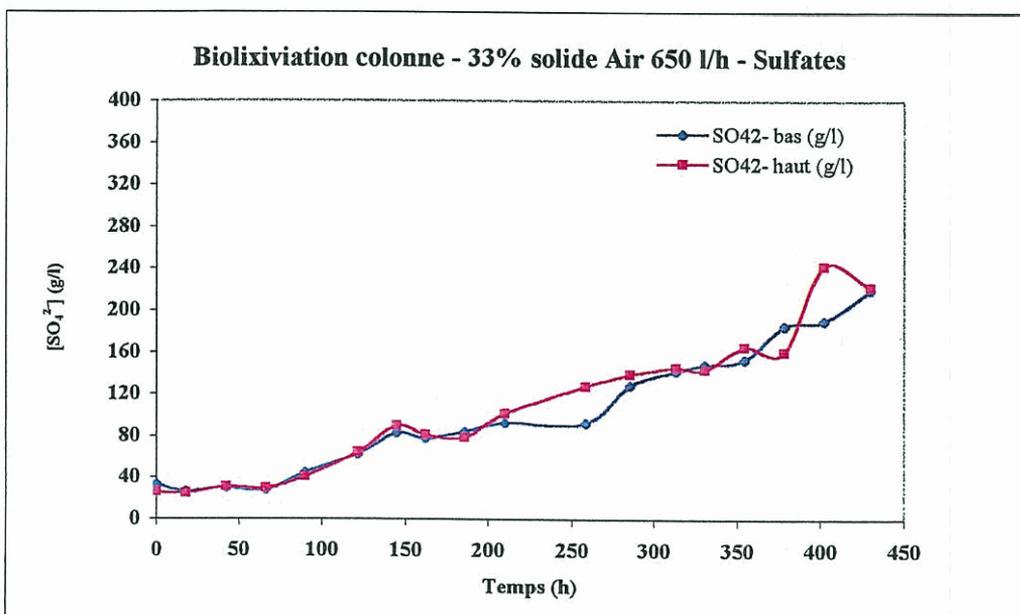
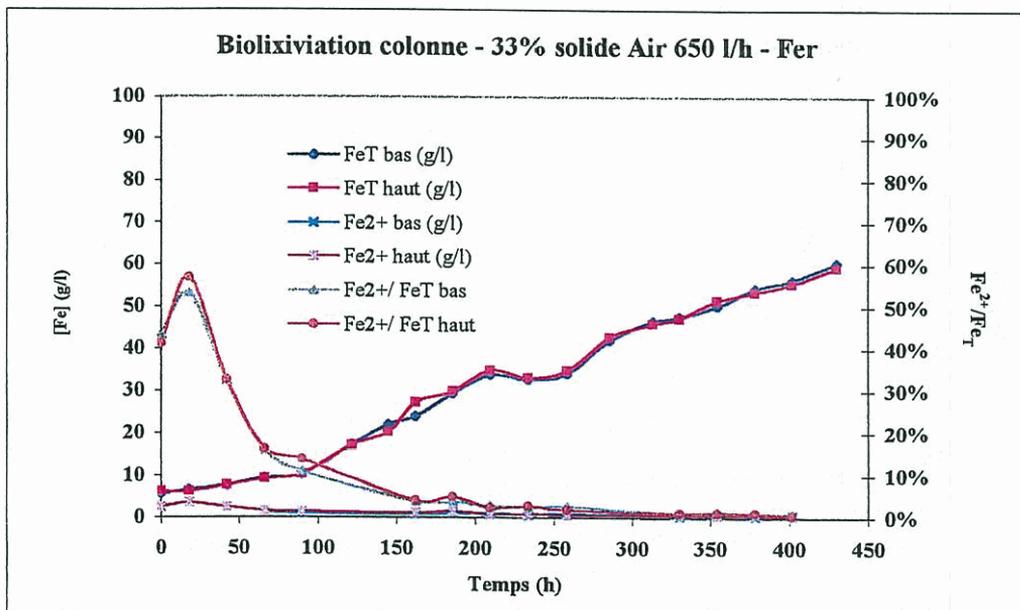
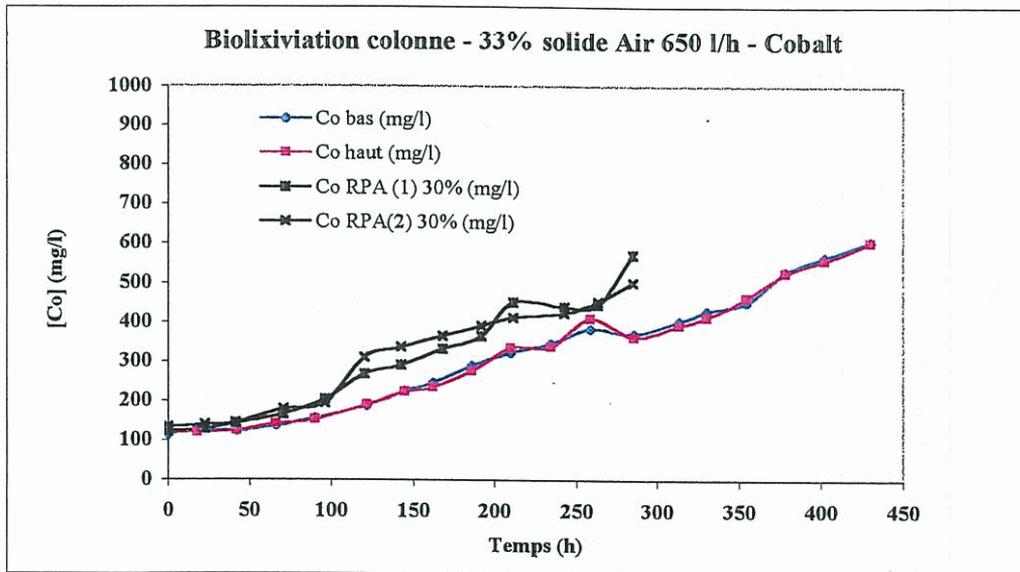
Liste des annexes

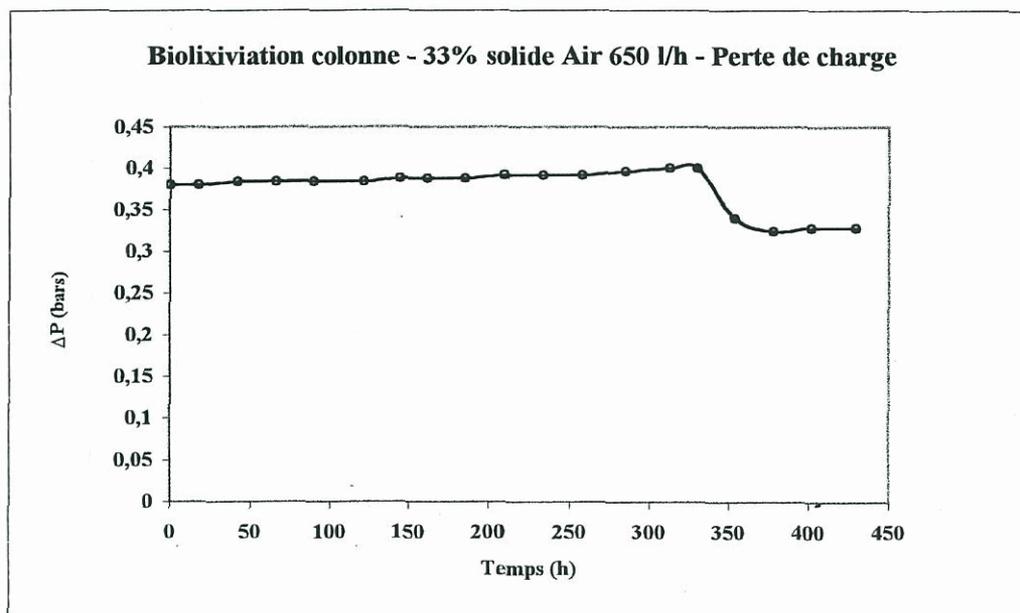
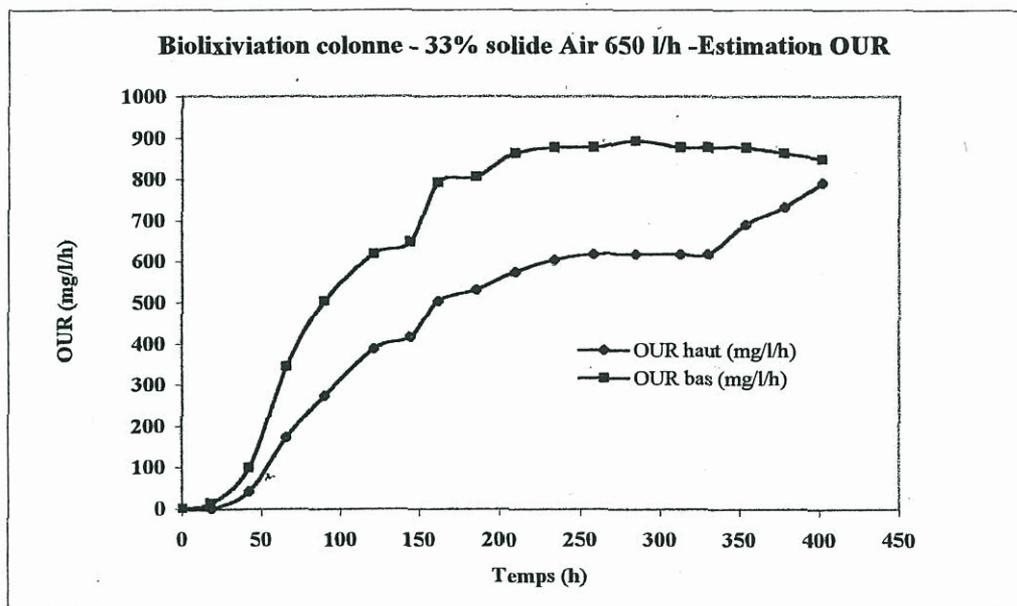
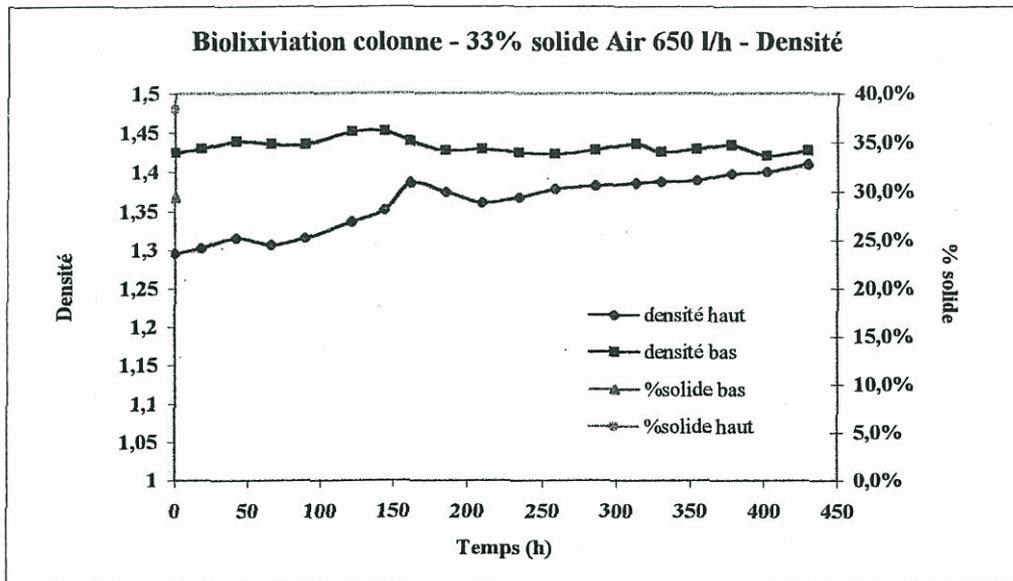
Ann. 1 - Résultats du batch 2.....	95
Ann. 2 - Résultats du batch 3.....	101
Ann. 3 - Résultats du batch 4.....	107
Ann. 4 - Résultats du batch 5.....	113
Ann. 5 - Résultats d'analyse.....	119
Ann. 6 - Bilans de matière obtenus avec BILCO.....	131
Ann. 7 - Modélisations cinétiques des batchs 3, 4 et 5.....	139

ANNEXE 1

Résultats du batch 2

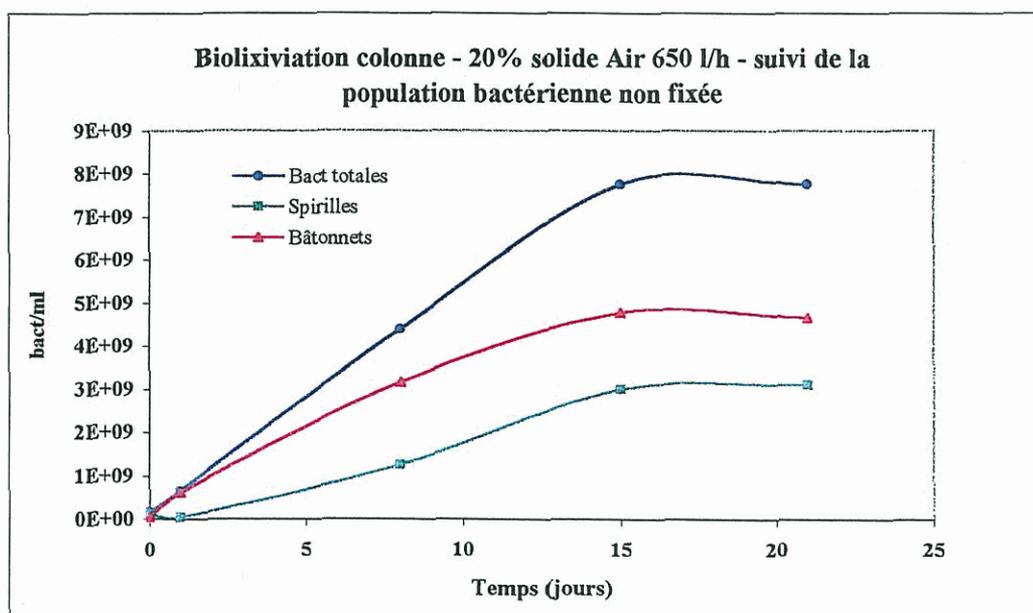
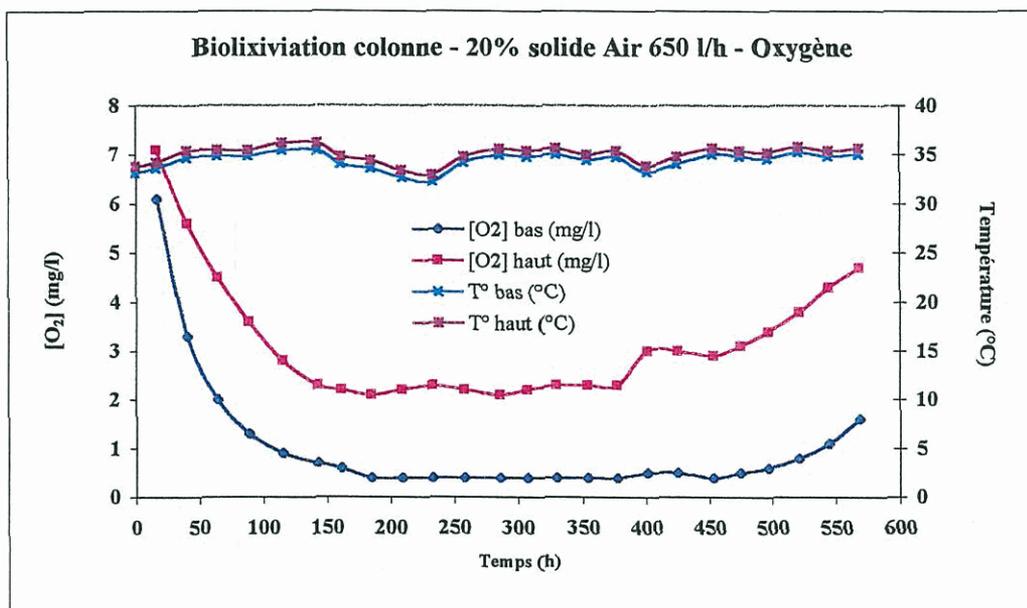
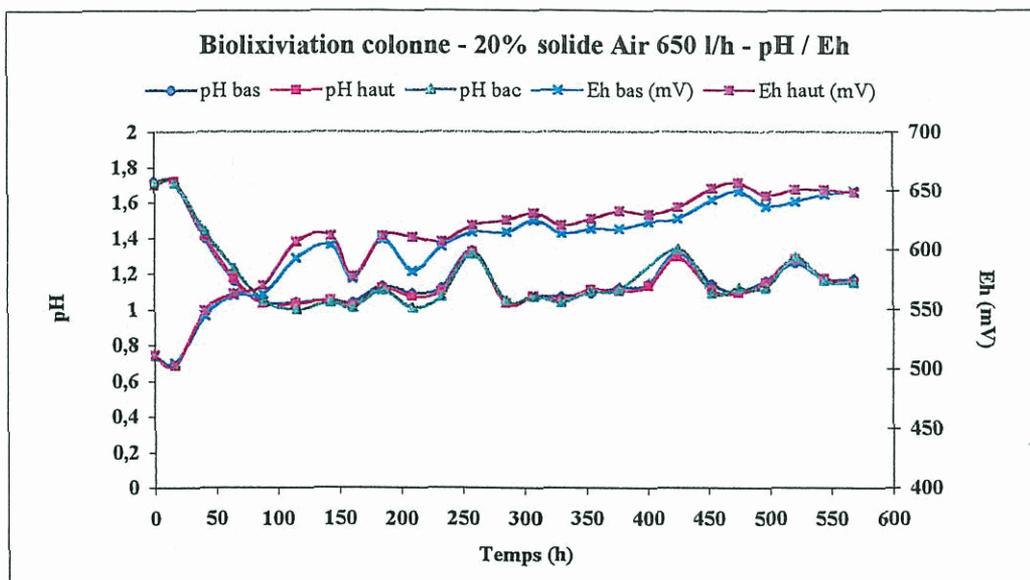


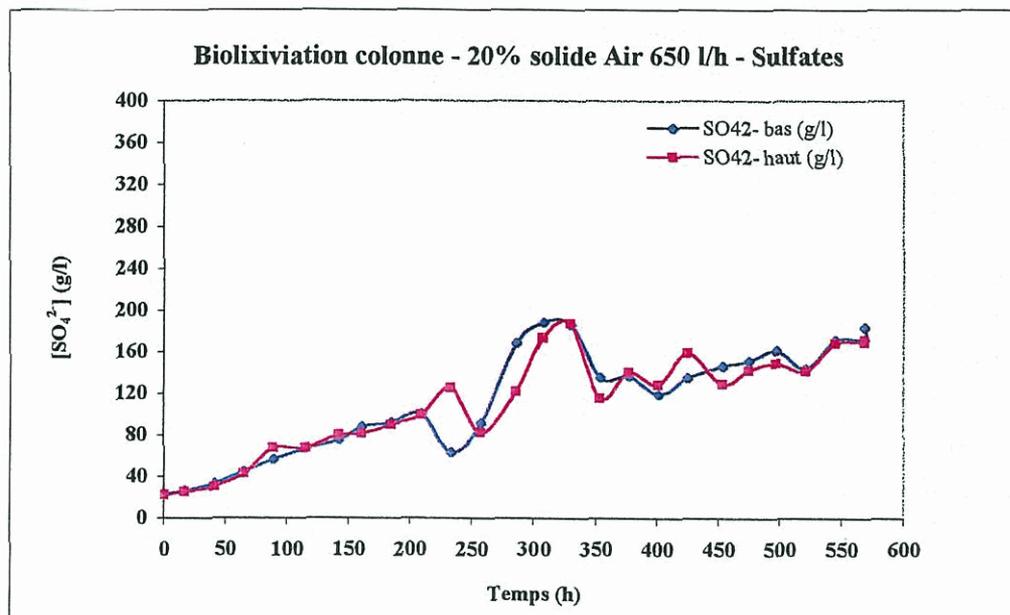
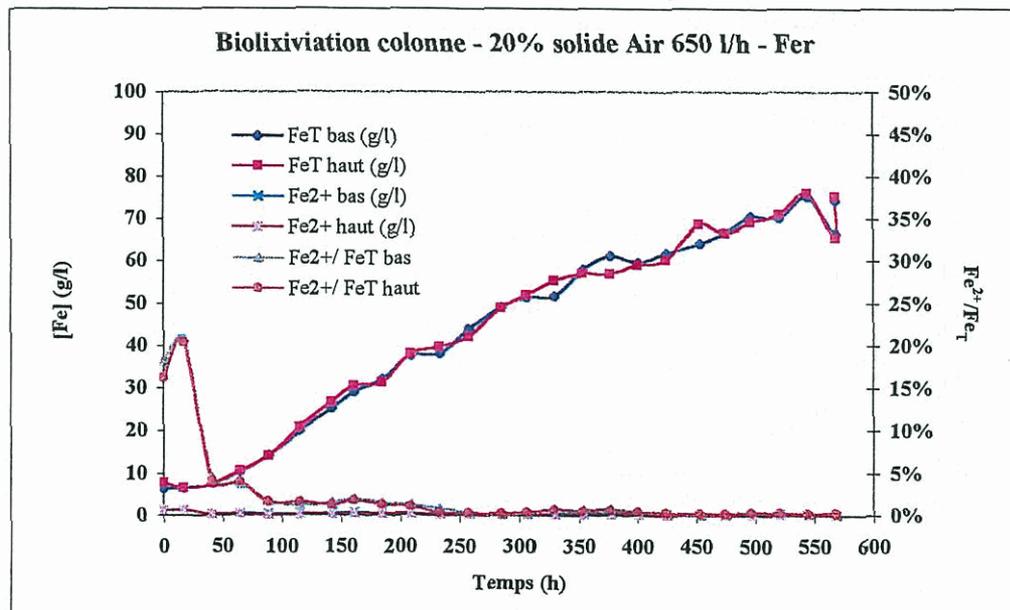
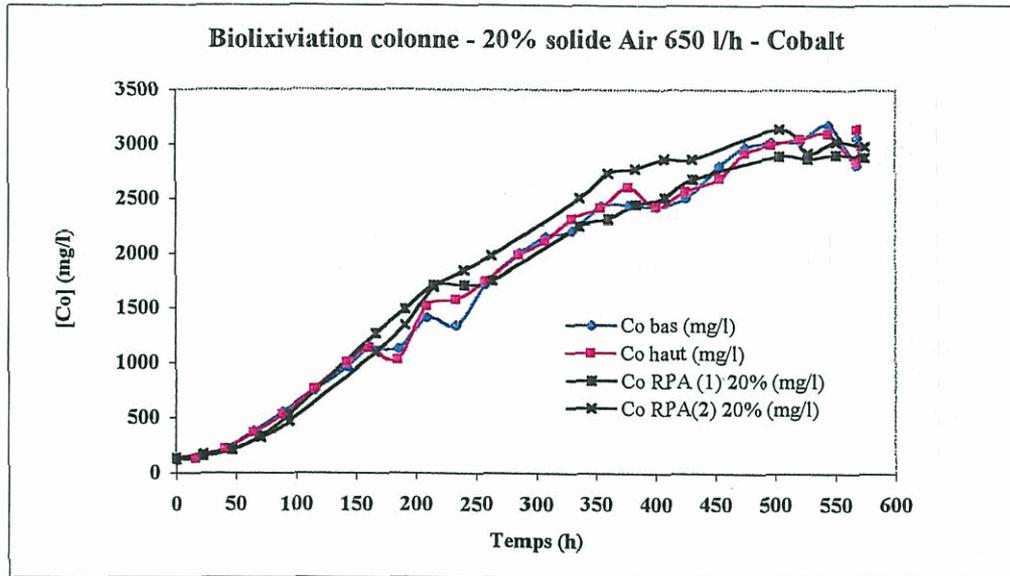


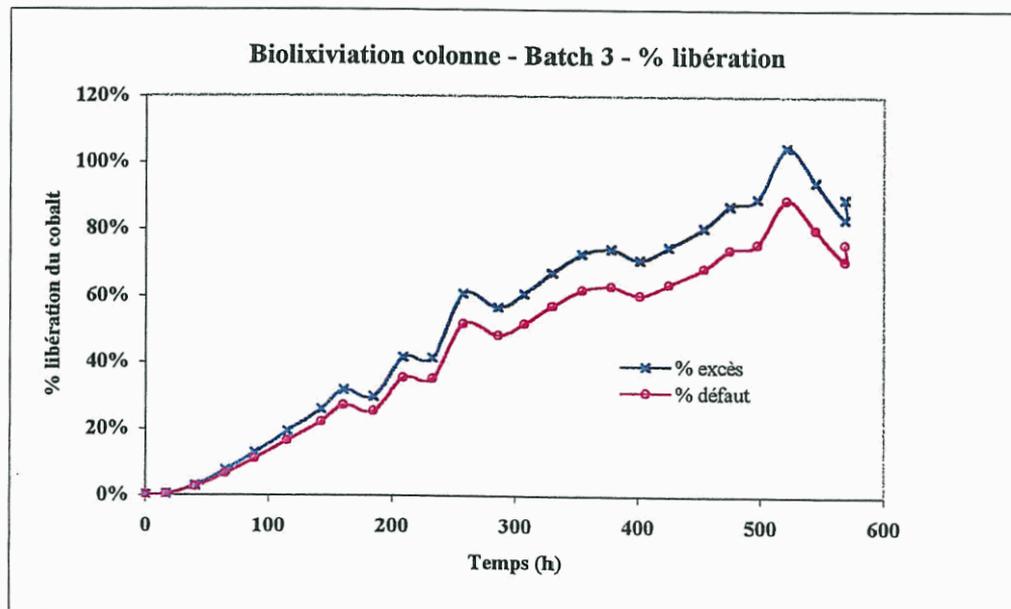
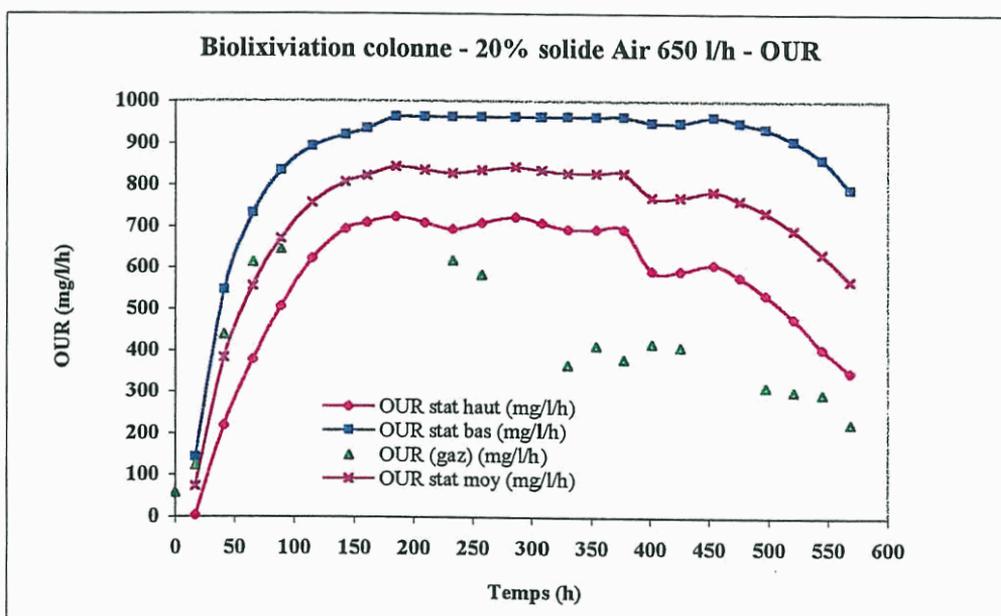
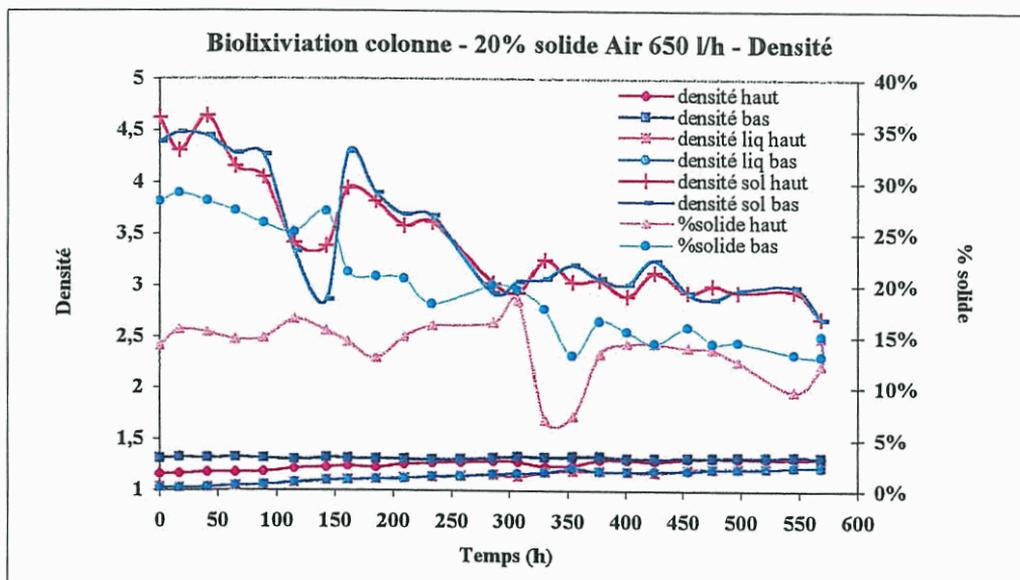


ANNEXE 2

Résultats du batch 3

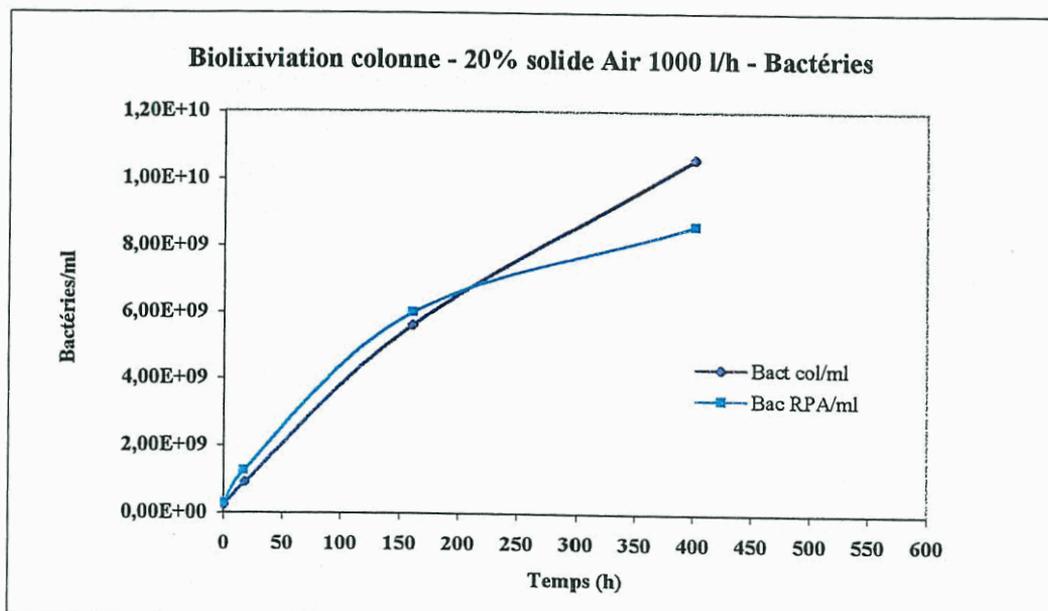
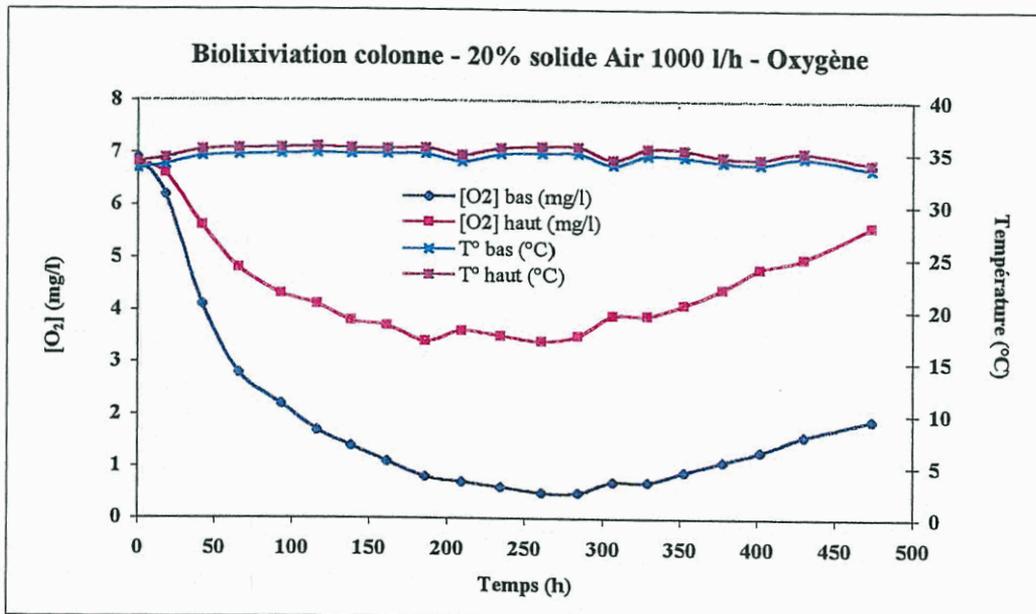
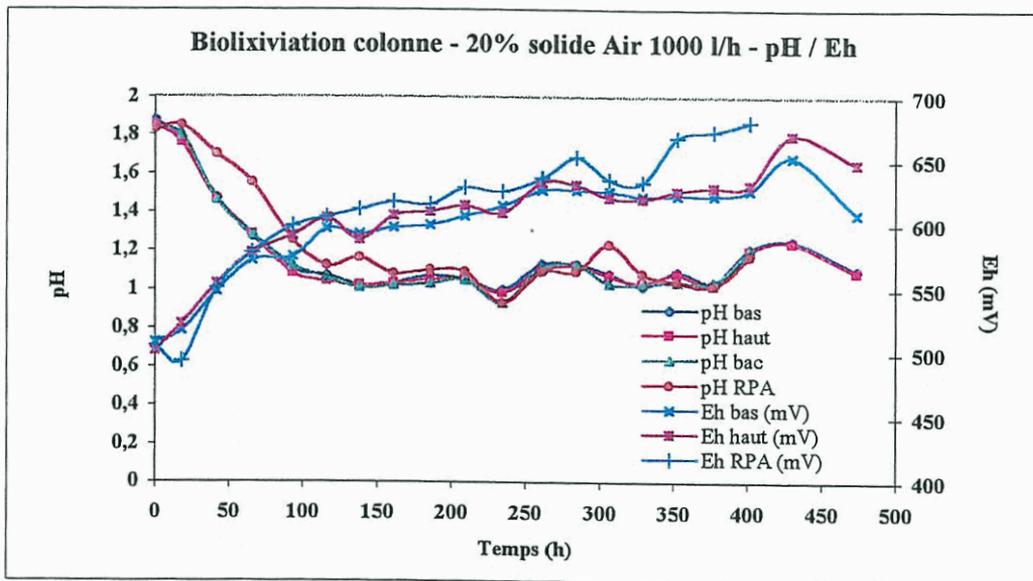


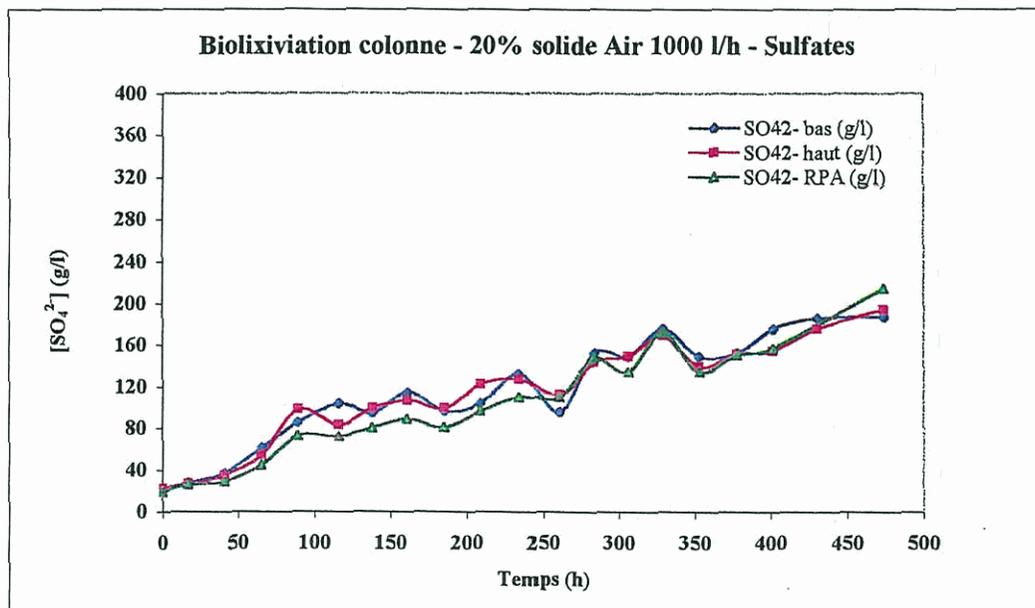
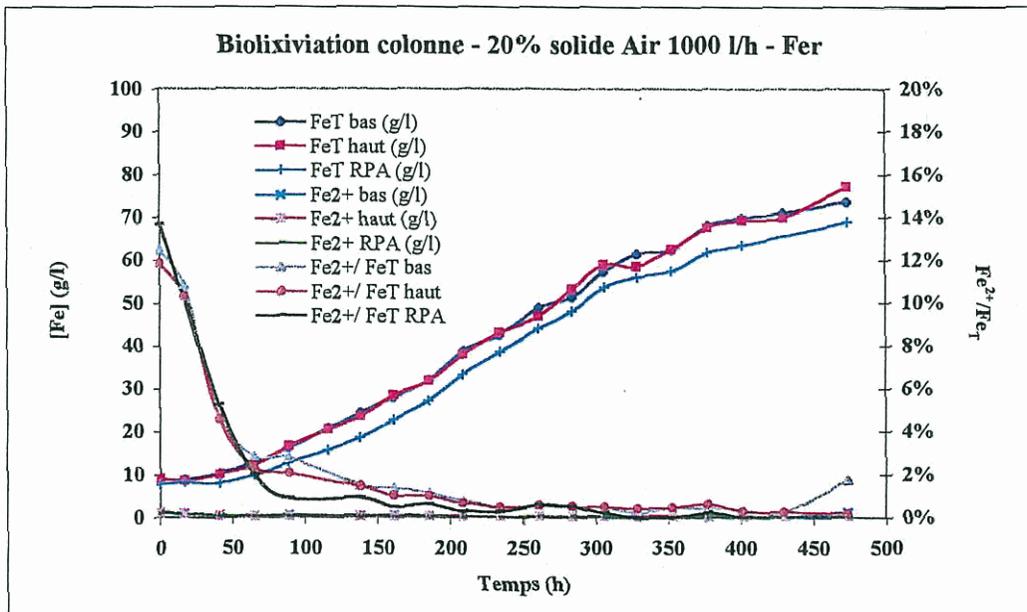
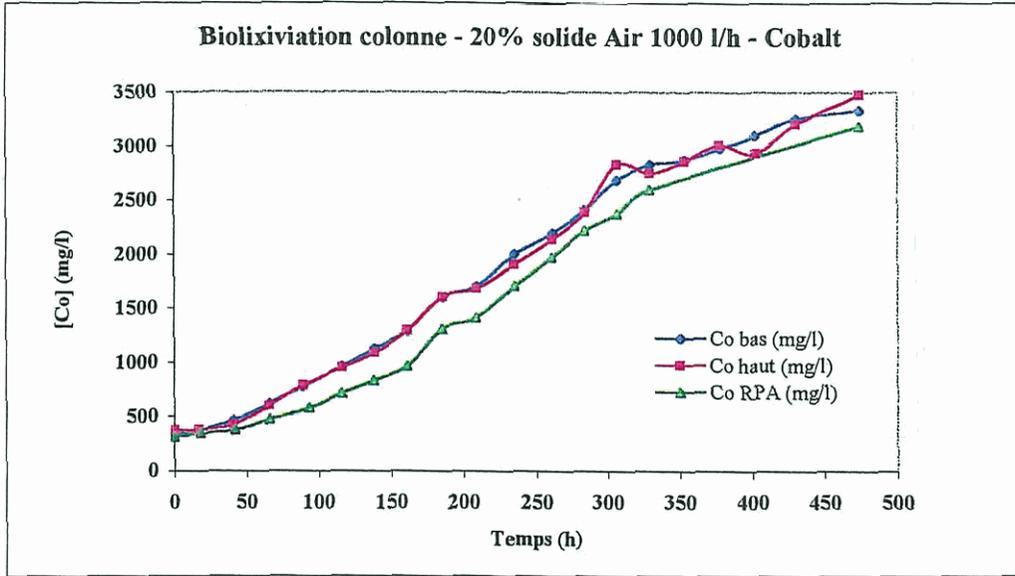


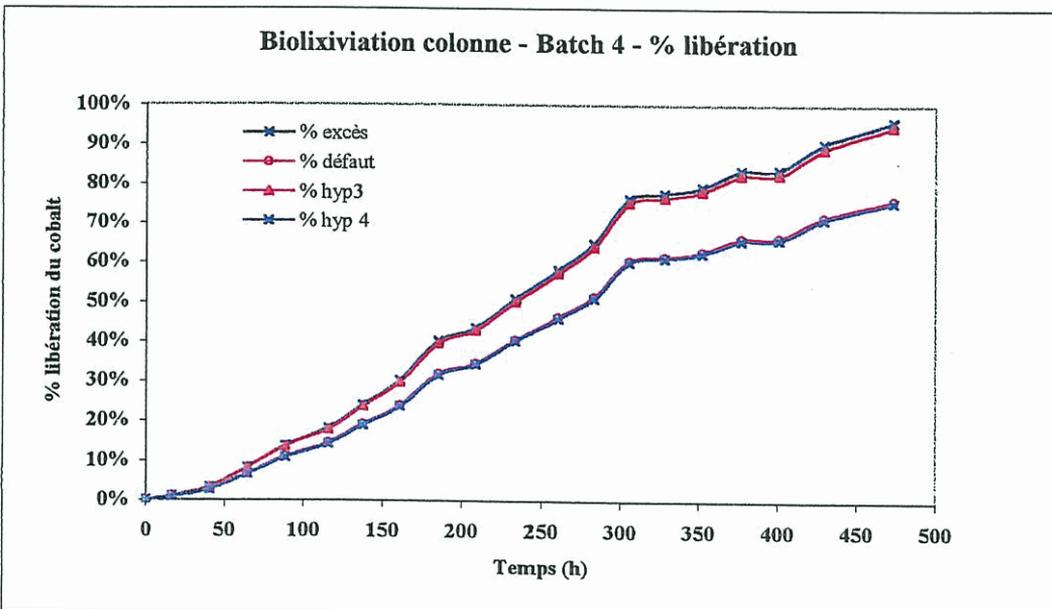
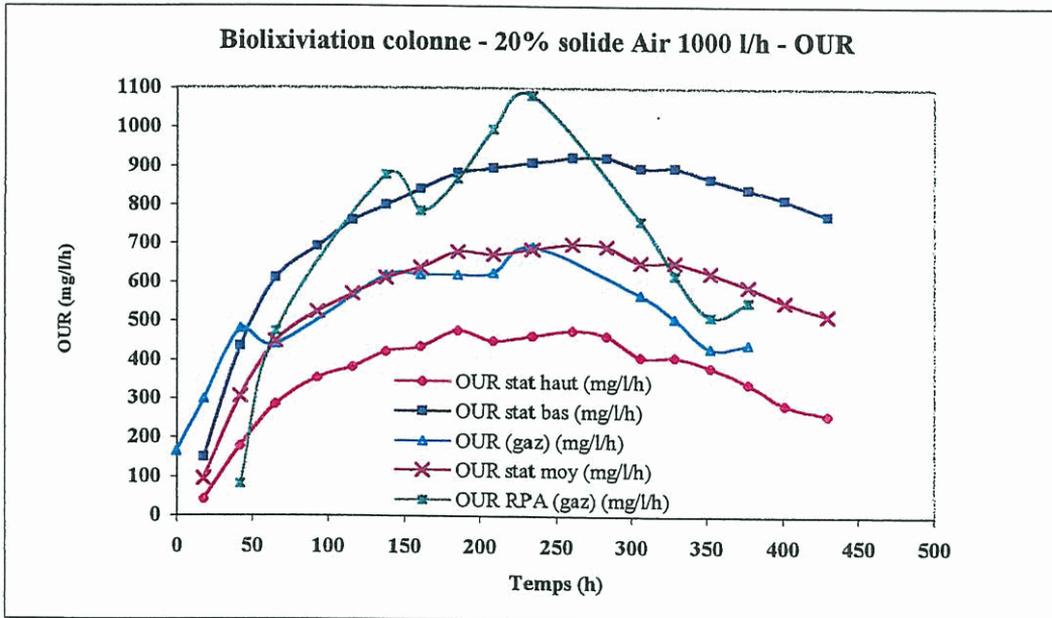
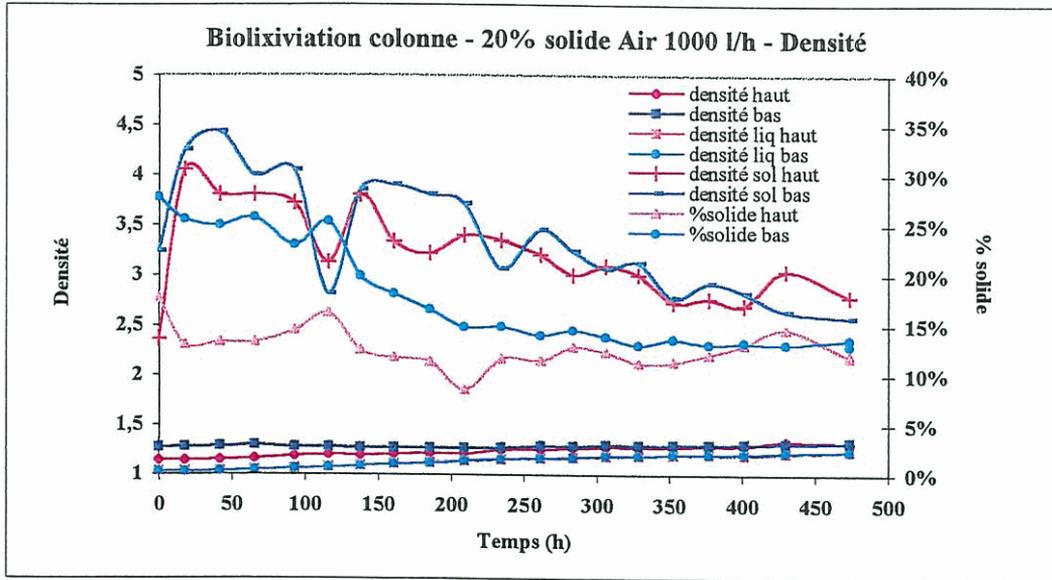


ANNEXE 3

Résultats du batch 4

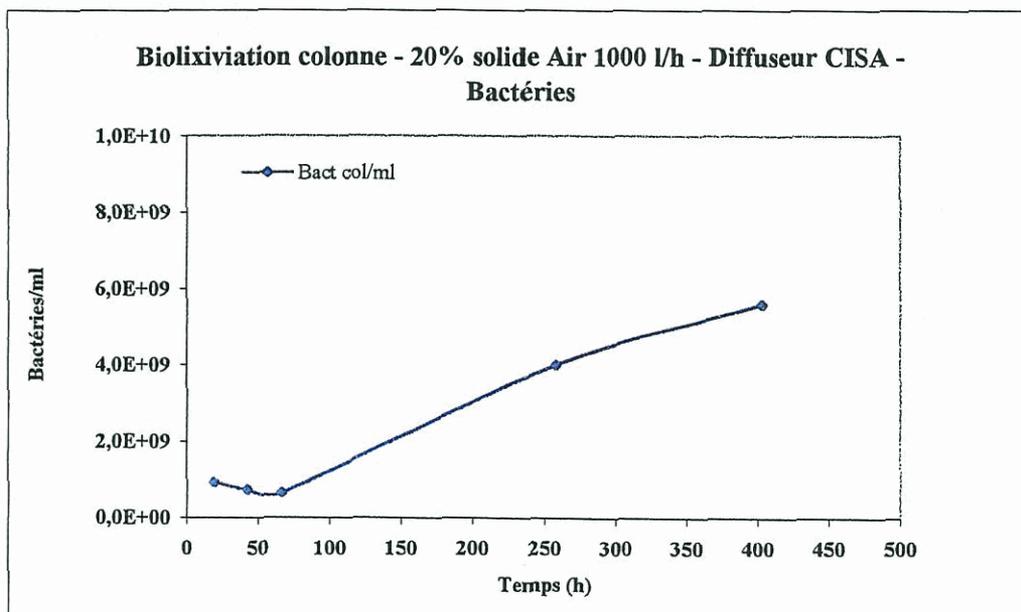
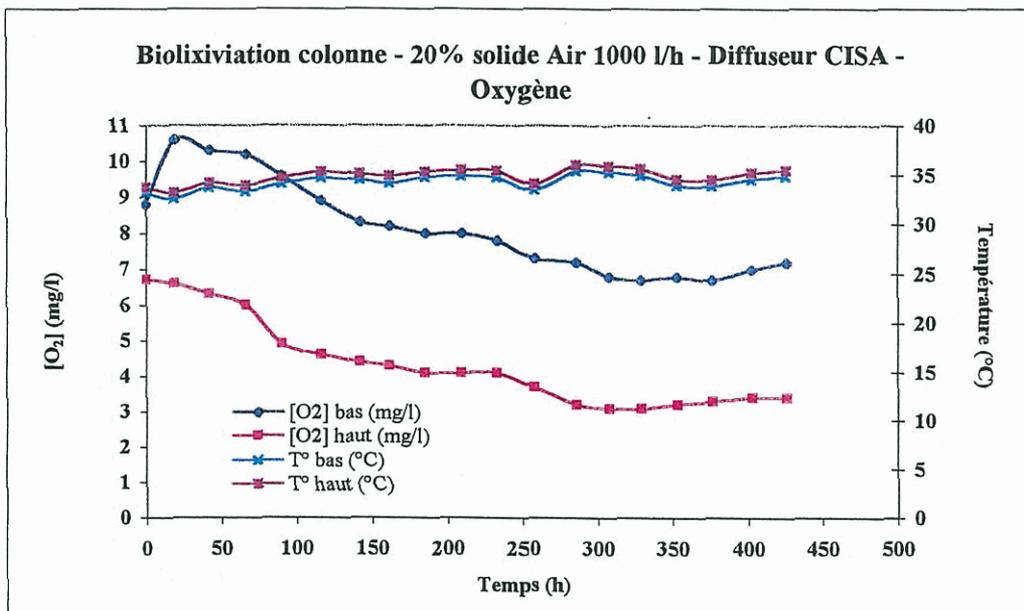
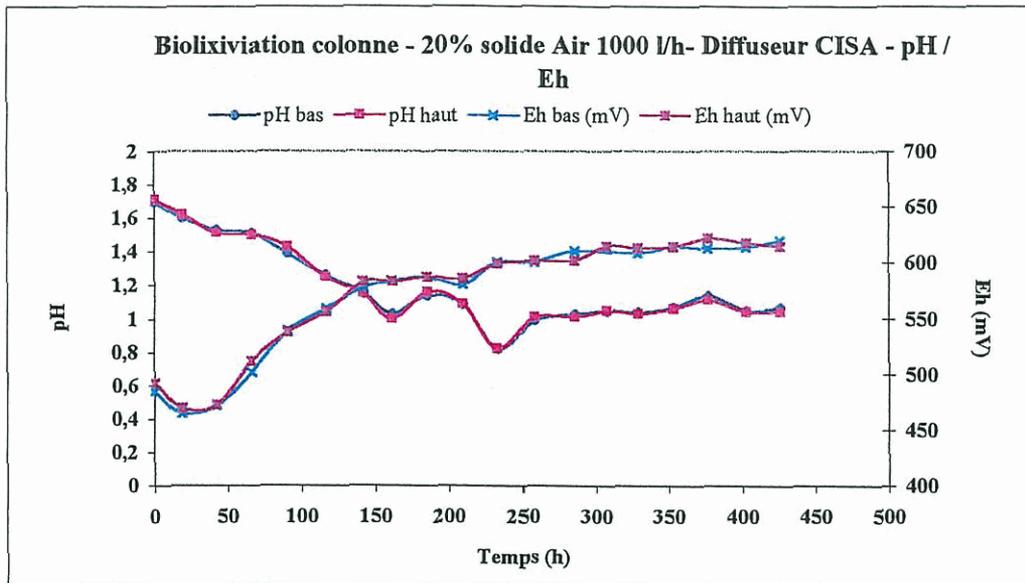


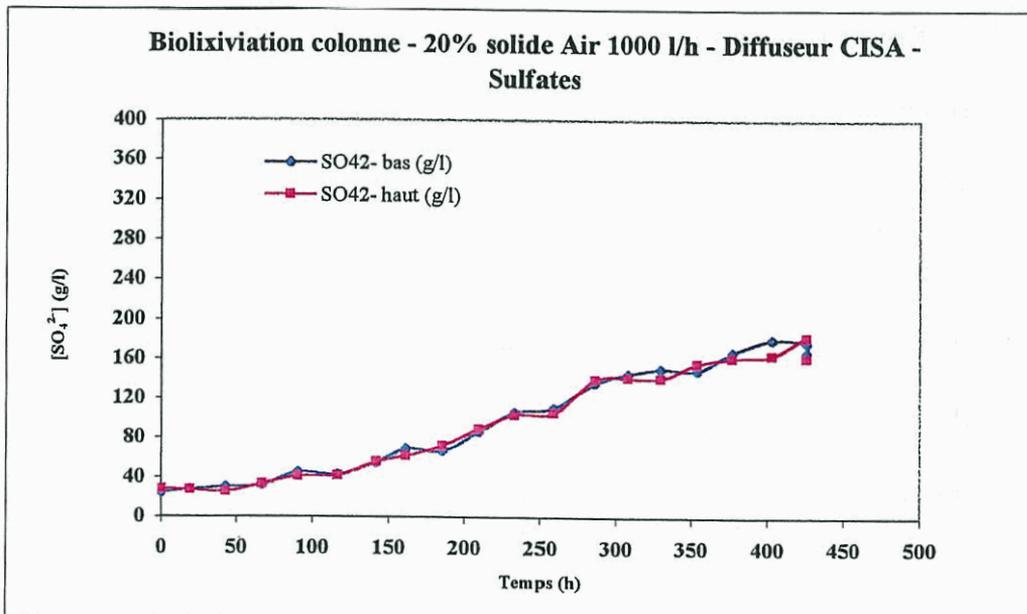
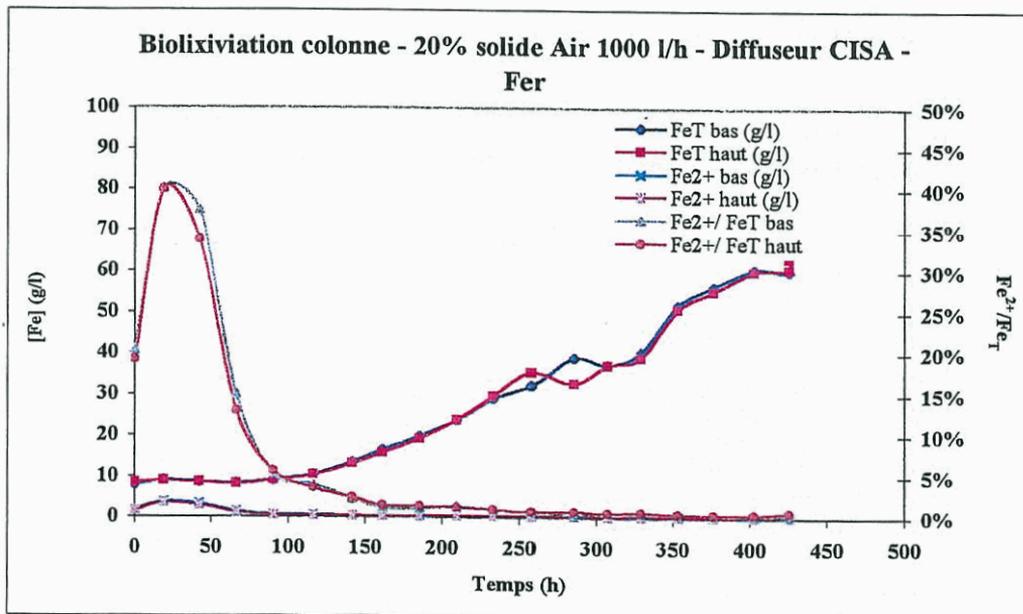
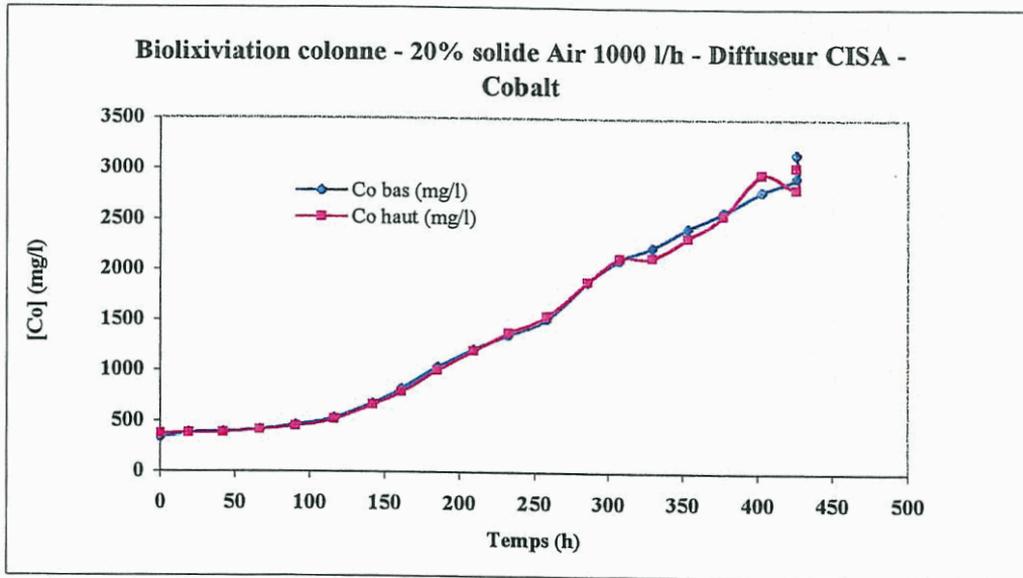


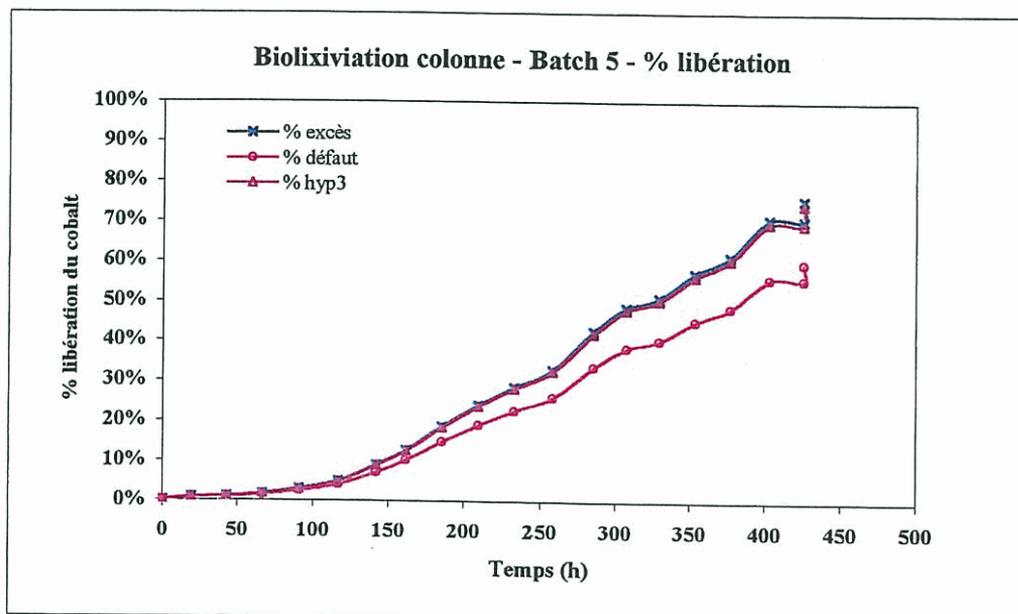
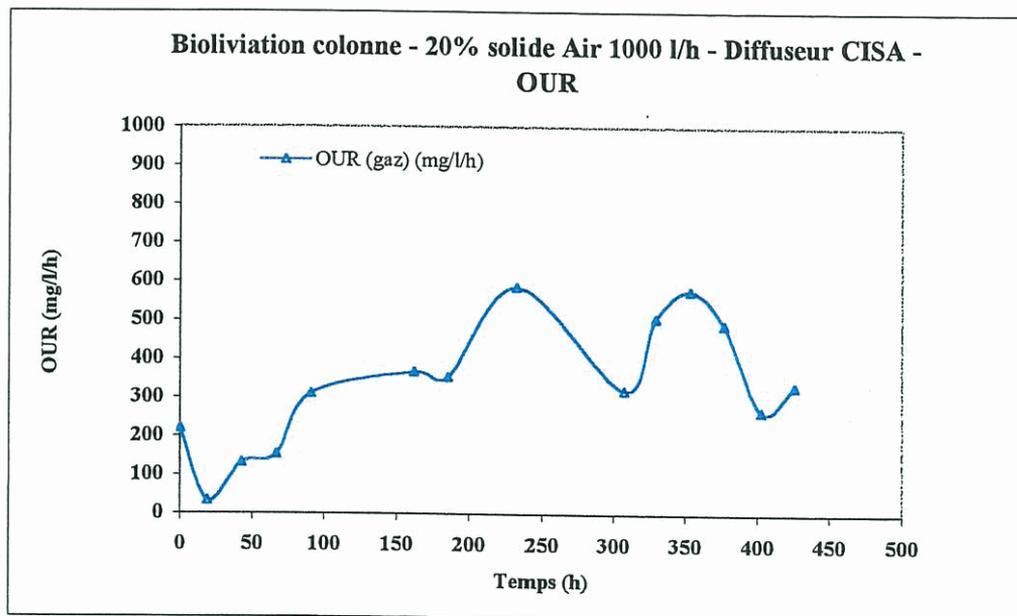
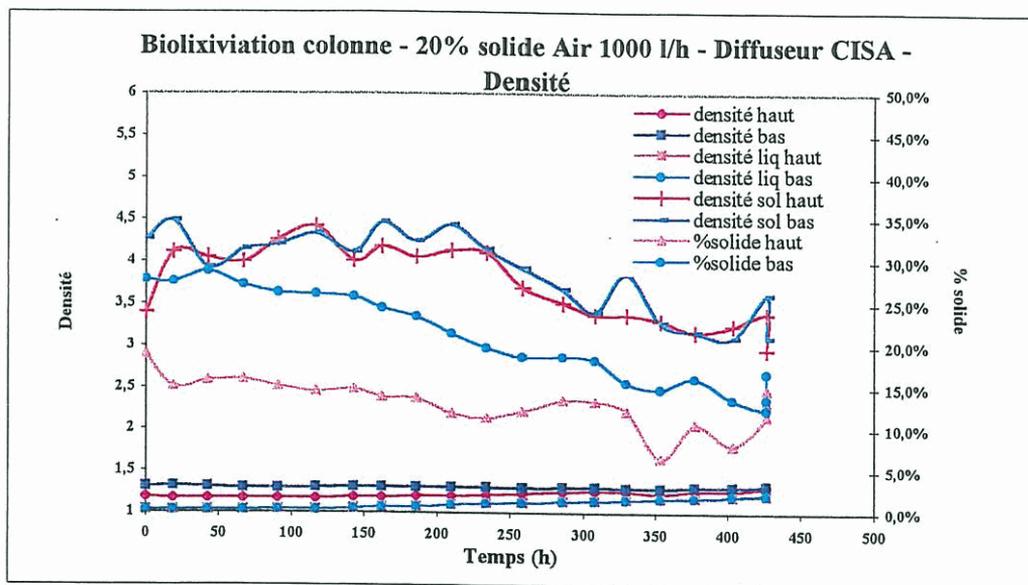


ANNEXE 4

Résultats du batch 5







ANNEXE 5

Résultats d'analyse

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 07-DEC-39

BRGM ANALYSE

~~Etude F1077A~~

Demande N° 99603199

		Identification		
Unité		Labo	1	
		Client	BIOLIX.COL.PYRITE.	
Cobalt	%	LDI	0.01	0.57
		LDS	100	
Fer	%	LDI	0.1	43.6
		LDS	100	
Soufre libre	%	LDI	0.05	< 0.05
		LDS	100	
Sulfates	%	LDI	0.2	1.65
		LDS	100	
Soufre total	%	LDI	0.05	49.9
		LDS	100	

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

LDS : Limite Supérieure de dosabilité

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 04-FEV-00

BRGM ANALYSE

Etude G1009A

Demande N°

70100

		Identification		
Unité		Labo	Client	
Cobalt	mg/Kg	LDI	20.	2880.
		LDS	5000	
Fer	%	LDI	0.05	23.7
		LDS	100	
Soufre libre	%	LDI	0.05	< 0.05
		LDS	100	
Sulfates	%	LDI	0.2	35.6
		LDS	100	
Soufre total	%	LDI	0.05	33.0
		LDS	100	

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

LDS : Limite Supérieure de dosabilité

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 04-FEV-00

BRGM ANALYSE

Etude G1009B

Demande N° 500137

	Unité	Identification		1 MINERAI KCC (2)
		Labo	Client	
Cobalt	%	LDI	0.01	1.37
		LDS	100	
Fer	%	LDI	0.05	35.2
		LDS	100	
Soufre libre	%	LDI	0.05	0.05
		LDS	100	
Sulfates	%	LDI	0.2	5.8
		LDS	100	
Soufre total	%	LDI	0.05	40.6
		LDS	100	

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

LDS : Limite Supérieure de dosabilité

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 28-FEV-00

BRGM ANALYSE

Etude G1042C

Demande N° 500304

		Identification			1	2
		Labo	Client			
Unité						
Cobalt	g/l	LDI	0.05		2.82	2.80
		LDS	100			
Fer	g/l	LDI	0.05		72.6	74.6
		LDS	100			
Fer ferreux	g/l	LDI	0.05		8.1	7.5
		LDS	100			
Fer ferrique	g/l	LDI	0.05		64.5	67.1
		LDS	100			
Sulfates	g/l	LDI	0.05		121.4	117.3
		LDS	200			

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

LDS : Limite Supérieure de dosabilité

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 28-FEV-00

BRGM ANALYSE

Etude G1042B

Demande N° 500303

		Identification		1		2	
				Labo Client		Sol bas biolix (3)	Sol haut biolix (3)
Unité							
Calcium	%	LDI	0.01	19.2	18.4		
		LDS	100				
Cobalt	mg/Kg	LDI	20.	1285.	1240.		
		LDS	5000				
Fer	%	LDI	0.01	4.55	5.02		
		LDS	100				
Soufre libre	%	LDI	0.05	< 0.05	< 0.05		
		LDS	100				
Sulfates	%	LDI	0.2	49.6	50.7		
		LDS	100				
Soufre total	%	LDI	0.05	20.6	20.7		
		LDS	100				

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

LDS : Limite Supérieure de dosabilité

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 31-MAR-00

BRGM ANALYSE

Etude G1042E

Demande N° 500487

Page N°

		Identification				
		Labo Client	1	2	3	4
Unité			Liq bas fin biolix4	Liq haut fin biolix4	Liq bas deb. biolix4	Liq haut debut bio.4
Cobalt	g/l LDI	0.05	3.14	3.17		
Cobalt	mg/l LDI	10.			330.	360.
Fer	g/l LDI	0.05	81.0	81.8	8.3	9.1
Fer ferreux	g/l LDI	0.05	6.0	6.2	1.5	2.4
Fer ferrique	g/l LDI	0.05	75.0	75.6	6.8	6.7
Sulfates	g/l LDI	0.05	119.0	104.0	23.0	24.9

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 31-MAR-00

BRGM ANALYSE

Etude G10420

Demande N°

500486

Page N°

	Unité	LDI	Identification				
			Labo Client	1 Sol bas fin biolix	2 Sol haut fin biolix	3 Sol bas debut biolix	4 Sol haut debut biolix
Calcium	%	LDI	0.01	24.7	23.7	1.30	4.34
Cobalt	%	LDI	0.01	0.15	0.14	1.55	1.28
Fer	%	LDI	0.01	4.86	4.87	41.6	34.1
Soufre libre	%	LDI	0.05	< 0.05	0.63	0.20	< 0.05
Sulfates	%	LDI	0.2	55.4	55.4	4.0	11.8
Soufre total	%	LDI	0.05	23.0	22.8	48.5	42.5

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 04-MAI-00

BRGM ANALYSE

Etude G1042G

Demande N° 500738

Page N°

	Unité	Identification				
		Labo Client	1 Sol bas fin biolix	2 Sol haut fin biolix	3 Sol bas debut biolix	4 Sol haut debut biolix
Calcium	% LDI 0.01		14.9	15.2	1.23	1.37
Cobalt	% LDI 0.01		0.48	0.42	1.50	1.26
Fer	% LDI 0.01		13.85	12.62	43.0	36.9
Soufre libre	% LDI 0.05		0.37	0.28	0.32	
Sulfates	% LDI 0.2		37.2	37.4	3.6	
Soufre total	% LDI 0.05		26.7	25.6	45.8	39.9

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

Etude de la biolixiviation de minerais sulfurés dans une colonne à gaz et liquide porteurs

Le 04-MAI-00

BRGM ANALYSE

Etude G1042F

Demande N° 500737

Page N°

	Unité	Identification					
		Labo Client	1 LiqBasFinBiolix.(5)	2 LiqHautFinBiolix.(5)	3 LiqBasDébutBiolix(5)	4 LiqHautDébutBiolix(5)	
Cobalt	g/l	LDI	0.05	2.85	2.84		
Cobalt	mg/l	LDI	10.			350.	365.
Fer	g/l	LDI	0.05	77.0	75.9	9.8	10.1
Fer ferreux	g/l	LDI	0.05	5.6	5.6	1.5	1.6
Fer ferrique	g/l	LDI	0.05	71.4	70.3	8.3	8.5
Sulfates	g/l	LDI	0.05	170.0	172.0	27.0	27.2

LDI : Limite Inférieure de dosabilité

ANNEXE 6

Bilans de matière obtenus avec BILCO

Comparison Sheet

Comparison sheet.

Estimated values: C:\BILCO\BIOLIX_C\VARCOHER.BIL

Batch 3

Experimental values: C:\BILCO\BIOLIX_C\COL.BIL

1
0
2

Stream #1 Entrée

Phase: Liquide

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	1011.2627 g/h	± 20.27064 %	1028 g/h	± 20 %	-16.737339

Eléments	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	112.48628 mg/k	± 9.9902415 %	112.4 mg/k	± 10 %	0.086280552
Fe	6.8724412 g/kg	± 10.026557 %	6.9 g/kg	± 10 %	-0.027558765
Total	7.194277 g/kg	± 9.9965555 %	7.2 g/kg	± 10 %	.0057230139

1,01 kg
d=1,031

Co 115 mg/l
Fe 7,07 g/l
SO₄ 22,21 g/l

Phase: Solide

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	232.92129 g/h	± 13.618504 %	276 g/h	± 20 %	-43.078705

Eléments	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	1.3995234 %	± 8.0164088 %	1.37 %	± 10 %	0.029523419
SO ₄	5.8 %	± 10 %	5.8 %	± 10 %	0
Fe	33.548068 %	± 8.3132955 %	35.2 %	± 10 %	-1.6519318
Total	40.180862 %	± 7.9300499 %	40.6 %	± 10 %	-0.41913806

0,233 kg

Co 1,10 %
SO₄ 5,8 %
Fe 33,54 %
S total 40,18 %

Stream #2 Sortie

Phase: Liquide

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	1238.4814 g/h	± 14.778067 %	1122 g/h	± 20 %	116.48144

Eléments	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	2514.7577 mg/k	± 8.3795009 %	2570 mg/k	± 10 %	-55.24234
Fe	60.926045 g/kg	± 8.0867849 %	58.5 g/kg	± 10 %	2.4260449
Total	48.007625 g/kg	± 9.1611119 %	47.7 g/kg	± 10 %	0.30762533

1,24 kg
d=1,235

Co 3090 mg/l
Fe 75 g/l
SO₄ 177 g/l

Phase: Solide

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	199.62722 g/h	± 9.6676083 %	198 g/h	± 10 %	1.6272218

Eléments	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	0.12977216 %	± 10.006639 %	0.13 %	± 10 %	00022783623
SO ₄	50.2 %	± 10 %	50.2 %	± 10 %	0
Fe	4.8263269 %	± 9.9201361 %	4.8 %	± 10 %	0.026326907
Total	20.74293 %	± 9.5850487 %	20.65 %	± 10 %	0.092929951

0,200 kg

Co 0,13 %
SO₄ 50,2 %
Fe 4,83 %
S total 20,74 %

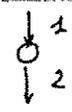
Comparison Sheet

Comparison sheet.

Estimated values: C:\BILCO\BIOLIX_C\RESULT4.BIL

Experimental values: C:\BILCO\BIOLIX_C\BATCH4.BIL

Batch 4



Stream #1

Phase: Liquide

24,31 kg
d=1,023

Co 343 mg/l
Fe 8,72 g/l
SO₄ 22,83 g/l

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	24.310854 kg	± 10.179955 %	24.79 kg	± 10 %	-0.47914614

Composition	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	0.33346553 g/kg	± 9.9958657 %	0.334 g/kg	± 10 %	00053447015
Fe	8.4544218 g/kg	± 9.9996531 %	8.47 g/kg	± 10 %	-0.015578193
S	7.3824355 g/kg	± 15.512662 %	7.66 g/kg	± 15 %	-0.2775645

Phase: Solide

5,32 kg

Co 1,40 %
Fe 37,2 %
SO₄ 7,9 %
S total 36,0 %

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	5.3178044 kg	± 8.9065208 %	7.3 kg	± 10 %	-1.9821956

Composition	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	1.3988681 %	± 8.1976306 %	1.42 %	± 10 %	-0.02113194
Fe	37.217723 %	± 8.1549214 %	37.9 %	± 10 %	-0.68227716
SO4	7.9 %	± 10 %	7.9 %	± 10 %	0
S	35.979083 %	± 8.9968321 %	45.5 %	± 10 %	-9.5209173

Stream #2

Phase: Liquide

29,62 kg
d=1,24

Co 3200 mg/l
Fe 82,82 g/l
SO₄ 131 g/l

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	29.617639 kg	± 7.9336444 %	26.67 kg	± 10 %	2.9476386

Composition	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	2.5776572 g/kg	± 7.9735767 %	2.54 g/kg	± 10 %	0.037657213
Fe	66.790171 g/kg	± 8.0224342 %	65.65 g/kg	± 10 %	1.1401709
S	35.146427 g/kg	± 11.795629 %	29.97 g/kg	± 15 %	5.1764268

Phase: Solide

4,24 kg

Co 9,145 %
Fe 4,87 %
SO₄ 55,4 %
S total 24,82 %

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	4.2374751 kg	± 8.8996896 %	3.9 kg	± 10 %	0.33747505

Composition	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	0.14517558 %	± 9.9763981 %	0.145 %	± 10 %	00017557936
Fe	4.8739582 %	± 9.9628725 %	4.865 %	± 10 %	.0089582442
SO4	55.4 %	± 10 %	55.4 %	± 10 %	0
S	24.821772 %	± 8.8517626 %	22.9 %	± 10 %	1.9217716

Comparison Sheet

Comparison sheet.

Estimated values: C:\BILCO\BIOLIX_C\VARCOHER.BIL
 Experimental values: C:\BILCO\BIOLIX_C\BATCH5.BIL

Batch 5



Stream #1

Phase: Liquide

22,56 kg
d = 1,031

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	22.565346 kg	± 10.050847 %	22.71 kg	± 10 %	-0.14465431

Co 369 mg/lc
 Fe 19,22 g/lc
 SO₄ 27,63 g/lc

Composition	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	0.35711483 g/kg	± 14.966577 %	0.357 g/kg	± 15 %	00011483195
Fe	9.9113188 g/kg	± 15.029532 %	9.95 g/kg	± 15 %	-0.038681171
S	8.9324175 g/kg	± 15.139932 %	9.03 g/kg	± 15 %	-0.097582523

Phase: Solide

6,38 kg

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	6.3774869 kg	± 8.553249 %	6.92 kg	± 10 %	-0.54251307

Co 1,38 %
 Fe 38,19 %
 SO₄ 3,6 %
 S total 36,64 %

Composition	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	1.3848494 %	± 11.036496 %	1.38 %	± 15 %	.0048494452
Fe	38.18764 %	± 11.14444 %	39.95 %	± 15 %	-1.7623599
SO ₄	3.6 %	± 15 %	3.6 %	± 15 %	0
S	36.639797 %	± 11.538246 %	42.85 %	± 15 %	-6.2102028

Stream #2

Phase: Liquide

27,54 kg
d = 1,213

	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	27.533071 kg	± 8.9329157 %	26.67 kg	± 10 %	0.86307054

Co 3072 mg/lc
 Fe 82,12 g/lc
 S total 37,96 g/lc

Composition	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	2.5329074 g/kg	± 12.699642 %	2.54 g/kg	± 15 %	-0.007092615
Fe	67.704639 g/kg	± 12.600666 %	65.65 g/kg	± 15 %	2.0546392
S	31.281543 g/kg	± 13.994435 %	29.97 g/kg	± 15 %	1.3115435

Phase: Solide

5,92 kg

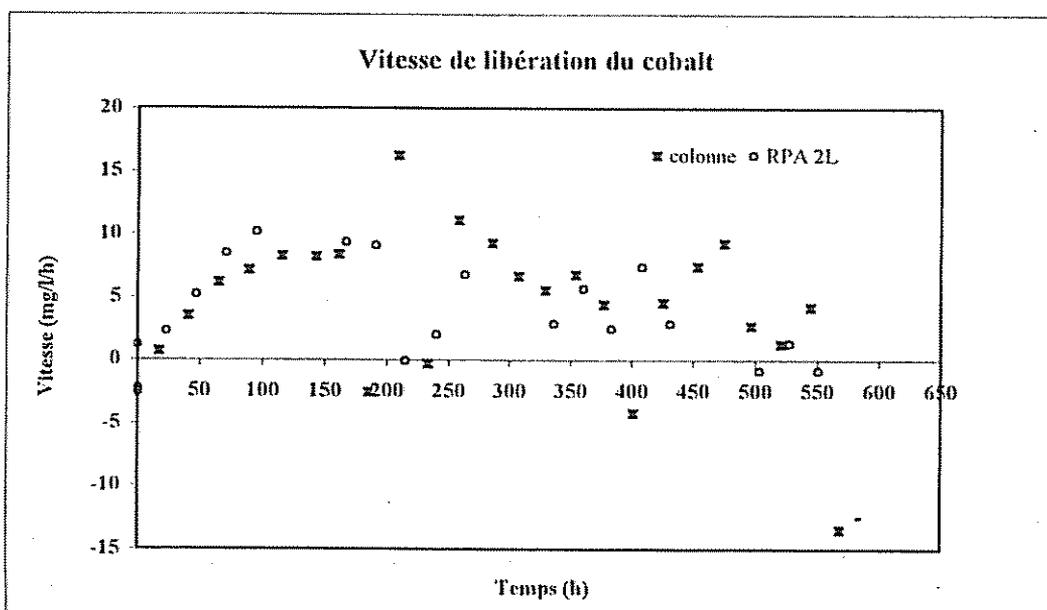
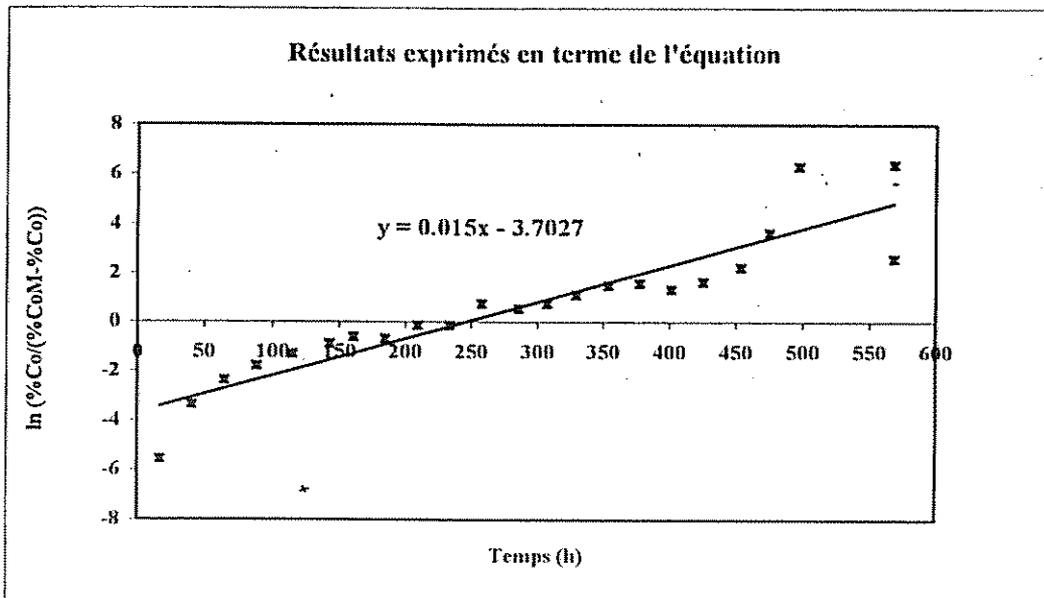
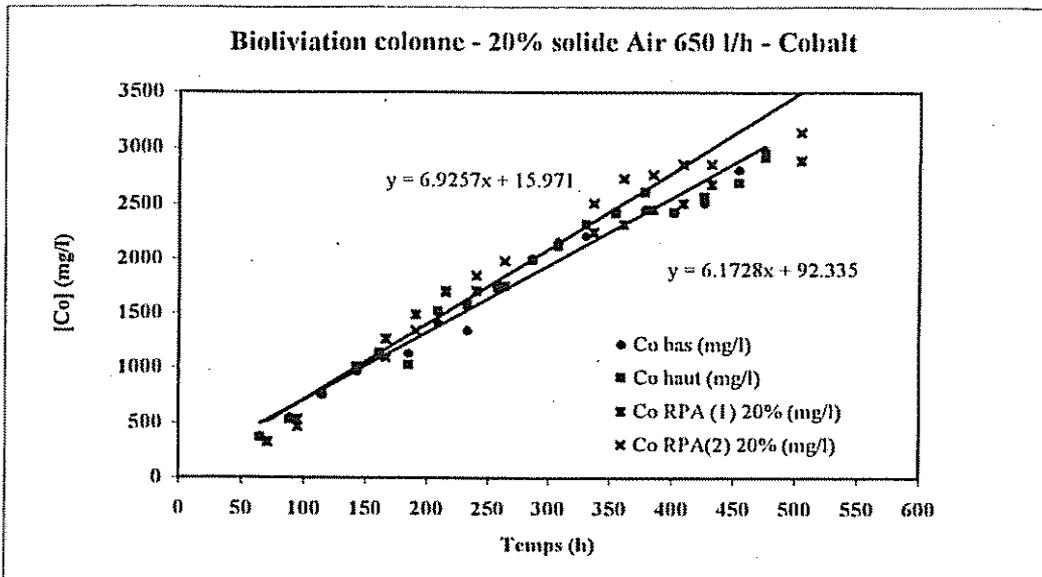
	Estimated values	Estimated errors	Experimental values	Experimental errors	Absolute deviation
Quantity	5.9259307 kg	± 9.1888095 %	5.68 kg	± 10 %	0.24593066

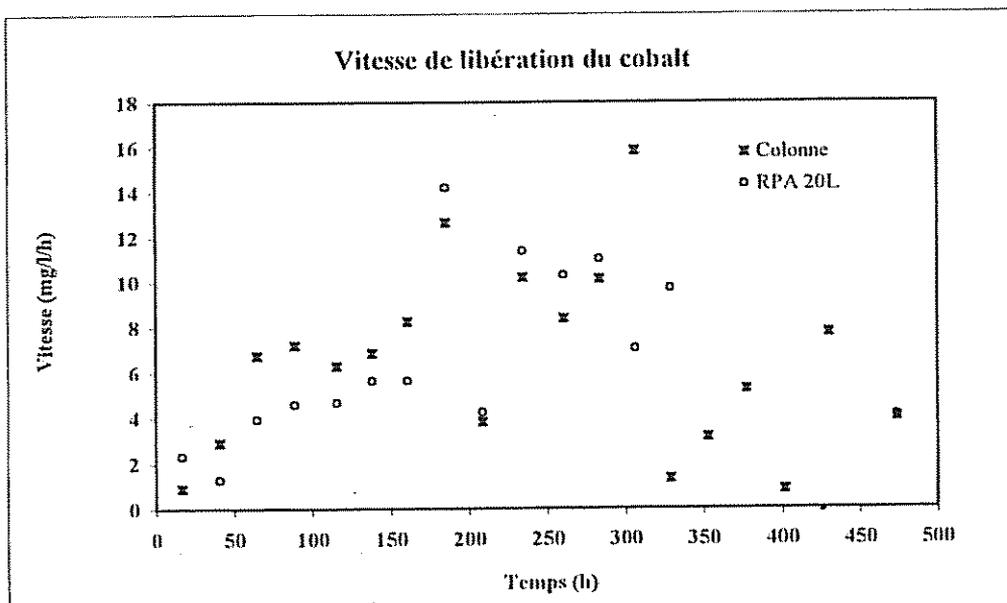
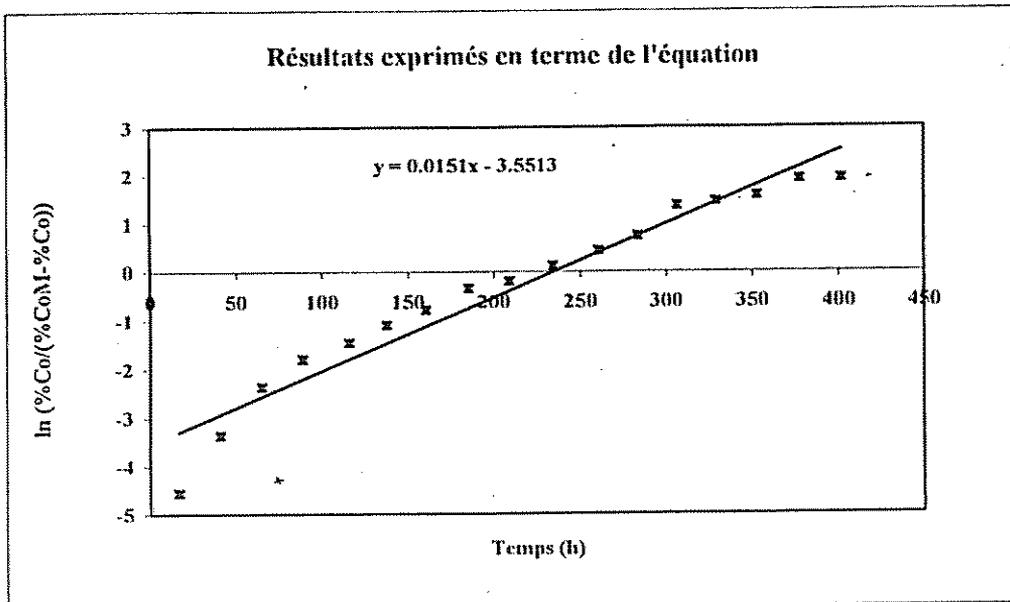
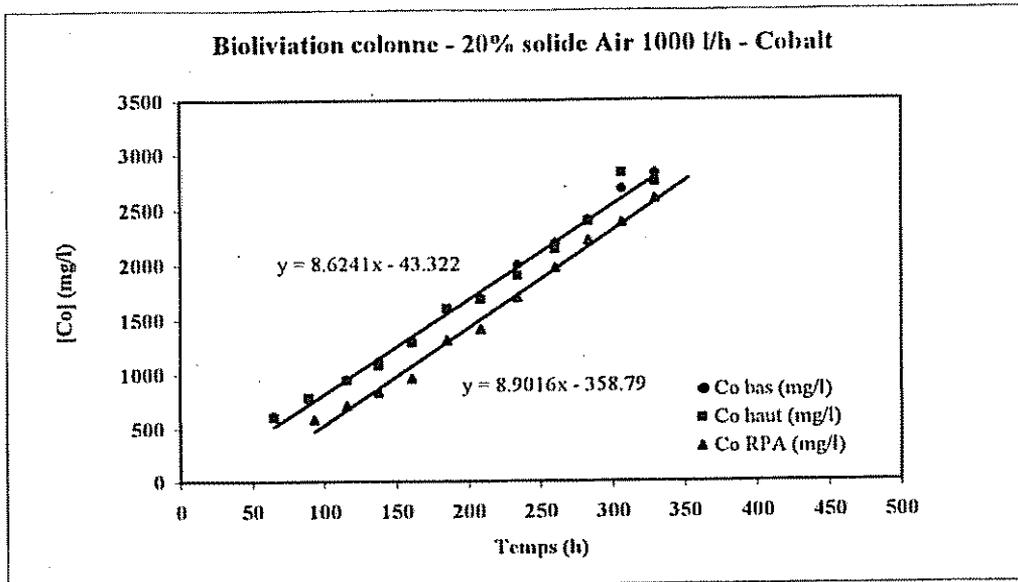
Co 9,45 %
 Fe 13,41 %
 SO₄ 37,3 %
 S total 27,8 %

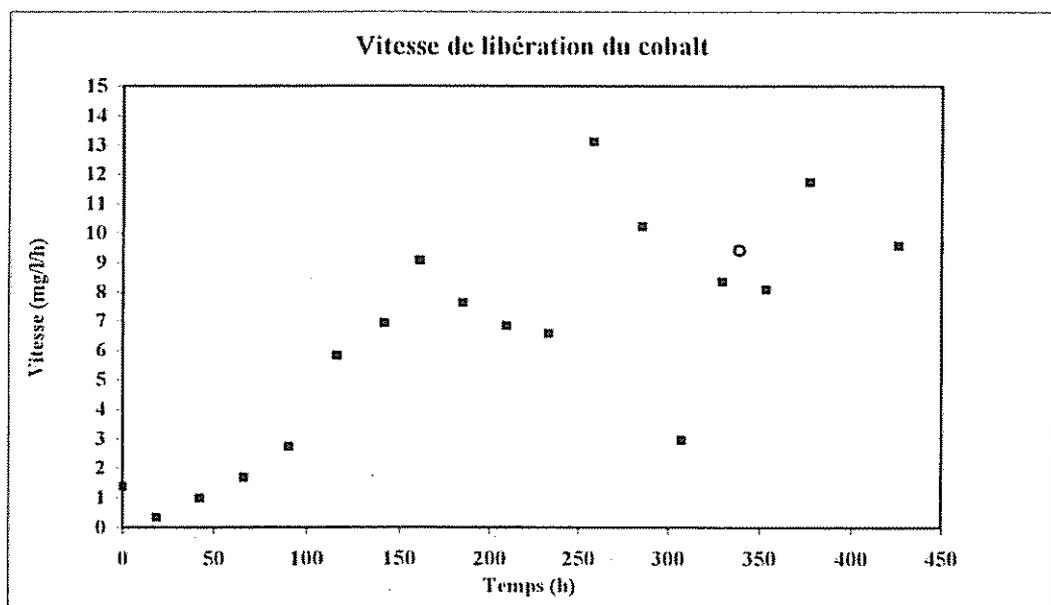
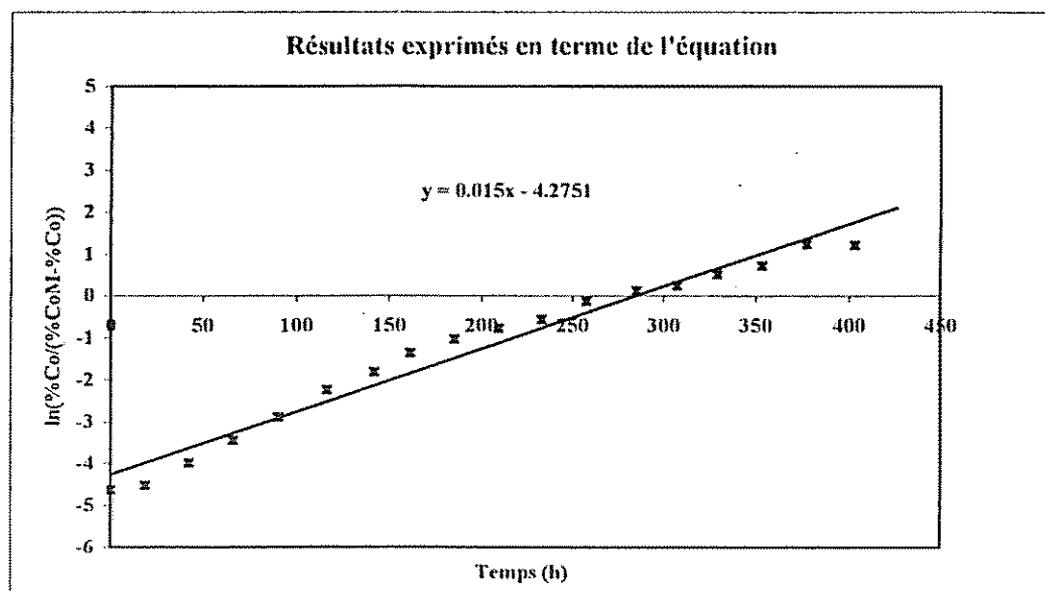
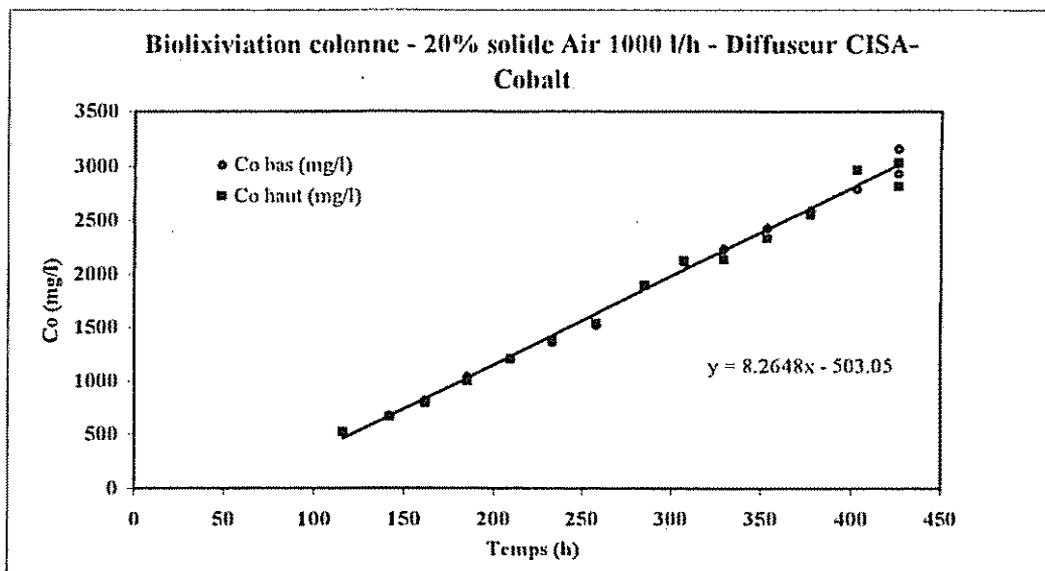
Composition	Ratio criterion 1	Error	Ratio criterion 1	Error	
Co	0.44952086 %	± 14.699129 %	0.45 %	± 15 %	00047914383
Fe	13.414728 %	± 14.447323 %	13.235 %	± 15 %	0.17972807
SO ₄	37.3 %	± 15 %	37.3 %	± 15 %	0
S	28.29909 %	± 12.53282 %	26.15 %	± 15 %	2.1490895

ANNEXE 7

Modélisations cinétiques des batchs 3, 4 et 5







BRGM
SERVICE ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL ET PROCÉDES INNOVANTS
Unité biotechnologies

BP 6009 - 45060 ORLEANS Cedex 2 - France - Tél. : 02.38.64.34.34