



HAL
open science

Identification de biosignatures structurales, chimiques et isotopiques à l'interface bactérie/minéral dans le système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite :

Céline Pisapia

► To cite this version:

Céline Pisapia. Identification de biosignatures structurales, chimiques et isotopiques à l'interface bactérie/minéral dans le système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite :. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL034N . tel-01752554

HAL Id: tel-01752554

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752554>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

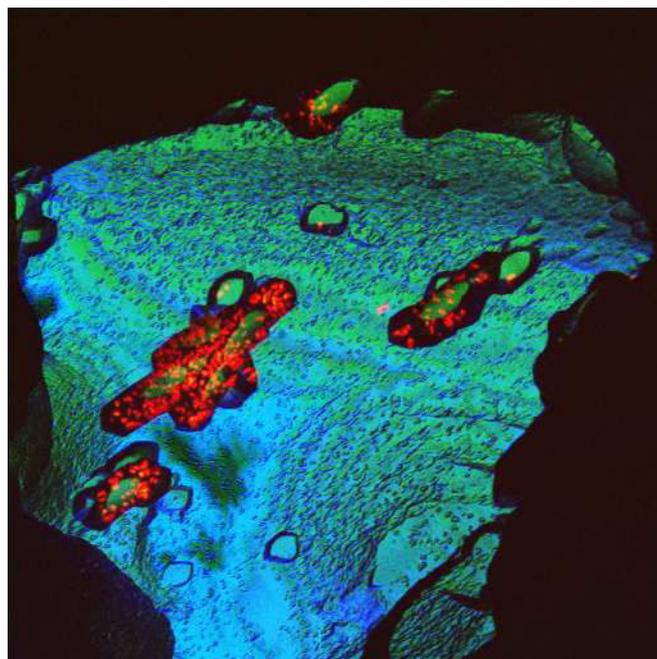
<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse
présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Spécialité Géosciences

par

Céline PISAPIA

Identification de biosignatures structurales, chimiques et isotopiques à
l'interface bactérie/minéral dans le système *Acidithiobacillus*
ferrooxidans/pyrite.



Soutenue publiquement le **11 juillet 2006** devant la commission d'examen :

D. Fortin	University of Ottawa, Canada, Rapporteur
P. Rouxhet	Université catholique de Louvain, Belgique, Rapporteur
L. Lemelle	LST, ENS Lyon, Examineur
B. Marty	CRPG, Nancy, Examineur
C. Mustin	LIMOS, Nancy, Examineur
M. Chaussidon	CRPG, Nancy, Directeur de Thèse
M. Viso	CNES, Paris, Invité

*A mes parents, Bagou, et à toutes les personnes
vivantes et disparues que le temps consacré à ce travail
a tenu (trop) éloignées de moi pendant ces quelques années...*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le président et membres du jury d'avoir bien voulu consacrer une part de leur temps précieux à juger ce travail et contribuer à le faire progresser.

Merci également au directeur, Bernard Marty, et directrice, Corinne Leyval, de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs et d'avoir permis l'aboutissement du projet.

Bien entendu, la plus grande part de mes remerciements va à mes deux « grands » directeurs de thèse, « chocho et cricri », aussi bien par la taille que par la qualité des discussions et conseils prodigués. Il est parfois difficile de confronter des personnalités distinctes dont la manière de travailler peut sembler radicalement différente mais c'est une telle richesse d'autre part, que je tiens à les remercier tous les deux conjointement de m'avoir permis d'évoluer dans ce cadre.

Plus personnellement ensuite, tout d'abord Christian Mustin, qui m'a porté à bout de bras pendant ce travail. Tu m'as fait partager ton expérience de la géomicrobiologie, qui me semblait, je dois avouer, un peu obscure au départ et m'a permis d'ouvrir les yeux sur un monde différent, de raisonner à une autre échelle, de regarder, « avec des yeux de bactéries », ces cailloux qui constituaient au départ notre seul langage commun. Je n'oublierai pas non plus les longues et passionnantes discussions du soir (désolée Sylvie, tu connais ton mari !) et les innombrables tentatives de refaire le monde.

Et aussi, Marc Chaussidon, qui m'a proposé ce sujet un samedi week-end de 1^{er} mai, au détour d'un couloir, dernier jour de manip de DEA qui était à l'époque ce que je pensais être le dernier jour de ma vie nancéenne. A quoi tient parfois un choix de thèse ! Merci donc d'avoir pensé à moi pour ce sujet et de m'avoir aidé à faire ce choix qui n'était pas forcément évident sur le moment. Mais merci également pour toute la suite, ta vision toujours éclairée des résultats, la liberté de mouvement que tu m'as accordée, ta disponibilité malgré toutes les charges administratives, ta manière directe et efficace de recadrer les choses et de poser les « bonnes » questions aux bons moments quand à force de toujours fixer le même point on finit par en oublier l'essentiel. Merci également et surtout pour tes conseils en période de fin thèse et pour l'après-thèse.

Ces deux laboratoires liés à deux parties distinctes de ce travail et parfois tiraillés par les vieilles gueggerres biologistes/géologues, sont bien entendus également associés à deux « vies » différentes, deux environnements et anecdotes variées. Mais une dernière fois dans cette thèse je vais tenter d'associer biologistes et géologues dans un même paragraphe et but communs. Merci au personnel des deux labos, je risque d'oublier du monde mais le cœur y est : Valérie, Isabelle, Chanchan, Dom, Aurélie, Odile avec qui toute tâche administrative deviendrait presque un plaisir ; Jean-Marc (allez l'OM encore et toujours), Julien, Caroline, Bruno, Jean-Claude, Manu... Merci à vous tous de rendre la vie dans les labo plus facile. Merci au trio de la sonde Denis, Michel et surtout Claire, pour les nombreux appels au secours (même à 4h du mat, désolée encore) et réglages de la machine. Merci à Caroline, CFL pour le labo des stables, Denis, Gilbert et Hervé pour les analyses, et tous les permanents des laboratoires pour les discussions officielles ou non qui permettent d'avancer et d'éclairer certaines situations qui peuvent sembler confuses.

Merci également à toutes les personnes extérieures à ces laboratoires mais qui ont mis à disposition leur technique et savoir-faire pour compléter ce travail. Je pense à Bernard Humbert et Jérôme Grausem pour le Raman, Fabien Gaboriaud pour l'AFM, Benoît Roland pour l'XPS ou encore Alain Kholer pour le MEB.

Grand clin d'oeil aux fondateurs du club des petit(e)s et amateurs de paliers en tout genre : Titi, vive Maurice Garin ! (j'ai réussi à le citer dans ma thèse, tu notes l'effort !) et Tit'anne, merci pour les nombreux pétages de plombs indispensables pour décompresser, remontage de moral dans les moments difficiles et autres vadrouillages dans la réserve de pal de la fac !!

Merci enfin et surtout à tous les étudiants croisés lors de ces années, quand on est dans la même galère, les liens viennent naturellement : Bilou (oh la belle sautée !), Sophie, Carole, Gégé, Yves (allez chocho ! et non ma thèse ce n'est pas que de la poésie... quoique !!!), Matthieu, Reika, Nico, Marie-Paule, Fabien, Laure S., Laure M., Agnès, Elsa, Stéphane (on attend toujours le speech en ricain accent marseillais !!), Pierrot (alors c'est quoi le prénom du deuxième ?), Manu, Popo (ouaiiiiiiii, trop bon !! et super merci pour les corrections), Zaz (une partie de bowling ?), Babou, Emile, Sandrine, Erwan, Jeanne B, Judi, Ouafae, Jeanne P, Paul-Olivier, Pierre M (non on n'oublie pas toujours les gOcadiens), Asfwa, Magalie, Antoine, les géoliens : Fred, pH, Choupi, Papy, Marie, Alice, πμ, RV où que vous soyez, Dubaï, Mars, en haut du Mont Blanc ou Houston... et tous les autres, la liste est encore longue.

Je préfère m'attarder un peu plus sur quelques personnes particulières pour qui et sur qui je pourrais écrire des heures. Je me contenterais de quelques lignes mais vous savez tous combien vous comptez pour moi :

Fred, mon frère, même si tu n'es plus ici, ma vie nancéenne restera longtemps encore associée à nos délires communs. Je me doute que tenir une thèse dans tes mains doit réveiller de douloureux souvenirs en toi, mais une étoile marseillaise de plus brille au-dessus de la route des crêtes et se joint à moi je suis sûre pour te souhaiter tout le bonheur du monde. **pH**, l'ACA est si triste sans toi, « collègue » et ami, vrai marseillais de cœur, on a parcouru un bon bout de chemin ensemble et que ce soit à nancy, cadarache ou dans les virages... qu'il soit long encore ce chemin... **RV**, putain Figuerolles e chantiers de la Ciutat! la vie est là, tout est dit là-haut. **Nico**, oui la vie est belle malgré tout, et y'a rien de mieux qu'une petite soirée entre amis autour de sirop de sapin en écoutant les amis d'ta femme pour se le rappeler... enfin et surtout **Marie-Paule**, ma ronchonchon préférée, dure au cœur tendre, encore une fois et pour le plus longtemps possible, allons nous asseoir sur le trottoir d'à côté, et même si les autres c'est tous des cons... on s'en fout !!! merci pour tout, merci de m'avoir soutenue, épaulée, remotivée, en particulier les derniers mois car sans toi, il est évident que je n'aurais pas pu aller au bout. Cette thèse t'est, bien sûr, également dédiée et du fond du cœur ! Merci pour tout ça et pour tout le reste. Sursum corda !

Je vous ai sûrement tous saoulés au cours de ces années avec Massilia, Raspi et autres groupes marseillais, tous plus chauvins les uns que les autres, mais une dernière fois, juste pour le plaisir : Marseille est la plus belle ville du monde !!!

« Actibus immensis urbs fulget Massiliensis »

Enfin et surtout, on sait tous que le temps perdu ne se rattrape pas, et même s'il est inutile de regarder en arrière, je ne peux conclure cette page sans m'excuser auprès de ma famille et amis à qui je n'ai pu consacrer suffisamment de temps, ni faire un dernier signe à toutes les personnes disparues au cours de ces années passées à Nancy, que la vie ne m'a pas laissé le loisir de voir et d'embrasser encore une fois.

Résumé

Les êtres unicellulaires tels que les bactéries ont développé, depuis 3 milliards d'années, des stratégies d'adaptation à de nombreux environnements très variés et parfois extrêmes. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bactérie chimiolithotrophe, présente ainsi une très forte dépendance trophique et énergétique vis-à-vis des minéraux sulfurés tels que la pyrite. Les caractéristiques de ce système en font d'ailleurs un bon analogue des associations être vivant/minéral de la Terre primitive. L'objectif de ce travail était ainsi de mieux comprendre les processus d'oxydation à l'interface *A.f.*/pyrite afin de déterminer des biosignatures « indirectes », non organiques et pérennes sur les surfaces minérales.

L'emploi de techniques variées et à résolution différente a permis de proposer un modèle d'oxydation de la pyrite par *A.f.* regroupant différents mécanismes bio-induits, distincts et concomitants. Ce modèle est basé sur l'efficacité et la portée des circulations électroniques au sein de la pyrite et sur l'impact de l'activité des bactéries adhérentes (mécanisme proximal) et en solution (mécanisme distal) sur ces transferts électroniques. Il explique notamment le développement de figures de corrosion géométriques, profondes et orientées et l'absence de passivation de la surface des minéraux caractéristiques de l'action des bactéries. Les produits de la bio-oxydation de la pyrite (oxyhydroxydes de fer, sulfates, polysulfures, thiosulfates et soufre élémentaire) sont organisés en bosses micrométriques mono-phasiques dans lesquelles prédominent : sulfates anhydres de symétrie C_{3v} , hématite ou akaganéite. La variabilité des $\delta^{18}O$ des produits de surface de la bio-oxydation de la pyrite est très importante (de $\approx -20\text{‰}$ à $\approx +25\text{‰}$). Elle traduit l'existence en surface du minéral d'environnements confinés, isolés du milieu réactionnel, au sein desquels se développent des mécanismes d'oxydation particuliers.

Malgré la « simplicité » de cette association, la réactivité non homogène des surfaces minérales ainsi que la complexité des processus bio-induits ou bio-contrôlés font apparaître une très importante hétérogénéité (morphologique, chimique et isotopique) de l'interface bactérie/minéral. L'identification d'une biosignature unique est alors rendue délicate. En revanche une clef de détermination pour la prospection de traces de vie sur des surfaces minérales est proposée. Elle met en évidence la nécessité de coupler des techniques et des échelles d'observations variées afin de faciliter la reconnaissance de multiples indices de vie.

Mots-clefs : Pyrite, *A.ferrooxidans*, biosignatures, produits d'oxydation de surface, SIMS, CLSM, Spectroscopie Raman.

Abstract

Bacteria have colonized since several milliard of years most of the terrestrial environments and especially the “extreme” ones. *Acidithiobacillus ferrooxidans* is thus well adapted to sulphidic acidic environments and the system *A.f./pyrite* may be considered as an analogue of pristine environments on earth or on other planets. The aim of this study was to refine our knowledge about the bio-oxidation process at the bacteria/mineral interface and to determine reliable and durable biosignatures of this system.

A new model of pyrite bio-oxidation has been proposed thanks to the joint use of several analytical techniques at different scales. It describes two different mechanisms related to electron transfers on the mineral lattice that are associated to a precise action of both adherent bacteria (“proximal” mechanism) and non-adherent bacteria (“distal” mechanism). It explains (i) the development of deep, geometric and oriented corrosion pittings at the surfaces of bio-oxidized pyrites and (ii) the absence of surface passivation. Bio-oxidation products are micrometric and monophased (anhydrous sulphates in a C_{3v} symmetry, hematite and akaganeite). Their oxygen isotopic composition are extremely variable (from $\approx -20\%$ to $\approx +25\%$) and result from specific surface mechanisms that occurred on confined environments that are isolated from the bulk reactional medium.

Even if this system might be considered as a quite simple one, a large surface heterogeneity is observed and results from the non homogeneous reactivity of the mineral surface and the variability and complexity of the bio-oxidation mechanisms at the pyrite surface. Consequently, there is not a unique biosignature of this system but a succession of clues that betray a biological activity at the mineral surface. These various signatures are identifiable only when using several and complementary techniques.

Keywords : Pyrite, *A. ferrooxidans*, biosignatures, surface oxidation products, SIMS, CLSM, Raman spectroscopy.

Sommaire

S
o
m
m
a
i
r
e

PARTIE I : LES AGENTS DU SYSTEME ET OXYDATION EN SOLUTION 12

1 LA BACTERIE DU SYSTEME : ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	12
1.1 CARACTERES GENERAUX	12
1.2 METABOLISME CELLULAIRE ET TRANSFERT D'ELECTRONS AU SEIN DE LA BACTERIE	13
1.3 SPECIFICITE VIS A VIS DES SULFURES	19
2 LE MINERAL DU SYSTEME ETUDIE : LA PYRITE	20
2.1 CRISTALLOCHIMIE	21
2.2 PROPRIETES ELECTROMAGNETIQUES DE LA PYRITE	22
2.3 MECANISMES D'OXYDATION CHIMIQUE DE LA PYRITE. (LOWSON, 1982)	23
2.3.1 Stabilité thermodynamique de la pyrite	23
2.3.2 Oxydation chimique de la pyrite	24
2.3.3 Oxydation électrochimique de la pyrite	25
2.3.4 Généralités sur la corrosion	27
3 LE SYSTEME ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS/PYRITE EN SOLUTION	29
3.1 MECANISME D'OXYDATION	29
3.2 OXYDATION DIRECTE <i>VERSUS</i> INDIRECTE	30
3.3 COMPOSITION ISOTOPIQUE DE LA SOLUTION	31
3.3.1 G	31
3.3.1.1 Les isotopes de l'oxygène et du soufre	31
3.3.1.2 Fractionnement isotopique	32
3.3.1.3 Processus de fractionnement isotopique	33
3.3.1.4 Les fractionnements biologiques	37
3.3.1.5 Les grands réservoirs terrestres d'oxygène et de soufre.	38
3.3.2 Composition isotopique (O,S) des sulfates issus de la (bio)oxydation de la pyrite.	42

PARTIE II : L'INTERFACE ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS/PYRITE 45

1 L'ADHESION BACTERIENNE : LA LIAISON SENSU STRICTO.	45
2 LA COUCHE D'OXYDATION.	47
2.1 NATURE DES COMPOSES DE SURFACE.	47
2.2 DISTRIBUTION SPATIALE DES COMPOSES DE SURFACE (TONIAZZO, 1998).	48
2.3 FORMATION D'OXYDES DE FER LORS DE LA BIO-OXYDATION DE LA PYRITE PAR A.F. A PH TRES ACIDE	50
3 LES FIGURES DE CORROSION	51
4 SYNTHESE SUR L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL	53

PARTIE III : BIOSIGNATURES ET TRACES DE VIE 56

1 LES BIOSIGNATURES INORGANIQUES	57
2 BIOSIGNATURES MOLECULAIRES	58
2.1 NATURE CHIMIQUE DE MOLECULES ORGANIQUES DANS LES ROCHES	58
2.2 HOMOCHIRALITE VS RACEMISATION.	59
2.3 COMPOSITION ISOTOPIQUE (HORITA, 2005)	60
2.4 TRACES DE NON-VIE OU LIMITES DE RESOLUTION DES INSTRUMENTS D'OBSERVATION ?	60
3 NOTRE SYSTEME EN TANT QUE BIOSIGNATURE - OU PLACER LA BIOSIGNATURE?	61

PARTIE I : PROTOCOLES D'OXYDATION **67**

1	TRAITEMENTS BIOLOGIQUES	67
1.1	LES BACTERIES	67
1.2	LE MINERAL	68
1.3	PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	69
2	TRAITEMENTS CHIMIQUES	72

PARTIE II : SUIVI DU SYSTEME IN VIVO **74**

1	L'OBSERVATION DU SYSTEME IN VIVO : MICROSCOPIES OPTIQUES ET CLSM	74
1.1	MICROSCOPIES OPTIQUES	74
1.2	MICROSCOPIE CONFOCALE A BALAYAGE LASER : CLSM	74
1.2.1	Principe et acquisition d'images	74
1.2.2	Traitement des données	79
2	COMPOSITION CHIMIQUE DE LA SOLUTION : ICP-AES	82
3	COMPOSITION ISOTOPIQUE DE LA SOLUTION	82
3.1	$\delta^{18}\text{O}_{\text{EAU}}$	82
3.2	$\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$ DES SULFATES EN SOLUTION	82

PARTIE III : LES ANALYSES DE SURFACE **84**

1	APPROCHE METHODOLOGIQUE DE L'ANALYSE DE SURFACE DES ECHANTILLONS	84
1.1	METHODOLOGIE	84
1.2	PREPARATION DES ECHANTILLONS	84
2	MORPHOLOGIE DE L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL : MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE, AFM	85
3	COMPOSITION CHIMIQUE DE L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL	87
3.1	SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES : IR ET RAMAN.	88
3.1.1	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier : FTIR	88
3.1.2	Spectroscopie Raman	89
3.2	CARACTERISATIONS <i>POST-MORTEM</i> SOUS VIDE DES SURFACES DE PYRITE	92
3.2.1	Microscopie Electronique à Balayage : MEB	92
3.2.2	Spectroscopie de Photoélectrons X : XPS	93
4	ISOTOPIE DE L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL : SPECTROMETRIE DE MASSE D'IONS SECONDAIRES, SIMS	95
4.1	PRINCIPE DE LA SONDE IONIQUE	96
4.2	FRACTIONNEMENT DE MASSE	104
4.3	PROFILS EN PROFONDEUR	105
4.4	IMAGERIE ISOTOPIQUE	110

<u>PARTIE I : CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION</u>		117
1	NATURE CHIMIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION	117
1.1	IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX PRODUITS D'OXYDATION EN SURFACE DE LA PYRITE.	117
1.2	LES SULFATES DE SURFACE.	118
1.3	LES OXY-HYDROXYDES DE FER	126
1.4	AUTRES COMPOSES SOUFRES	129
2	DIVERSITE CHIMIQUE ET SPATIALE INTER- ET INTRA-GRAIN	131
<u>PARTIE II : INFLUENCE DES FACES MINERALES SUR LA NATURE CHIMIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION FORMES</u>		136
1	METHODE D'ESTIMATION DES FACES OU ORIENTATIONS CRISTALLINES LOCALES	136
2	INFLUENCE DU FACIES CRISTALLOCHIMIQUE SUR LES PROCESSUS LOCAUX D'OXYDATION DE LA PYRITE	141
2.1	FACIES CRISTALLOCHIMIQUES IDENTIFIES	141
2.2	REPARTITION DES COMPOSES DE SURFACE	142
2.3	FACIES CHIMIQUES/MINERALOGIQUES CARACTERISTIQUES	143
<u>PARTIE III : INFLUENCE DE L'AGENT OXYDANT SUR LA NATURE DES PRODUITS D'OXYDATION</u>		149
1	CARACTERISATION SEMI-QUANTITATIVE DES ASSOCIATIONS DE PRODUITS D'OXYDATION EN SURFACE DE PYRITES.	150
2	OXYDATION DE LA PYRITE PAR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	151
3	OXYDATION ABIOTIQUE AQUEUSE	152
4	OXYDATION A L'AIR	154
5	TYPES DE SULFATES EN FONCTION DU TRAITEMENT	156
6	NATURE DES OXYDES DE FER FORMES	157
7	INFLUENCE COMBINEE TRAITEMENT/GROUPE CRISTALLIN	159
8	SYNTHESE : VARIABILITE LIEE AU TRAITEMENT ?	162
<u>PARTIE IV : SYNTHESE SUR LES MECANISMES D'OXYDATION DE SURFACE</u>		165
1	TRANSFERT D'ELECTRONS AU SEIN DU MINERAL	165
2	FORMATION DES COMPOSES	168
2.1	DISSOLUTION DE LA PYRITE : FORMATION SOUFRE	168
2.2	PROCESSUS ELECTROCHIMIQUE	168
2.3	OXYDES DE FER	174
2.3.1	Formation des oxydes de fer en solution acide	174
2.3.2	Production bactérienne d'oxydes de fer	176
2.3.3	Production abiotique d'oxydes de fer	179
3	SCHEMA D'OXYDATION DE LA PYRITE	180
<u>PARTIE V: BIOSIGNATURE CHIMIQUE ?</u>		182

PARTIE I : OBSERVATION *IN VIVO* DU SYSTEME **188**

1 OXYDATION ABIOTIQUE	188
1.1 MORPHOLOGIE DE LA SURFACE MINERALE	188
1.1.1 Oxydations abiotiques en solution	188
1.1.2 « Témoins » d'oxydation à l'air libre.	190
1.2 MISE EN EVIDENCE D'UNE PASSIVATION DE SURFACE	191
2 OXYDATION PAR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	193
2.1 MORPHOLOGIE DE LA SURFACE DE PYRITES BIO-CORRODEES.	193
2.1.1 Les figures de corrosion	193
2.1.2 Lien entre les figures de corrosion et les faces cristallines du minéral.	194
2.2 ADHESION BACTERIENNE	197
2.2.1 Paramètres descriptifs d'une surface de pyrite en cours de bio-oxydation	198
2.2.2 Estimation des taux de recouvrements	200
2.2.3 Sites d'adhésion de surface	209
2.3 ADHESION BACTERIENNE/FIGURES DE CORROSION	210
2.3.1 Recouvrement bactérien des figures de corrosion	210
2.3.2 Localisation des bactéries dans les figures de corrosion et circulation d'électrons	213
2.3.3 Isothermes d'adsorption	217

PARTIE II : MODELISATION ET ANALYSE GEOSTATISTIQUE DES SURFACES DE PYRITES CORRODEES **221**

1 PRINCIPE DES VARIOGRAMMES 2D	221
2 ANALYSE GEOSTATISTIQUE DE GRAINS BIO-OXYDES	223
3 MODELISATION 3D DE LA SURFACE DE PYRITE EN COURS DE BIO-OXYDATION : RESULTATS DE CARBONNE ET AL (2005).	228

PARTIE III : SYNTHESE SUR LE MECANISME DE BIO-CORROSION DE LA PYRITE PAR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS **230**

PARTIE IV : BIOSIGNATURE MORPHOLOGIQUE ? **234**

PARTIE I : COMPOSITION CHIMIQUE ET ISOTOPIQUE DES LIXIVIATS 240

1	SUIVI DE LA CHIMIE DES LIXIVIATS LORS DE L'OXYDATION DE LA PYRITE	240
2	DISSOLUTION INCONGRUENTE DE LA PYRITE	244
3	COMPOSITION ISOTOPIQUE DU MILIEU REACTIONNEL	246
3.1	COMPOSITION ISOTOPIQUE DES MOLECULES D'EAU	246
3.2	COMPOSITION ISOTOPIQUE DES SULFATES DISSOUS	248

PARTIE II : COMPOSITION ISOTOPIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION EN SURFACE DE PYRITES OXYDEES 252

1	FRACTIONNEMENT DE MASSE INSTRUMENTAL	252
2	CONTAMINATION BACTERIENNE ?	253
3	IMAGES ISOTOPIQUES : HETEROGENEITE DE SURFACE INTRA-GRAINS	254
4	PROFILS EN PROFONDEUR : MISE EN EVIDENCE D'UNE HETEROGENEITE DE SURFACE INTRA-GRAINS ET INTER-GRAINS	257
4.1	INFLUENCE DES ORIENTATIONS CRISTALLOCHIMIQUES SUR LES $\delta^{18}\text{O}$ DE SURFACE.	257
4.2	MORPHOLOGIE DE LA SURFACE ANALYSEE : MISE EN EVIDENCE DE TUNNELS DE CORROSION	259
4.3	SIGNATURE ISOTOPIQUE « BIOLOGIQUE » DES PRODUITS D'OXYDATION DE SURFACE ?	261

PARTIE III : MANUSCRIT SOUMIS A GCA 264**PARTIE IV : SYNTHÈSE SUR LES MÉCANISMES D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*** 305

1	MÉCANISMES PROXIMAUX ET DISTAUX	305
2	PROCESSUS D'OXYDATION DE SURFACE	307

PARTIE V : BIOSIGNATURE ISOTOPIQUE ? 311

1	MECANISMES D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	316
1.1	CONTROLE BIOLOGIQUE DE L'OXYDATION	316
1.2	CONTROLE MINERALOGIQUE	317
1.3	MODELE D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR <i>A.F.</i>	319
1.4	TRANSPOSITION A D'AUTRES SYSTEMES.	323
2	BIOSIGNATURE DE L'OXYDATION DE LA PYRITE PAR A.F. OU INDICES DE VIE ?	326
3	COUPLAGE D'ECHELLE ET METHODOLOGIE	328
4	LIMITES DE L'ETUDE	329

CONCLUSION GENERALE	333
----------------------------	------------

Références Bibliographiques	339
------------------------------------	------------

Annexes	355
----------------	------------

Liste des Figures Tableaux et Abréviations

**I
l
l
u
s
t
r
a
t
i
o
n
s**

Liste des Figures

CHAPITRE 1

Figure C1. 1 : Membrane tripartite d'une bactérie Gram négative de type *Acidithiobacillus ferrooxidans* (d'après Campbell, 1995)

Figure C1. 2 : Métabolisme d'une bactérie autotrophe acidophile : *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Figure C1. 3 : Flux de protons dans une cellule microbienne au niveau de la membrane interne mitochondriale.

Figure C1. 4 : transfert des électrons au sein de *Af* (d'après Nunzi, 1993)

Figure C1. 5 : Potentiel redox des principales protéines impliquées dans la chaîne respiratoire de *A.f.*

Figure C1. 6 : Modèles des chaînes respiratoires de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (modifié d'après Nunzi, 1993)

Figure C1. 7: Paramètres de maille du système cubique et maille élémentaire du cube de pyrite.

Figure C1. 8 : Diagramme Eh-pH du système Fe-S-O-H pour $[Fe] = 10^{-6}$ et $[S] = 10^{-3}$ (Mustin, 1992; Toniazzo, 1998)

Figure C1. 9 : Les deux voies oxydantes des sulfures de fer.

Figure C1. 10 : Schéma général du processus de corrosion électrochimique d'une surface de pyrite.

Figure C1. 11 : Les différents mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* (modifié d'après Crundwell, 2003) . (a) mécanisme indirect; (b) mécanisme indirect avec contact ; (c) le mécanisme direct avec contact.

Figure C1. 12 : Extrait de la carte des nucléides modifié d'après Vidal (1998) : répartition des différents isotopes stables ou radioactifs (en grisés) pour chaque élément en fonction du nombre de neutrons (N) et de protons (Z) de l'atome.

Figure C1. 13 : Facteur de fractionnement à l'équilibre pour les isotopes de l'oxygène entre des sulfates dissous et des molécules d'eau (d'après Mizutani & Rafter, 1969)

Figure C1. 14 : Distillation de Rayleigh des isotopes de l'oxygène au cours d'un phénomène d'évaporation d'un réservoir fini d'eau liquide de $\delta^{18}O$ initial à -10‰.

Figure C1. 15 : Phénomène de distillation de Rayleigh sur les isotopes de l'oxygène entre différents réservoirs d'eau au cours des cycles de condensation/vaporisation.

Figure C1. 16 : Cycle de l'oxygène libre couplé au cycle du CO_2 et H_2O .

Figure C1. 17 : Composition isotopique en oxygène $\delta^{18}O$ de différents compartiments terrestres et marins (modified from Clark and Fritz, 1997).

Figure C1. 18 : Cycle majeur du soufre sur Terre associé aux différents grands réservoirs. Les valeurs sont données en millions de tonnes.

Figure C1. 19 : Composition isotopique en soufre $\delta^{34}\text{S}$ de différents compartiments (d'après Thode in Krouse & Grinenko,).

Figure C1. 20 : Composition isotopique de molécules de sulfates dans divers compartiments terrestres en soufre ($\delta^{34}\text{S}$) et oxygène ($\delta^{18}\text{O}$).

Figure C1. 21 : Liaison entre le $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$ et le $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ (d'après Van Everdingen and Krouse, 1985)

Figure C1. 22 : Schéma des interactions bactéries/minéral en surface du minéral. Notions de sites d'adhésion, d'activité et d'oxydation (d'après Méline, 1995 ; Mustin, 1992).

Figure C1. 23 : Hétérogénéité de distribution des composés de surface d'une pyrite oxydée (d'après Toniazzo, 1998)

Figure C1. 24 : Modèle de formation d'oxydes de fer lors de la bio-oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (d'après Blight et al, 2000)

Figure C1. 25 : Figures de corrosion couramment décrites sur des grains de pyrite bio-corrodés (images supérieures) ou après attaque chimique (images inférieures).

Figure C1. 26 : Première phase de l'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* d'après le modèle de Toniazzo (1998)

Figure C1. 27 : Deuxième phase de l'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* d'après le modèle de Toniazzo (1998)

Figure C1. 28 : Exemple d'hopanoïde, molécule caractéristiques constitutive des membranes bactériennes (d'après Deniau, 2002)

Figure C1. 29 : Enantiomères et homochiralité (d'après le GDR DSBC).

Figure C1. 30 : Environnement de la Terre primitive (d'après Lowe, 1994)

CHAPITRE 2

Figure C2. 1 : Approche expérimentale et schéma d'étude du système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite

Figure C2. 2 : Protocole expérimental : Oxydation en fermenteur.

Figure C2. 3 : Dispositifs de bio-oxydation en réacteur

Figure C2. 4 : Principe de la microscopie confocale

Figure C2. 5 : Dispositif confocal à balayage laser employé dans cette étude avec platine motorisée à microplaques

Figure C2. 6 : Influence de l'ajout de Sulforhodamine B sur la croissance de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. g_0 et g désignent les temps de génération en absence et présence de SRB. CE désigne la concentration de SRB utilisée expérimentalement et CMI la concentration minimale d'inhibition.

Figure C2. 7 : Définition de ROIs, seuillage, co-localisation et création de masques (images binaires) à partir d'une image confocal pour traitement statistique.

Figure C2. 8 : Schéma fonctionnel d'un élémentaire 3000

Figure C2. 9 : Principe de la Microscopie à Force Atomique

Figure C2. 10 : Image AFM en mode contact d'une surface d'anhydrite après impact du faisceau de sonde ionique. Le profil AB (coupe en Z) donne une estimation de la topographie et de la profondeur de l'impact.

Figure C2. 11 : Image AFM en mode contact d'une surface de pyrite après analyse à la sonde ionique et coupe en Z (profil AB) au centre de la zone d'impact du faisceau de sonde ionique.

Figure C2. 12 : Principe d'un spectromètre Infra-Rouge à Transformée de Fourier

Figure C2. 13 : Diffusion Rayleigh et Raman

Figure C2. 14 : Spectre Raman d'une pyrite nettoyée faisant apparaître les principaux modes de vibration du doublet S-S²⁻ : Ag, Eg et Tg₃.

Figure C2. 15 : Schéma de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage.

Figure C2. 16 : Emission d'un photoélectron en XPS

Figure C2. 17 : Exemple de spectres XPS réalisé sur une cassure fraîche de pyrite (d'après Eggleston, 1996). Le détail des orbitales S2p_{3/2} et Fe 2p_{3/2} est donné à partir du spectre de balayage général en énergie. Les pointillés indiquent les pics de décomposition du signal global de l'orbital.

Figure C2. 18 : Schéma d'une sonde ionique Caméca 1270 (documents Caméca).

Figure C2. 19 : Ionisation des éléments (d'après Storms et al, 1977) (documents Caméca).

Figure C2. 20 : Source Césium d'une sonde ionique Caméca 1270 (documents Caméca).

Figure C2. 21 : Accumulation de charges positives à la surface de l'échantillon (documents Caméca).

Figure C2. 22 : Principe du bombardement ionique (documents Caméca).

Figure C2. 23 : Spectromètre de masse (documents Caméca).

Figure C2. 24 : Secteur électrostatique de la sonde ionique Caméca 1270 (documents Caméca).

Figure C2. 25 : Secteur magnétique de la sonde ionique Caméca 1270 (documents Caméca).

Figure C2. 26 : Schéma d'un multiplicateur d'électrons (d'après un document Cameca).

Figure C2. 27 : Pulse Height Analyser

Figure C2. 28 : Gamme de fractionnement instrumental (Δ_{inst}) couramment rencontré en fonction de l'élément étudié (masse de l'isotope léger) (d'après Rollion-Bard, 2001).

Figure C2. 29 : Fractionnement instrumental mesuré pour les isotopes de l'oxygène, au cours d'une même session d'analyse, dans une matrice de quartz et de magnétite (d'après Rollion-Bard, 2001).

Figure C2. 30 : Etalonnage de la vitesse de décapage par un faisceau de sonde ($\Delta E = 10\mu\text{m}$, balayage $50 \times 50\mu\text{m}$) de surfaces minérales polies de sulfate et de pyrite en fonction de l'intensité primaire du faisceau ionique.

Figure C2. 31 : Profil d'intensité de l'oxygène et détermination du $\delta^{18}\text{O}$ de composés de surface sur une pyrite bio-oxydée lors d'un profil en profondeur réalisé à la sonde ionique 1270.

Figure C2. 32 : Fractionnements instrumentaux (Dinst) déterminés sur deux sulfates polis de matrice similaires (anhydrite) en début de session d'analyse. La reproductibilité des mesures est de $\pm 0.30\%$ et les Dinst sont identiques (dans les barres d'erreur).

Figure C2. 33 : Fractionnements instrumentaux (Dinst) déterminés une anhydrite non polie montée sur la même feuille d'indium que les échantillons de pyrite à analyser au cours de deux sessions d'analyse distinctes.

Figure C2. 34 : Principe du balayage aller-retour pour la reconstruction d'images isotopiques

Figure C2. 35 : Evolution au cours d'une session d'imagerie du Dinst pour l'oxygène sur des grains d'anhydrite.

CHAPITRE 3

Figure C3. 1 : Sites et zones réactionnels en surface du minéral.

Figure C3. 2 : Spectres Infra-Rouge des poudres de pyrites K obtenues à partir de grains de granulométrie $160\text{-}250\mu\text{m}$ oxydés selon différentes voies (aqueuse ou à l'air libre).

Figure C3. 3 : Spectre Raman caractéristique d'un sulfate de solution en configuration « parapluie » (Td) précipité sur une surface de pyrite. Les vibrations du doublet S-S₂⁻ de la pyrite sont identifiés par Ag, Eg et Tg₃.

Figure C3. 4 : Déplacement des vibrations d'élongation ν_1 de la liaison S-O d'une molécule de sulfate et spectres caractéristiques de trois types de sulfates.

Figure C3. 5 : Signature Raman et conformation moléculaire des 4 types de sulfates rencontrés sur les surfaces de pyrite K oxydée.

Figure C3. 6 : Spectres XPS d'un grain de pyrite K biooxydée 60 jours ($53\text{-}80\mu\text{m}$). Orbitales du carbone, oxygène, soufre et fer. Mise en évidence de produits d'oxydation de la pyrite.

Figure C3. 7 : Organisation de sulfates ferreux et ferriques en surface de pyrite d'après les spectres XPS.

Figure C3. 8 : Signature Raman, de référence ou en surface de pyrites K oxydées, des quatre types d'oxydes de fer rencontrés

Figure C3. 9 : Nature (a) et associations (b) des oxydes rencontrés dans les spectres Raman de pyrite oxydées par différents agents.

Figure C3. 10 : Spectres Raman caractéristiques des trois types de composés soufrés rencontrés, en complément des sulfates, en surface de pyrite K oxydée ainsi que leurs déplacements Raman (en cm^{-1}) et énergies de liaison XPS (en eV) caractéristiques.

- Figure C3. 11 : Quelques exemples de spectres Raman (vierges, mono- ou polyphasiques) « typiques » obtenus sur des surfaces de pyrite K oxydée biotiquement ou abiotiquement.
- Figure C3. 12 : Spectres XPS des orbitales C(1s), O(1s), Fe(2p)_{3/2}, S(2p) sur deux grains de granulométrie 160-250µm oxydés à l'air libre.
- Figure C3. 13 : Grandeurs et orientations du système analysé : x,y,z les orientations cristallines de la pyrite et f,q,j les angles définis par les projections en (x,y) des champs électriques et dipôle induit avec l'axe x.
- Figure C3. 14 : Représentation des vecteurs normaux et directeurs des orientations cristallines utilisés pour le calcul théorique des rapports Ag/Eg et Ag/Eg45° des vibrations principales du doublet S-S₂- de la pyrite.
- Figure C3. 15 : Répartition du nombre de composés sur les groupes Ag/Eg - Ag/Eg45° déterminés par spectroscopie Raman sans distinction de leur nature chimique.
- Figure C3. 16 : Répartition sur chaque groupe de faces des associations de composés de surface déterminés par spectroscopie Raman.
- Figure C3. 17 : Spectres Raman caractéristiques de surfaces de pyrites K biooxydées.
- Figure C3. 18 : Diagramme triangulaire reflétant la composition chimique de la couche d'oxydation de surfaces de pyrites K biooxydées par Acidithiobacillus ferrooxidans.
- Figure C3. 19 : Spectres Raman caractéristiques des zones réactionnelles prépondérantes sur les surfaces de pyrite K lors d'oxydation abiotique aqueuse par des ions ferriques ou du peroxyde d'hydrogène.
- Figure C3. 20 : Diagramme triangulaire reflétant la composition chimique moyenne de la couche d'oxydation de surfaces de pyrites K oxydées abiotiquement en solution acide (nFer= 24; nH₂O₂= 26).
- Figure C3. 21 : Photographie en microscopie optique (x100) de la surface d'un grain de pyrite K naturelle oxydée à l'air libre.
- Figure C3. 22 : Spectres Raman caractéristiques de surface de pyrite K oxydée à l'air libre.
- Figure C3. 23 : Diagramme triangulaire reflétant la composition chimique de la couche d'oxydation de surfaces de pyrites K oxydées à l'air libre.
- Figure C3. 24 : Nature et association des oxydes rencontrés dans les spectres Raman de pyrite oxydées en fonction des agents oxydant.
- Figure C3. 25 : Récapitulatif des combinaisons de composés observés sur les différents groupes cristallins identifiés en fonction du traitement oxydant.
- Figure C3. 26 : Synthèse sur la répartition des composés de surface sur des grains de pyrite oxydés par voie biotique ou abiotique et comparés aux témoins naturels d'oxydation à l'air libre.
- Figure C3. 27 : Diagramme triangulaire présentant la répartition des composés majoritaires (polysulfures, oxydes de fer et sulfates ferreux et ferriques) identifiés par spectroscopie Raman en fonction des traitements oxydants.

Figure C3. 28 : Glissement des modes de vibration Ag et Eg observés sur des spectres Raman réalisés sur des surfaces de pyrites K oxydés par voies biotique ou abiotique.

Figure C3. 29 : Représentation schématique des processus d'oxydation en surface de pyrite (Herbert, 1999 d'après Moses et al., 1987 et Moses & Herman, 1991).

Figure C3. 30 : Formation supposée d'un sulfate de type II en surface de pyrite.

Figure C3. 31 : Liaison d'une molécule de sulfates en surface de goethite par l'intermédiaire de Pb adsorbé (d'après Ostergren et al., 2000).

Figure C3. 32 : Représentation schématique de la formation et transformations possibles des principaux oxydes de fer (modifié d'après Cornell et Swchertmann, 1996). Les espèces présentes dans les spectres Raman sont marquées en rouge.

Figure C3. 33 : Fluorescence en CLSM d'une solution contenant $8\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'Oregon Green 514 carboxylic acid à deux longueurs d'onde du laser d'excitation (Ar 514nm et Ar 457nm).

Figure C3. 34 : Coupe en Z d'une image réalisée par CLSM. La surface du minéral est marquée par la réflexion du laser et apparaît en rouge sur cette figure. Les marquages verts sont issus de l'Oregon Green molécule sensible au pH et répartie de manière homogène dans la solution. La fluorescence (zones vertes) indiquerait un pH plus élevé que celui en solution (1,8) dans laquelle aucune fluorescence apparaît.

Figure C3. 35 : Schéma de synthèse des processus de surface lors de la (bio)oxydation de la pyrite à partir des informations obtenues par spectroscopie Raman. Les agents oxydants sont indiqués en rouge.

Figure C3. 36 : Diagramme synthétisant la spécificité (prédominance de zones mono ou polyphasiques) et l'avancement (prédominance d'intermédiaires réactionnels ou de phases stables) des réactions d'oxydation de la pyrite en présence de différents agents oxydants. Le type de sulfate le plus caractéristique de chaque traitement est noté en rouge.

CHAPITRE 4

Figure C4. 1 : Images d'une surface de pyrite oxydée par traitement abiotique (Fe^{3+}) pendant 20 mois. (a) : photographie en microscopie optique (x200) ; (b) et (c) : images MEB du même grain.

Figure C4. 2 : Images d'une surface de pyrite oxydée par traitement abiotique H_2O_2 pendant 20 mois. (a) et (b) : photographie en microscopie optique (x200) ; (c), (d) et (e) : images MEB.

Figure C4. 3 : Images d'une surface de pyrite oxydée par traitement abiotique à l'air. (a) et (b) : photographie en microscopie optique (x200) ; (c) et (d) : photographies MEB du même grain.

Figure C4. 4 : Image (a) et cartographies MEB en oxygène (b), soufre (c) et fer (d) sur une surface de pyrite naturelle oxydée à l'air. Les barres d'échelle représentent $90\mu\text{m}$.

Figure C4. 5 : Image de la surface d'un grain de pyrite oxydée par des ions ferriques en solution par Microscopie Confocale à Balayage Laser. Des composés hydrophobes de surface sont marqués par la sulforhodamine B.

Figure C4. 6 : Images CLSM réalisées sur des surfaces de pyrite K de granulométrie 53-80 μm en contact avec des inocula de A.f.. Mise en évidence de figures de corrosion perforantes, géométriques et orientées.

Figure C4. 7 : Images MEB d'un grain de pyrite biooxydée en batch durant 26 mois (granulométrie 53-80 μm). Les parois de la figure de corrosion sont orientées de la même manière que les marches observées sur la surface du minéral initial.

Figure C4. 8 : Images MEB d'un grain de pyrite biooxydée en batch durant 26 mois (granulométrie 53-80 μm). Orientations cristallographiques et morphologies des figures de corrosion associées.

Figure C4. 9 : Identification possible de faces d'un grain de pyrite naturelle à partir de la morphologie des figures de corrosion qui s'y développent.

Figure C4. 10 : Schéma représentatif d'une image réalisée par Microscopie Confocale à Balayage Laser sur des grains minéraux mis en contact avec des bactéries.

Figure C4. 11 : Evolution du taux de recouvrement des surfaces minérales de grains de pyrite non corrodés et nettoyés en fonction de la concentration bactérienne initiale de l'inoculum. Le nombre de répétition par point est donné par $n=X$ pour chaque point. Un exemple d'image CLSM réalisée sur 3 grains (granulométrie 53-80 μm) pour un inoculum à 5.107 bactéries.mL⁻¹ est donné.

Figure C4. 12 : Images CLSM sur des surfaces de pyrite non corrodée non nettoyée en contact avec deux inocula bactérien différents et calcul du recouvrement bactérien de ces surfaces(moyenne \pm sd) en fonction de la concentration bactérienne initiale. Les données sont comparées à celles obtenus sur des pyrites non corrodées nettoyées pour des inocula bactériens initiaux identiques.

Figure C4. 13 : Images en microscopie optique et confocale à balayage laser d'un grain de pyrite non nettoyé mis en contact avec un inoculum bactérien à 5.107 bactéries.mL⁻¹. Des phases de surface bien cristallisées (composés d'oxydation de surface) sont identifiées et leur position sur les surfaces sont comparées à celles des bactéries adhérentes au minéral.

Figure C4. 14 : Images CLSM et évolution du taux de recouvrement des surfaces minérales de grains de pyrite préalablement bio-corrodés (moyenne \pm sd) en fonction de la concentration bactérienne initiale en solution. Le nombre de répétition par point est donné par $n=X$. Les données de recouvrement sur des grains de pyrite non corrodés sont rappelés pour comparaison.

Figure C4. 15 : Forme théorique générale d'une figure de corrosion : obélisque à base hexagonale irrégulière. a, b, c : grandeurs mesurées expérimentalement et permettant d'estimer l'augmentation de surface minérale exprimée par corrosion et de volume de matériel arraché.

Figure C4. 16 : Observations CLSM de grains de pyrite de granulométrie 52-80 μm en présence d'inocula de A.f. de concentrations bactériennes différentes.

Figure C4. 17 : Taux de recouvrement θ_1 des figures de corrosion des grains de pyrite par les bactéries (moyenne \pm sd) en fonction de la concentration bactérienne initiale et degré moyen de corrosion du minéral (SS1/S).

Figure C4. 18 : Proportion de bactéries adhérentes dans les figures de corrosion (moyenne \pm sd) par rapport au nombre total de bactéries adhérentes en fonction de la concentration de l'inoculum bactérien.

Figure C4. 19 : Corrélation entre le nombre de bactéries adhérentes dans les figures de corrosion et la taille de ces figures de corrosion (μm^2) pour toutes les points d'observation.

Figure C4. 20 : Localisation des bactéries au sein d'une figure de corrosion. Section verticale (XZ).

Figure C4. 21 : Coupe en Z au niveau de figures de corrosion en surface de grains préalablement bio-oxydés mis en contact avec des inocula de concentration bactérienne différente. B/S : rapport des intensités de fluorescence bactérienne sur celle de réflexion du minéral.

Figure C4. 22 : Schéma de la double circulation d'électrons supposée dans la pyrite et sites potentiels d'adhésion bactérienne.

Figure C4. 23 : Tracé caractéristique de variogramme à partir d'une image CLSM réalisée sur une surface de pyrite.

Figure C4. 24 : Directions d'analyse des images CLSM par variogrammes dans 4 directions de l'espace 2D : 0°, 90°, 45°, -45°

Figure C4. 25 : Diagrammes polaires de la surface d'un grain de pyrite bio-oxydé pour (a) la surface totale du grain, (b) sur une zone sans figure de corrosion (rugosité de surface), (c) un ensemble de « petites » figures de corrosion et (d) un ensemble de « grandes » figures de corrosion. Une graduation correspond à 1µm.

Figure C4. 26 : Variogramme d'un grain imagé par CLSM.

Figure C4. 27 : Variogramme réalisés dans la direction 45° sur les intensités de réflexion du minéral et de fluorescence des bactéries dans le voisinage d'une figure de corrosion.

Figure C4. 28 : Reconstruction 3D d'une surface de pyrite en cours de bio-oxydation par le logiciel gOcad à partir d'images tomographiques obtenues par réflexion laser (d'après Carbonne et al., 2005)

Figure C4. 29 : Modèle du déroulement de la biocorrosion d'une pyrite en présence de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

t_0 : Etat initial de surface ;

t_1 : Initiation du phénomène de corrosion. Adhésion des bactéries dans les zones anodiques du minéral, marquant des futures cathodes locales ;

t_2 : Instauration du mécanisme distal. Apparition des figures de surface et premiers produits d'oxydation de surface ;

t : Développement des figures de corrosion en profondeur. Le système est auto-entretenu par les bactéries adhérentes. Couplage des mécanismes proximaux et distaux. Absence de passivation de la surface.

Figure C4. 30 : Critères de différenciation de signatures morphologiques d'altération biotique et abiotique sur des surfaces de pyrite.

CHAPITRE 5

Figure C5. 1 : Suivi des paramètres physico-chimiques lors d'une culture de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur sulfate ferreux

Figure C5. 2 : Suivi des paramètres physico-chimiques lors d'une culture de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur pyrite (Ferm0)

Figure C5. 3 : Suivi des paramètres bio-physico-chimiques lors de deux cultures de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur pyrite K (Ferm1 et Ferm2).

Figure C5. 4 : Suivi des éléments solubilisés lors de l'oxydation de la pyrite K par *Acidithiobacillus ferrooxidans* pour les expériences Ferm1 et Ferm2.

Figure C5. 5 : Pourcentage massique total d'oxydation de la pyrite au cours d'un cycle de biolixiviation par *Acidithiobacillus ferrooxidans*, dans les fermenteurs 1 et 2, calculé d'après les analyses ICP-AES des éléments (Fe, S) solubilisés à partir d'une pulpe de pyrite à 20g.L-1.

Figure C5. 6 : Evolution du taux d'oxydation au cours de la biolixiviation. La ligne horizontale en pointillés marque le rapport théorique de 2, constant au cours du temps, de la pyrite.

Figure C5. 7 : Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ des molécules d'eau lors de deux expériences de biolixiviation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* en fermenteur (moyenne \pm erreur standard).

Figure C5. 8 : Evolution du $t_{1/2}$ d'échange (en heures) d'un atome d'oxygène entre un sulfate dissous et une molécule d'eau en fonction du pH, pour une température de 30°C, d'après les données de Lloyd (1968).

Figure C5. 9 : Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ et du $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates totaux et dissous mesurés au cours du temps pour Ferm1 (moyenne \pm sd).

Figure C5. 10 : Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ des sulfates totaux et dissous mesurés au cours du temps pour Ferm2 (moyenne \pm sd).

Figure C5. 11 : Fractionnement de masse instrumentaux sur des oxydes et sulfates en conditions d'analyse Faraday - Faraday.

Figure C5. 12 : Images en ims 1270 du ^{12}C et ^{16}O de surface d'un grain de pyrite biooxydée. Mise en évidence de « bosses » de surface riches en oxygène mais sans contribution carbonée associée. Ces phases observées sont minérales et ne peuvent être attribuées à des agrégats ou biofilms bactériens. Les ratios $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de ces phases d'oxydation de surface sont calculés.

Figure C5. 13 : Images isotopiques (^{16}O et ^{32}S) réalisées sur des surface de pyrites bio-oxydées et oxydées par des ions ferriques en milieu stérile.

Figure C5. 14 : $\delta^{18}\text{O}$ moyen des phases de surface de pyrite oxydées selon différents traitements pour plusieurs faces ou groupements de faces. Le nombre de groupes cristallographiques rencontrés est donné par n. Chaque boîte exprime les moyennes (barres horizontales), minima et maxima des valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ sur chaque groupement cristallin. Les barres verticales donnent la dispersion des données traitement par traitement.

Figure C5. 15 : Image par Microscopie à Force Atomique (AFM) réalisée sur une surface de pyrite après analyse à la sonde ionique. La zone de décapage du faisceau primaire de la sonde révèle des zones plus fragiles profondes de 1 μm non visibles avant analyses. Une coupe XZ est réalisée et indique la morphologie de ces « pseudo-racines », ainsi qu'une reconstitution de la surface par le geomodelleur gOcad.

Figure C5. 16 : Répartition des compositions isotopiques en oxygène des produits d'altération en surface de grains de pyrite en fonction de l'agent oxydant : biologique, ions ferriques, peroxyde d'hydrogène, témoins d'oxydation à l'air libre.

Figure C5. 17 : Schéma de formation de sulfates congruents traduisant l'influence des bactéries adhérentes au niveau des parois des figures de corrosion.

Figure C5. 18 : Schéma de formation de sulfates incongruents traduisant l'influence des bactéries non adhérentes.

Figure C5. 19 : Modèle de formation et de stabilisation d'un sulfate en surface de la pyrite par mécanisme distal.

Figure C5. 20 : Modèle de formation et de stabilisation d'un sulfate en surface de la pyrite en environnement confiné.

Figure C5. 21 : Modèle de formation et de stabilisation d'oxy-hydroxydes de fer en surface de la pyrite en environnement confiné.

CHAPITRE 6

Figure C6. 1 : Géométrie des figures de corrosion en fonction des faces cristallographiques de la pyrite.

Figure C6. 2 : Schéma de synthèse du mécanisme de bio-corrosion de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Figure C6. 3 : Figures de corrosion observées par CLSM sur des grains de pyrites K et Es après oxydation en batch de 19 mois par *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Figure C6. 4 : Figures de corrosion observées par CLSM sur des grains de pyrites K et Es après oxydation en batch de 19 mois par *Acidithiobacillus thiooxidans*. La flèche blanche indique le développement d'une figure de corrosion quasi-géométrique.

Figure C6. 5 : Observation CLSM d'un grain de pyrite K après oxydation en batch de 19 mois par *Acidithiobacillus thiooxidans*. Mise en évidence d'une passivation de surface par le marquage à la SRB (flèches blanches).

Figure C6. 6 : Clef de détermination de la présence de traces d'activités de A.f. sur une surface de pyrite. Le « chemin » rouge indique les associations d'indices à forte probabilité biotique.

Figure C6. 7 : Schéma d'étude d'un système bio-minéral.

Liste des Tableaux

CHAPITRE 1

Tableau C1. 1 : Classification des bactéries en fonction de leurs sources d'énergie et de carbone.

Tableau C1. 2 : *Acidithiobacillus ferrooxidans* et les sulfures. Principaux produits de lixiviation (Ox : oxydes, Ps : polysulfures, S8 : soufre élémentaire, SO₄²⁻ : sulfates).

Tableau C1. 3 : Constantes cinétiques des équations globales d'oxydation de la pyrite (d'après Nordstrom & Southam, 1997). Les réactions (i), (ii) et (iii) correspondent respectivement à l'oxydation de la pyrite par l'oxygène dissous, l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques et l'oxydation de la pyrite par les ions ferriques.

Tableau C1. 4 : Principaux rapports isotopiques des éléments légers utilisés ainsi que les standards internationaux de référence correspondant.

Tableau C1. 5 : Synthèse bibliographique des fractionnements biotiques et abiotiques lors de l'oxydation de la pyrite déterminés expérimentalement.

Tableau C1. 6 : Nature chimique et occurrence (en mol.g⁻¹ de minéral) des produits d'oxydation en surface de deux pyrites.

Tableau C1. 7 : Morphologies des principaux types de « bosses » formant la couche d'oxydation de surface de pyrites naturelles bio-oxydées (d'après Toniazzo, 1998).

CHAPITRE 2

Tableau C2. 1 : Composition des milieux de culture de *Acidithiobacillus ferrooxidans* et thiooxydants. Source élémentaires et énergétiques.

Tableau C2. 2 : Composition chimique des pyrites de l'étude (d'après Mustin, 1992)

Tableau C2. 3 : Caractéristiques des fluorochromes employés dans cette étude

Tableau C2. 4 : Morphologie de l'impact du faisceau de sonde sur une surface d'anhydrite et volume de matériel éjecté équivalent.

CHAPITRE 3

Tableau C3. 1 : Principaux produits d'oxydation identifiés par spectroscopie Raman et XPS sur des surfaces de pyrite bio- ou chimio-oxydée (Demoisson, 2006; Nesbitt and Muir, 1994; Nesbitt *et al.*, 1998)

Tableau C3. 2 : Déplacement de la vibration d'élongation (v₁) de sulfates en fonction de leur degré d'hydratation (d'après Chio *et al.*, 2005).

Tableau C3. 3 : Quatre grands types de sulfates de surface identifiés dans les spectres Raman réalisés sur des surfaces de pyrites K oxydées, pour tout type de traitement.

Tableau C3. 4 : Résultats de l'analyse XPS d'une zone de 50x50µm en surface d'un grain de pyrite biooxydée.

Tableau C3. 5 : Tableau récapitulatif des énergies de liaison observées par XPS sur les orbitales C(1s), O(1s), S(2p) et Fe(2p)_{3/2} sur deux grains de pyrite K naturelle. Les liaisons correspondantes sont données ainsi que les pourcentages de participation de ces énergies de liaison au pic total de l'orbitale ou du spectre complet.

Tableau C3. 6 : Caractéristiques Raman et détermination des faciès cristallographiques sur 121 des 131 grains de pyrite oxydée analysés.

Tableau C3. 7 : Récapitulatif des assemblages majeurs de produits d'oxydation en surface de pyrite en fonction des groupes cristallographiques identifiés.

Tableau C3. 8 : Répartition des types de sulfates rencontrés en spectroscopie Raman en fonction des groupes cristallins réalisés.

Tableau C3. 9 : Récapitulatif des faciès chimiques et réactivités majeurs déterminés sur les faciès cristallographiques A, B, E et F déterminés par spectroscopie Raman.

Tableau C3. 10 : Répartition des types de sulfates rencontrés en spectroscopie Raman en fonction des traitements appliqués (n représente le nombre de spectres).

Tableau C3. 11 : détail de l'expression des combinaisons de composés, en pourcentage, en fonction des différents traitements.

CHAPITRE 4

Tableau C4. 1: Récapitulatif des principaux paramètres descriptifs du système et de l'adhésion de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur des surfaces de pyrite.

Tableau C4. 2 : Estimation des taux de recouvrements de surfaces de pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* obtenus dans cette étude, et comparés aux données de la littérature.

Tableau C4. 3 : Recouvrements bactériens sur des surfaces de grains non corrodés (nettoyés ou non) et corrodés en fonction de la concentration bactérienne initiale. Le degré moyen de corrosion et le recouvrement des zones corrodées (θ_1) sont indiqués pour les grains corrodés.

Tableau C4. 4 : Calcul de la surface « réelle » développée par les parois des figures de corrosion du minéral en comparaison des surfaces basales des figures de corrosion de plusieurs images CLSM. Le volume des morphologies est également donné.

CHAPITRE 5

Tableau C5. 1 : Calcul de l'évolution du $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau du milieu réactionnel avec l'influence de l'eau de respiration. Le nombre de molécules d'eau formées par respiration est calculée en fonction du nombre de molécules de sulfates incongruents formées.

Tableau C5. 2 : $\delta^{18}\text{O}$ de produits d'oxydation de surface déterminés à partir d'images isotopiques par sonde ionique 1270.

Liste des Abréviations

AFM : Atomic Force Microscopy

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy

IR : Infra-Rouge

OG : Oregon Green

SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry

SRB : Sulforhodamine B

XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy

Introduction générale Orientation de l'étude

INTRODUCTION

« A la question de savoir pourquoi nous ne trouvons pas de riches dépôts fossilifères appartenant à ces périodes apparemment les plus reculées, antérieures au Cambrien, je ne peux donner de réponse satisfaisante. [...] Pour l'instant, il s'agit d'un fait inexplicable qui pourrait bien servir d'argument valable contre les vues défendues ici. »

(Darwin, *De l'origine des espèces*).

Introduction générale

Tout être vivant sur Terre dispose d'organes ou de moyens sensoriels lui permettant d'appréhender son environnement. Son comportement est conditionné par les stimuli qu'il reçoit et il agit en réponse à ceux-ci. La démarche scientifique répond aux mêmes critères. Elle débute bien souvent par une observation descriptive ou comparative d'un objet ou d'un phénomène, complétée par la suite par une série d'expériences en laboratoire visant à le reproduire ou le reconstituer, pour aboutir à un formalisme plus théorique dudit phénomène ou objet : le modèle.

Depuis la caractérisation d'objets macroscopiques facilement observables par l'œil humain, de nouvelles méthodes d'observation nous ont permis d'appréhender d'autres objets jusqu'alors invisibles pour des raisons d'éloignement ou de dimensions non accessibles aux techniques d'observation du moment. Mais ce développement de nouvelles technologies s'accompagne d'une évolution progressive de la conception que nous nous faisons de notre environnement. Il semble dit que le XXI^{ème} siècle sera celui des nanotechnologies, où pour atteindre l'infiniment lointain, on cherche à développer l'observation de l'infiniment petit.

Des mondes aussi différents qu'un agrégat bactérien ou une exoplanète nous sont maintenant accessibles à travers des techniques d'observation souvent similaires (ex : spectroscopies vibrationnelles). Certains « acteurs » du monde microscopique ont bénéficié de ces avancées technologiques dans le domaine de l'industrie bio-médicale. Ainsi, de nombreuses bactéries hétérotrophes pathogènes (bacille de Koch...) ou bénéfiques pour l'homme (*E.coli*...) ont été considérées comme des modèles d'étude à part entière, au détriment d'autres microorganismes dont l'utilité ou la pathogénicité n'étaient pas avérées. Cependant, depuis quelques années, de nouvelles voies de recherche se sont ouvertes sur l'étude du monde, peu exploré jusqu'alors, de microorganismes chimiolithotrophes qui tirent l'énergie indispensable à leur métabolisme de réactions d'oxydoréduction impliquant des éléments minéraux. Ils sont les témoins de ce lien chimique qui nous unit à l'environnement inorganique et des interactions que les règnes biologiques et minéraux s'efforcent d'établir depuis au moins 3 milliards d'années sur Terre. Ces interactions ont, au même titre que d'autres organismes étudiés jusqu'alors, des répercussions importantes sur la société humaine

que ce soit sur un plan économique (récupération de métaux et lixiviation de minerais connus depuis l'Antiquité), écologique (dépollution, bio-indicateurs) mais également plus fondamentale la notre quête de connaissance de nos origines ou pour l'Exobiologie. En effet, des bactéries autotrophes telles que *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A.f.*), tirant leur énergie de l'oxydation du fer et du soufre peuvent être considérées comme des analogues potentiels de première vie terrestre. La planète était alors un environnement riche en sulfures de fer et pauvre en matières organiques métabolisables. Ce n'est sans doute pas un hasard si les études concernant ce type d'êtres vivants se sont développées conjointement aux recherches d'exoplanètes et de la définition de critères d'habitabilité.

Ainsi, nous disposons aujourd'hui d'une batterie assez large de techniques plus performantes les unes que les autres, nous permettant d'atteindre un degré de précision et une échelle d'observation inédites. Un des défis majeur des recherches à venir sur de tels systèmes sera d'utiliser conjointement ces diverses techniques sur un même système d'étude bio-minéral pour mieux appréhender sa dynamique interne (fonctionnement et interactions).

C'est dans cet esprit que s'inscrit ce travail de thèse, qui bénéficie d'un vaste ensemble de connaissances héritées de descriptions précises du fonctionnement des compartiments minéraux et biologiques. Le but de ce projet est de mettre à profit diverses techniques pour la description d'un système « très simple » combinant une bactérie chimiolithotrophe et un minéral constituant une source d'énergie pour cette dernière. L'application première de ce travail est d'améliorer la description quantitative du système à l'échelle micrométrique et de déterminer l'origine et le déterminisme des processus biochimiques intervenant à la surface des minéraux. Ceci est mis en oeuvre à l'aide notamment de nouveaux outils : les microscopies et spectroscopies confocales non destructives et permettant une observation *in vivo* (Raman, fluorescence laser) ou la spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS). Un corollaire évident à ce travail fondamental est la recherche d'une technique prospective et robuste de traces de vie, non pas dans le but de déterminer une preuve unique de traces biologiques dans un environnement minéral mais de dégager un ensemble d'indices qui « signeraient » l'activité biologique par rapport aux processus purement abiotiques et identifiables en tant que tels.

Choix du système d'étude

Le système étudié dans ce travail est composé de deux agents : une bactérie autotrophe et un minéral sulfuré. Le choix s'est porté sur le couple *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite tant pour des raisons de propriétés intrinsèques des deux parties que pour l'intérêt de l'association qu'elles forment. Cette association bactérie/minéral a été largement étudiée depuis quelques années pour son implication environnementale, notamment dans les phénomènes de drainages miniers acides et des pollutions en métaux lourds associées. Elle est également de plus en plus considérée comme un système modèle pour les recherches sur les origines de la vie sur Terre ou dans l'Univers. En effet, le règne des Monères (du grec *monêrês* « simple » en allusion à la nature unicellulaire de la majorité des Procaryotes) domine la biosphère terrestre et dépasse tous les eucaryotes réunis, que ce soit en terme de nombre d'individus ou de niches écologiques colonisées. Mais malgré leur omniprésence, leur existence n'est pas remarquable au premier coup d'œil. Cependant, comme tout être vivant sur Terre, ils modifient, par leur activité, leur proche environnement. C'est la recherche de ces transformations « environnementales » à l'interface bactérie/minéral qui a guidé ce travail.

- **Intérêt de la bactérie** : *Acidithiobacillus ferrooxidans* est une bactérie chimiolithotrophe, un être vivant constitué du premier niveau capable de vie, à savoir une seule cellule. Elle ne requiert que du CO₂ comme source de carbone pour sa synthèse moléculaire et tire l'énergie nécessaire à son métabolisme de réactions d'oxydoréduction impliquant des phases minérales.

Cette bactérie n'a besoin que d'un minimum d'éléments pour vivre : substrats élémentaires nécessaires à l'élaboration des composants cellulaires (sels minéraux, CO₂, NH₄⁺) et substrats énergétiques (soufre et fer à l'état réduit). Ceci fait d'elle une bactérie facile à cultiver et à manipuler en laboratoire lors d'expérimentations, même si son temps de génération est relativement lent ($\tau = 30-40h$). *A. f.* adhère facilement sur les surfaces de pyrite favorisant ainsi le transfert d'électrons du minéral semi-conducteur vers l'oxygène dissous via sa chaîne respiratoire. De plus, elle ne retire que peu d'énergie lors de l'oxydation de minéraux sulfurés et est, par conséquent, contrainte de fortement transformer le minéral pour satisfaire ses besoins énergétiques.

Ces transformations drastiques laissent inmanquablement des traces à la surface du minéral, traces qui constituent l'objet principal de cette étude.

- **Intérêt du minéral** : En raison de l'orientation des doublets de soufre, la pyrite FeS_2 possède une hémédrie cubique (absence d'axes 4) induisant une réactivité différentielle des faces cristallines (Lowson, 1982). Cette anisotropie affecte les propriétés de conductivité du minéral et notamment la circulation des électrons au sein du réseau cristallin. La pyrite est à la fois, suffisamment réactive (bon donneur d'électrons) pour permettre une attaque bactérienne significative et assez noble pour ne pas « trop » réagir en milieu acide. Elle conserve alors son intégrité, au contraire d'autres systèmes tels que des silicates basiques dont l'instabilité conduit purement et simplement à leur dissolution. La pyrite est donc un environnement propice au développement de *A.f.*, et est suffisamment stable pour préserver durablement les potentielles traces d'activités du vivant l'ayant affectée.
- **Intérêt de l'association *A.f./Pyrite*** : C'est un système simple, dont l'étude ne pose pas de problèmes expérimentaux particuliers et où les éléments en jeu peuvent être clairement définis. Il est également intéressant par les analogies qu'il présente avec les premières formes de vie sur Terre vivant dans un environnement réducteur riche en sulfures et dans des conditions physico-chimiques pouvant être qualifiées d'extrêmes. De plus, ce système participe activement au couplage de plusieurs cycles biogéochimiques fondamentaux sur Terre : ceux du carbone, du fer et du soufre par la mobilisation concomitante de ces éléments à partir de particules minérales et la fixation du CO_2 atmosphérique pour la production de biomasse.

Orientation de l'étude

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité d'un projet de recherche commencé il y a plus de 15 ans au Centre de Pédologie Biologie (CPB-CNRS) et aujourd'hui reconduit au sein du Laboratoire des Interactions Minéraux Microorganismes Matière Organique dans les Sols (LIMOS). Il fait suite à plusieurs travaux engagés sur une thématique d'altération minérale par des microorganismes. L'association naturelle *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite, et plus spécifiquement l'interface bactérie-minéral, a été étudiée selon :

- une approche physico-chimique de l'oxydation et du rôle du minéral dans celle-ci.
- une approche biologique sur la définition de l'activité oxydante de la bactérie.
- une approche morpho-chimique de l'interface du système (surface minérale).

Malgré la relative simplicité du système étudié, de nombreuses questions restent aujourd'hui en suspens. Les études précédentes ont ouvert la voie sur la nécessité (1) de localiser précisément les bactéries sur la surface minérale, (2) d'identifier la nature réelle de l'interaction bactérie/surface minérale durant l'oxydation de la pyrite et (3) de déterminer les parts respectives des processus bio-induits (indirects) et bio-contrôlés (directs).

Le but de la présente thèse est d'essayer d'apporter des éléments de réponse aux questions précédentes, en approfondissant l'étude de la surface minérale, siège de réactions et des échanges lors des processus d'oxydo-réduction, et qui regroupe aussi bien les réactifs (abiotiques et biotiques) que les produits de réactions. Ce travail nous amènera ainsi à :

- Comprendre et détailler les mécanismes de surface à l'échelle des bactéries. Ceci n'est réalisable qu'à l'aide d'outils permettant de travailler *in vivo* à une résolution spatiale micrométrique, comme la Microscopie Confocale à Balayage Laser ou la spectroscopie Raman. Ces techniques permettent, respectivement, de localiser les bactéries et de déterminer la nature chimique des composés d'oxydation sur une surface minérale. A ces techniques de surface « *in vivo* », vient s'ajouter la Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires qui, à travers une analyse *in situ* des compositions isotopiques des produits d'oxydation de surface, permet de « pister » les mécanismes d'oxydation de surface.
- Dédire de ces mécanismes de surface des potentielles traces d'activité bactérienne sur des surfaces de pyrites suffisamment stables pour pouvoir constituer des biosignatures.
- Définir, à défaut, une méthode prospective de recherche de telles biosignatures.

Synthèse bibliographique

C
H
A
P
I
T
R
E
1

CHAPITRE 1

PARTIE I : LES AGENTS DU SYSTEME ET OXYDATION EN SOLUTION	12
1 LA BACTERIE DU SYSTEME : ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	12
1.1 CARACTERES GENERAUX	12
1.2 METABOLISME CELLULAIRE ET TRANSFERT D'ELECTRONS AU SEIN DE LA BACTERIE	13
1.3 SPECIFICITE VIS A VIS DES SULFURES	19
2 LE MINERAL DU SYSTEME ETUDIE : LA PYRITE	20
2.1 CRISTALLOCHIMIE	21
2.2 PROPRIETES ELECTROMAGNETIQUES DE LA PYRITE	22
2.3 MECANISMES D'OXYDATION CHIMIQUE DE LA PYRITE. (LOWSON, 1982)	23
3 LE SYSTEME ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS/PYRITE EN SOLUTION	29
3.1 MECANISME D'OXYDATION	29
3.2 OXYDATION DIRECTE <i>VERSUS</i> INDIRECTE	30
3.3 COMPOSITION ISOTOPIQUE DE LA SOLUTION	31
PARTIE II : L'INTERFACE <i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS/PYRITE</i>	45
1 L'ADHESION BACTERIENNE : LA LIAISON SENSU STRICTO.	45
2 LA COUCHE D'OXYDATION.	47
2.1 NATURE DES COMPOSES DE SURFACE.	47
2.2 DISTRIBUTION SPATIALE DES COMPOSES DE SURFACE (TONIAZZO, 1998).	48
2.3 FORMATION D'OXYDES DE FER LORS DE LA BIO-OXYDATION DE LA PYRITE PAR A.F. A PH TRES ACIDE	50
3 LES FIGURES DE CORROSION	51
4 SYNTHESE SUR L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL	53
PARTIE III : BIOSIGNATURES ET TRACES DE VIE	56
1 LES BIOSIGNATURES INORGANIQUES	57
2 BIOSIGNATURES MOLECULAIRES	58
2.1 NATURE CHIMIQUE DE MOLECULES ORGANIQUES DANS LES ROCHES	58
2.2 HOMOCHIRALITE VS RACEMISATION.	59
2.3 COMPOSITION ISOTOPIQUE (HORITA, 2005)	60
2.4 TRACES DE NON-VIE OU LIMITES DE RESOLUTION DES INSTRUMENTS D'OBSERVATION ?	60
3 NOTRE SYSTEME ETUDIE EN TANT QUE BIOSIGNATURE - OU PLACER LA BIOSIGNATURE ?	61

INTRODUCTION

Cette étude s'inscrit dans un double contexte scientifique (1) de compréhension de mécanismes locaux au niveau de l'interface bactérie/minéral régissant l'oxydation de sulfures de fer par des microorganismes et (2) de détermination d'une méthode de prospection de biosignatures potentiellement utilisable en exobiologie ou pour détecter l'action des premiers organismes sur Terre.

Ce chapitre a pour but de présenter les deux agents du système étudié : la bactérie (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) et le minéral (pyrite), et de dégager les caractéristiques principales et fondamentales de chacun. Un état des connaissances des deux éléments en jeu (Partie I) ainsi que de leur interaction à échelle micrométrique (Partie II) est détaillé ici. La dernière partie du chapitre constitue un bilan (non-exhaustif) de la notion de biosignature, permettant de replacer cette étude dans le cadre plus général de l'observation d'une activité biologique et de sa reconnaissance sur un support minéral.

Partie I : Les agents du système et oxydation en solution

Le processus d'oxydation étudié dans ce travail met en jeu deux composantes : la bactérie, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, et le minéral, la pyrite. La forte interaction existant entre ces deux « agents » est une conséquence des caractères intrinsèques de chacun d'entre eux. De quoi dispose la bactérie pour récupérer l'énergie nécessaire à son métabolisme ? Quels avantages offre la pyrite ? Il convient donc, dans cette première partie, de présenter les caractéristiques majeures de la bactérie et du minéral qui conditionnent leur interaction et les mécanismes globaux d'altération.

1 La bactérie du système : *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Thiobacillus ferrooxidans a été décrite pour la première fois juste après la Seconde Guerre Mondiale. C'est une bactérie capable d'oxyder le fer (d'où son nom de *ferrooxidans*) et le soufre (Colmer and Hinkle, 1947; Temple and Colmer, 1951). On la rencontre fréquemment dans des environnements sulfatés souvent très acides, ce qui lui a valu une nouvelle dénomination : *Acidithiobacillus ferrooxidans* ou *A.f.*

1.1 Caractères généraux

A.f. se présente sous la forme de bâtonnets allongés de 1,6 à 1,7 μm de long et 0,3 à 0,7 μm de diamètre et ne possède pas de flagelle. Comme la plupart des Thiobacilles, c'est une bactérie **mésophile** dont l'optimum de croissance se situe aux alentours de 30°C mais qui est capable de se développer entre 15 et 37°C. Les réactions d'oxydation accomplies ou catalysées par ces bactéries sont exothermiques, les températures au sein des bioréacteurs (tas de résidus miniers par exemple) pouvant atteindre localement 60°C. Certaines souches de Thiobacilles peuvent d'ailleurs être qualifiées de thermophiles (Ferroni *et al.*, 1986)

Comme tout Procaryote, être vivant de degré d'organisation le plus élémentaire, sans membrane entourant le matériel génétique (i.e. sans noyau), les Thiobacilles possèdent une paroi cellulaire complexe, barrière indispensable pour se protéger de l'environnement extérieur. *A.f.* est une bactérie Gram négative (Remsen and Lundgren, 1966), dont la paroi cellulaire est tripartite (Figure C1. 1) :

- membrane externe : double couche phospholipidique, riche en protéines
- périplasme contenant les « navettes électroniques » et accepteurs d'électrons comme la rusticyanine.
- membrane interne ou cytoplasmique qui isole le milieu cellulaire interne.

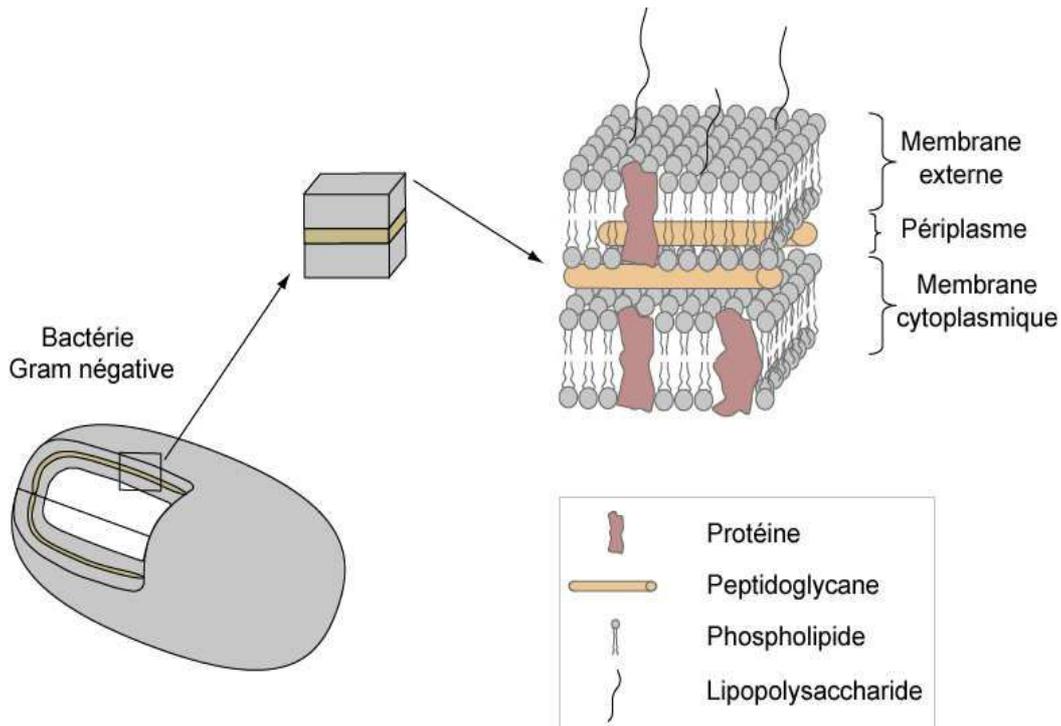


Figure C1. 1 : Membrane tripartite d'une bactérie Gram négative de type *Acidithiobacillus ferrooxidans* (d'après Campbell,1995)

A.f. est un microorganisme **acidophile** obligé, dont le pH optimum de croissance se situe entre 1,6 - 2,8, même si son pH cytoplasmique est proche de la neutralité (6,5). On le rencontre fréquemment dans des environnements sulfatés très acides (Leduc and Ferroni, 1994), avec des pH inférieurs à 1 et des teneurs en sulfates pouvant dépasser 50g.L⁻¹. N'ayant pas la capacité de sporuler, cette paroi cellulaire complexe est sa seule protection contre ces environnements très agressifs et extrêmes.

1.2 Métabolisme cellulaire et transfert d'électrons au sein de la bactérie

Un microorganisme a besoin, pour se développer et se diviser, de sources de carbone et d'énergie. On distingue globalement deux types de sources de carbone :

- organique : des molécules organiques ou polymères (oses, acides organiques, hydrocarbures...) que les microorganismes dégradent pour se procurer les éléments essentiels à leur développement cellulaire (C,N); le microorganisme est alors qualifié d'hétérotrophe
- inorganique où le CO₂ atmosphérique dissous constitue la seule source de carbone lors de la synthèse des constituants cellulaires d'un organisme qualifié d'autotrophe.

L'énergie nécessaire à ce métabolisme peut être (1) photonique (photosynthèse et cycle de Calvin) ou (2) chimique (réactions d'oxydo-réduction).

Tableau C1.1 : Classification des bactéries en fonction de leurs sources d'énergie et de carbone.

		Source de carbone	
		Inorganique CO ₂	Organique (CH ₂ O) _n
Source d'énergie	Lumineuse Photons	<i>Photolithotrophe</i>	<i>Photoorganotrophe</i>
	Chimique Fe ²⁺ , S ⁰ , NH ₄ ⁺	<i>Chimiolithotrophe</i>	<i>Chimioorganotrophe</i>

Le fonctionnement d'une cellule est donc conditionné par deux flux principaux :

- un flux d'éléments (C, N...)
- un flux d'électrons entre des composés oxydables (donneurs d'électrons) et des composés réductibles (accepteurs d'électrons).

Dans cette classification, *A.f.* est une bactérie **chimiolithotrophe** (Tableau C1. 1), autotrophe et non photosynthétique. Des réactions d'oxydo-réduction lui apportent l'énergie nécessaire pour fixer le CO₂ destiné à la synthèse de composés carbonés cellulaires plus élaborés (Figure C1. 2). Pour *A.f.* l'accepteur final d'électrons est en général le dioxygène, O₂. N'utilisant qu'une seule source d'azote, sous forme minérale, NH₄⁺, la bactérie est qualifiée d'**autotrophe stricte**.

A.f. peut être considérée comme une bactérie « pionnière » qui fabrique de la matière organique à l'obscurité dans un environnement minéral assez hostile et habituellement peu favorable à la vie (très acide).

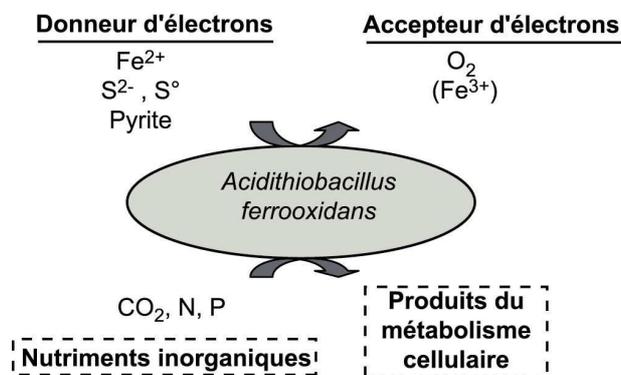
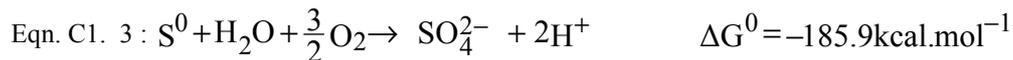
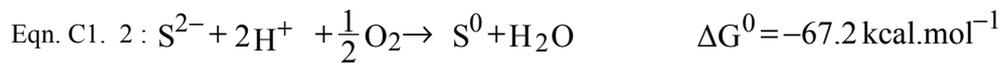
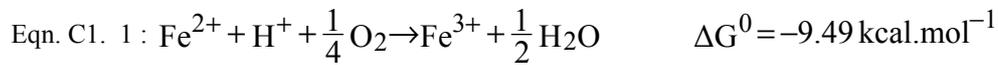


Figure C1. 2 : Métabolisme d'une bactérie autotrophe acidophile : *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A.f. utilise les formes réduites de fer et de soufre comme donneurs potentiels d'électrons : Fe^{2+} , S^0 , $\text{S}_n\text{-S}^{2-}$ ($n < 5$) ou encore divers polythionates ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$). C'est une bactérie **aérobie facultative** qui est capable d'oxyder du soufre élémentaire en conditions anaérobies par réduction dissimilatrice du Fe^{3+} (Dziurla, 1995).



En présence de sulfures de fer, *A.f.* dispose à la fois de fer et de soufre comme source potentielle d'énergie (Eqn. C1. 1 à Eqn. C1. 3) dont l'accessibilité est primordiale. En effet, si la bactérie est capable d'utiliser différentes formes non totalement oxydées de ces éléments, elle retire jusqu'à 20 fois plus d'énergie lors de l'oxydation d'une mole de soufre que lors de l'oxydation d'une mole de fer. *A.f.* se développe ainsi mieux en présence de pyrite que d'une solution de fer (II) (Mustin, 1992; Toniazzi, 1998; Yu et al., 2001).

De plus, l'oxydation de composés soufrés conduit à la production de protons, entretenant l'acidité nécessaire à son métabolisme cellulaire. En effet, un fort gradient de protons favorise la synthèse d'ATP (Figure C1. 3) et diminue les cinétiques d'auto-oxydation du fer par O_2 . La disponibilité des ions ferreux pour *A.f.* reste bonne et l'inhibition de croissance bactérienne due aux ions ferriques est limitée.

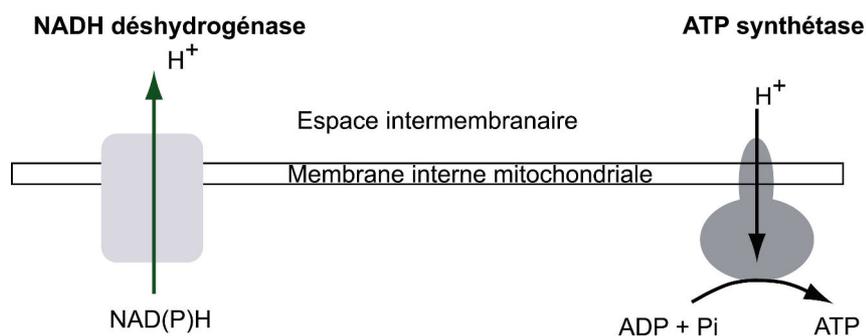


Figure C1. 3 : Flux de protons dans une cellule microbienne au niveau de la membrane interne mitochondriale.

Nunzi (1993) schématise les circulations d'électrons au sein de *A.f.* selon deux voies (Figure C1. 4), transférant les électrons des ions ferreux vers l'oxygène (voie principale) ou vers un transporteur d'hydrogène, la Nicotinamide Adénosine DiPhosphate ou NADP (voie

secondaire). Ce dernier, possédant un potentiel redox plus faible que celui de toutes les protéines de la chaîne respiratoire de *A.f.*, ne peut être réduit spontanément. Un système de transport inverse d'électrons permet alors l'entrée de protons dans la cellule pour acheminer les électrons vers le NADP.

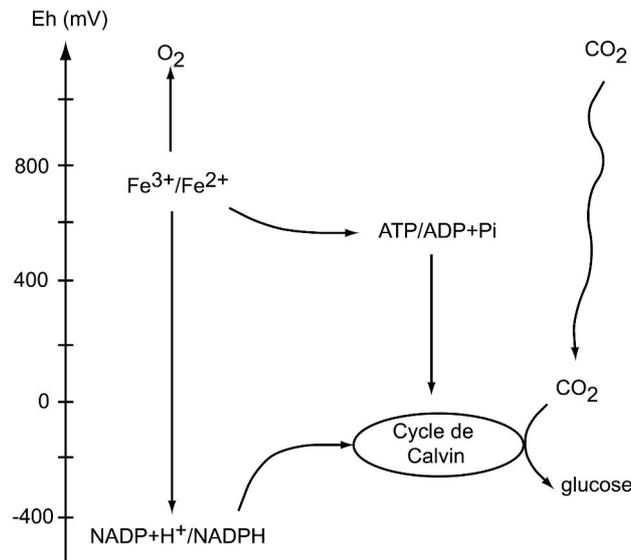


Figure C1.4 : transfert des électrons au sein de *A.f.* (d'après Nunzi, 1993)

Les chaînes respiratoires du fer et du soufre de la bactérie font intervenir de nombreuses protéines intermembranaires et non-constitutives pour la plupart. Par des successions d'états oxydés-réduits, elles permettent le transfert d'électrons du donneur initial (Fe²⁺ ou S⁰) jusqu'à l'accepteur final (en général O₂ ou NADP). Le couple Fe³⁺/Fe²⁺ ayant un haut potentiel d'oxydo-réduction ($E_0 = +780\text{mV}$) et un faible pouvoir réducteur, les ions ferreux peuvent réduire de nombreuses protéines de la chaîne respiratoire de la bactérie. Dans certains cas au contraire, en anaérobiose ou lorsqu'il est attaché sur la surface minérale, *A.f.* pourrait oxyder directement les produits soufrés et utiliser le couple Fe³⁺/Fe²⁺ comme accepteur d'électrons (Sand *et al.*, 1999).

Parmi ces protéines, *Acidithiobacillus ferrooxidans* possède de nombreux **cytochromes**, bien qu'ils n'aient pas encore tous été identifiés. Ainsi, les cytochromes c peuvent représenter jusqu'à 10% des protéines totales synthétisées dans la bactérie (Yarzabal *et al.*, 2002).

Des études sur la nature et la diversité de ces protéines ont été menées depuis plus de 30 ans. Ainsi, Cobley & Haddock (1975) ont identifié deux types de cytochromes c et de cytochromes a impliqués dans la chaîne respiratoire de *A.f.*. Ils évoquent également pour la

première fois l'existence d'une protéine « bleue » possédant un atome de cuivre central qu'ils nomment **rusticyanine** et qui sera purifiée trois ans plus tard (Cox and Boxer, 1978). Contrairement, à de nombreuses enzymes similaires, cette molécule de la famille des protéines à cuivre possède un haut potentiel redox et est très stable, même à pH acide (Cobley and Haddock, 1975). Son site actif ne semble pas être affecté par les réactions de protonation/déprotonation dues aux variations de pH. Ces caractéristiques laissent penser que c'est une protéine périplasmique, comme *a priori* toutes les molécules de la chaîne respiratoire. En effet, l'autooxydabilité du fer ferreux au pH cytoplasmique (6,5), l'insolubilité des composés qui en résulte et les activités optimales des cytochromes à pH acide ne permettraient pas une oxydation cytoplasmique du fer (Nunzi, 1993). Le potentiel d'oxydo-réduction de la rusticyanine a été mesuré à +680mV à pH 3.2 (Ingledeew and Cobley, 1980) et +670mV à pH 2.23 (Lappin *et al.*, 1985) et ne semble pas varier entre pH 1 et 3. Elle joue un rôle prépondérant dans l'oxydation des ions ferreux même si la seule réduction de cette protéine par le fer (II) est trop lente pour expliquer les taux d'oxydation du fer par ces bactéries (Blake and Shute, 1987). Il semble ainsi que la rusticyanine ne soit pas le premier accepteur d'électrons de la chaîne et que ce soit son association à d'autres cytochromes qui explique les cinétiques observées.

Le cytochrome c-552 (Yamanaka and Fukumori, 1995) de potentiel d'oxydo-réduction +360mV à pH7, une fer (II) cytochrome c oxydoréductase (ou protéine Fe/S) ainsi que des cytochromes a sont présentés comme les cytochromes majeurs impliqués dans les chaînes respiratoires de *A.f.* (Figure C1. 5).

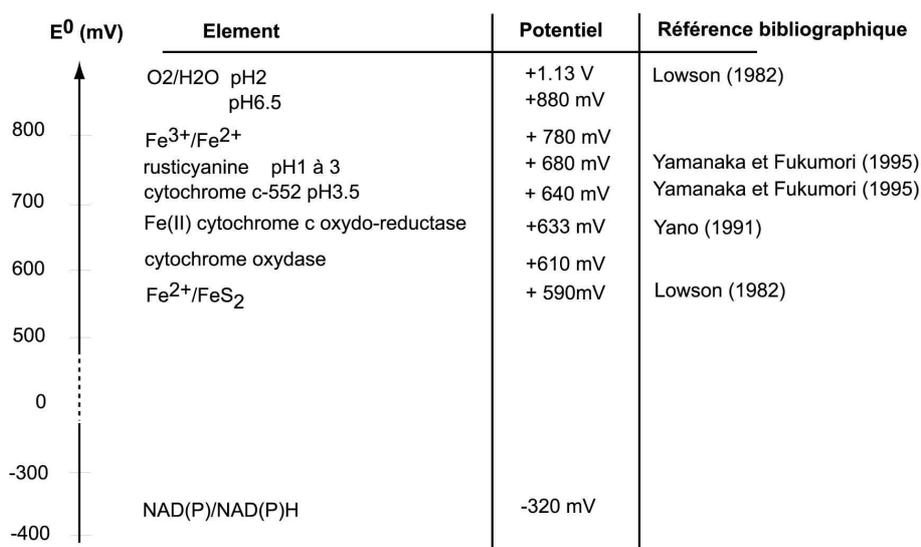


Figure C1. 5 : Potentiel redox des principales protéines impliquées dans la chaîne respiratoire de *A.f.*

Ingledeew et Cobley (1980) décrivent également un complexe polynucléaire de fer (III) situé sur le côté externe de la membrane cellulaire qui pourrait intervenir dans la chaîne respiratoire. La Figure C1. 6 présente quelques-uns des modèles développés depuis une dizaine d'années pour décrire les chaînes respiratoires du fer et du soufre chez cette bactérie (Blake and Shute, 1987; Yamanaka and Fukumori, 1995).

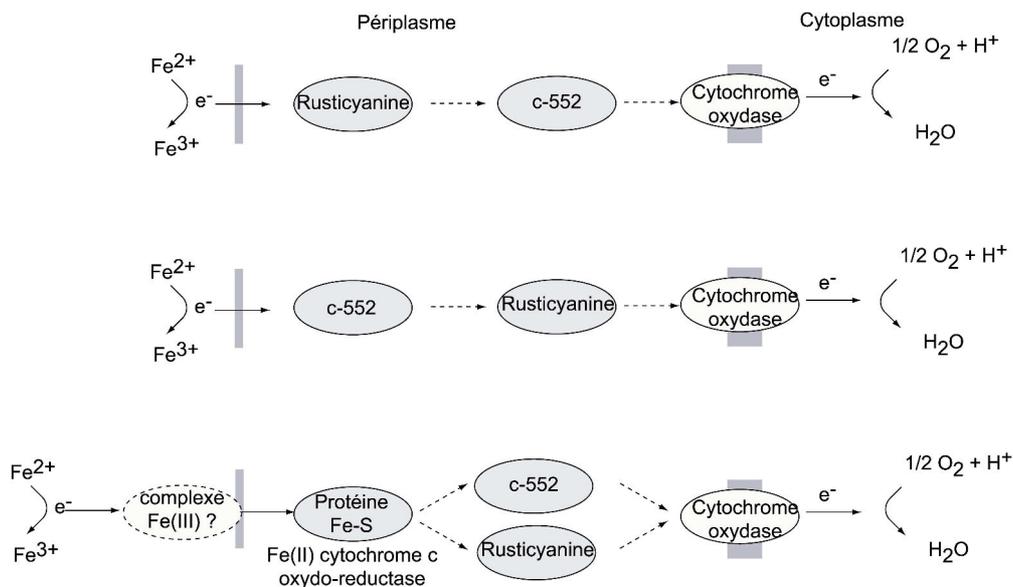


Figure C1. 6 : Modèles des chaînes respiratoires de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (modifié d'après Nunzi, 1993)

Aujourd'hui, la protéine Fe/S est considérée comme l'accepteur initial d'électrons, dans l'espace périplasmique, qu'elle céderait ensuite à la rusticyanine ou au cytochrome c-552. Les cytochromes a1 (constitutifs de la membrane cytoplasmique) sont quant à eux considérés comme la dernière navette électronique avant l'accepteur final qu'est l'oxygène.

Tout en précisant la nature et les fonctions supposées de ces molécules, les auteurs (Abergel *et al.*, 2003; Brasseur *et al.*, 2002; Brasseur *et al.*, 2004; Elbehti and Lemesle-Meunier, 1996; Rodriguez *et al.*, 1986) soulignent l'existence de nombreuses inconnues dans les chaînes oxydatives du fer et du soufre de *A.f.* :

- (1) les mêmes protéines interviennent-elles dans les deux chaînes et à quel niveau ?
- (2) est-ce le patrimoine génétique ou les conditions environnementales qui prédominent lors de l'expression de ces protéines ?
- (3) quel est le rôle exact de la rusticyanine ?

Des cellules de *A.f.* adaptées à l'oxydation du soufre semblent posséder un nombre de cytochromes c plus réduit que celle cultivées sur fer (II) (Yarzabal *et al.*, 2002). L'oxydation

de soufre fournissant plus d'énergie à la cellule que celle du fer, ces auteurs suggèrent que la chaîne oxydative du fer nécessite plus de transporteurs d'électrons tels que les cytochromes c pour catalyser l'oxydation du fer (II). Cependant, des cellules cultivées alternativement sur milieu fer ou soufre régulent leur synthèse de protéines, en termes de quantité et de diversité, en fonction du substrat disponible.

Le rôle exact de la rusticyanine dans ces chaînes respiratoires, qui peut représenter de 5 à 10% du total des protéines solubles synthétisées par la bactérie en présence de fer (Yarzabal *et al.*, 2002), est toujours débattu. Il est en général admis que cette protéine intervient principalement dans la chaîne respiratoire du fer en raison de ses taux plus importants enregistrés dans des cellules cultivées sur fer (II) que sur soufre et de la faible oxydation du fer par des bactéries adaptées au soufre (Jedlicki *et al.*, 1986; Yarzabal *et al.*, 2003). Cependant, elle peut être observée dans les deux types de bactéries (Bengrine *et al.*, 1998). Le taux de rusticyanine dans les cellules serait ainsi également fonction du substrat disponible de même que des phases de croissance de la bactérie.

A.f. semble donc capable de développer des chaînes respiratoires différentes spécifiques du substrat disponible, redondantes et peut-être interconnectées qui s'exprimeraient alternativement en fonction de l'environnement proche de la bactérie (Ida *et al.*, 2003; Yarzabal *et al.*, 2002). Il n'y aurait donc pas d'ordre unique établi dans l'enchaînement des différents transporteurs d'électrons de *A.f.*

Ainsi, les circulations d'électrons au sein de la bactérie et surtout les potentiels d'oxydo-réduction de ces protéines jouent un rôle prépondérant pour l'oxydation de la pyrite par *A.f.*. Toutes les caractéristiques de cette bactérie énoncées jusqu'ici en font un très bon agent oxydant des sulfures de fer.

1.3 Spécificité vis à vis des sulfures

La spécificité de cette bactérie vis-à-vis de sulfures et en particulier de la pyrite est très importante. De nombreux minéraux sulfurés sont les cibles des oxydations de bactéries autotrophes oxydantes telles que *A.f.* mais également *Acidithiobacillus thiooxidans* (oxydant le soufre) ou *Leptospirillum ferrooxidans* (oxydant le fer à pH acide). Le Tableau C1. 2 récapitule quelques exemples de sulfures métalliques oxydés par voie biotique. La libération de métaux engendrée est d'ailleurs fréquemment exploitée dans les zones minières (Curutchet *et al.*, 2001; Suzuki, 2001).

Tableau C1. 2 : *Acidithiobacillus ferrooxidans* et les sulfures. Principaux produits de lixiviation (Ox : oxydes, Ps : polysulfures, S₈ : soufre élémentaire, SO₄²⁻ : sulfates).

Sulfure	Bactérie	Métal lixivié	Type d'attaque	Intermédiaire réactionnel	Produits de lixiviation
Pyrite (FeS ₂)	Af, Lf	Fe	oxydante	thiosulfate	SO ₄ ²⁻ , Ox, S ₂ O ₃ , Ps, S ₈
Molybdenite (MoS ₂)		Mo	oxydante	thiosulfate	SO ₄ ²⁻ , S ₈
Wolframite (WS ₂)		W	oxydante	thiosulfate	SO ₄ ²⁻ , S ₈
Chalcopyrite (CuFeS ₂)		Fe, Cu	oxydante + protonique	polysulfures	S ₈ , Ps, Ox, SO ₄ ²⁻
Arsenopyrite (FeAsS)		Fe, As	oxydante + protonique	polysulfures	S ₈ , Ps, Ox, SO ₄ ²⁻
Sphalérite (ZnS)		Zn	oxydante + protonique	polysulfures	S ₈ , Ps, Ox, SO ₄ ²⁻
Galène (PbS)		Pb	oxydante + protonique	polysulfures	S ₈ , Ps, Ox, SO ₄ ²⁻

Le faible rendement énergétique des réactions d'oxydo-réduction du fer et du soufre comparé à ceux des respirations chez les bactéries hétérotrophes ($\Delta G_{\text{oxydation du glucose}} = 2860 \text{ kJ/mol}$), crée obligatoirement une forte affinité et dépendance de *A.f.* vis-à-vis des minéraux sulfurés. Pour croître, les bactéries doivent donc oxyder une grande quantité de fer et de soufre. Ceci explique les taux importants de transformation et d'altération des phases minérales observés dans des résidus riches en sulfures de fer en présence de Thiobacilles. Cette altération physicochimique, résultant de la forte dépendance énergétique de la bactérie vis-à-vis du minéral, constitue sans doute une signature pertinente d'une activité bactérienne. Les surfaces des sulfures sont ainsi susceptibles d'enregistrer des indices importants et pérennes de traces de vie.

2 Le minéral du système étudié : la pyrite

La pyrite est un disulfure de fer (FeS₂ à FeS_{1,94}), cristallisant dans le système cubique (hémicubique). Elle possède une dureté de 6 - 6 ½ sur l'échelle de Mohs et une densité de 4.6 - 5.2, le minéral pur étant donné à 5.02g.cm⁻³. On la trouve principalement en tant que minéral accessoire de roches éruptives et métamorphiques ainsi que dans des sites hydrothermaux. Elle est connue depuis l'Antiquité et doit son nom au mot grec "puritês" (étincelant) ou "puros" (feu) en raison des étincelles qui se produisent lorsqu'on la casse. Les Grecs et Romains la considéraient comme un remède permettant, selon Pline, d'éviter la "pourriture du sang". Les Incas quant à eux s'en servaient de miroirs d'où le surnom de "pierre des Incas" parfois donné à ce minéral. Elle fut également utilisée au Moyen Age comme source d'acide sulfurique. Plus récemment, la pyrite est communément appelée "or des fous" en raison de son éclat métallique, jaune vif, qui évoque celui de l'or.

2.1 Cristallochimie

La pyrite appartient au système cubique (Figure C1. 7) dont les paramètres de maille et la symétrie sont caractérisés notamment par la présence de 4 axes 3 de symétrie. Elle se présente principalement sous deux formes : le cube et le dodécaèdre pentagonal ou pyritoèdre et possède de nombreuses combinaisons de formes à macles fréquentes (ex: macle de la Croix de fer). On parle également de pyrite triglyphe pour désigner des cristaux de pyrite hydrothermale présentant des stries parallèles à l'une des arêtes des faces. Ces stries correspondent à des artéfacts de croissance cristalline entre les deux formes majoritaires, le cube et le pyritoèdre (Lowson, 1982). Le minéral peut parfois s'organiser sous forme de grains épars dans une matrice lui conférant une forme de framboise, d'où son nom de pyrite framboïde. La pyrite ne présente pas de clivage particulier et a une cassure conchoïdale.

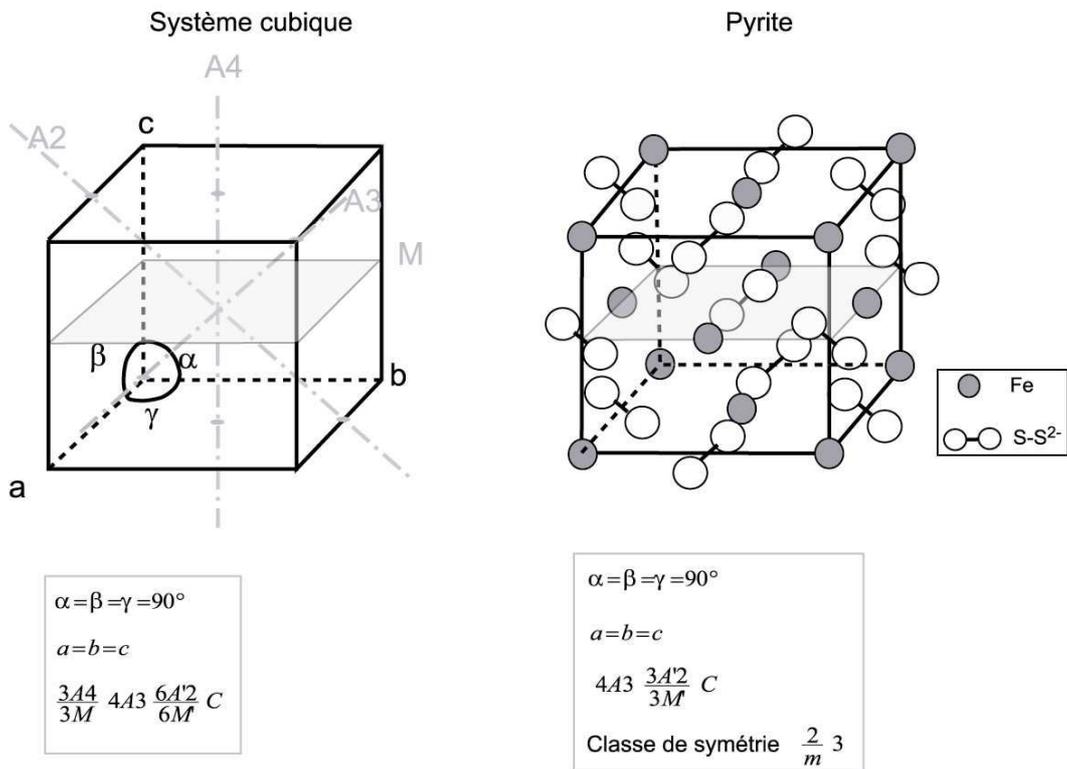


Figure C1. 7 : Paramètres de maille du système cubique et maille élémentaire du cube de pyrite.

Schématiquement, on peut considérer que, dans la pyrite, les atomes de fer remplacent les atomes de sodium de la maille élémentaire du cube de NaCl et que le doublet soufre-soufre remplace le chlore. Ainsi, les atomes de fer occupent les sommets du cube et le centre des faces alors que ceux de soufre se trouvent au milieu des arêtes et parallèles aux axes 3. Chaque atome S est coordonné à 3 atomes de fer et un atome de soufre, chaque atome de fer

étant quant à lui entouré de 6 atomes de soufre (Mattila *et al.*, 2004; Ndlovu and Monhemius, 2005). Les paramètres de maille donnent $a = b = c = 5.42 \text{ \AA}$ (Siebert and Stocker, 1992) et les distances des liaisons Fe-S et S-S sont respectivement de l'ordre de 2.262 \AA (Ennaoui *et al.*, 1993) et 2.14 \AA (Fujimori *et al.*, 1996). La liaison S-S est une liaison covalente (entre deux atomes dont l'orbitale électronique est incomplète) alors que la liaison entre le fer et les doublets $S-S^{2-}$, plus longue, entre deux atomes de charge opposée possède un caractère ionique. Cependant, la pyrite est un minéral particulier du système cubique en raison de la présence de doublets $S-S^{2-}$ orientés selon les axes 3 du cube et qui créent une anisotropie dans cette maille cristalline (Figure C1. 7). La pyrite présente ainsi une hémicubie centrée où les axes de symétrie 4 (A4) et trois axes 2 (A2) ont disparu.

Cette anisotropie moléculaire est particulière et a des conséquences importantes sur le comportement chimique et la réactivité de la pyrite. En particulier, le comportement vibrationnel des liaisons de la maille cristalline est fortement influencé par ce doublet $S-S^{2-}$ et les signatures Raman notamment, très sensibles aux vibrations du doublet disulfure, sont spécifiques (cf Chapitre 3). D'autre part, les différentes faces cristallines de la pyrite ne réagissent pas de manière identique aux agents oxydants. Une circulation préférentielle des électrons au sein de la maille cristalline a été constatée et peut être à l'origine de ces réactivités différentielles influencées ou non par une activité biologique en surface.

2.2 Propriétés électromagnétiques de la pyrite

Les propriétés électromagnétiques de la pyrite sont induites par les électrons de valence 3d du fer et 3p du soufre (Lowson, 1982).

Le fer et le soufre sont respectivement présents dans la pyrite sous forme de Fe^{2+} et de doublets $S-S^{2-}$ et n'ont pas de moment magnétique. La susceptibilité magnétique de la pyrite, légèrement positive et dépendante de la température, peut être négligée.

Cependant, il existe au sein du réseau cristallin du minéral un gradient de champ électrique attribué à l'orientation non plane des doublets de soufre et à l'anisotropie qui en découle. La circulation d'électrons au sein de la maille cristalline est ainsi orientée et pourrait influencer la corrosion du minéral.

La pyrite est considérée comme un minéral semi-conducteur. Comme pour d'autres disulfures (molybdénite et wolframite), la bande de valence du minéral est remplie par des électrons provenant seulement des orbitales électroniques des atomes de fer. Au contraire, dans les autres sulfures métalliques (pyrrhotite, galène) les électrons de valence proviennent à la fois des atomes de fer que de soufre (Lowson, 1982; Sand *et al.*, 1999). Les propriétés

semi-conductrices d'un minéral reflètent la présence de transporteurs d'électrons pouvant avoir trois sources : (1) altération de la stœchiométrie initiale, (2) présence d'impuretés et (3) excitation thermique (Abratis *et al.*, 2004). La pyrite est considérée comme un bon conducteur et présente des sites de type n (excès de fer), de type p (excès de soufre) ou mixtes, appelés de type n-p. Mais le lien entre le ratio Fe/S et les propriétés électriques de la pyrite n'est pas si simple. Ainsi, des pyrites provenant de gisement de haute température sont considérées de type n alors que celles formées à basse température sont de type p. De même, des pyrites sédimentaires seraient de type n alors que des pyrites hydrothermales seraient de type p. Les impuretés présentes dans la maille cristalline peuvent aussi avoir un rôle sur les propriétés électrochimiques des pyrite en augmentant leur potentiel de donneur (type n), ou d'accepteur (type p) d'électrons (ex : As). Cette juxtaposition de sites au sein de la maille cristalline joue un rôle non négligeable sur la conductivité de la pyrite. En effet, les sites de type n sont considérés comme plus conducteurs (même si leur résistivité augmente avec la température) que ceux de type p, en modifiant la mobilité des éléments porteurs de charge dans le réseau.

La conductivité électrique du minéral, et donc le transfert d'électrons au sein de la maille cristalline, a un impact sur la réactivité de la pyrite lors des réactions d'oxydo-réduction. Ainsi, quelque soit l'électrolyte, la pyrite présente le potentiel de repos le plus élevé parmi les sulfures métalliques, ce qui en fait le sulfure le plus noble et donc le moins réactif. Lors de couplages galvaniques avec d'autres sulfures, la pyrite jouera le rôle d'une cathode. L'oxydation chimique naturelle de la pyrite est donc lente, peu intense sauf en présence de bactéries acidophiles du genre *Acidithiobacillus* ou *Leptospirillum*.

2.3 Mécanismes d'oxydation chimique de la pyrite. (Lowson, 1982)

2.3.1 Stabilité thermodynamique de la pyrite

De nombreux diagrammes ont été établis pour le système Fe-S-O-H à 25°C (Figure C1. 8). Ils mettent en évidence l'existence de nombreuses phases solides ou dissoutes plus ou moins hydratées incluant différents états des éléments : le fer [(+II) et (+III)], le soufre [(-II) à (+VI)] et l'oxygène [(-II) ou (0)]. On peut ainsi trouver des espèces soufrées stables (sulfures, soufre élémentaire, sulfates) ou métastables (polysulfures, polythionates, thiosulfate), de nombreux oxy-hydroxydes de fer (FeO, Fe₂O₃, Fe₃O₄, FeOOH...) ou des hydroxysulfates comme la jarosite KFe₃(SO₄)₂(OH)₆ souvent décrite comme le produit d'oxydation de la pyrite stable en milieu très acide.

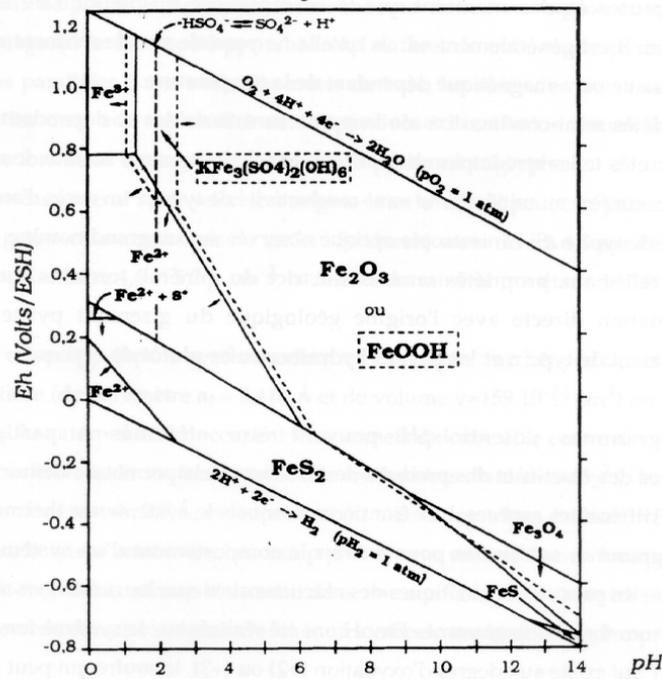


Figure C1. 8 : Diagramme Eh-pH du système Fe-S-O-H pour $[Fe] = 10^{-6}$ et $[S] = 10^{-3}$ (Mustin, 1992; Toniazzo, 1998)

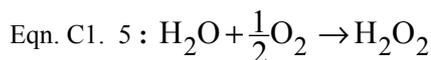
2.3.2 Oxydation chimique de la pyrite

L'oxydation de la pyrite se fait par étapes dont l'oxydation aqueuse par l'oxygène moléculaire est considérée comme initiatrice (Singer and Stumm, 1968) :

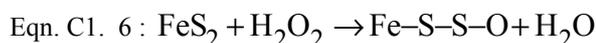


Au cours de cette étape, seul le soufre est oxydé en sulfate. Cependant, divers intermédiaires réactionnels et composés métastables comme des thiosulfates ou des sulfites peuvent apparaître. Mc Kibben et Barnes (1986) décomposent cette première attaque en trois sous-étapes :

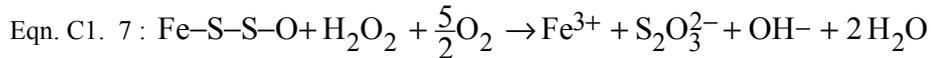
(1) adsorption des molécules d'oxygène à la surface de la pyrite entraînant la formation de peroxyde d'hydrogène :



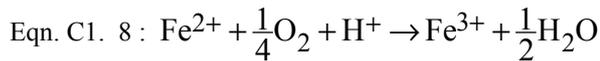
(2) Les molécules de H_2O_2 formées transfèrent alors deux électrons à la pyrite formant une molécule d'eau et une forme instable intermédiaire :



(3) Cette forme instable réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former des thiosulfates qui sont oxydés rapidement en sulfates :



Le fer de la pyrite est quant à lui simplement solubilisé sous forme d'ions ferreux qui sont ensuite oxydés par l'oxygène dissous :



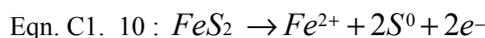
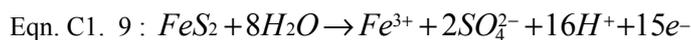
Cependant cette réaction est très lente en milieu acide en raison de la faible pression partielle en oxygène à des pH inférieurs à 2.

Certains auteurs (Moses *et al.*, 1987) considèrent cette oxydation aqueuse de la pyrite par l'oxygène moléculaire peu probable en raison des propriétés magnétiques opposées des deux composés, l'oxygène étant paramagnétique alors que la pyrite est diamagnétique. Cette réaction étant limitée, l'oxydation électrochimique de la pyrite par les ions ferriques serait donc le processus majeur.

2.3.3 Oxydation électrochimique de la pyrite

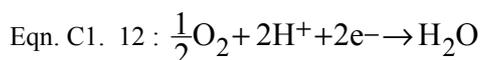
Elle est décrite selon Lawson (1982) par une succession de réactions d'oxydo-réduction.

- Une oxydation plus ou moins totale du fer et du soufre se déroule à l'**anode** selon les deux demi-réactions suivantes :



Cette-dernière réaction est favorisée à pH très acide (<2) et expliquerait la formation de soufre élémentaire lors de l'oxydation de la pyrite.

- Les réactions **cathodiques** traduisent en revanche la réduction de l'oxygène dissous ou du Fer (III) lorsque celui-ci est présent en quantités suffisantes :



Par conséquent, il existe un cycle oxydatif rapide de la pyrite par les ions ferriques dont la cinétique n'est contrôlée que par la disponibilité des ions ferriques en solution (Eqn. C1. 13) :



En conséquence, en conditions abiotiques et acides, les deux accepteurs d'électrons majoritaires connus pour l'oxydation de la pyrite sont donc :

- l'oxygène dissous à pH acide : $\text{FeS}_2 + \frac{3}{2}\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ (Eqn. C1. 14)
- les ions ferriques : $\text{FeS}_2 + 14\text{Fe}^{3+} + 8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 15\text{Fe}^{2+} + 2\text{SO}_4^{2-} + 16\text{H}^+$ (Eqn. C1. 15)

Ces réactions traduisent la formation majoritaire de sulfates de fer en solution. Deux voies principales sont décrites pour la formation de ces sulfates lors de l'oxydation de sulfures de fer (Figure C1. 9), faisant intervenir des intermédiaires polysulfures ou thiosulfates (Hansford and Vargas, 1999; Sand *et al.*, 1999).

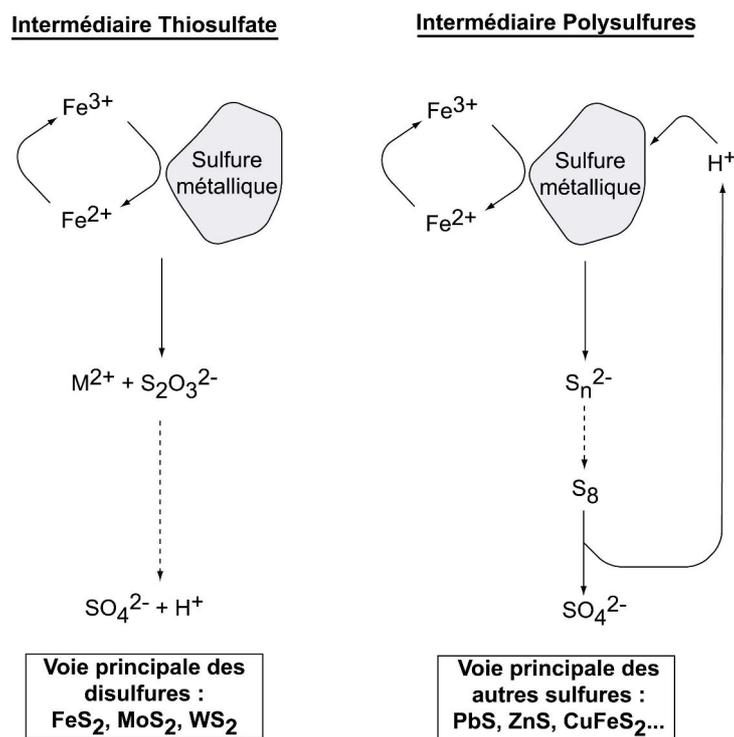


Figure C1. 9 : Les deux voies oxydantes des sulfures de fer.

L'oxydation électrochimique des disulfures de fer (pyrite FeS₂), de molybdène (molybdénite MoS₂) ou de tungstène (wolframite WS₂) se déroule en général par l'intermédiaire d'un chemin réactionnel « thiosulfates ». Au contraire, pour les autres

sulfures, la voie « polysulfures » est la plus couramment admise et implique une production de fer (II) et de soufre élémentaire.

2.3.4 Généralités sur la corrosion

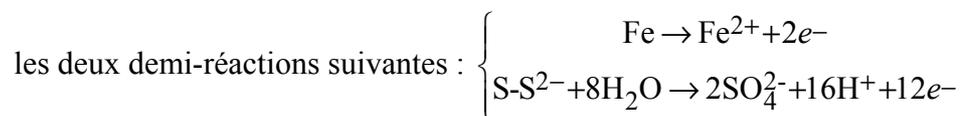
L'altération de la pyrite en milieu naturel a lieu à travers un processus de corrosion du minéral. Du latin *corredere* (ronger, attaquer), la corrosion d'un métal peut se définir de manière générale comme « l'interaction physico-chimique entre un métal et son milieu environnant entraînant des modifications dans les propriétés du métal et pouvant conduire à une dégradation significative de la fonction du métal, du milieu environnant [...] » (norme ISO 8044, 1999). La corrosion électrochimique est d'ailleurs naturelle et l'état thermodynamique le plus stable d'un métal est son état oxydé. Le processus de corrosion résulte de l'association de trois mécanismes :

- une dissolution anodique (zone d'oxydation)
- un transfert des électrons libérés à l'anode vers la cathode
- un ensemble de réactions de réduction à la cathode.

La corrosion peut progresser sur toute la surface du métal de façon plus ou moins uniforme (si les surfaces anodiques sont de grande dimension), ou rester localisée sous forme de piqûres. Dans ce dernier cas, les surfaces du minéral mises ainsi en contact avec la solution augmente au cours du temps.

Pour l'oxydation électrochimique de la pyrite en phase aqueuse (Figure C1. 10), la phase minérale peut être assimilée à un réseau cristallin d'atomes dans lequel les électrons de conduction circulent entre des anodes et des cathodes de surface (Marchal, 1999) :

- (1) la pyrite est oxydée au niveau des sites anodiques, où la dissolution est effective et où des figures de corrosion se développent. Cette dissolution peut être schématisée par



- (2) Les électrons sont transférés via le réseau cristallin du minéral vers des sites cathodiques où les agents oxydants en solution (O_2 , Fe^{3+} ...) sont réduits. Ces réactions de réduction protègent ces zones de dépôts de composés oxydés peu solubles.

Par conséquent, les produits d'oxydation se trouvent en bordure des figures de corrosion.

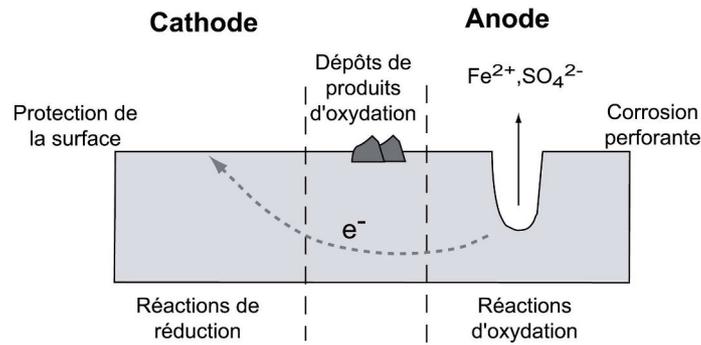


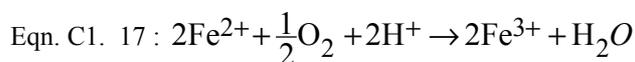
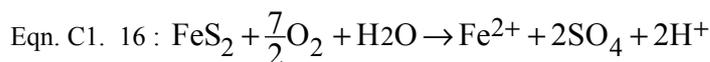
Figure C1. 10 : Schéma général du processus de corrosion électrochimique d'une surface de pyrite.

En revanche, le point de départ de la corrosion n'est pas clairement établi. Il semble admis que les défauts cristallins et zones de « faiblesse » du minéral présentent des sites préférentiels d'initiation de la corrosion. De même, les faces cristallines à terminaisons Fe ou S n'ont pas la même réactivité et ne favorisent *a priori* pas les mêmes types ou cinétiques de réaction (Guevremont *et al.*, 1998a; Hung *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2004; Rosso *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1997).

Conclusion sur la pyrite

La pyrite est un minéral du système semi-conducteur dont l'oxydation et la corrosion sont à la fois conditionnées par la densité surfacique de sites anodiques et cathodiques et par la circulation plus ou moins facilitée des électrons entre ces sites.

L'oxydation de la pyrite en milieu acide est couramment résumée par les trois réactions suivantes :



La plupart des modèles développés témoignent d'une dissolution non stœchiométrique de la pyrite incluant une lixiviation non congruente du fer ou du soufre et la formation des produits d'oxydation en surface du minéral (Toniazzo, 1998) :

- lixiviation préférentielle du fer, générant une couche résiduelle enrichie en soufre.
- lixiviation préférentielle du soufre, conduisant à la formation en surface de sulfates et d'oxy-hydroxydes de fer.

Cependant, ces processus d'oxydation de la pyrite sont décrits comme lents en conditions abiotiques et fortement accélérés par la présence de microorganismes tels que *Acidithiobacillus ferrooxidans*. La section suivante s'attachera donc à décrire le fonctionnement de ce système et l'influence des agents bactériens sur ce phénomène de corrosion minérale.

3 Le système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite en solution

3.1 Mécanisme d'oxydation

La bio-oxydation est largement utilisée dans le domaine industriel, les propriétés oxydatives de microorganismes comme *Acidithiobacillus ferrooxidans* étant utilisées pour la valorisation et la récupération de métaux (Cu, Au, Co). Cependant, ces processus peuvent avoir des conséquences néfastes sur l'environnement, en produisant des eaux très acides (Colmer and Hinkle, 1947; Druschel *et al.*, 2004; Ferris *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2004) ou en induisant des pollutions en métaux lourds et éléments nocifs tels que l'arsenic (Casiot *et al.*, 2003; Ferris *et al.*, 2004; Pagnanelli *et al.*, 2004; Yunmei *et al.*, 2004). Les processus bactériens intervenant dans l'oxydation de sulfures sont donc largement étudiés de manière globale à travers l'évolution des solutions ou des lixiviats (Edwards *et al.*, 2000).

La bactérie *A.f.* intervient essentiellement dans l'oxydation de la pyrite en accélérant la régénération des ions ferriques (Eqn. C1. 17), et par conséquent l'attaque électrochimique de la pyrite (Eqn. C1. 18). La pyrite peut par conséquent être oxydée par des bactéries ferro-oxydantes ne possédant pas de capacités à oxyder le soufre (Hansford and Vargas, 1999).

Tableau C1. 3 : Constantes cinétiques des équations globales d'oxydation de la pyrite (d'après Nordstrom & Southam, 1997). Les réactions (i), (ii) et (iii) correspondent respectivement à l'oxydation de la pyrite par l'oxygène dissous, l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques et l'oxydation de la pyrite par les ions ferriques.

Réaction	Conditions	
	Abiotique	Biotique
(i)	$2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	$8.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
(ii)	$2.10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$	$5.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$
(iii)	$2.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	

Les constantes cinétiques de ces réactions (Tableau C1. 3), obtenues en conditions biotiques et abiotiques, attestent de l'amplification du processus d'oxydation en présence de *A.f.* (Breed and Hansford, 1999; Fowler *et al.*, 2001; Holmes and Crundwell, 2000; McGuire *et al.*, 2001; Williamson and Rimstidt, 1994).

3.2 Oxydation directe *versus* indirecte

De manière plus générale, trois types de mécanismes sont souvent énoncés pour décrire l'oxydation de la pyrite par *A.f.*. Ils prennent en compte à la fois l'action des bactéries en suspension mais également celle des bactéries adhérentes à la surface minérale (Figure C1. 11):

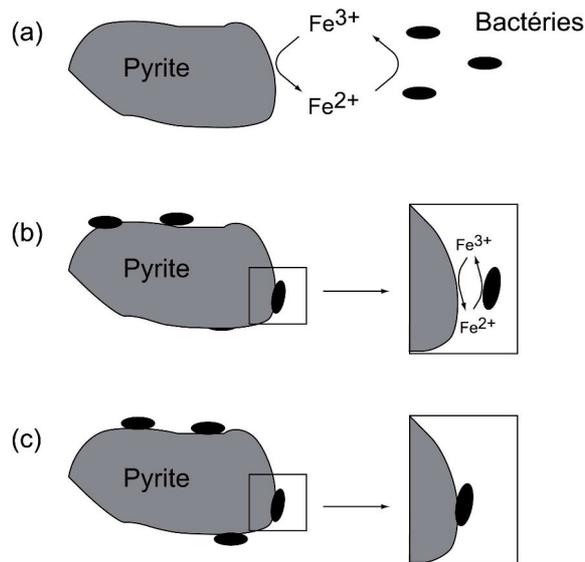


Figure C1. 11: Les différents mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* (modifié d'après Crundwell, 2003) . (a) mécanisme indirect; (b) mécanisme indirect avec contact ; (c) le mécanisme direct avec contact.

- (a) un mécanisme indirect : il fait intervenir les bactéries non adhérentes, qui oxydent les ions ferreux, présents en solution, en ions ferriques qui oxydent à leur tour le minéral.
- (b) un mécanisme indirect avec contact : les bactéries adhérentes oxydent les ions ferreux, présents à l'interface ou dans des exopolymères bactériens, en ions ferriques qui oxydent à leur tour le minéral.
- (c) un mécanisme direct par contact bactérien : les bactéries adhérentes au minéral oxydent directement le minéral, en produisant des enzymes spécifiques susceptibles de transporter les électrons jusqu'à leur chaîne respiratoire.

Tous ces mécanismes d'attaque bactérienne font intervenir différents agents oxydants (ions ferriques ou enzymes bactériennes) en couplant l'oxydation du fer et/ou du soufre de la pyrite à la réduction de l'oxygène dissous. Les produits d'oxydation formés peuvent, par le biais de la composition isotopique des sources des éléments incorporés, permettre de tracer ces voies oxydatives.

3.3 Composition isotopique de la solution

Toutes les études menées jusqu'à présent sur la bio-oxydation des sulfures ont montré une forte prédominance des sulfates en tant que produits d'oxydation de la pyrite. De nombreux travaux se sont par conséquent focalisés sur les compositions isotopiques en oxygène et en soufre de ces produits sulfatés (Bailey *et al.*, 2004; Krouse *et al.*, 1991; Mccready and Krouse, 1982; Taylor *et al.*, 1984; Van Everdingen and Krouse, 1985).

3.3.1 Géochimie isotopique du soufre et de l'oxygène (d'après Vidal, 1998 ; Clark & Fritz, 1997)

3.3.1.1 Les isotopes de l'oxygène et du soufre

Quasiment tous les éléments chimiques du tableau périodique de Mendeleïev (71 sur 92) possèdent plusieurs isotopes, c'est à dire des atomes possédant le même nombre de protons mais un nombre différents de neutrons. Parmi ces isotopes qui se différencient par leur masse atomique, on distingue :

- des isotopes **stables** pour lesquels le rapport N/Z est le plus constant (en général proche de 1 pour les éléments de faible masse atomique).
- des isotopes **radioactifs** dont les éléments fils sont appelés **radiogéniques**.
- des isotopes **cosmogéniques** issus du bombardement cosmique sur des isotopes stables de l'atmosphère ou des premiers centimètres de la surface terrestre.

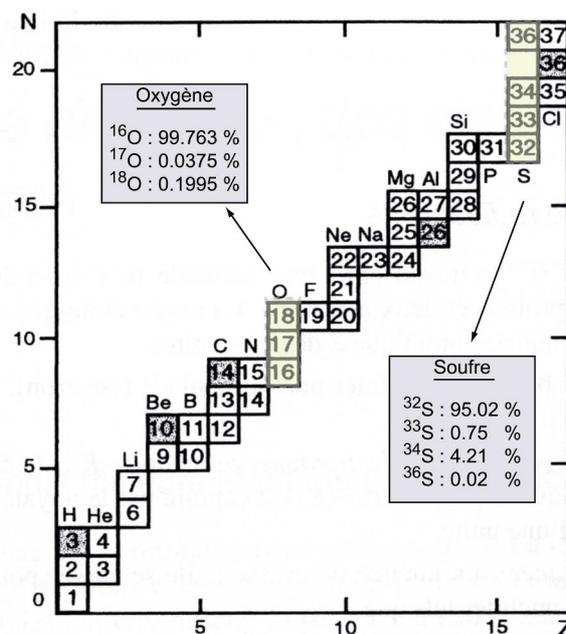


Figure C1.12 : Extrait de la carte des nucléides modifié d'après Vidal (1998) : répartition des différents isotopes stables ou radioactifs (en grisés) pour chaque élément en fonction du nombre de neutrons (N) et de protons (Z) de l'atome.

Les éléments analysés dans ce travail sont l'oxygène, de masse moléculaire 16, et le soufre, de masse moléculaire 32 dont les abondances relatives des divers isotopes sont détaillées Figure C1. 12.

3.3.1.2 Fractionnement isotopique (notation δ)

Lorsque la différence de masse entre deux isotopes d'un même élément n'excède pas quelques pour cent, et que l'on ne tient pas compte de l'influence de la radioactivité, les rapports isotopiques d'un élément sont considérés comme constants quelque soit l'âge ou la nature des matériaux. En revanche, si la différence de masse est importante (C, O, S...), des fractionnements isotopiques significatifs peuvent intervenir lors de processus chimiques, biologiques et géologiques. Le **fractionnement** entre deux isotopes d'un matériau est en général reporté à travers la notation δ , qui prend en compte le rapport entre ces deux isotopes, relativement à une valeur standard.

$$\delta = \left[\frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000 \text{ exprimé en } \text{‰}.$$

avec : $R_{\text{échantillon}}$ le rapport isotope lourd (rare) sur léger (abondant) de l'échantillon

R_{standard} le même rapport dans un matériau standard.

Un δ positif indique un enrichissement en isotope lourd par rapport au standard alors qu'un δ négatif indique un enrichissement en isotope léger par rapport à ce même standard (Tableau C1. 4).

Pour l'oxygène, le fractionnement isotopique sera ainsi exprimé par :

$$\delta^{18}\text{O} = \left[\frac{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{échantillon}}}{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000, \text{ le standard étant le SMOW : Standard Mean Ocean}$$

Water, rapport $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau de mer actuelle, souvent noté V-SMOW, la référence étant donné par l'IAEA (Vienne).

De la même manière, le fractionnement isotopique du soufre est donné par :

$$\delta^{34}\text{S} = \left[\frac{\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{échantillon}}}{\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000, \text{ le standard étant le V-CDT : Cañon Diablo Troilite,}$$

rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de la troilite FeS de la météorite Cañon Diablo du Meteor Crater (Arizona).

Tableau C1.4 : Principaux rapports isotopiques des éléments légers utilisés ainsi que les standards internationaux de référence correspondant.

Element	Rapport isotopique	Abondance naturelle %	δ	Standard de référence	
Hydrogène	D/H	0,015	δD	VSMOW	$1,5575 \cdot 10^{-4}$
Azote	$^{15}N/^{14}N$	0,367	$\delta^{15}N$	N ₂ atmosphérique	$3,613 \cdot 10^{-3}$
Carbone	$^{13}C/^{12}C$	1,11	$\delta^{13}C$	VPDB	$1,1237 \cdot 10^{-2}$
Oxygène	$^{18}O/^{16}O$	0,204	$\delta^{18}O$	VSMOW	$2,0052 \cdot 10^{-3}$
				VPDB	$2,0672 \cdot 10^{-3}$
Soufre	$^{34}S/^{32}S$	4,21	$\delta^{34}S$	CDT	$4,5005 \cdot 10^{-2}$

Le fractionnement isotopique existant entre deux corps est exprimé par $\Delta_b^a = \Delta_{a-b} = \delta_a - \delta_b$

3.3.1.3 Processus de fractionnement isotopique

On considère que la fréquence de vibration d'une molécule est dépendante de sa masse, $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$. Ainsi, une molécule constituée d'un isotope lourd possède une fréquence de vibration moindre que la même molécule contenant un isotope léger du même élément, et donc une réactivité moins importante. Ceci est traduit par les constantes cinétiques d'une réaction chimique faisant intervenir des isotopes lourds ou légers d'un élément. Des fractionnements isotopiques peuvent donc intervenir dans des réactions d'échanges isotopiques, de fractionnements cinétiques lors de processus bio-physico-chimiques ou de changement d'état par exemple.

▪ Echanges isotopiques

Lors d'une réaction à l'équilibre isotopique entre deux composés, les rapports de deux isotopes dans chaque composé sont constants à une température donnée. Cependant, cela ne signifie pas qu'ils sont identiques. Ces réactions sont soumises à la Loi d'Action de Masse. En général, lors d'une réaction d'échange isotopique, l'isotope lourd s'accumulera dans la phase à plus fort état d'oxydation. Ainsi, un sulfate est en général enrichi en ^{34}S relativement à un sulfure. De même, on admet que plus une phase est dense, plus elle comporte d'isotopes lourds. Ainsi, à l'équilibre, pour une molécule d'eau, on a $\delta^{18}O_{\text{glace}} > \delta^{18}O_{\text{liquide}} > \delta^{18}O_{\text{vapeur}}$.

On définit alors un **facteur de fractionnement à l'équilibre α** qui relie les compositions isotopiques de deux phases ou composés à l'équilibre :

$$\alpha_b^a = \alpha_{a-b} = \frac{R_a}{R_b} = \frac{\delta_a + 1000}{\delta_b + 1000}$$

avec : R_a le rapport isotope lourd sur léger de la phase a

R_b le rapport isotope lourd sur léger de la phase b

Ce facteur est calculé expérimentalement et est, sauf pour l'équilibre H/D, très proche de 1.

L'**enrichissement isotopique** d'une phase à une autre est ensuite défini par :

$$\varepsilon_{a-b} = \left[\frac{R_a}{R_b} - 1 \right] \times 1000$$

Quand α est assez faible, ε traduit la différence fractionnement isotopique des deux composés, $\varepsilon_{a-b} = 1000 \cdot \ln \alpha_b^a \approx \delta_a - \delta_b = \Delta_b^a$

Le facteur de fractionnement dépend la composition chimique des phases en jeu, de la structure cristalline, de la pression mais le facteur le plus influant est la température. Elle est lié à α selon la relation :

$$1000 \ln \alpha_b^a = \frac{A \times 10^6}{T^2} + B$$

avec : A et B des constantes déterminées expérimentalement.

Si l'on considère, par exemple, l'équilibre eau liquide/eau gazeuse à 25°C on peut

écrire : $\alpha_V^L(O) = \frac{R_L}{R_V} = \left(\frac{^{18}O/^{16}O} \right)_L = 1,0093$ pour un enrichissement ε de +9,3‰ entre la

phase liquide L et la phase vapeur V. Il en est de même pour l'incorporation d'atomes d'oxygène provenant de molécules d'eau dans une molécule de sulfate (Figure C1. 13) :

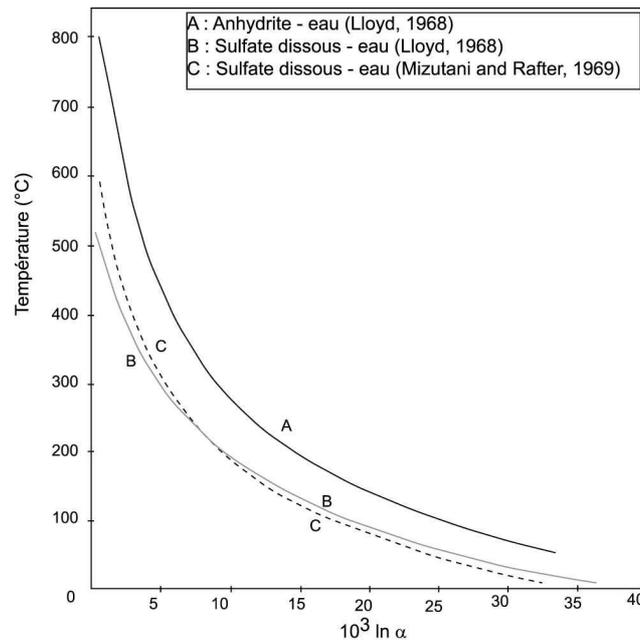


Figure C1. 13 : Facteur de fractionnement à l'équilibre pour les isotopes de l'oxygène entre des sulfates dissous et des molécules d'eau (d'après Mizutani & Rafter, 1969)

▪ Fractionnements cinétiques

Dans le cas de réactions non réversibles où l'équilibre chimique et isotopique n'est pas atteint, des fractionnements isotopiques peuvent intervenir. Ils sont dépendants des constantes cinétiques des réactions, donc des rapports des masses des isotopes et de leur énergie vibrationnelle. Ils sont en général plus importants, pour une réaction donnée, que ceux observés à l'équilibre. Un isotope léger est ainsi supposé réagir plus rapidement qu'un isotope lourd au cours d'une même réaction. Cette cinétique différente est à l'origine de ces fractionnements appelés cinétiques.

▪ Distillation de Rayleigh

Au cours d'un processus géochimique, une partition des isotopes d'un élément peut s'établir à partir d'un réservoir initial fini et quantifiable dont les éléments sont retirés au cours du temps (la taille du réservoir diminue) et qui ne réagit pas en retour avec le produit final. Une distillation de Rayleigh s'applique sous 3 conditions :

- le matériau est continuellement déplacé du réservoir 1 vers le réservoir 2.
- le fractionnement accompagnant ce déplacement est régi par α .
- α est constant au cours du temps et à chaque étape du processus.

En théorie, une distillation de Rayleigh ne peut intervenir que dans le cas de systèmes ouverts. Cependant, ces équations peuvent servir à décrire également des systèmes fermés

entre deux réservoirs finis au cours d'un processus où l'équilibre isotopique est constamment atteint.

Dans ces conditions, l'évolution de la composition isotopique du matériau résiduel du réservoir initial est décrit par :

$$R = R_0 \cdot f^{(\alpha-1)}$$

avec : R le rapport isotopique du réservoir de départ à l'instant t

R_0 le rapport isotopique initial du réservoir de départ

α le facteur de fractionnement réactif-produit

f la fraction de réactif restant.

En simplifiant cette équation pour la ramener en notation delta, on obtient :

$$\delta_{\text{fraction restante}} = \delta_0 + \varepsilon_{\text{produit-réactif}} \cdot \ln f$$

Ainsi, au cours de la réaction, le réservoir initial s'enrichit si ε est positif (ou s'appauvrit si ε est négatif) de manière exponentielle, ce qui constitue une caractéristique de la distillation de Rayleigh.

La composition isotopique du produit peut également être déterminée au cours du temps selon :

$$R_{\text{produit}} = R_0 \cdot \frac{1-f^\alpha}{1-f}$$

$$\text{ou } \delta_{\text{produit}} = (\delta_0 + 1000) \frac{1-f^\alpha}{1-f} - 1000$$

Dans le cas de l'évaporation d'un réservoir d'eau liquide (Figure C1. 14), on peut écrire :

$$\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{eau liquide}} = \left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{eau initiale}} \cdot f^{\left(\alpha_{\text{vapeur-liquide}} - 1 \right)}$$

$$\text{ou } \delta^{18}\text{O}_{\text{eau liquide}} = \delta^{18}\text{O}_{\text{eau initiale}} + \varepsilon^{18}\text{O}_{\text{vapeur-liquide}} \cdot \ln f$$

avec $\varepsilon = -8.9\%$ à 30°C .

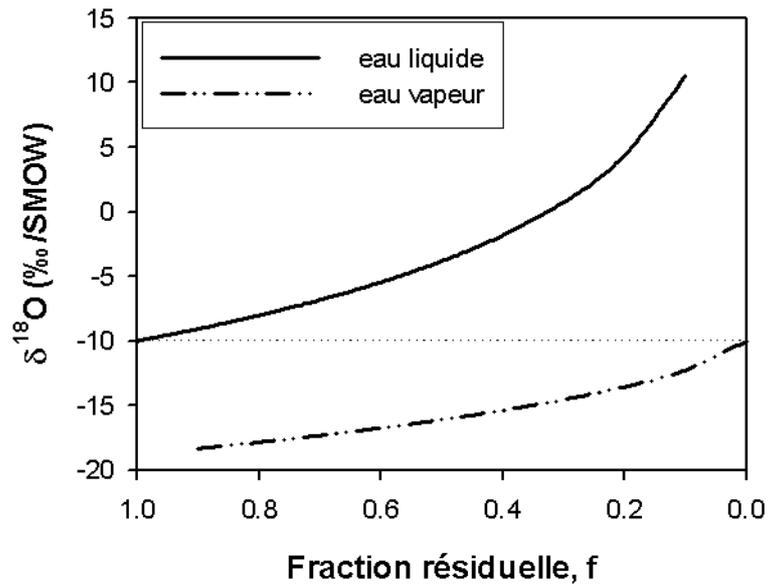


Figure C1. 14 : Distillation de Rayleigh des isotopes de l'oxygène au cours d'un phénomène d'évaporation d'un réservoir fini d'eau liquide de $\delta^{18}\text{O}$ initial à -10‰ .

Les processus d'évaporation/condensation du cycle de l'eau sur Terre traduisent à grande échelle ce phénomène (Figure C1. 15).

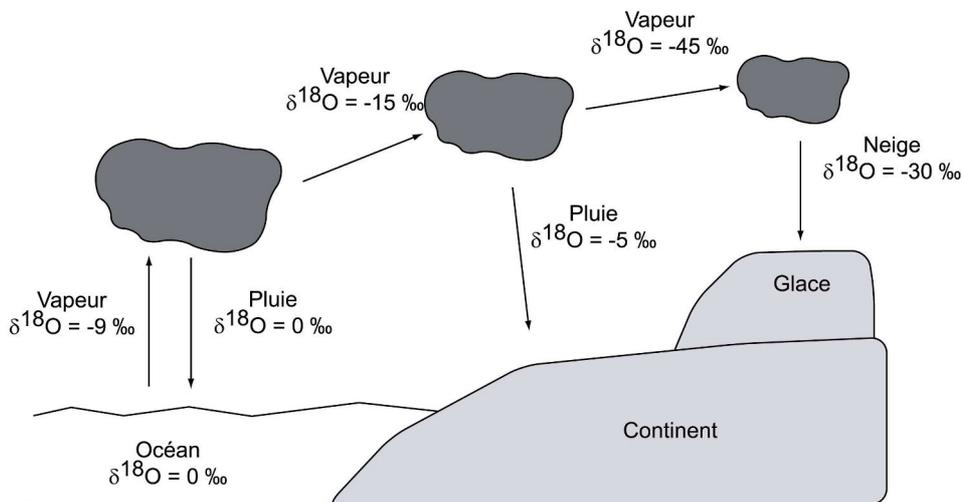


Figure C1. 15 : Phénomène de distillation de Rayleigh sur les isotopes de l'oxygène entre différents réservoirs d'eau au cours des cycles de condensation/vaporisation.

3.3.1.4 Les fractionnements biologiques

Des fractionnements cinétiques sont souvent associés aux processus biologiques en raison du caractère unidirectionnel des réactions. Les cinétiques des réactions mettant en jeu

des isotopes légers étant plus rapides, et les organismes tendant à accélérer des processus abiotiques généralement plus lents, les fractionnements isotopiques entre réactifs et produits sont alors plus évidents. Les produits finaux bio-induits sont alors souvent enrichis en élément léger de par ces effets cinétiques. C'est notamment le cas lors de l'incorporation d'éléments dans l'organisme lui-même au cours de réactions métaboliques (Coleman *et al.*, 2003; Furnes *et al.*, 2001). Cependant, la variabilité de ces fractionnements est souvent très importante en raison de la multitude de facteurs intervenant : concentration des substrats initiaux, taux de réactions, conditions environnementales et espèce en question si des réactions métaboliques sont en jeu.

En revanche, si le réservoir initial est suffisamment conséquent, si les réactions ne sont pas trop rapides et ont lieu dans un temps suffisamment court, les processus biologiques peuvent également être décrits par des équations de Rayleigh.

3.3.1.5 Les grands réservoirs terrestres d'oxygène et de soufre.

L'oxygène et le soufre, deux éléments principaux de l'environnement terrestre, sont impliqués dans des processus biogéochimiques à grande échelle.

L'oxygène

Le cycle de l'oxygène libre O₂ sur Terre est un des cycles géochimiques majeurs. Il est en grande partie contrôlé par les océans et est très fortement lié à la biosphère. L'oxygène est en effet un des principaux constituants de la matière vivante (32.5% pour les bactéries) avec le carbone (48.8%), l'azote (11.4%) et l'hydrogène (7.3%) (Edeline, 1993). Son transfert entre la biomasse continentale ou marine est très rapide notamment en raison des processus de photosynthèse et de respiration aérobie. Son cycle est ainsi très fortement couplé à ceux du carbone (organique ou non) et de l'eau (Figure C1. 16).

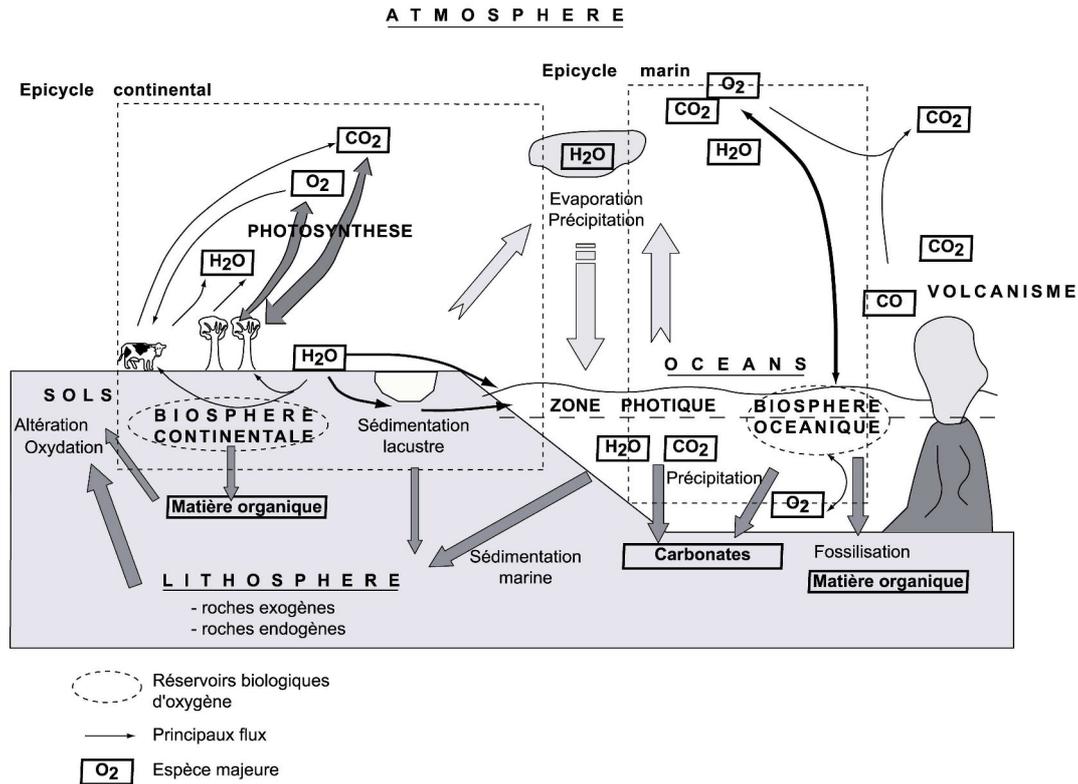


Figure C1. 16 : Cycle de l'oxygène libre couplé au cycle du CO₂ et H₂O.

L'oxygène est utilisé pour la respiration aérobie de divers organismes et dans les processus d'oxydation (cycle du fer par exemple). Cette forte implication des atomes d'oxygène dans de nombreuses réactions, notamment biologiques, a un impact sur la compartimentation isotopique des grands réservoirs terrestres. Ainsi, l'oxygène atmosphérique, en grande partie d'origine biotique, présente un enrichissement isotopique de +23,5‰ (Figure C1. 17) par rapport à la composition isotopique de l'océan, autre grand réservoir pris comme référence ($\delta^{18}\text{O} = 0\text{‰}$).

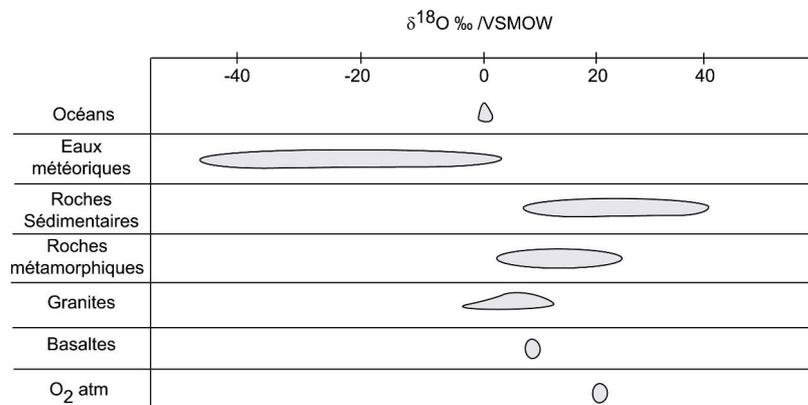


Figure C1. 17 : Composition isotopique en oxygène $\delta^{18}\text{O}$ de différents compartiments terrestres et marins (modified from Clark and Fritz, 1997).

Le soufre

C'est un élément très abondant sur Terre, ubiquiste et nécessaire à la vie, même s'il n'entre que très peu dans la composition globale des êtres vivants (moins de 1%). Issu du dégazage du manteau terrestre, il est transféré aux organismes vivants (à l'exception des sulfo-oxydants) et incorporé principalement dans la méthionine et la cystéine, deux acides aminés.

Le soufre se trouve principalement sous forme de sulfates et de sulfures dans deux grands réservoirs que sont les roches (dépôts volcaniques ou roches sédimentaires et évaporites) et les océans. On distingue :

- Une boucle rapide : les sulfates marins sont émis dans l'air et réincorporés dans l'océan, après condensation, par les pluies et rivières.
- Une boucle géologique lente : les sulfates issus de l'érosion continentale sont transportés via les rivières vers les grands réservoirs géologiques où le soufre est piégé dans les sédiments, sous la forme de sulfures métalliques ou d'évaporites sulfatées.

Le cycle du soufre (Figure C1. 18) est également très marqué par les réactions microbiennes (sulfato-réduction essentiellement) et est de plus en plus influencé par les émissions anthropiques (SO_2 issu de la combustion des énergies fossiles).

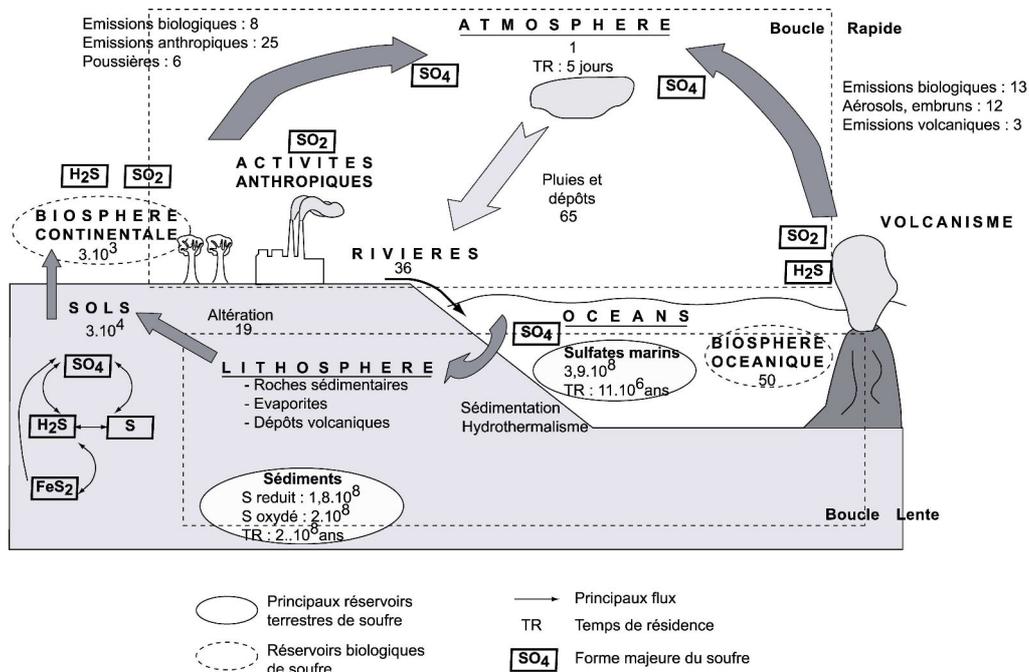


Figure C1. 18 : Cycle majeur du soufre sur Terre associé aux différents grands réservoirs. Les valeurs sont données en millions de tonnes.

Le rapport isotopique le plus souvent étudié est le $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ($\delta^{34}\text{S}$) qui augmente lors de l'oxydation de sulfures (aqueux) en sulfates et inversement, qui diminue lors de la réduction des sulfates en particulier lors de processus bio-induits (Figure C1. 19).

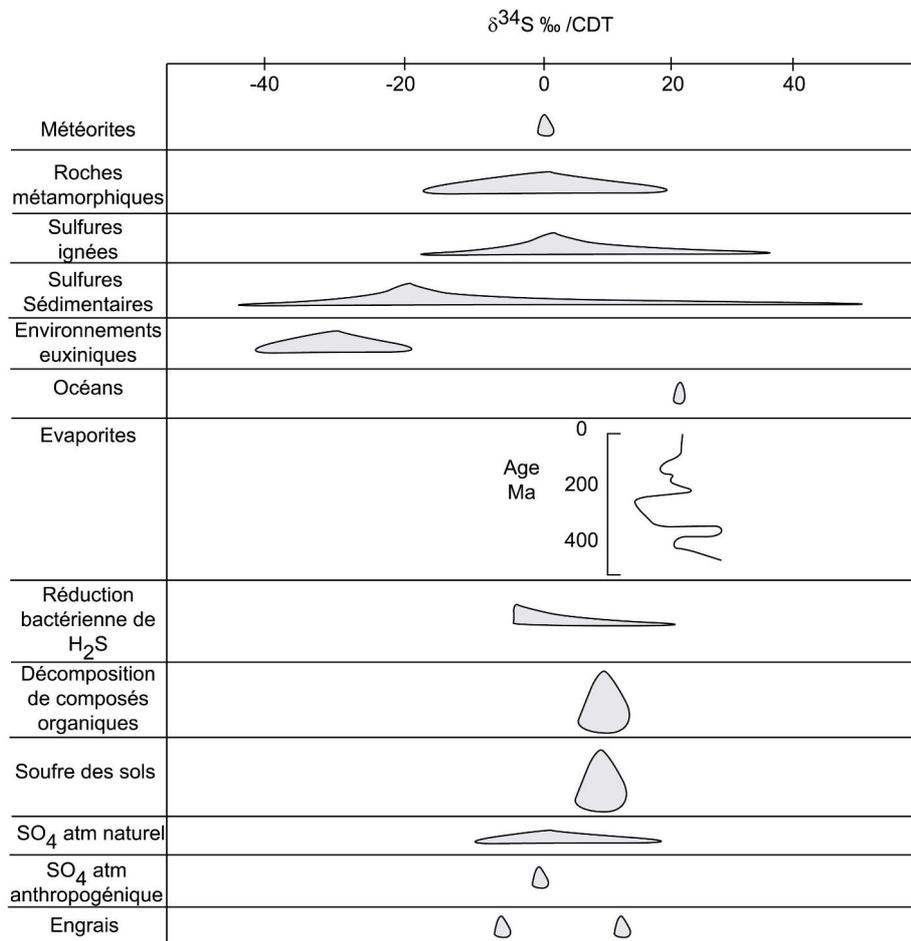


Figure C1. 19 : Composition isotopique en soufre $\delta^{34}\text{S}$ de différents compartiments (d'après Thode in Krouse & Grinenko,).

Couplage des cycles de l'oxygène et du soufre :

L'oxygène et le soufre étant deux éléments abondants sur Terre et fortement liés à l'activité biologique, ils sont très facilement remaniés et transportés d'un compartiment (biologique ou géologique) à un autre. Les sulfates, considérées tout particulièrement dans cette étude, peuvent être aussi bien caractérisés par leur composition isotopique en oxygène qu'en soufre (Figure C1. 20). Les fractionnements isotopiques du soufre étant de moins grande ampleur que ceux de l'oxygène (plus léger), le $\delta^{34}\text{S}$ d'une molécule de sulfate est en général utilisé pour retracer l'origine de celle-ci (roches sédimentaires ou ignées). En revanche, sa composition isotopique en oxygène sera plus représentative d'une voie oxydante

permettant l'incorporation d'atomes d'oxygène provenant de sources diverses (O_2 atmosphérique ou H_2O par exemple).

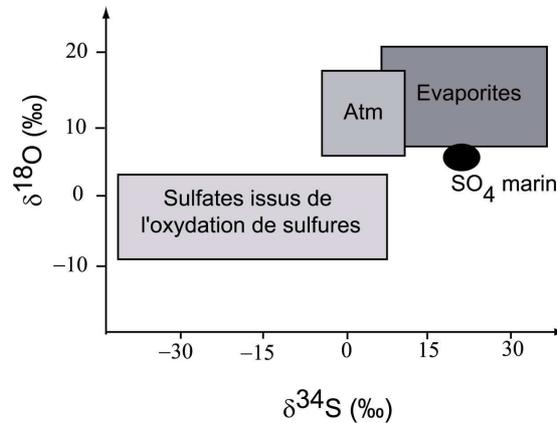


Figure C1. 20 : Composition isotopique de molécules de sulfates dans divers compartiments terrestres en soufre ($\delta^{34}S$) et oxygène ($\delta^{18}O$).

Pour une étude plus précise des sulfates issus de l'oxydation de sulfures, il est nécessaire de détailler plus précisément l'état des connaissances sur les compositions isotopiques en oxygène et soufre de ces molécules.

3.3.2 Composition isotopique (O,S) des sulfates issus de la (bio)oxydation de la pyrite.

McCready & Krouse (1982) et Taylor et al., (1984) ont montré que l'oxydation de composés soufrés en solution par voie biotique ou abiotique pouvait entraîner des fractionnements isotopiques du soufre. Cependant, l'oxydation en conditions similaires de sulfures de fer tels que la pyrite engendre un faible $\Delta^{34}S$ entre sulfates et pyrite, difficilement mesurable (Bailey *et al.*, 2004; Krouse *et al.*, 1991; Toran and Harris, 1989). Le fractionnement du soufre entre la source (pyrite) et les produits d'oxydation (sulfates) ne peut donc pas réellement être utilisé comme traceur de voie oxydante ou pour différencier les processus biotiques et abiotiques, mais plutôt comme un traceur de source de soufre dans les résidus d'altération.

L'oxygène étant plus léger que le soufre, les fractionnements isotopiques (cinétiques) observés sont souvent assez importants et permettent en général de caractériser des réactions biologiques par rapport aux processus purement abiotiques. Dans le cas de l'oxydation de la pyrite, on peut noter qu'il existe, au contraire du soufre, plusieurs sources possibles d'incorporation de l'oxygène dans les sulfates finaux : les molécules d'eau H_2O et le

dioxygène atmosphérique dissous $O_{2,atm}$ dont les $\delta^{18}O$ sont caractéristiques ($\delta^{18}O_{H_2O}$ de -5‰ à -15‰ et $\delta^{18}O_{O_2} = +23.5‰$) et facilement différenciables (Kroopnick and Craig, 1972). Les réactions chimiques et mécanismes d'oxydation précédemment décrits (Eqn. C1. 16 et Eqn. C1. 18) indiquent également que ces deux sources d'oxygène sont compétitives et pourraient donc permettre de distinguer les différentes voies oxydantes. Ainsi, d'après les stœchiométries de ces réactions, les sulfates formés lors de la réaction d'attaque moléculaire de la pyrite (Eqn. C1. 16) incorporent 87,5% de leur oxygène provenant de l'oxygène dissout et 12,5% des molécules d'eau. Au contraire, des sulfates issus de la réaction électrochimique (Eqn. C1. 18) contiennent de l'oxygène provenant entièrement des molécules d'eau.

D'autre part, à cet effet « source d'oxygène », viennent s'ajouter des fractionnements cinétiques entre les sulfates et les sources d'oxygène (H_2O ou O_2), accentués par la présence de bactéries dans le milieu (Tableau C1. 5).

Tableau C1. 5 : Synthèse bibliographique des fractionnements biotiques et abiotiques lors de l'oxydation de la pyrite déterminés expérimentalement.

Oxydation	* $\Delta^{18}O_{SO_4-H_2O}$ (‰)	$\Delta^{18}O_{SO_4-O_2}$ (‰)	$\Delta^{34}S_{SO_4-Pyrite}$ (‰)	Références Bibliographiques	
Biotique (A.f.)	L		de -1.7 à +1.4	Nakai & Jensen (1964) Kaplan & Rittenberg (1964)	
	L**		-2	Toran & Harris (1989)	
	L		-11.4	Lloyd (1967)	
	L		-1.7	Taylor et al., (1984)	
	L		-11.12	Taylor et al., (1984)	
	L	de +8.9 à +10.9		Taylor et al., (1984)	
	L	de +17.6 à +18.1		Taylor et al., (1984)	
	N	2.6		Van Everdingen & Krouse (1985)	
	N			Sakai (1957)	
	N			-4.5	
Abiotique	L	0	-8.7	Lloyd (1967)	
	L		-4.3	Lloyd (1967)	
	L	de +4.1 à +6.2	-4.6	Taylor et al., (1984)	
	L	de +9.5 à +12.5		Taylor et al., (1984)	
	N			-3.8	McLimans (1977)
	N	+9.5			Taylor et al., (1984)
	N	+7.5			Taylor et al., (1984)

* L : Expériences en laboratoires

N : Observations en milieu naturel

** Mélange de *A.f.*, *T. neopolitanus* et *T. intermedius*

Le $\delta^{18}O$ des sulfates dissous formés lors de l'oxydation de la pyrite peut se déterminer (Van Everdingen and Krouse, 1985) selon :

$$\text{Eqn. C1. 19 : } \delta^{18}O_{SO_4} = x \cdot (\delta^{18}O_{H_2O} + \Delta_{SO_4-H_2O}) + (1-x) \cdot [0.875 \times (\delta^{18}O_{O_2} + \Delta_{SO_4-O_2}) + 0.125 \times (\delta^{18}O_{H_2O} + \Delta_{SO_4-H_2O})]$$

où x représente la proportion de sulfates formés par l'équation C1.18 et $\Delta_{SO_4-H_2O}$ et $\Delta_{SO_4-O_2}$ les fractionnements cinétiques associés entre les sulfates et l'eau ou l'oxygène dissout

respectivement. La Figure C1. 21 montre la relation existant entre les compositions isotopiques de l'eau du milieu et les sulfates formés en fonction de la fraction de sulfates formés par les équations C1.16 et C1.18 (identifiée ici par $H_2O=x$).

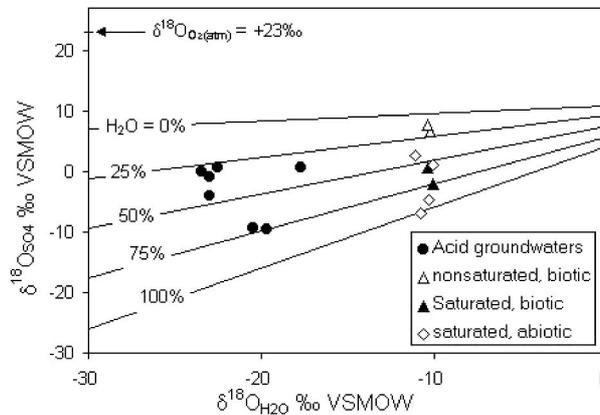


Figure C1. 21 : Liaison entre le $\delta^{18}O_{SO_4}$ et le $\delta^{18}O_{H_2O}$ (d'après Van Everdingen and Krouse, 1985)

Les échanges isotopiques entre les sulfates dissous et les molécules d'eau du milieu étant très lentes, même à pH acide (Chiba and Sakai, 1985; Chiba *et al.*, 1981; Lloyd, 1968), les sulfates formés peuvent donc être considérés comme de bons indicateurs des voies oxydantes.

Les isotopes de l'oxygène des sulfates dissous issus de l'oxydation de la pyrite permettent ainsi de dégager les voies oxydantes et les chemins réactionnels empruntés lors du processus de lixiviation. Cependant, ces données globales de solution ne suffisent pas à caractériser la diversité et l'hétérogénéité du processus (intermédiaires réactionnels, mécanismes de surface) à l'interface bactéries/sulfures. De plus, les natures chimiques et isotopiques des lixiviats ne peuvent pas constituer des biosignatures pérennes. En revanche, les surfaces des grains de pyrite, où les principales transformations et réactions chimiques ont lieu, constituent des objets de travail plus fiables pour la recherche de biosignatures. Or, les différents types de propriétés (mécaniques, électriques, thermodynamiques...) y sont fortement modifiées et ne peuvent être décrites finement par des études globales en solution. Il est ainsi nécessaire de prendre en compte l'hétérogénéité de l'interface bactérie/minéral et de préciser les processus de surface d'un point de vue morphologique, chimique et isotopique pour essayer de dégager des potentielles traces de vie susceptibles d'être conservées au cours du temps et de constituer des biosignatures.

Partie II : L'interface *Acidithiobacillus ferrooxidans/pyrite*

Bien que les lixiviats donnent des renseignements sur les processus généraux de la bio-oxydation de la pyrite, ils ne permettent pas de comprendre le fonctionnement du système à échelle micrométrique, c'est à dire à l'échelle de la bactérie. La surface minérale, constituant à la fois un lieu de vie pour les bactéries (microniche écologique) et une interface où se déroulent les réactions d'oxydation, est le lieu clef des processus d'altération. Une meilleure compréhension de ces mécanismes interfaciaux passe, par conséquent, par une étude statistique et approfondie de la surface minérale basée sur l'identification et la localisation des sites d'adhésion et d'activité bactérienne, ainsi que des sites réactifs de la phase minérale.

Ces sites actifs sont-ils confondus ou clairement distincts ? Quels sont les paramètres physico-chimiques ou biologiques qui les contrôlent ? En d'autres termes, y a-t-il un déterminisme particulier dans les processus d'interactions bactérie/minéral, ou une prédisposition du minéral ou de la bactérie permettant d'identifier ces sites ?

1 L'adhésion bactérienne : la liaison *sensu stricto*.

L'adhésion d'un microorganisme sur une surface minérale peut être décrite de manière thermodynamique (en termes d'équilibre bactéries/surface) ou mécanistique incluant les propriétés intrinsèques des cellules bactériennes et du support d'adhésion. Cette adhésion, qu'elle soit réversible ou non, se déroule en général selon trois phases (Toniazzo, 1998):

- une « phase passive » gouvernée par des processus physico-chimiques.
- une « phase active » avec production de molécules organiques biologiques (biopolymères) pouvant participer au renforcement de la liaison.
- une « phase dynamique » correspondant à une colonisation du support par les cellules adhérentes (division cellulaire).

A.f. montre en général une forte tendance à s'adsorber sur des surfaces minérales, en particulier sur de la pyrite (Dziurla, 1995; Meline, 1995) en se fixant par l'une des extrémités de la cellule (Blake *et al.*, 1995). De nombreux facteurs comme la charge de surface semblent influencer l'interaction initiale entre la bactérie et le minéral (Karavaiko *et al.*, 1995). Des taux de recouvrement surfacique ont été déterminés par des méthodes indirectes : cellule de Thoma, nombre le plus probable (NPP), chromatographie... et indiquent des taux de

recouvrement moyen sur pyrite de 2 à 3% pour des concentrations de bactéries en suspension voisines de $10^7 - 10^8$ bactéries.mL⁻¹. Ces adsorptions sont caractérisées par une valeur-seuil supérieure au-delà de laquelle l'ajout de bactéries dans le milieu n'entraîne plus de fixation supplémentaire des cellules sur le minéral ; un plateau de saturation est atteint. D'autre part, une partie des bactéries adhérentes, se désorbent assez difficilement en raison de la présence de biopolymères renforçant l'adhésion (Dziurla, 1995; Meline, 1995; Monroy *et al.*, 1994). Meline (1995) décrit cette adhésion de *A.f.* sur la pyrite comme : (1) forte, avec une nette diminution du nombre de bactéries en solution en 30 minutes, (2) significative pendant la phase de latence où 90% des bactéries se fixent et (3) précédant la lixiviation de la pyrite.

Cependant, la seule détermination du taux d'adhésion bactérienne ne permet pas conclure sur la nature exacte des liaisons développées. Celles-ci ne peuvent *a priori* être imputées à des charges de surface bactérienne, celles-ci étant quasi-nulles pour *A.f.* ou légèrement positives à pH inférieur à 2 (Dziurla *et al.*, 1998). La réalisation d'isothermes d'adsorption (Meline, 1995) a permis de montrer que les liaisons bactérie/minéral pouvaient être pour partie de nature hydrophobe. Ainsi, en présence d'un support hydrophile tel que le quartz, l'adhésion bactérienne est moindre que celle sur un support hydrophobe (porapak). Cependant, l'affinité de *A.f.* pour des surface de pyrite est encore supérieure à celle du support hydrophobe. D'autres paramètres, comme les sites spécifiques développés en surface de la pyrite (défauts cristallins particuliers, phases superficielles oxydées hydrophobes...) semblent jouer un rôle non négligeable sur l'adhésion bactérienne. De plus, des bactéries *A.f.* préalablement adaptées à un milieu riche en fer, et ayant donc développé un assemblage protéique membranaire adéquat, présentent une meilleure affinité pour les surface de pyrite que celles adaptées à un milieu soufré. Ainsi, l'expression des protéines périplasmiques, transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire de la bactérie, participant à l'oxydation du fer semble favoriser l'adhésion de *A.f.* sur des pyrites. La constitution protéique membranaire de la bactérie (chaîne d'oxydation du fer ou du soufre) joue un rôle non négligeable dans l'adhésion bactérie/minéral.

Enfin, des expériences réalisées par Méline (1995) sur deux pyrites pures différentes montrent que la quantité de bactéries fixées ne reflètent pas l'affinité de cette bactérie pour un substrat mais le nombre de sites d'adhésion disponibles.

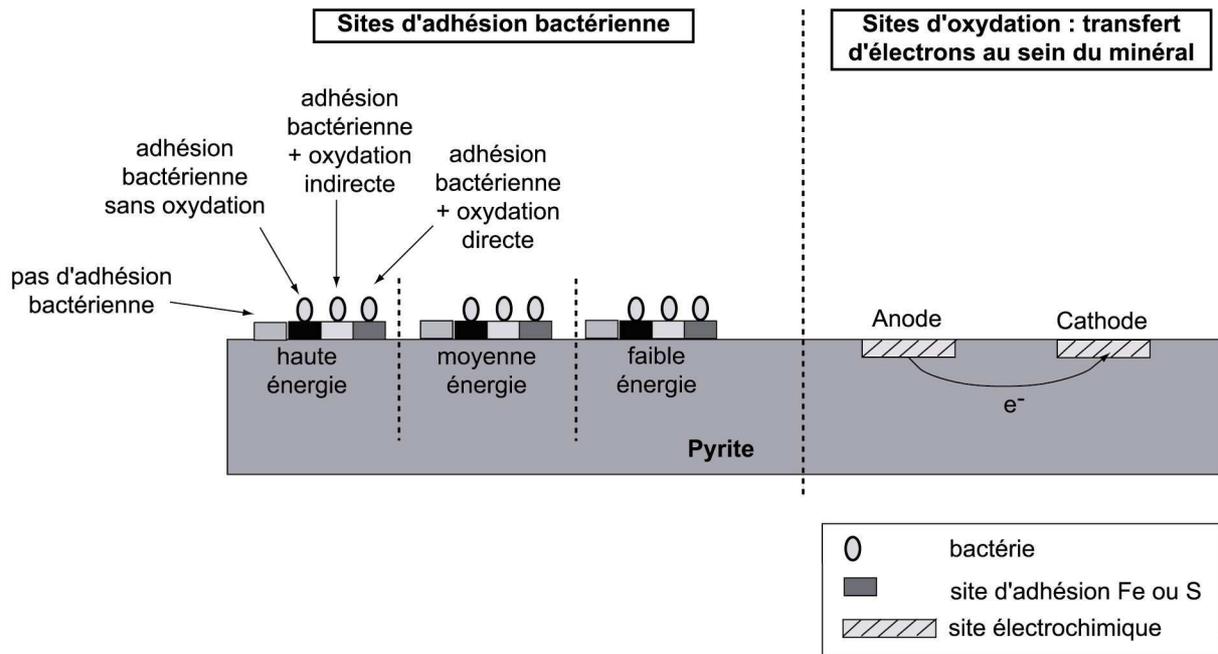


Figure C1. 22 : Schéma des interactions bactéries/minéral en surface du minéral. Notions de sites d'adhésion, d'activité et d'oxydation (d'après Méline, 1995 ; Mustin, 1992).

La distribution bactérienne en surface d'un minéral ne peut donc être considérée comme aléatoire. Elle dépend des conditions physico-chimiques du minéral, de sa nature semi-conductrice, de ses sites de surface à énergie variable mais également des propriétés de la paroi bactérienne. Tous ces paramètres seront donc à prendre en considération dans la suite de ce travail pour permettre d'établir le lien entre site minéral électrochimique et site d'adhésion bactérienne (Figure C1. 22).

2 La couche d'oxydation.

2.1 Nature des composés de surface.

Les équations globales précédemment décrites (Eqn. C1. 16 et Eqn. C1. 18) traduisent la formation du composé sulfaté majoritaire, quelque soit l'intermédiaire mis en jeu (thiosulfate ou polysulfure). La surface du minéral peut enregistrer ces stades d'oxydation incomplète et conserver ces intermédiaires réactionnels. Des observations *in situ* à échelle micrométrique, principalement par spectroscopie Raman, rendent compte d'une forte hétérogénéité chimique des composés d'oxydation de surface, non reflétée par les bilans globaux obtenus dans les solutions de lixiviation (Blight *et al.*, 2000; Fowler *et al.*, 2001; McGuire *et al.*, 2001; Toniazzo, 1998). Cette couche d'oxydation apparaît mono- ou polyphasiques avec différents mélanges de sulfates, polysulfures, soufre élémentaire S_8 ou oxy-hydroxydes de fer. Une quantification de ces composés de surface a également été

réalisée par dosages sélectifs en spectroscopie d'émission atomique (ICP-AES) et en chromatographie gazeuse (GC-MS). Le tableau suivant résume les connaissances actuelles sur la nature chimique et l'expression des produits d'oxydation, biologique ou abiotique, en surface d'un grain de pyrite.

Tableau C1. 6 : Nature chimique et occurrence (en mol.g⁻¹ de minéral) des produits d'oxydation en surface de deux pyrites.

Nature des phases de surface	Pyrite hydrothermale	Pyrite volcano-sédimentaire
FeOOH	1,25	0,53
Fe ₂ (SO ₄) ₃	5,7	2,85
FeSO ₄	ε	5,7
S ₈	0,14	0,02

Toniazzo (1998) a également montré que la proportion relative des différentes espèces pouvait dépendre des propriétés cristallographiques et électrochimiques du minéral. Une pyrite globalement plus réductrice (semi-conducteur de type n) développe préférentiellement des sulfates ferreux en surface. De plus, des études réalisées en spectroscopie Raman laisseraient entrevoir un lien entre le type de face cristalline exprimée par les grains minéraux et la nature des produits d'oxydation qui s'y développent. Ainsi, les liens existants entre les produits d'oxydation du soufre et du fer et les propriétés spécifiques de la surface minérale sur laquelle ils cristallisent semblent assez complexes et restent à définir.

2.2 Distribution spatiale des composés de surface (Toniazzo, 1998).

Les phases de surface observées par spectroscopies Raman et de photoélectron X (XPS) montrent une hétérogénéité chimique importante à échelle sub-micrométrique et nanométrique. Ces observations ont été complétées grâce à la microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) et à des modélisations de surfaces de pyrites oxydées par le géomodeleur gOcad. La visualisation tridimensionnelle de la « couche » d'oxydation et la répartition des principaux produits formés en surface fournit une base de réflexion sur l'organisation de cette interface à échelle micrométrique.

La répartition des composés de surface présente deux hétérogénéités majeures : (1) l'une liées à leur morphologie et (2) l'autre liée à leur distribution spatiale. La couche d'oxydation s'organise, en effet, en « bosses » d'extension latérale et verticale variables (quelques centaines de nanomètres à quelques microns) qui ne recouvrent pas la surface de la pyrite de manière homogène (Figure C1. 23). Certaines zones présentent ainsi une forte

densité de composés de surface (toujours de taille variable) alors que d'autres en sont quasiment démunies. Après reconstruction numérique des images obtenues en AFM, une étude statistique à l'aide de variogrammes a été menée permettant d'affiner la détermination des paramètres géométriques (surface, volume, hauteur...) et de distribution des composés de surface.

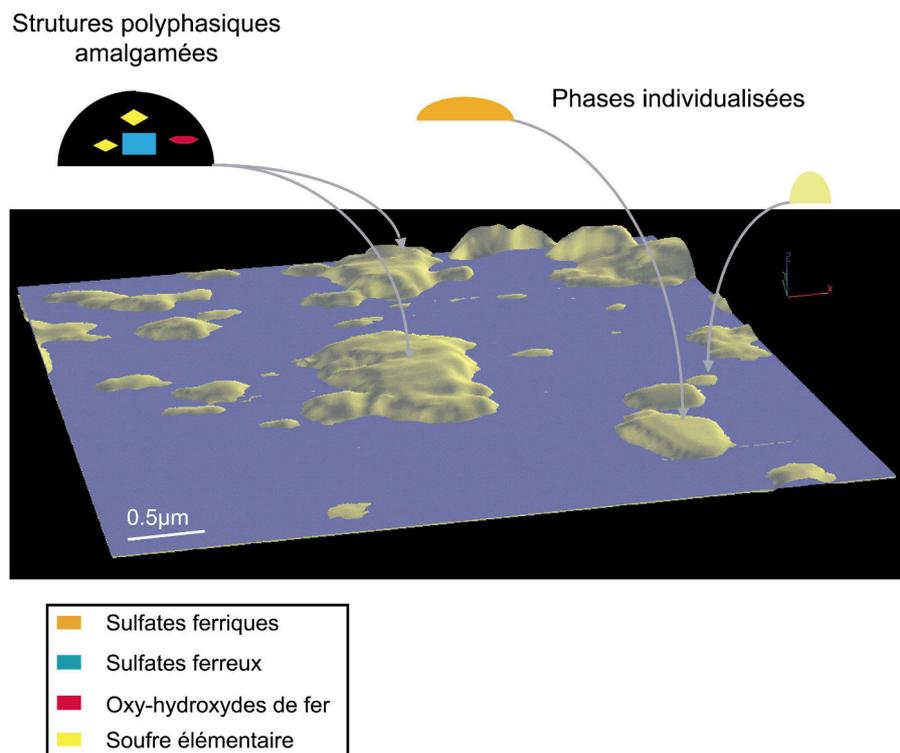
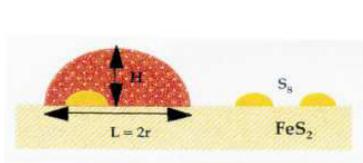


Figure C1. 23 : Hétérogénéité de distribution des composés de surface d'une pyrite oxydée (d'après Toniazzo, 1998)

Toutefois, aucun modèle de distribution précise des produits d'oxydation de surface de la pyrite n'a pu être établi, l'anisotropie de répartition des composés étant apparemment principalement liée aux paramètres structuraux du minéral sous-jacent. En effet, deux pyrites naturelles pures (reprises dans cette étude) oxydées dans des conditions similaires se distinguent plus par une organisation différente de la couche d'oxydation que par des différences significatives dans la nature chimique ou la quantité de phases oxydées.

La morphologie des « bosses » formées par les composés de surface semble, quant à elle plus constante, et révèle sûrement un lien étroit entre la nature du composé formé et la morphologie de la bosse qu'il constitue (Tableau C1. 7). Les « gros piliers » sembleraient correspondre aux sulfates de fer plus ou moins hydratés associés à des oxy-hydroxydes de fer, alors que les plus petits seraient constitués de soufre élémentaire.

Tableau C1.7 : Morphologies des principaux types de « bosses » formant la couche d'oxydation de surface de pyrites naturelles bio-oxydées (d'après Toniazzo, 1998).

	L (nm)	H (nm)	S (μm^2)	V (μm^3)	Ss (m^2/g^{-1})
Grandes bosses	1000	200	0,827	0,083	11
	800	200	0,628	0,054	11,5
	800	100	0,534	0,026	20,8
	600	100	0,314	0,015	21,4
Petites bosses	200	100	0,063	0,002	30
	200	50	0,039	0,001	46,2
	100	50	0,016	>0,001	60

Toniazzo (1998) a ainsi montré une très forte hétérogénéité spatiale des surfaces de pyrites oxydées. Il semble donc indispensable de tenir compte de cette hétérogénéité pour comprendre et affiner les interactions bactéries/minéral et y trouver une signature pertinente de l'activité biologique.

Comment les bactéries réagissent-elles à ces variations et états de surface ? Et quelles conséquences cela a-t-il lors des processus de bio-corrosion de surface ? Y-a-t-il un lien entre l'adhésion bactérienne, le développement des phases superficielles et le développement des figures de corrosion ?

L'utilisation de techniques d'observations *in vivo* permettant la co-localisation des bactéries et de la microtopographie de surface comme la microscopie confocale à balayage laser (CLSM pour Confocal Laser Scanning Microscopy) développée lors de cette étude peut permettre d'apporter des éléments de réponse précis à ces questions.

2.3 Formation d'oxydes de fer lors de la bio-oxydation de la pyrite par A.f. à pH très acide

Aujourd'hui, parmi les produits d'oxydation de la pyrite à pH acide détectés en surface des minéraux, la présence d'oxydes de fer est sans doute la plus débattue. En effet, en deçà de pH 3 et aux potentiels redox rencontrés lors de ces lixiviations, l'espèce majoritaire du fer est l'ion Fe^{2+} . Toutefois, la présence en surface d'oxy-hydroxydes de fer lors d'attaque biologique de grains de pyrite en conditions très acides (Blight *et al.*, 2000; Toniazzo, 1998) ou lors d'une simple oxydation à l'air (Buckley and Woods, 1987) est indéniable.

La précipitation de ces oxydes en conditions acides est favorisée par une modification des conditions physico-chimiques locales à proximité des bactéries. La présence d'un biofilm bactérien pourrait permettre une surconcentration locale d'ions ferriques facilitant la précipitation d'oxy-hydroxydes de fer (Blight *et al.*, 2000). Ces composés pourraient

également servir de précurseur à la formation de jarosite (sulfate de fer ferrique hydroxylé : $KFe^{3+}(SO_4)_2(OH)_6$) généralement présente en quantité non négligeable près des cellules de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en présence de pyrite.

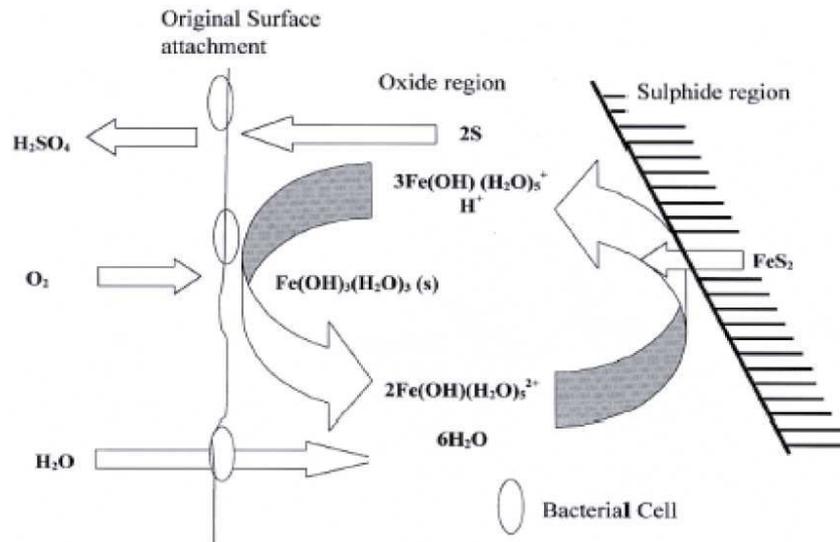
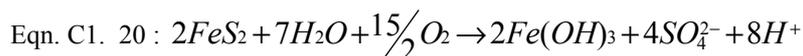


Figure C1. 24 : Modèle de formation d'oxydes de fer lors de la bio-oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (d'après Blight et al, 2000)

Blight et al., (2000) proposent un modèle de formation de ces oxydes en surface de pyrite dans un environnement sulfaté acide (Figure C1. 24), lié à la présence de bactéries, et qui peut-être résumé par l'équation globale suivante :



Cependant, ces composés ont également été observés dans des conditions abiotiques acides (Toniazzo, 1998). Il est donc nécessaire de mieux caractériser les processus locaux d'oxydation en surface des minéraux, où les conditions thermodynamiques sont différentes de celles régnant dans la solution environnante, pour expliquer la formation de tels composés.

3 Les figures de corrosion

Ndlovu et Moonhemius (2005) ont montré que les cinétiques d'oxydation des surfaces de pyrite sont variables, en conditions biotiques et abiotiques, en raison de l'organisation du réseau cristallin et de l'état des sites d'oxydation de surface du minéral. Ainsi, une face (111) est décrite comme plus réactive qu'une face (100) (Guevremont *et al.*, 1998a), mais une même face, peut avoir un comportement différent en fonction de ces atomes terminaux. Ainsi, une face (111) à terminaison Fer sera plus réactive que le même plan à terminaison S-S

(Ndlovu and Monhemius, 2005). En considérant uniquement les faces cristallines de pyrite les plus couramment exprimées dans la nature, ces auteurs ont établi une succession croissante de réactivité, fonction de l'orientation cristalline et des terminaisons chimiques : $(111)Fe > (111)S > (110) > (100)$.

Il en est de même pour les morphologies des figures de corrosion développées par ces faces, après traitement biologique. Ainsi, des figures allongées (Figure C1. 25b et d), rappelant les formes bactériennes, sont observées sur les surfaces $(111)S$, (110) , (100) à terminaison principale S-S et fortement colonisées par les bactéries (Edwards and Rutenberg, 2001; Edwards *et al.*, 2001; Mustin *et al.*, 1993).

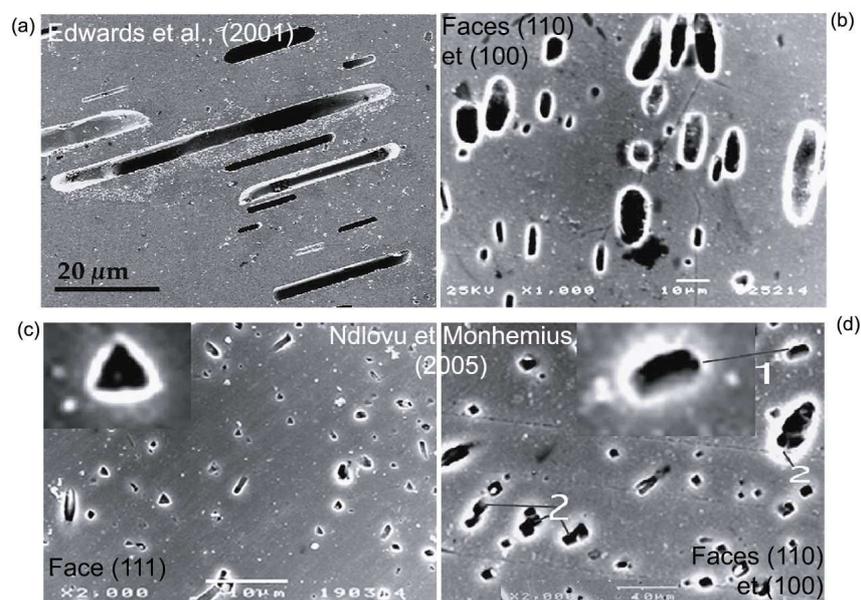


Figure C1. 25 : Figures de corrosion couramment décrites sur des grains de pyrite biocorrochés (images supérieures) ou après attaque chimique (images inférieures).

Les faces présentant les figures les plus allongées (Figure C1.26a) pourraient correspondre à celles où se développent des biofilms (Edwards *et al.*, 2001; Rodriguez-Leiva and Tributsch, 1988). Au contraire, d'autres faces, à terminaison Fe, présentent des figures plus éparées et moins développées, pour lesquelles la dissolution aurait lieu à travers une attaque indirecte par des ions Fe^{3+} régénérés en solution par les bactéries. Enfin, la géométrie et progression de ces figures pourraient également dépendre de l'orientation cristalline des faces sur lesquelles elles se développent, comme l'atteste la présence de figures de forme triangulaire sur des faces (111) (Figure C1.26 c).

Le développement des figures de corrosion sur les faces cristallines d'un grain de pyrite bio-oxydée dépendrait ainsi de plusieurs facteurs :

- adhésion des bactéries sur des sites S-S ou sur des dislocations.
- développement de biofilms favorisant la formation de figures de corrosion allongées (mécanisme direct).
- attaque indirecte des faces Fe par des ions Fe³⁺ (mécanisme indirect).
- orientation cristalline des faces oxydées.

Toutefois, des surfaces de pyrite oxydées abiotiquement présentent également des figures de corrosion similaires. En revanche, elles sont réparties de manière plus aléatoire et possèdent des formes plus homogènes.

Ces figures de corrosion sont-elles totalement contrôlées par le réseau cristallin ou induites par des composés biologiques ? Qu'est-ce qui contrôle leur initiation et développement ? Peut-on trouver un lien entre l'organisation des figures de corrosion sur les faces minérales et la distribution bactérienne sur ces mêmes faces ?

4 Synthèse sur l'interface bactérie/minéral

Différents modèles ont été proposés pour expliquer la formation de composés particuliers en surface de minéraux biooxydés ou encore la mise en place et l'évolution des figures de corrosion. Ces modèles ne synthétisent pour autant pas l'ensemble des données chimiques, spatiales ou morphologiques collectées en surface de pyrites oxydées.

Le mécanisme direct d'attaque du minéral pyrite par des enzymes bactériennes, évoqué par de nombreux auteurs, n'a pas encore été prouvé ; la pyrite ne représente d'ailleurs pas un substrat assimilable en tant que tel par les bactéries. En revanche, il semble plus probable que les microorganismes, adhérents ou non, attaquent le minéral par voie indirecte ; les phases de surface issues de la (bio)oxydation de la pyrite fournissent quant à elles des substrats énergétiques, plus ou moins disponibles, aux bactéries. Certains de ces composés sont d'ailleurs recouverts d'un film bio-organique, résultant de l'adhésion de microorganismes sur la pyrite (Toniazzi, 1998).

Les sites de surface où cristallisent les composés d'oxydation sont localisés aux abords des zones de corrosion et de dissolution de la surface. Un modèle d'oxydation de la pyrite par *A.f.*, synthétisant les données précédemment reportées a été réalisé par Toniazzi (1998) et peut se résumer en deux actions majeures des bactéries sur les surfaces de pyrite :

- 1^{ère} action (Figure C1. 26): les bactéries proches du minéral ou adhérentes, métabolisent les composés plus ou moins oxydés présents en surface de la pyrite (soufre élémentaire, thiosulfates...) et réduisent ainsi la passivation de la surface en la

nettoyant de ses composés réduits. Si les surfaces minérales initialement en contact avec les bactéries sont propres, ces-dernières ne peuvent alors métaboliser que les substrats énergétiques dissous dans le milieu. L'initiation de la corrosion a alors lieu de manière totalement abiotique, par une oxydation progressive de la surface par l'oxygène atmosphérique dissous et des ions ferriques.

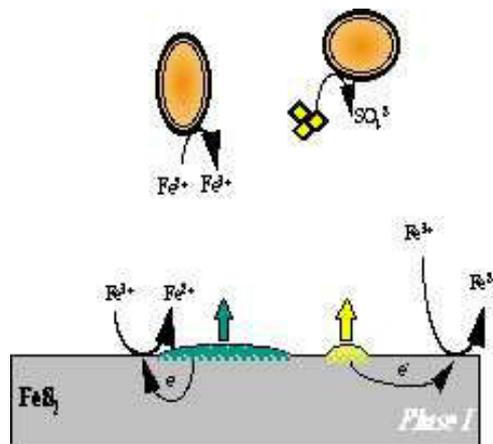


Figure C1. 26 : Première phase de l'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* d'après le modèle de Toniazzo (1998)

- 2^{ème} action (Figure C1. 27) : la corrosion se propage sous l'action des bactéries qui accélèrent le processus d'attaque indirecte en régénérant rapidement les ions ferriques en solution. De nouveaux produits d'oxydation apparaissent alors sur les grains minéraux engendrant la forte hétérogénéité de surface décrite précédemment : distribution non homogène des figures de corrosion, des divers composés, sous forme de « grandes bosses » polyphasiques (sulfates ferreux et ferriques, oxy-hydroxydes de fer) et de « petites bosses » monophasiques (soufre élémentaire).

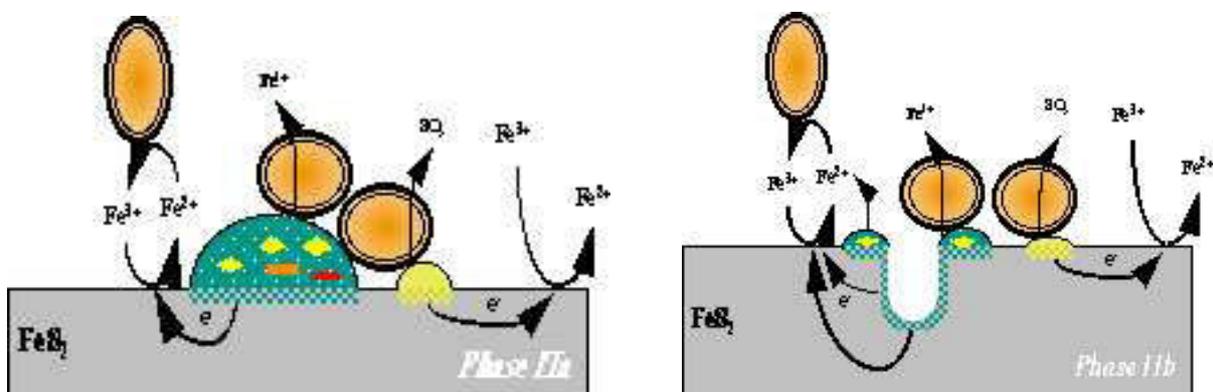


Figure C1. 27 : Deuxième phase de l'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* d'après le modèle de Toniazzo (1998)

Ce modèle est réalisé à partir d'un couplage de techniques variées permettant de confronter des données globales et locales de l'interface bactérie/minéral. Il illustre les interactions des processus chimiques et bactériens lors de l'oxydation de surface de la pyrite et met en évidence les divers paramètres qui conditionneraient cette oxydation : biodisponibilité et solubilisation des phases de surface métabolisables, régénération des ions ferriques en solution, transfert des électrons au sein de la maille cristalline...

Cependant, plusieurs questions restent sans réponse :

- y a-t-il une spécificité des composés de surface formés en fonction de l'agent oxydant ou du réseau cristallin du minéral ?
- existe-t-il un lien entre les composés de surface formés et les figures de corrosion observées ?
- quelle est la localisation exacte des bactéries au cours du processus de corrosion et peut-on relier les sites d'adhésion bactérienne aux sites actifs de corrosion du minéral ?
- Quels sont les paramètres gouvernant la formation et la propagation des figures de corrosion ?

Partie III : Biosignatures et traces de vie

« *Early environments were apparently sufficiently similar on Earth and Mars, and life arose so rapidly on Earth once conditions became clement, that emergence of life on both planets at that time is scarcely less plausible than emergence on only one.* »

(NASA Exobiology Program Office, « *An Exobiological Strategy for Mars Exploration* », NASA SP-530, 56pp, April 1995)

Pour répondre à ce type d'interrogations, il faut être capable de comprendre la « stratégie du vivant » et apprendre à reconnaître les indices de vie. Il est donc indispensable de pouvoir définir la vie comme la non-vie en des termes mesurables, voire quantifiables, quelles que soient les échelles de temps et d'espace considérées. La vie terrestre est la seule référence tangible que nous ayons pour définir les caractéristiques des biosignatures les plus probables. Elle est à la fois profondément monotone et unitaire par son organisation autour de motifs moléculaires carbonés, et très diversifiée par son adaptabilité « quasi-infinie » à de nombreux milieux de vie.

Le mot biosignature est constitué de l'association de bio-, du grec *bios* : vie et du latin *signum* : signe, marque, empreinte. Etymologiquement, une biosignature est donc une « trace de vie » ce qui inclut à la fois évidences directes et indirectes de vie, ou plus schématiquement des fossiles (minéraux ou organiques), des ichnofossiles et toute transformation pérenne de l'environnement provoquée par un organisme vivant. Sur notre planète, où la vie est largement répandue et a colonisé de nombreuses niches écologiques jusqu'à des environnements très extrêmes (aphotiques, acides, anoxiques...), les indices de vie sont nombreux et variés, macroscopiques ou microscopiques (Al-Hanbali *et al.*, 2001; Awramik *et al.*, 1983; Nyberg and Schopf, 1981). Malgré cette évidence, la recherche de ces indices dans des sédiments archéens est sujette à controverse (Brasier *et al.*, 2002; Rasmussen, 2000; Schopf, 1993) tant la simple morphologie ne suffit pas à valider l'origine biologique de ces « fossiles ». L'application de ces critères à des objets extraterrestres comme les météorites ALH84001 ou Tatahouine est délicate (Bradley *et al.*, 1997; Folk and Taylor, 2002; Gillet *et al.*, 2000; Mckay *et al.*, 1996; Neelson, 1997), d'autant plus qu'à l'incertitude sur l'authenticité de ces bio-morphologies vient s'ajouter l'éventualité d'une contamination terrestre. Aujourd'hui de nombreux auteurs préfèrent associer à l'étude de ces critères morphologiques la recherche d'autres indices d'activité biologique (Lemelle *et al.*, 2004a;

Lemelle *et al.*, 2004b; Schulze-Makuch *et al.*, 2002; Zak, 1999), comme les molécules organiques de la vie ou la composition isotopiques de biominéralisations...

1 Les biosignatures inorganiques

La vie sur Terre est omniprésente et l'évolution de formes d'organismes pluricellulaires offre de nombreuses archives largement étudiées par les paléontologues. L'existence de **macro-** ou **micro-fossiles** semblent être la plus classique et répandue des « biosignatures » identifiables. Les organismes à squelette ou test rigide sont assez facilement conservés dans les sédiments et nous permettent de compléter notre vision de l'évolution de la vie depuis 540 millions d'années. Les mécanismes de « fossilisation » d'êtres unicellulaires comme les bactéries sont plus flous (Hoffman and Farmer, 1997) et le rôle de la paroi cellulaire n'est pas clairement établi (Beveridge and Fyfe, 1985; Ferris *et al.*, 1988; Gillet *et al.*, 2000; Schultze-Lam *et al.*, 1996; Yee *et al.*, 2003). De plus, les cristaux formés en remplacement de ces cellules bactériennes présentent souvent des formes et structures comparables à celles pouvant être obtenues par des processus de synthèse strictement abiotiques.

Par ailleurs, une bactérie peut laisser des **empreintes** (« fingerprints ») sur les surfaces sur lesquelles elle s'est développée (Edwards and Rutenberg, 2001; Luttge, 2005; Rojas-Chapana and Tributsch, 2004; Tributsch, 2001), un négatif de sa forme sur le minéral, au même titre que l'on retrouve positif et négatif d'une ammonite. Toutefois, il faut être capable, une fois de plus, de certifier l'origine biologique d'une telle forme.

En plus de l'identification de fossiles d'organismes biologiques, il existe d'autres indices inorganiques de trace de vie : les minéraux formés par l'intermédiaire de processus biologiques, les « **biominéraux** ». Les organismes vivants peuvent, en effet, intervenir directement ou indirectement lors des précipitations minérales en agissant comme des catalyseurs ou comme centre de nucléation (*in vivo* ou *post-mortem*) pour des micro-cristaux de phosphates, carbonates, silice amorphe, sulfures ou encore d'oxydes. D'autre part, la matière organique indigène, apportée par les microorganismes eux-mêmes (cellules biologiques) ou résultant de leur activité (polymères, métabolites...) participe à la stabilité de ces minéraux bioformés (Sawlowicz, 1993). Les récifs coralliens ou les tapis cyanobactériens en sont les exemples terrestres actuels les plus évidents tout comme les banded iron formation (BIF) des sédiments archéens (Duhig *et al.*, 1992). A plus petite échelle, les cristaux de

magnétite présents dans les bactéries magnétotactiques (Schelble *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 1997) peuvent être considérées comme des biosignatures. De même, les pyrites framboïdes sont souvent considérées comme bio-induites de par leur mode de formation qui fait réagir du H₂S produit par voie biologique à du fer.

Des textures particulières de roches, résultant de l'altération de surfaces minérales par des microorganismes, peuvent être également considérées comme des biosignatures. De telles **biotransformations** ont pu être décrites dans des verres basaltiques du plancher océanique induites par une microflore indigène très active (Furnes and Staudigel, 1999; Furnes *et al.*, 2005; Ross and Fisher, 1986; Thorseth *et al.*, 2003; Thorseth *et al.*, 1995; Torsvik *et al.*, 1998). Ces traces d'altération peuvent être aussi enregistrées par le biais de figures de corrosion ou de minéraux secondaires précipités caractéristiques.

Ces biominéraux et phases secondaires formés par l'action directe ou indirecte d'être vivants peuvent enregistrer, au même titre que les molécules organiques, des fractionnements isotopiques particuliers. Ainsi, il est admis que nombre de pyrite sédimentaires issus de réduction bactérienne de sulfates présentent en général des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ négatives (Habicht and Canfield, 1997; Kaplan and Rittenberg, 1964; Strauss, 1997) même si certaines valeurs très positives sont reportées dans la littérature (Ohmoto *et al.*, 1990; Ohmoto *et al.*, 1993; Schidlowski *et al.*, 1983). La seule signature isotopique d'un élément (C, S, O...) ne suffit donc pas à distinguer un signal biologique d'un signal abiotique mais fournit des indices de vie potentielle. L'application de ces critères à l'étude de météorites susceptibles de contenir des traces de vie martienne est également très délicate (Greenwood *et al.*, 1997; Shearer *et al.*, 1996) en raison d'une contamination terrestre possible ou de la « rareté » du signal recherché.

2 Biosignatures moléculaires

2.1 Nature chimique de molécules organiques dans les roches

La vie peut également laisser une empreinte directe dans les roches sous forme de **molécules organiques** spécifiques, constituées d'éléments de la vie (C, H, N, P, O, S). A la mort d'organismes vivants, les biopolymères primaires (protéines, polysaccharides, lipides) subissent un processus de dégradation qui conduit à la formation de macromolécules non assimilables (matière organique concentrée) par les microorganismes. Ces molécules hydrocarbonées conservent une part de l'identité des organismes de départ, comme certains hopanoïdes (Figure C1. 28), stérols constitutifs de membranes cytoplasmiques (Kannenberg and Poralla, 1999) et qui sont retrouvés dans des sédiments (Summons *et al.*, 1999).

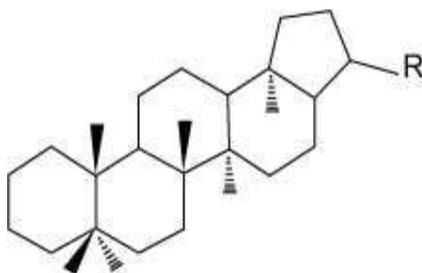


Figure C1. 28 : Exemple d'hopanoïde, molécule caractéristique constitutive des membranes bactériennes (d'après Deniau, 2002)

Les molécules d'ADN peuvent, dans certains cas (milieux hypersalins par exemple), se conserver sans trop de transformation et être considérés comme des traces de vie. Toutefois, la durée de vie d'une telle molécule est peu compatible avec les échelles de temps concernant les premières formes de vie terrestres, d'autant plus que les mécanismes de préservation de ces molécules semblent mal contraints (Bada *et al.*, 1994; Willerslev *et al.*, 2004). D'autre part, la seule présence de molécules organiques comme des acides aminés par exemple ne peut garantir une preuve fiable de vie, leur synthèse pouvant être purement abiotique (Hasselstrom *et al.*, 1957; Marshall, 1994; Miller, 1953; Teresaki *et al.*, 2002), ce qui amincit d'autant plus la frontière entre molécules organiques simples et molécules d'origine biologique.

2.2 Homochiralité vs racémisation.

Il existe dans la nature deux formes de molécules symétriques, appelées énantiomères dextrogyres (D), ou lévogyres (L), images l'une de l'autre dans un miroir mais non superposables (Figure C1. 29). Les systèmes biologiques utilisent en général une seule des formes énantiomères (L ou D) d'une molécule chirale (du grec *kheir*, main). Ainsi les protéines sont faites d'acides aminés L alors que le désoxyribose de l'ADN est dextrogyre.

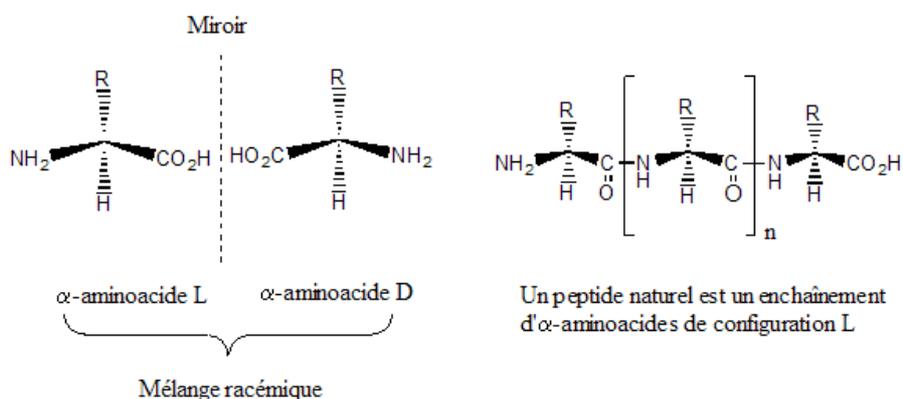


Figure C1. 29 : Enantiomères et homochiralité (d'après le GDR DSBC).

L'explication de cette homochiralité biologique, mise en évidence pour la première fois par Pasteur en 1847, reste toujours sans réponse, mais pourrait avoir son origine dans des processus de synthèse stellaire ou cométaire, comme le prouve l'excès d'acides aminés L dans la météorite de Murchison.

La préservation de cette **homochiralité** pourrait donc être une forme de signature biologique. Le temps de demi-vie de la racémisation (processus qui rééquilibre le ratio des énantiomères L/D) étant de 10^6 ans dans les conditions terrestres, et de 10^{13} ans en conditions martiennes, cette homochiralité pourrait constituer une biosignature en astrobiologie.

2.3 Composition isotopique (Horita, 2005)

Le $\delta^{13}\text{C}$ est sûrement le rapport isotopique le plus couramment employé pour caractériser l'élément le plus abondant de la vie en raison du large appauvrissement en ^{13}C par le cycle de Calvin lors de la photosynthèse et de l'apparente stabilité de ce signal ($\delta^{13}\text{C} \approx -25\text{‰} \pm 7$) au cours des âges (Schidlowski *et al.*, 1983). La vie semble également préférer l'hydrogène au deuterium ainsi que le ^{32}S par rapport au ^{34}S . Des processus biologiques tels que la méthanogenèse sont couramment cités pour engendrer des fractionnement isotopiques biologiques identifiables (Botz *et al.*, 1996; Hornibrook *et al.*, 2000; Summons *et al.*, 1998; Whiticar, 1999). Cependant, une fois de plus, il n'est pas facile de dégager un signal unique d'une roche ($\delta^{13}\text{C}$, biomarqueurs chimiques...) sans écarter l'hypothèse d'une contamination biologique récente ainsi que de molécules organiques non biologiques (Westall and Folk, 2003).

2.4 Traces de non-vie ou limites de résolution des instruments d'observation ?

De nombreuses caractéristiques d'une forme de vie terrestre peuvent être dégagées, basées sur des indices variés et obtenues par des méthodes d'analyses distinctes et indépendantes. Cependant, aucune définition de biosignature fiable, indiscutable voire universelle ne peut être avancée par les auteurs. Serait-il possible alors d'aborder le sujet en sens inverse et de tenter de dégager une preuve d'absence de vie ? Il semble difficile de répondre à cette question tant les recherches de biosignatures, basées sur des objets variés et intervenant à des échelles différentes (macroscopique, moléculaire ou atomique), sont dépendantes des outils utilisés et des pouvoirs de détection de ces techniques d'approche. La vie sur Terre est une évidence à toute échelle d'observation. Malgré cela, en deçà d'un certain taux de colonisation du milieu et d'échantillonnage de ce milieu, les techniques actuelles

peuvent ne pas être capable de détecter des traces de vie. L'observation et l'analyse d'échantillons précambriens ou martiens, dont les quantités disponibles et l'accessibilité seront limitées, les limites de détection des procédures et la représentativité des mesures seront parmi les paramètres-clé de validation.

3 Notre système étudié en tant que biosignature - Où placer la biosignature ?

Il existe donc toute une panoplie de techniques pour détecter une trace de vie basée sur les principales caractéristiques connues des formes de vie terrestres. En quoi le système choisi dans ce travail peut s'intégrer à ces études de caractérisation et de recherche de biosignatures et peut-il apporter des informations complémentaires ?

Comme il a été précisé au paragraphe 1, le système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/sulfures de fer est un système très simple mettant en jeu une bactérie autotrophe dont les propriétés intrinsèques (aérobie facultative, sulfo- et ferro-oxydante) auraient pu lui permettre de vivre dans les environnements de la Terre primitive (Figure C1. 30).

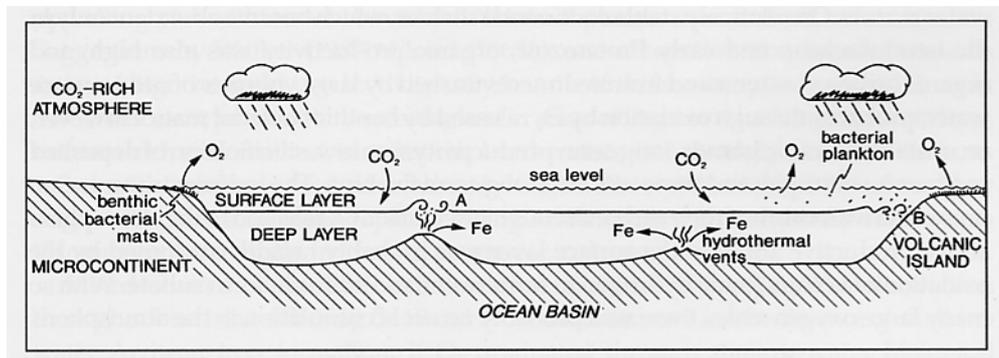


Figure C1. 30 : Environnement de la Terre primitive (d'après Lowe, 1994)

Sa relation avec le minéral source d'énergie est très forte et engendre de fortes transformations de celui-ci (Jones *et al.*, 2003; Mustin C. *et al.*, 1992; Sasaki *et al.*, 1998; Suzuki, 2001; Toniazzo *et al.*, 1999a) ainsi que des minéralisations secondaires (Fortin and Beveridge, 1997; Toniazzo *et al.*, 1999a). Une compréhension fine des mécanismes en jeu à l'interface bactérie/minéral permettrait de caractériser une biosignature indirecte d'un analogue potentiel de vie primitive terrestre. La pyrite est d'ailleurs considérée comme une source potentielle de développement de la vie (Russel *et al.*, 1990). Les environnements primitifs avec un océan stratifié et une biosphère supposée abondante dans les systèmes profonds hydrothermaux riches en sulfures de fer, dégazage de H₂S correspondent en effet à

des conditions environnementales propices au développement de bactéries sulfo- et ferro-oxydantes telles que *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

D'autres part, les dernières missions spatiales ayant révélé la présence de sulfates sur la surface de Mars, en plus de sites hydrothermaux, ceci pourrait étayer les hypothèses de vie passée sur Mars dans des environnements proches de celles de la Terre primitive (association de bactéries sulfato-réductrices et sulfo- et ferro-oxydantes). Ces observations confortent l'hypothèse que le système *A.f./sulfures de fer* pourrait être un bon analogue pour des études en exobiologie.

Le travail effectué ici s'attachera donc, à travers une caractérisation fine des processus d'oxydation à échelle micrométrique, à mettre en évidence des potentielles traces pérennes d'activité biologique pouvant constituer des biosignatures.

Matériel et Méthodes

CHAPITRE 2

CHAPITRE 2

PARTIE I : PROTOCOLES D'OXYDATION	67
1 TRAITEMENTS BIOLOGIQUES	67
1.1 LES BACTERIES	67
1.2 LE MINERAL	68
1.3 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	69
2 TRAITEMENTS CHIMIQUES	72
PARTIE II : SUIVI DU SYSTEME IN VIVO	74
1 L'OBSERVATION DU SYSTEME IN VIVO : MICROSCOPIES OPTIQUES ET CLSM	74
1.1 MICROSCOPIES OPTIQUES	74
1.2 MICROSCOPIE CONFOCALE A BALAYAGE LASER : CLSM	74
2 COMPOSITION CHIMIQUE DE LA SOLUTION : ICP-AES	82
3 COMPOSITION ISOTOPIQUE DE LA SOLUTION	82
3.1 $\Delta^{18}\text{O}_{\text{EAU}}$	82
3.2 $\Delta^{18}\text{O}$ ET $\Delta^{34}\text{S}$ DES SULFATES EN SOLUTION	82
PARTIE III : LES ANALYSES DE SURFACE	84
1 APPROCHE METHODOLOGIQUE DE L'ANALYSE DE SURFACE DES ECHANTILLONS	84
1.1 METHODOLOGIE	84
1.2 PREPARATION DES ECHANTILLONS	84
2 MORPHOLOGIE DE L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL : MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE, AFM	85
3 COMPOSITION CHIMIQUE DE L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL	87
3.1 SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES : IR ET RAMAN.	88
3.2 CARACTERISATIONS <i>POST-MORTEM</i> SOUS VIDE DES SURFACES DE PYRITE	92
4 ISOTOPIE DE L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL : SPECTROMETRIE DE MASSE D'IONS SECONDAIRES, SIMS	96
4.1 PRINCIPE DE LA SONDE IONIQUE	96
4.2 FRACTIONNEMENT DE MASSE	104
4.3 PROFILS EN PROFONDEUR	106
4.4 IMAGERIE ISOTOPIQUE	110

INTRODUCTION

Le système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite a fait l'objet de nombreuses études dont le but était de caractériser par différentes approches méthodologiques : la lixiviation des éléments (Fe, S) en solution, l'adhésion des bactéries sur le minéral, ou l'effet du minéral sur les cinétiques d'altération. Cette étude a pour objectif principal d'affiner la compréhension, au niveau de l'interface bactérie/minéral, des mécanismes régissant la biooxydation de sulfures de fer tels que la pyrite en s'appuyant sur une caractérisation précise de la morphologie, de la chimie et de la composition isotopique de cet interface. Ce dernier, par sa nature de site réactionnel, peut être le lieu de formation et de conservation de « biosignatures » variées.

A partir d'expériences de bio-oxydation, menées en réacteurs, en conditions contrôlées, un couplage de méthodes a permis de caractériser les différents paramètres et compartiments (Figure C2.1) du système d'étude.

En effet, une description aussi complète que possible des paramètres contrôlant les processus d'oxydation des sulfures ne peut être obtenue que par une étude conjointe des différents compartiments du système : solution, bactérie, minéral et interface bactérie/minéral. Le recours à des techniques d'observations et d'analyses quantitatives *in vivo* du processus d'altération (suivi des conditions bio-physico-chimiques des solutions et imagerie) ou *a posteriori* de la surface minérale bio-oxydée (composition chimique et isotopique) est nécessaire.

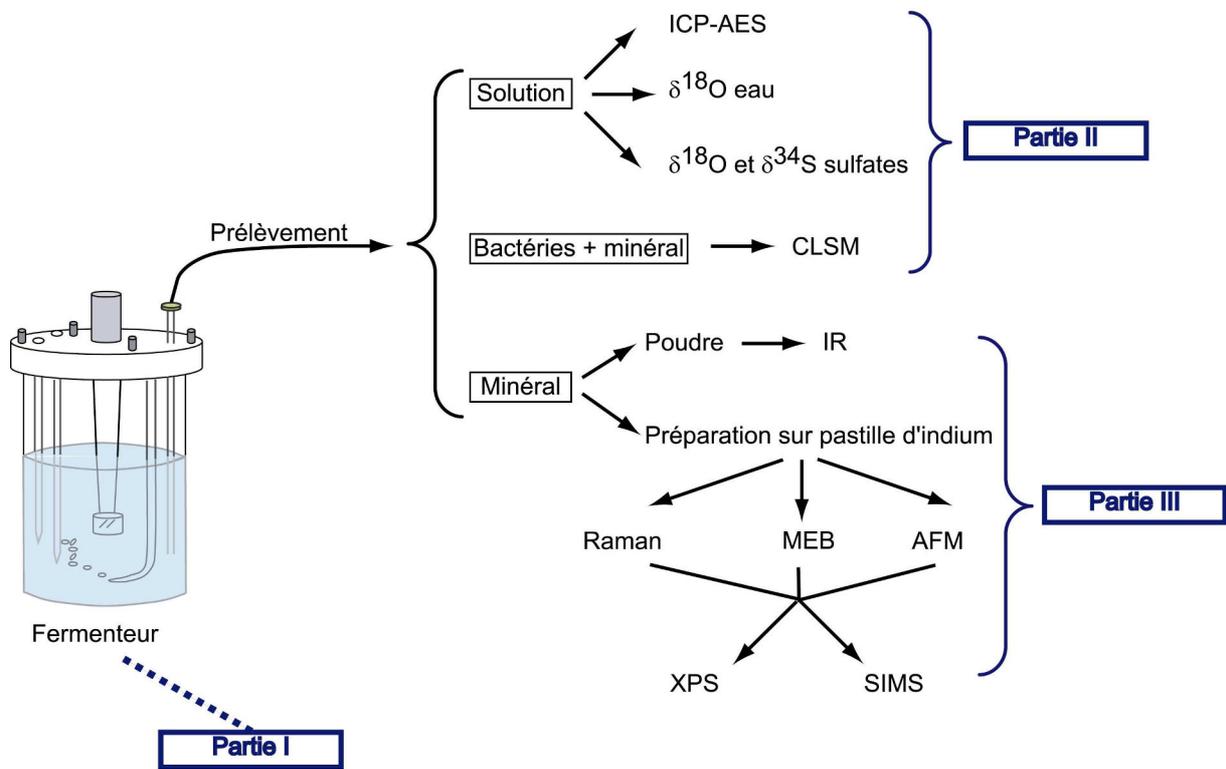


Figure C2.1 : Approche expérimentale et schéma d'étude du système *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Partie I : Protocoles d'oxydation

1 Traitements biologiques

1.1 Les bactéries

Les bactéries utilisées lors de cette étude proviennent de souches pures de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), collection allemande de microorganismes. Deux souches du genre *Acidithiobacillus* ont été principalement utilisées, *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Acidithiobacillus thiooxidans*. Elles sont conservées sur milieu liquide et repiquées régulièrement pour conserver un état physiologique actif semblable pour toutes les expériences de bio-oxydation. Les milieux de culture employés assurent aux bactéries un apport de substrats élémentaires nécessaires à l'élaboration des métabolites cellulaires et de substrats énergétiques oxydables. Différents milieux de culture DSMZ modifiés (Monroy, 1993) ont été utilisés pour maintenir les souches en conditions physiologiques actives (Tableau C2. 1).

Tableau C2. 1 : Composition des milieux de culture de *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *thiooxidans*. Source élémentaires et énergétiques.

		Composition des milieux de culture					
		Sources élémentaires					Source d'énergie
		Source de N	Source de P et K	Source de Mg	Source de Ca	Tampon acide	
Bactérie	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1g.L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ 0.4g.L ⁻¹	MgSO ₄ , 7H ₂ O 0.4g.L ⁻¹	—	H ₂ SO ₄ 33mL.L ⁻¹	FeSO ₄ , 7H ₂ O 20g.L ⁻¹
	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	NH ₄ Cl 0.1g.L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ 3g.L ⁻¹	MgCl ₂ , 6H ₂ O 0.1g.L ⁻¹	CaCl ₂ , 2H ₂ O 0.14g.L ⁻¹	—	S° 10g.L ⁻¹

Les solutions élémentaires sont toutes préparées stérilement par autoclavage (20 min à 120°C). Les sources d'énergie sont stérilisées séparément et ajoutées au milieu final ajusté à pH 1,8 et pH 4,2 respectivement pour les bactéries *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *thiooxidans*. Lors des expériences d'oxydations minérale, les sources énergétiques sont remplacées par des sulfures de fer (pyrite par exemple) en quantité suffisante pour obtenir des suspensions minérales à 2% (20g.L⁻¹).

Les cultures pures bactériennes sont conservées en flacons sérums de 50mL sur table d'agitation, en chambre d'incubation à 28°C dans le noir et repiquées toutes les 3 à 4 semaines.

Les numérations des suspensions bactériennes en réacteurs sont effectuées à l'aide d'une cellule de Thoma (chambre de numération quadrillée de volume connu). La numération est réalisée sous microscope, avec un grossissement x400 sur 18 volumes élémentaires. Le nombre de bactéries par mL de solution est donné par : $N = n \cdot 4 \cdot 10^6$ où N est le nombre de bactéries par millilitre de solution et n, le nombre moyen de bactéries présentes dans un volume élémentaire de la cellule de Thoma. L'erreur expérimentale sur les numérations est d'environ 25%.

1.2 Le minéral

Origine et composition des pyrites

Deux pyrites pures (de collection) ont été utilisées lors des expériences de lixiviation biotiques ou abiotiques. Leurs analyses chimiques sont récapitulées Tableau C2. 2 :

- Pyrite K : d'origine hydrothermale, prélevée dans un gisement sulfuré pegmatitique du Pérou. C'est une pyrite triglyphe possédant des cannelures très marquées sur ses faces cristallines. Elle est particulièrement pure, avec moins de 0,1% d'impuretés et possède un éclat métallique prononcé.
- Pyrite Es : d'origine volcano-sédimentaire, elle provient du gisement carbonaté de Logroño (Espagne). Légèrement moins pure que K (99,2%), elle se présente sous forme de petits cubes tronqués à aspect plus terne. Elle contient un pourcentage non négligeable d'arsenic (0,3%) réparti de manière homogène dans la maille cristalline.
-

Tableau C2. 2 : Composition chimique des pyrites de l'étude (d'après Mustin, 1992)

		Analyse Chimique quantitative (%)			Analyse Microsonde sur grains (%)			Pureté minéralogique (%)
		Fe	S	As	Fe	S	As	
Pyrite	K hydrothermale	46.24	53.19	0.02	46.56	53.38	0.029	99.95
	Es volcano-sédimentaire	43.66	49.15	0.29	46.23	52.97	0.309	99.2

Etat de surface initial des pyrites

Les minéraux utilisés lors des expériences de bio-oxydation provenaient d'aliqouts de poudres de granulométrie définie après concassage, broyage à sec dans un broyeur à anneaux

concentriques et tamisage par voie humide sur une série de tamis AFNOR : 32-53-80-125-160-250-500 μm (Mustin, 1992). Les grains minéraux sont stérilisés et nettoyés par voie humide avant introduction dans les milieux de culture. Deux autoclavages consécutifs (120°C pendant 20min) à 24h d'intervalle et une agitation dans des solutions de dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) et d'hexane sont nécessaires pour désorber, en quasi-totalité, les composés de surface hydrophiles solubles (sulfates ferreux et ferriques : FeSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) ou insolubles (oxyhydroxydes de fer : FeOOH , Fe_2O_3 ...) et les produits hydrophobes (soufre élémentaire S_8) respectivement (Toniazzo, 1998). Après ce traitement, les surfaces de pyrite, sont considérées comme "propres" et exemptes de tout composé pouvant influencer significativement sur les expériences d'oxydation et les analyses spectrochimiques de surface ultérieures. Un spectre référence de ces pyrites nettoyées sera présenté ultérieurement partie III paragraphe 3.1.2 lors de la présentation de la spectroscopie Raman (Figure C2. 14). Seuls les vibrations de la liaison du doublet S-S^{2-} de la pyrite sont observés. Par ailleurs, ces surfaces de pyrite ne présentent pas de figures de corrosion particulières identifiables avant expérimentation.

1.3 Protocoles expérimentaux

▪ Expérimentation en fermenteurs

Les expériences de bio-oxydation sont réalisées en fermenteur de plus grande capacité (1.5L ou 3L) munis d'un système d'agitation et d'une jaquette de fermeture téflonnés afin d'éviter toute attaque du métal par les bactéries (Figure C2. 2). La jaquette dispose d'orifices étanches permettant d'ajouter des électrodes pour contrôler les conditions physico-chimiques de la solution (pH et Eh), un tube de prélèvement en verre, et un système permettant l'oxygénation et la sortie d'air du fermenteur. Le système est stérilisé par autoclave (20min, 120°C) avec le milieu de culture 70b auquel sont rajoutés 20g.L^{-1} de pyrite propre et stérile. Un inoculum bactérien en phase exponentielle est introduit dans le milieu sous hotte stérile de manière à porter la concentration bactérienne initiale en solution de lixiviation à 5.10^6 bactéries. mL^{-1} . Ce système de bio-oxydation permet à la fois de réaliser un suivi cinétique *in vivo* des paramètres physico-chimiques, des compositions chimiques et isotopiques des éléments de la solution, et de disposer d'un grand nombre d'échantillons (statistiquement représentatif) de surfaces bio-oxydées de minéraux utilisables en spectroscopie de surface (Raman, IR) ou études isotopiques (SIMS).

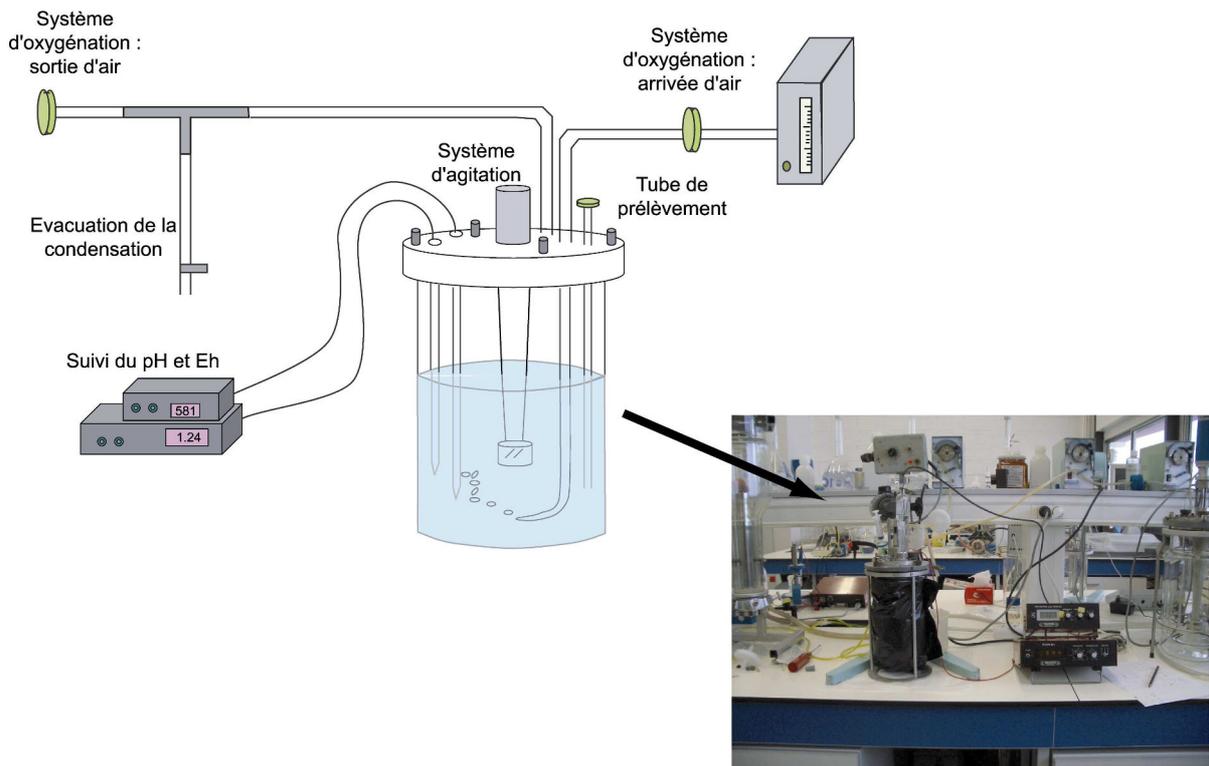


Figure C2. 2 : Protocole expérimental : Oxydation en fermenteur.

▪ Expérimentation en réacteurs

En complément des fermenteurs, des réacteurs de type batch (100mL) (Figure C2. 3) sont utilisés dans des conditions similaires (milieu, pulpe minérale, concentration bactérienne initiale) mais sans système d'oxygénation forcée. Le système de fermeture de ces dispositifs a été optimisé afin de limiter l'évaporation du milieu et de poursuivre les expériences de bio-oxydation sur de longues périodes sans complément ni modification du milieu de culture. Un bouchon perforé couplé à une membrane imperméable aux gaz (Biofolie[®]) permet de conserver la stérilité de la culture tout en laissant ne limitant pas l'oxygénation du milieu. Ces dispositifs particuliers ont permis de maintenir, pour certaines expériences, les conditions d'oxydation en milieu stérile pendant 24 mois en limitant l'évaporation sans diminuer les échanges gazeux.



Figure C2. 3 : Dispositifs de bio-oxydation en réacteur

▪ Adhésion bactérienne

Afin d'observer et de quantifier l'adhésion de *A.f.* sur des surfaces de pyrite, des expériences complémentaires en petits réacteurs de 1mL ont été réalisées à différentes concentrations bactériennes (de $1,25 \cdot 10^6$ à $5 \cdot 10^8$ bactéries.mL⁻¹) sur des aliquots de trois lots de pyrite de granulométrie 53-80µm correspondant à :

- des grains nettoyés non corrodés.
- des grains non nettoyés non corrodés.
- des grains non nettoyés issus d'un réacteur de bio-oxydation actif depuis 22mois, rincés et vortexés 5 fois dans du milieu neuf stérile pour décrocher les bactéries adhérentes.

Des observations en microscopie confocale à balayage laser sont réalisées, après contact, sur une dizaine de grain issu de chaque traitement, pour déterminer à la fois, le taux d'adhésion et la localisation précise des bactéries sur ces surfaces minérales.

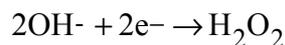
▪ Microplaques Lumox

Des incubations en microplaques (96 puits), dont le fond est constitué d'un film Biofolie[®] assurant la stérilité du milieu sans atténuer les échanges gazeux, ont permis de réaliser des observations *in vivo*, par microscopie confocale à balayage laser, dans chacun des puits de 200µL.

2 Traitements chimiques

A titre comparatif, des expériences témoins d'oxydation par voie chimique en conditions totalement abiotiques ont été menées dans des batchs de 25mL contenant une solution de milieu 70 modifié stérile et des grains de pyrite nettoyés selon le même protocole que lors d'oxydations biologiques. Un agent oxydant, les ions ferriques ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solution finale à 1000 mg.L^{-1} de fer) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , solution finale à 3%) (stérilisé séparément par filtration à $0,2\mu\text{m}$), est ajouté à ce milieu de manière stérile. Des témoins d'oxydation non aqueux par le dioxygène atmosphérique ont également été étudiés. Ces oxydants sont représentatifs de divers modes d'altération des sulfures :

- L'ion Fe^{3+} est le principal responsable de l'oxydation électrochimique de la pyrite en milieu acide dont l'action est amplifiée par la ré-oxydation des ions ferreux par les bactéries (mécanisme indirect ou indirect avec contact). Seule une forte concentration en sulfate ferrique permet d'entretenir ce processus en conditions abiotiques.
- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être produit par des réactions de réduction cathodique associant deux OH^- .



L'oxydation résulte de la présence d'oxygène radicalaire sans intervention d'ions Fe^{3+} . Les produits formés par ces voies oxydatives sont donc susceptibles d'avoir une signature chimique et isotopique différente de celles obtenues par attaque électrochimique.

D'autre part, sur des environnements extrêmes, comme la surface de Mars, H_2O_2 est l'agent oxydant principal, formé à partir de vapeur d'eau et des rayonnements UV du soleil : $\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{UV}} 2\text{H}^* + 2\text{OH}^* \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

La réaction d'oxydation des ions ferreux par H_2O_2 est connue sous le nom de réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^*$

- Le dioxygène atmosphérique : des grains de pyrite broyés et laissés à l'air depuis plus de 10 ans ont été pris comme témoins de l'oxydation à l'air, en conditions oxydantes de l'atmosphère terrestre. Cette oxydation s'effectue sans doute au sein d'un film d'eau adsorbée à la surface des grains, dont la structure et la composition isotopique sont différentes de celles d'une eau libre liquide. Ces « témoins » fournissent ainsi un traceur de source, de composition isotopique différente de celle des autres traitements.

Les dispositifs expérimentaux biotiques et abiotiques employés fournissent deux types d'échantillons : solution et suspension minérale, qui sont utilisés de manière spécifique pour des analyses *in vivo* en solution (Partie II) ou des analyses *post-mortem* (Partie III).

Partie II : Suivi du système in vivo

Des méthodes microspectroscopiques non destructives en solution ont été développées et utilisées afin d'observer le processus d'altération sans influencer sur l'état physiologique des microorganismes et sans altérer ou détruire les surfaces minérales. Celles-ci permettent un suivi global des paramètres physico-chimiques ainsi qu'une meilleure caractérisation des processus à travers la mise en évidence conjointe des bactéries et figures de corrosion sur les surfaces minérales.

1 L'observation du système in vivo : Microscopies optiques et CLSM

1.1 Microscopies optiques

Au cours des expériences de bio-oxydation, des observations microscopiques ont été réalisées à l'aide de deux microscopes optiques permettant de vérifier le bon état général des inocula et d'effectuer des comptages bactériens dans les lixiviats :

- un microscope Leitz Dialux 20 à contraste de phase permettant d'accentuer les changements d'indice de réfraction et d'augmenter ainsi le contraste visuel entre les bactéries et la solution.
- un microscope Nacet NS 400 à contraste interférentiel de Nomarski (DIC pour Differential Interference Contrast) qui génère une différence de phase entre deux faisceaux polarisés de lumière incidente (effet d'ombrage), mettant en relief les petits objets tels que les bactéries et la rugosité des surfaces minérales.

1.2 Microscopie Confocale à Balayage Laser : CLSM

1.2.1 Principe et acquisition d'images

La Microscopie Confocale à Balayage Laser (CLSM pour Confocal Laser Scanning Microscopy) est une microscopie photonique particulière qui permet d'affiner et d'amplifier le signal émis par l'échantillon imagé en se focalisant sur l'observation du plan focal. Les microscopies optiques ou à fluorescence classiques présentent une perte de résolution, en particulier dans la direction de l'axe optique (Z), en raison de la collection de photons émis par les plans sous- et sus-jacents au plan focal qui génère un flou dans l'image (bruit de fond

important). Le principal avantage de la Microscopie Confocale à Balayage Laser est d'éliminer les photons provenant de plans défocalisés et ainsi d'augmenter le rapport signal-sur-bruit. Contrairement aux microscopies conventionnelles, l'échantillon est excité par une source laser ponctuelle monochromatique (Figure C2. 4). La préparation est balayée en (X,Y) par un faisceau ponctuel pour permettre une reconstruction point par point de l'échantillon. Les photons réémis ou réfléchis par l'échantillon sont focalisés par un diaphragme variable (pinhole ou trou d'aiguille) qui permet de ne sélectionner que ceux provenant réellement du plan focal observé. Ces photons sont ensuite filtrés en fonction de leur longueur d'onde, collectés et amplifiés dans un photo-multiplicateur (PM) qui va générer un signal électrique dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons reçus. Ce signal est ensuite numérisé en niveaux de gris et une image du plan focal balayé est reconstruite pixel par pixel. Une tomographie de l'échantillon peut être obtenue en réalisant des coupes (X,Y) 2D sériées en Z, avec un pas prédéfini (fonction de la finesse de la structure étudiée et de la résolution de l'objectif utilisé) entre chaque observation de plans focaux.

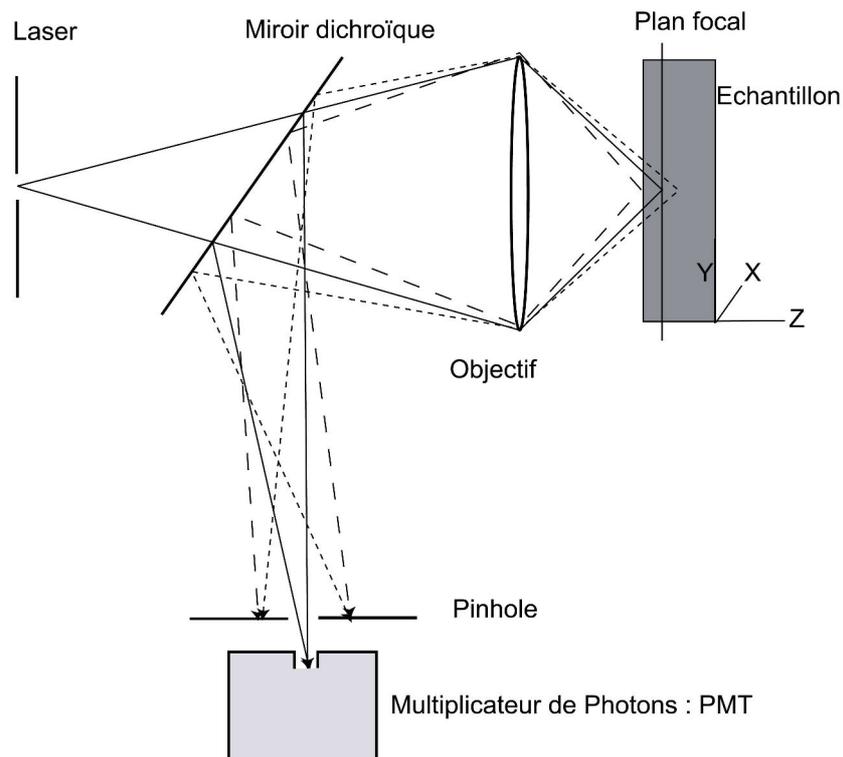


Figure C2. 4 : Principe de la microscopie confocale

Cette technique permet l'observation *in vivo* d'objets minéraux et organiques (cellules microbiennes), réfléchissants, auto-fluorescents ou marqués par des fluorochromes

spécifiques. Ceux-ci sont, en général, des molécules à noyau aromatique qui peuvent émettre de façon transitoire des photons lorsqu'elles sont excitées par une source lumineuse ad hoc. Ainsi, chaque fluorochrome possède une longueur d'onde d'excitation et d'émission caractéristiques. En biologie et biochimie, ils sont employés pour marquer sélectivement des composants cellulaires (acides nucléiques, lipides, sucres...) ou pour quantifier les ions présents (H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...).

Les microscopes confocaux à balayage laser sont en général équipés de différentes sources laser (longueurs d'onde d'excitation), de photo-multiplificateurs optimisés et d'un système permettant de sélectionner les longueurs d'onde d'émission (filtres, prismes...). Il est ainsi possible de récupérer simultanément, tout en les séparant, des signaux de fluorescences correspondant à différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

D'autre part, lorsque l'échantillon est opaque, la lumière incidente du laser réfléchi sur la surface peut être collectée. Une image confocale en réflexion de l'échantillon (grains minéraux) peut alors être obtenue et associée aux signaux de fluorescence.

Dans cette étude, les images ont été réalisées à partir d'un microscope inversé Nikon TE 2000 U Eclipse équipé d'une tête confocal Radiance 2100 AGR-3Q Biorad. Le microscope est équipé d'objectifs à sec (x4, x10 et x20) et à immersion (x40 et x60). Le système permet d'adapter différents types de platine échantillons motorisées dont une platine microplaque qui permet l'observation directe des minéraux et/ou des bactéries présents dans les puits de microplaques Lumox (Figure C2. 5). Ainsi, des observations *in vivo* et *in vitro* sont possibles dans ces mini-réacteurs de lixiviation (puits de microplaque) sans interrompre l'expérience.

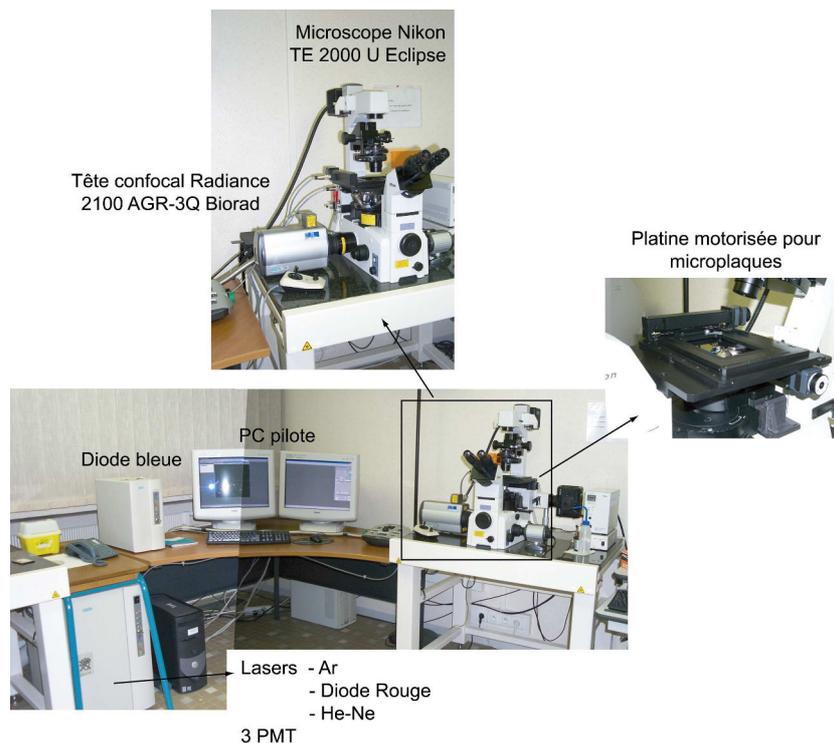


Figure C2.5 : Dispositif confocal à balayage laser employé dans cette étude avec platine motorisée à microplaques

La tête de balayage est reliée, par une fibre optique, à 4 lasers fournissant 7 longueurs d'onde différentes d'excitation, réparties entre le proche UV et le rouge :

- une diode bleue à 405nm (BLD).
- une laser Argon à 457, 476, 488 et 514nm.
- un laser He-Ne à 543nm.
- une diode rouge à 637nm.

En détection, le système rainbow permet, par combinaison de filtres interférentiels Long Pass (LP) et Short Pass (SP), de définir des fenêtres spectrales par pas de 10nm. Les signaux de fluorescences peuvent ainsi être récupérés entre 420 et 620nm. Ces filtres pseudo Band Pass ont une transmission supérieure à 80%, pour une largeur de bande passante de 10nm. Des images en réflexion des grains minéraux ainsi que les fluorescences induites par l'ajout de divers fluorochromes (marqueurs bactériens, sonde pH...) ont été obtenues en utilisant principalement les longueurs d'onde 488 et 514nm du laser Ar. Les caractéristiques des principaux fluorochromes employés dans cette étude sont résumées Tableau C2. 3.

Tableau C2. 3 : Caractéristiques des fluorochromes employés dans cette étude

Nom	Live/Dead	Bacterial Viability Kit	Sulforhodamine B	Oregon Green 514 carboxylic acid
Molécule	Syto 9	Propidium	C ₂₇ H ₃₀ N ₂ O ₇ S ₂	C ₂₂ H ₉ F ₅ O ₇ S
Propriétés	Diffusion facilitée	Diffusion membranaire	Hydrophobe	Sensible aux variations de pH
Composé marqué	Acide nucléique	Acide nucléique	Composé hydrophobe	--
Concentration finale (µmol.L ⁻¹)	--	--	0,7	1,5
λ excitation (nm)	489	488 - 595	565	489 - 506
λ émission (nm)	520	615	586	526 - 555
Rendement quantique	--	--	84	26 - 86

Trois fluorochromes (Syto9, Propidium, Sulforhodamine B) ont été employés pour marquer les cellules bactériennes. Toutefois, les deux marqueurs d'acides nucléiques ont une action létale et ne peuvent pas être utilisés pour étudier l'adhésion des bactéries aux surfaces minérales. Une méthode spécifique de coloration, utilisant un colorant vital (Sulforhodamine B) a donc été développée.

L'ajout de Sulforhodamine B (SRB) n'influe pas sur la viabilité de *Acidithiobacillus ferrooxidans* comme le montre la Figure C2. 6. Cette molécule a été largement employée pour doser les protéines cytoplasmiques dans une large gamme de pH (3-10). Sa fluorescence ne dépend pas du pH, la molécule peut donc être utilisée en milieu très acide (pH 1 à 2).

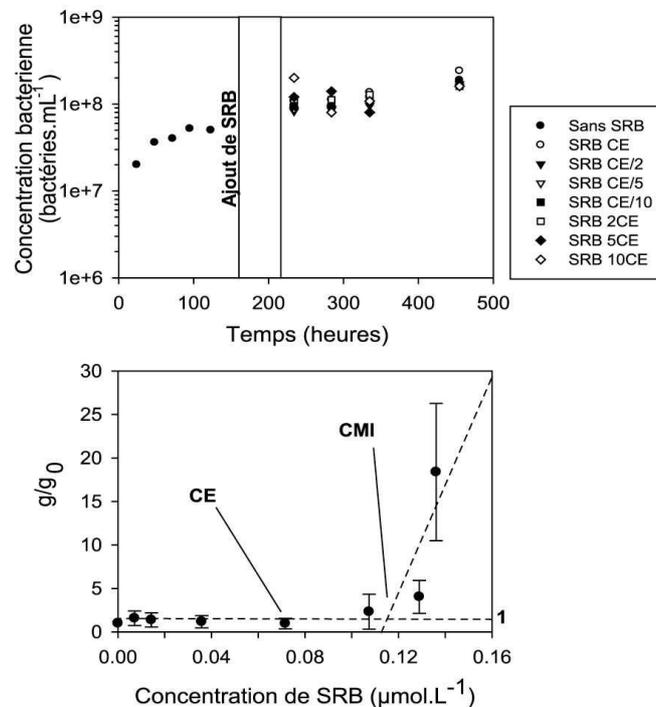


Figure C2. 6 : Influence de l'ajout de Sulforhodamine B sur la croissance de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. g₀ et g désignent les temps de génération en absence et présence de SRB. CE désigne la concentration de SRB utilisée expérimentalement et CMI la concentration minimale d'inhibition.

Quelle que soit la concentration de SRB en solution, la croissance bactérienne n'est pas réellement perturbée (Figure C2. 6). Deux jours après l'ajout de SRB dans le milieu de culture, les courbes de croissance bactériennes sont similaires. Le calcul du temps de génération des bactéries en présence (g) ou absence de SRB (g_0) permet de définir une concentration minimale d'inhibition (CMI) au-delà de laquelle l'ajout de SRB affecte la division cellulaire. Les très basses concentrations de SRB ne sont pas non plus favorables au marquage des cellules en raison de la forte réversibilité de leur pénétration dans les cellules vivantes. Ainsi, la concentration expérimentale (CE) choisie ($0.7\mu\text{mol.L}^{-1}$) permet donc un marquage cellulaire suffisamment stable et intense pour être employé en microscopie confocale sans affecter l'état physiologique des bactéries. On peut ainsi suivre *in vivo* l'adhésion des bactéries sur les surfaces minérales.

1.2.2 Traitement des données

Les données acquises sont traitées via le logiciel Laser Sharp 2000 de pilotage du microscope confocal. Une analyse statistique, sur différents grains et zones de grains, a été mise en oeuvre pour caractériser à la fois :

- la morphologie de l'interface bactérie/minéral
- la distribution bactérienne sur la surface minérale
- les figures de corrosion du minéral

Plusieurs algorithmes de calcul ont été appliqués sur les données acquises, soit globalement (sur l'ensemble des images tomographiques), soit localement dans des régions d'intérêt (ROI pour Region Of Interest) :

- la réattribution photonique « Reassignment » qui permet d'éliminer les co-localisations accidentelles dues à une mauvaise séparation des canaux lors de la phase d'acquisition (« Bleedthroug »). Cet traitement mathématique permet par exemple de distinguer la réflexion du laser sur la surface du minéral d'un marquage de cette même surface par un fluorochrome.
- la distribution moyenne des signaux de réflexion ou de fluorescence en fonction de la profondeur (« Mean Graph »).
- une analyse 4D « Time Course » qui permet de suivre l'évolution des signaux de fluorescence au cours du temps.

- la corrélation spatiale ou « co-localisation » qui permet de sélectionner les surfaces couvertes ou non couvertes par les bactéries.
- les ROIs sont définies sur les piles d'images projetées selon Z et permettent de dégager les contours du minéral ainsi que des figures de corrosion.

Deux régions d'intérêt principales ont pu être ainsi définies sur les grains corrodés :

- celle correspondant aux zones corrodées et figures de corrosion du minéral
- celle correspondant à la surface totale du minéral permettant de déduire la région du grain correspondant aux surfaces « lisses » et non corrodées.

Une image de grain de pyrite en contact avec des bactéries est ainsi traitée successivement par différents algorithmes pour déterminer les taux de recouvrement bactérien (Figure C2. 7). En effet, après reassignement, définition de ROI et seuillage, des masques ou images binaires sont définis dans chaque ROI (par l'algorithme co-localisation), à partir des points non-colocalisés, et sont appliqués aux piles d'images 3D des trois canaux. Les pourcentages de pixels correspondant aux zones de la surface minérale (ou des figures de corrosion) couverte ou non par les bactéries permettent de déterminer le taux de recouvrement bactérien total (ou relatif à ces figures).

Ces mêmes images peuvent être reconstruites numériquement à l'aide d'un modelleur 2D ou 3D (logiciel gOcad par exemple) pour analyse géostatique. Le principe de ces reconstructions sera détaillé au Chapitre 4.

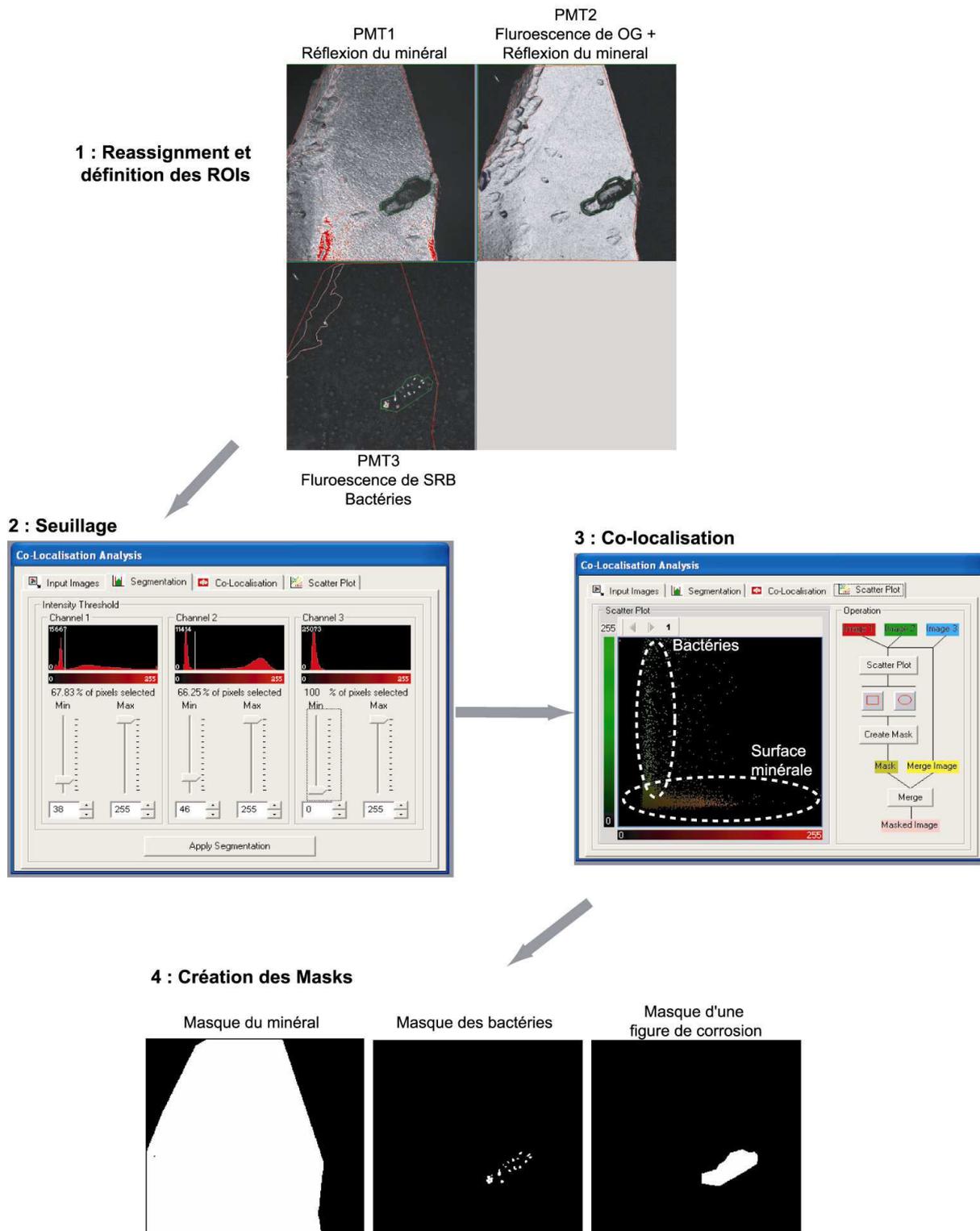


Figure C2.7 : Définition de ROIs, seuillage, co-localisation et création de masques (images binaires) à partir d'une image confocal pour traitement statistique.

2 Composition chimique de la solution : ICP-AES

Les teneurs en éléments totaux en solution ont été déterminées par spectrométrie d'émission ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry). C'est une méthode physique basée sur les propriétés d'interaction de la matière avec un rayonnement électromagnétique. Un plasma (gaz ionisé électriquement neutre) à haute température (7000K), généré par couplage inductif, excite les atomes de l'échantillon dans le domaine UV-Visible qui émettent des photons de longueur d'onde caractéristique en retournant à leur état fondamental. Des analyses en fer et cuivre ont été réalisées sur une ICP-AES en mode simultané Jobin Yvon 32S et le soufre total a été mesuré sur une ICP-AES en mode séquentiel (Jobin Yvon Ultratrace 238) avec une erreur moyenne sur les mesures de 2 à 3%, $\approx 10\%$ et $\approx 1\%$ respectivement. Avant analyse, les solutions prélevées dans des réacteurs de bio-oxydation sont filtrées à $0,2\mu\text{m}$. Un aliquot est utilisé directement pour les analyses de soufre alors qu'une solution d'acide d'Yttrium est ajoutée comme standard interne à un deuxième aliquot pour les analyses simultanées de fer et de cuivre, pour une solution finale à $0,6\%$ en Yttrium. Une droite de calibrage est établie avant chaque série d'analyse avec 5 solutions standards préparées dans la même matrice que les échantillons (milieu de culture) et de concentrations connues.

D'autres aliquots sont utilisés pour des analyses isotopiques de l'eau ($\delta^{18}\text{O}$) des milieux de culture et des sulfates en solution ($\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$).

3 Composition isotopique de la solution

3.1 $\delta^{18}\text{O}_{\text{eau}}$

Les compositions isotopiques en oxygène des solutions des réacteurs de lixiviation biologique et chimique ont été déterminées après équilibrage avec du CO_2 de composition isotopique connue dans un bain thermostaté à 25°C pendant 12h. Les déterminations du $\delta^{18}\text{O}$ du CO_2 rééquilibré ont été effectuées sur un spectromètre de masse VG602 en référence à un standard interne et donnés en ‰_{SMOW} avec une reproductibilité des mesures meilleure que $0,1\text{‰}$. Des aliquots de solutions initiales et prélèvements en cinétique en cours d'expérience ont été analysés .

3.2 $\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates en solution

Les sulfates en solution issus de la lixiviation de la pyrite ont été analysés après précipitation en sulfates de baryum BaSO_4 à partir d'une solution de chlorure de baryum

BaCl₂ à 5% à raison de 1mL de BaCl₂ par milligramme de SO₄²⁻ à précipiter. Au préalable, la solution est portée à ébullition pendant 30 min afin d'éliminer le CO₂ dissous et d'éviter la précipitation de carbonate de baryum. Le précipité de sulfate de baryum est récupéré par filtration sous vide et analysé en spectrométrie de masse couplé à un analyseur élémentaire.

Dès son introduction en machine, l'échantillon traverse un four, équipé d'une colonne spécifique de l'élément à analyser, où il subit une combustion et est transformé en CO ou SO₂ pour les analyses en oxygène et en soufre, respectivement. Les gaz de combustion sont entraînés vers la chaîne d'analyse par un flux d'Hélium au préalable mis en contact avec du cuivre à 650°C pour éliminer toute présence éventuelle de O₂. Le gaz est ensuite dirigé vers un chromatographe puis un spectromètre de masse pour analyse de composition isotopique (Figure C2. 8).

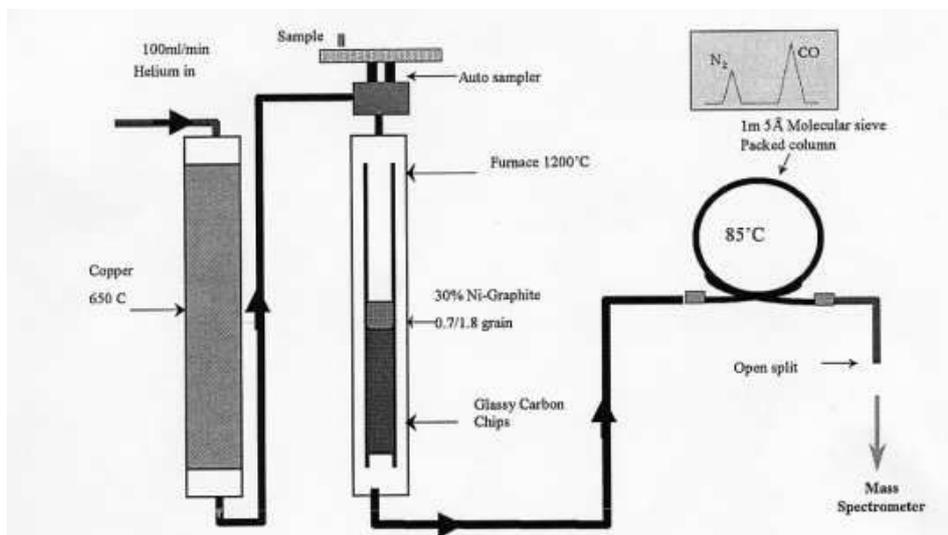


Figure C2. 8 : Schéma fonctionnel d'un Analyseur élémentaire 3000

Les résultats sont donnés par rapport à des gaz de référence et corrigés par rapport à des standards connus relativement au SMOW pour l'oxygène et au CDT pour le soufre.

Des échantillons standards passés régulièrement, tous les 6 échantillons en moyenne, attestent de la stabilité de la machine au cours des sessions d'analyse avec des reproductibilités de 0,05 à 0,1‰ en oxygène et 0,1 à 0,2‰ en soufre.

Partie III : Les analyses de surface

L'utilisation de méthodes d'analyses locales pas (Raman, XPS) ou peu (SIMS) destructrices sur les surfaces minérales permet de caractériser des traces d'activités biologiques ou chimiques potentiellement pérennes et de tenter de dégager des biosignatures.

1 Approche méthodologique de l'analyse de surface des échantillons

1.1 Méthodologie

Les techniques présentées ci-après ont pour but de caractériser la nature chimique et composition isotopique des phases en surface de pyrites oxydées. Ces techniques peuvent être regroupées selon la nature de l'information qu'elles apportent mais également en fonction des contraintes méthodologiques qu'elles imposent. Ainsi, deux groupes de techniques d'analyse peuvent être dégagés :

- des analyses de surface, en général en conditions atmosphériques et non destructrices, pouvant être réalisées *in vivo* et qui interviennent au début de la chaîne d'analyse : AFM, Raman, MEB.
- des analyses de surface en conditions de vide poussé et/ou légèrement destructrices et qui interviennent en dernier lieu sur les échantillons en raison des contraintes techniques imposées par les machines : XPS, SIMS.

Le principe de ces différentes techniques sera, dans la suite de ce chapitre, détaillé en fonction des informations apportées tout en répondant à ces critères de chronologie et de contraintes analytiques.

1.2 Préparation des échantillons

Un dispositif de fixation des grains minéraux a été choisi afin d'utiliser une même bague pour les différentes analyses spectrochimiques, à l'exception de l'Infra-Rouge dont la préparation des échantillons sera détaillée paragraphe 3.1.1. Les grains de pyrite de granulométrie 53 μ m à 250 μ m sont récupérés dans les réacteurs de lixiviation, vortexés et séchés pour éliminer toute trace de bactérie. L'absence de cellules bactériennes à la surface des grains a été vérifiée par Microscopie Confocale et Microscopie Electronique à Balayage. Les minéraux sont ensuite observés sous loupe binoculaire pour sélectionner des grains

oxydés suffisamment plats et montés (par pressage) dans des feuilles d'indium (Aldrich, 35727-8). La taille de la bague est adaptée au diamètre des portes-échantillons de la sonde ionique mais cette préparation peut également être utilisée pour toutes les autres analyses de surface (AFM, Raman...) exceptée la Spectroscopie Infra-Rouge. La nature conductrice de l'indium et de la pyrite autorise d'autre part des analyses MEB et XPS sans autre préparation spécifique. Les analyses isotopiques nécessitant le dépôt d'une couche conductrice d'or en surface (interférant en Raman) sont effectuées en dernier.

2 Morphologie de l'interface bactérie/minéral : Microscopie à Force Atomique, AFM

Depuis quelques années, les microscopies à champ proche se sont développées permettant de déterminer *in situ* des propriétés physico-chimiques ou rhéologiques de surface d'échantillons divers. La microscopie à Force Atomique, inventée en 1985 par G. Binnig et H. Rohrer, permet d'obtenir une analyse topographique tridimensionnelle de surfaces à très haute résolution pouvant aller, dans certains cas, jusqu'à la résolution atomique. C'est une méthode assez flexible qui permet de travailler sur des échantillons variés : métaux, polymères, cellules biologiques, qu'il soient indurés ou non, sous forme de films ou de poudres, en milieu liquide ou à sec. Elle est ainsi très bien adaptée à l'étude de surfaces de pyrite dans notre cas.

Dans cette étude, les images AFM ont été réalisées à partir du microscope ECU plus Explorer (Thermomicroscopes Veeco instrument) du LCPME qui ne nécessite pas un environnement ultravide. Le principe de la méthode (Figure C2. 9) est de mesurer les différentes forces d'interaction (électrostatiques, Van der Waals, magnétique, ionique...) entre une pointe supposée terminée par un seul atome et les atomes de la surface d'un échantillon. La pointe en question est placée au bout d'un levier sur lequel est projeté un laser. Il se réfléchit sur le levier puis ensuite sur un miroir avant d'entrer dans un photodétecteur constitué de quatre cellules photoélectriques. Les déplacements dans les trois dimensions de l'espace de la pointe sont contrôlés par une céramique piézoélectrique et permettent d'obtenir une résolution nanométrique en z.

L'AFM possède divers modes de fonctionnement, le mode contact (à force constante) et les modes vibrants ou non contact (à fréquence de vibration de la pointe constante). Un système d'asservissement ajuste la position de la pointe par rapport à la surface de l'échantillon, immobile pendant les mesures. La consigne d'asservissement est basée sur une

mesure en continu de la déflexion du levier (en mode contact) ou de l'amplitude de vibration du levier (en modes vibrants).

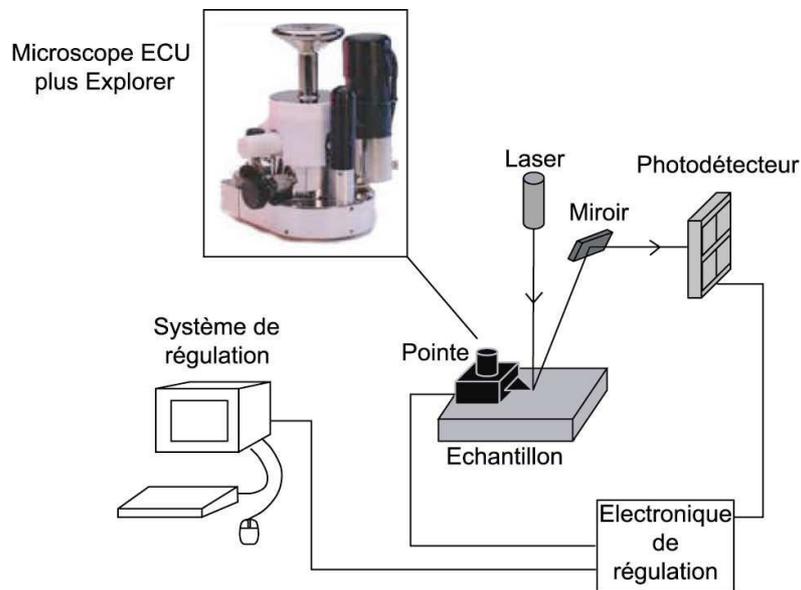


Figure C2.9 : Principe de la Microscopie à Force Atomique

Le mode contact permet d'obtenir directement la topographie de surface, alors que les modes vibrants visualisent les forces d'interactions pointe/surface. On obtient dans ce dernier cas une image numérique des surfaces isomesures des forces et non directement la topographie.

Cette technique d'étude de surface a été précédemment utilisée (Toniazzo, 1998) pour caractériser la surface de pyrite bio-oxydées et déterminer la distribution et morphologie des produits d'oxydation de surface. Dans cette étude, l'AFM a été utilisée en mode contact pour « imager » des surfaces d'échantillons standards (pyrite FeS_2 et sulfates CaSO_4) préalablement analysés en sonde ionique (Figure C2. 10) afin d'établir des droites de calibrage des vitesses de creusement du faisceau primaire de sonde ionique. Les profondeurs d'investigation des analyses isotopiques et les volumes moyens décapés sur les grains ont ainsi pu être estimés pour diverses intensités primaires du faisceau de sonde ionique.

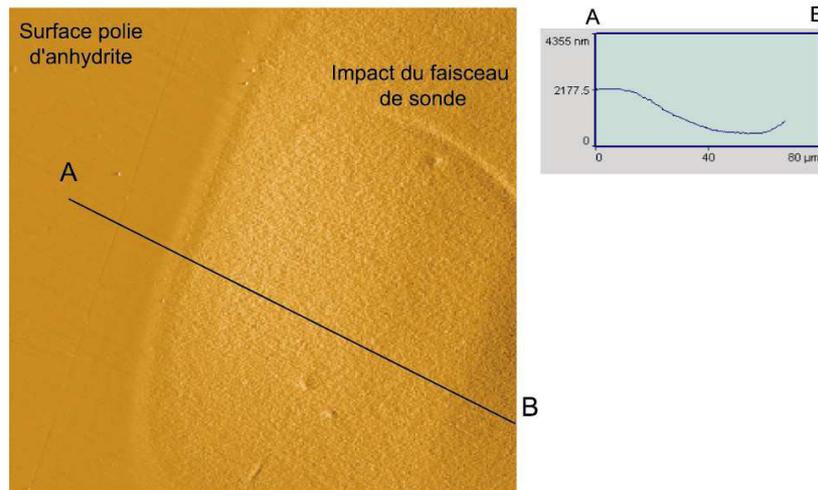


Figure C2. 10 : Image AFM en mode contact d'une surface d'anhydrite après impact du faisceau de sonde ionique. Le profil AB (coupe en Z) donne une estimation de la topographie et de la profondeur de l'impact.

Ces observations peuvent également être réalisées sur des grains de pyrite bio- ou chimio-oxydés ayant été analysés par sonde ionique afin d'imager, en profondeur, les zones des grains minéraux qui présentaient des produits d'oxydation en surface (Figure C2. 11).

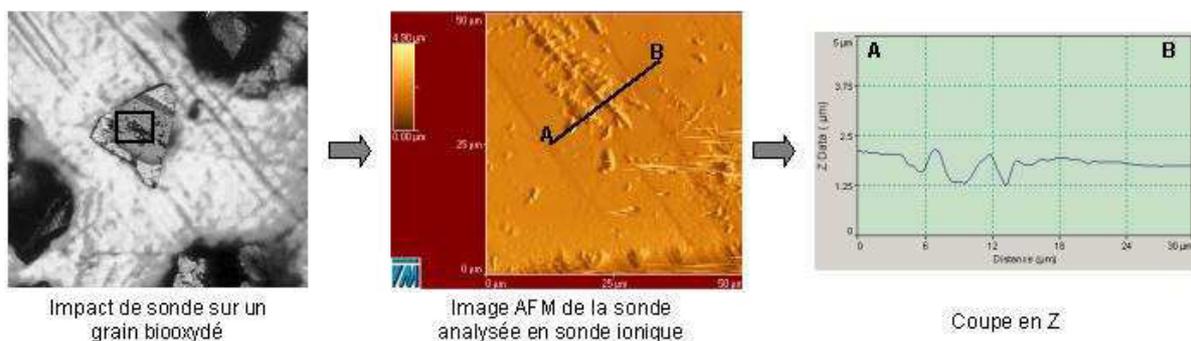


Figure C2. 11 : Image AFM en mode contact d'une surface de pyrite après analyse à la sonde ionique et coupe en Z (profil AB) au centre de la zone d'impact du faisceau de sonde ionique.

3 Composition chimique de l'interface bactérie/minéral

Différentes méthodes spectroscopiques sensibles aux environnements de surface, ont été utilisées pour déterminer, de manière précise et à différentes échelles, la nature et répartition des produits d'oxydation présents en surface de pyrites bio- ou chimio-oxydées :

- Spectroscopies Infra-Rouge et Raman
- Spectroscopie de Photoélectrons X.

3.1 Spectroscopies vibrationnelles : IR et Raman.

Les spectroscopies Infra-Rouge (IR) et Raman sont deux méthodes d'étude des vibrations moléculaires, dont les transitions quantiques se situent dans la gamme 100-10 000 cm^{-1} .

Alors que l'IR est sensible aux variations de moment dipolaire d'une molécule, l'intensité du signal Raman dépend de la polarisabilité d'une molécule. Par exemple, le Raman détectera aisément le soufre élémentaire S_8 (de moment dipolaire nul) au contraire de l'IR qui sera, en revanche, très sensible à la présence d'eau (moment dipolaire important). La spectroscopie Raman peut donc être employée *in vivo*, sans déshydratation préalable de l'échantillon contrairement à l'IR. Ces deux techniques sont donc complémentaires et permettent, via la détection de vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, de déterminer les phases minérales ou organiques présentes dans les échantillons analysés.

3.1.1 Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier : FTIR

Principe

Les analyses IR ont été réalisées sous purge d'azote sur un spectromètre Infra-Rouge Bruker (Vector 22) qui permet de balayer une gamme de 370 à 7500 cm^{-1} avec une résolution de l'ordre de 1 cm^{-1} et piloté par le logiciel OPUS Version 2.2. Dans cette étude, les spectres ont été enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} .

L'appareil est composé d'une source de rayonnement IR (global), d'un système interférométrique (Michaelson) et d'un détecteur DTGS (Figure C2. 12). L'interféromètre, par un jeu de miroirs et de séparatrices, divise la radiation incidente et crée une différence de marche (déphasage) entre les deux faisceaux. Ceux-ci traversent alors l'échantillon avant d'atteindre le détecteur. L'interférogramme obtenu est traité par transformée de Fourier inverse qui fournit le spectre Infra-Rouge de l'échantillon.

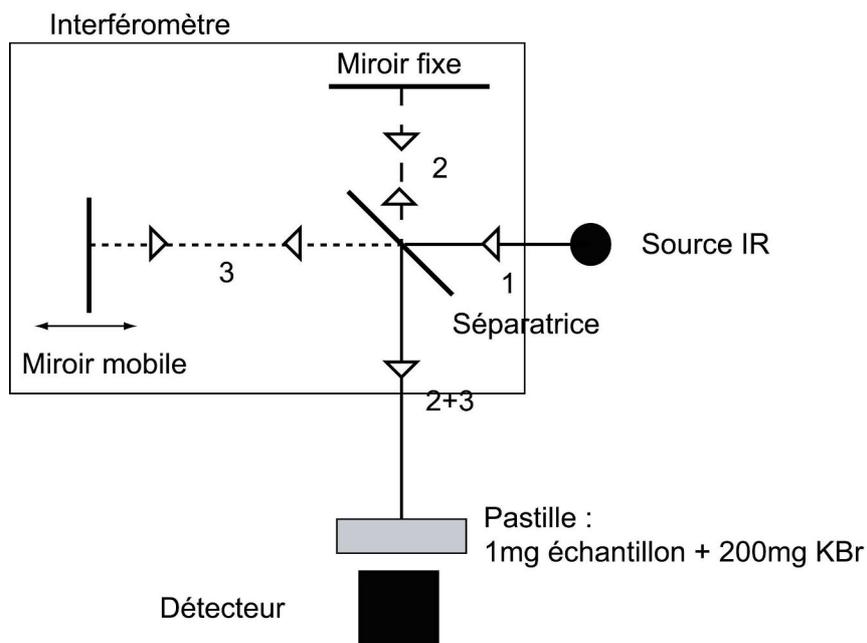


Figure C2. 12 : Principe d'un spectromètre Infra-Rouge à Transformée de Fourier

Préparation des échantillons

Les échantillons minéraux analysés sont prélevés dans les réacteurs de lixiviation, vortexés pour décrocher les bactéries adhérentes puis séchés et conservés, au minimum 48h, sous vide en dessiccateur en présence de P_2O_5 . Avant analyse, l'échantillon est mélangé de façon homogène à du KBr (produit transparent en Infra-Rouge) avant d'être pastillé. Environ, 1mg de poudre d'échantillon est mélangé à 200mg de KBr (Spectralal, Riedel-de Haën) et broyé finement dans un mortier en agathe. La pastille est réalisée sous presse à 10T et est analysée directement pour éviter toute réhydratation.

3.1.2 Spectroscopie Raman

Tout comme l'IR, la spectrométrie Raman est une spectroscopie de vibration moléculaire, non destructrice, qui détecte les transitions vibrationnelles (déplacement en nombre d'ondes de 0 à 4000 cm^{-1}) résultant du processus de diffusion inélastique de la lumière. Lorsque l'échantillon à analyser est excité par une source monochromatique de lumière (laser), la majeure partie des photons excitateurs est réfléchi ou absorbé. Une fraction bien plus faible est diffusée (Figure C2. 13) : approximativement, 1 photon sur 1.10^4 est diffusé élastiquement (sans changement d'énergie par rapport au rayonnement excitateur) par le matériau (diffusion Rayleigh), alors que 1 photon sur 1.10^8 est diffusé inélastiquement (avec modification d'énergie) : c'est la diffusion Raman.

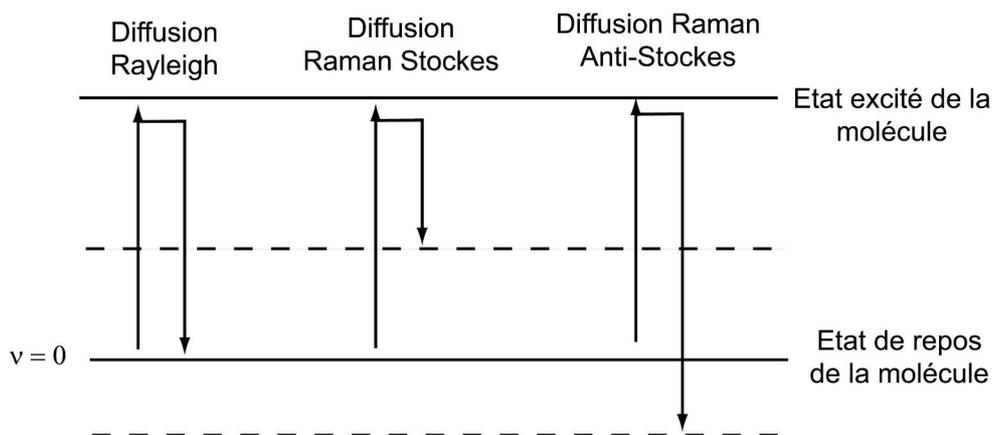


Figure C2. 13 : Diffusion Rayleigh et Raman

Pour que la diffusion Raman se produise, il faut également que le champ électrique de la lumière excitatrice induise un changement de polarisabilité de la molécule. En effet, toutes les molécules possèdent une polarisabilité α . L'application d'un champ électrique \vec{E} à une molécule peut induire un dipôle $\vec{\mu}$ tel que $\vec{\mu} = \alpha \vec{E}$ où α est donc une constante de proportionnalité entre le champ appliqué par le laser incident et le dipôle induit par ce champ.

Cette polarisabilité qui est anisotrope, représente la « facilité » avec laquelle le nuage électronique peut se distordre sous l'effet d'un champ électrique. Elle varie donc en fonction de l'orientation du champ par rapport à l'axe de la molécule, et peut être représentée par un tenseur d'ordre 3 dont la représentation dans l'espace est une ellipsoïde :

$$\begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix}$$

La pyrite possède 14 modes de vibrations dont 4 sont inactifs, 5 sont actifs en Infra-Rouge et 5 en spectrométrie Raman (Gornay, 2002). Ces 5 modes sont identifiés comme A_g , E_g et 3 T_g .

Les microanalyses Raman ont été effectuées avec un spectromètre Raman Jobin-Yvon TC64000 équipé d'un système de détection CCD à l'azote liquide permettant d'utiliser une faible puissance laser qui n'altère pas ou peu les surfaces analysée. Les échantillons séchés, montés sur feuille d'indium, sont excités par une source laser Ar ($\lambda = 514 \text{ nm}$) de résolution spatiale $1,5 \mu\text{m}$ et à une puissance de 2 mW. Les échantillons sont placés sous un microscope confocal Olympus BH 10 couplé au spectromètre, équipé :

- d'une platine motorisée pas à pas.
- ou d'une platine de microscope métallographique autorisant des rotations angulaires précises de l'échantillon dans le plan XY (par exemple 45° pour les déterminations d'orientation cristallines).

Le microscope est équipé d'une caméra qui permet de localiser les zones à analyser et, associée à l'objectif de la platine, de focaliser le laser sur la surface d'analyse (analyse confocale). Les mesures ont toutes été réalisées à l'aide d'un objectif x50 d'ouverture numérique 0,95 dont les résolutions spatiales théoriques latérales et axiales sont respectivement de 0,42 μm et 2,31 μm .

Les spectres sont réalisés sur une plage de 50 à 1300 cm^{-1} à travers deux plages d'analyse (50-730 cm^{-1} et 680-1300 cm^{-1}) qui permettent de visualiser correctement les vibrations du doublet S-S²⁻ de la pyrite ainsi que les composés principaux d'oxydation précédemment identifiés. Certains échantillons ont été également analysés deux fois, après rotation de 45° de la platine du microscope pour déterminer leur orientations cristallines moyennes. Le spectromètre est configuré en mode triple soustractif et calibré avant chaque analyse sur la raie du Hg (éclairage néon de la pièce). Deux réseaux à l'entrée éliminent les ondes Rayleigh. Le faisceau est ensuite reconcentré puis dispersé par un troisième réseau situé en amont du détecteur.

Des spectres de référence sur des surface de pyrite nettoyées mettent en évidence uniquement les principaux modes de vibration du doublet S-S²⁻ de la pyrite K : Ag à 379 cm^{-1} , Eg à 343 cm^{-1} et les trois Tg (Tg₁ 350 cm^{-1} , Tg₂ 377 cm^{-1} et Tg₃ 430 cm^{-1}). Les deux pics Tg₁ et Tg₂, sauf dans quelques rares configurations où les principales vibrations Ag et Eg sont éteintes, sont masqués par les pics à 379 et 343 cm^{-1} et ne sont pas identifiables (Figure C2. 14).

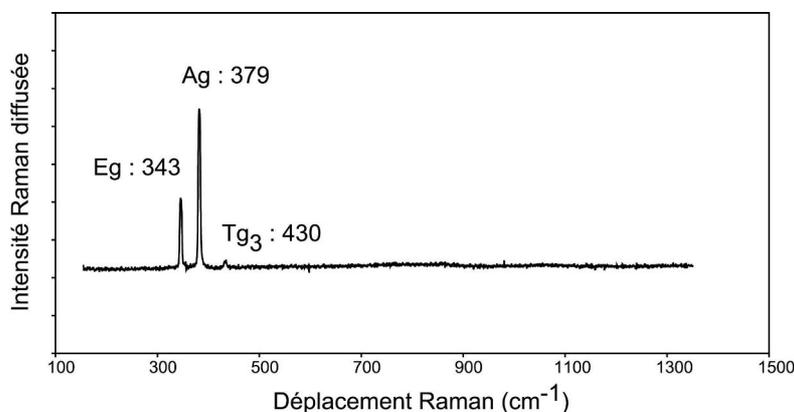


Figure C2. 14 : Spectre Raman d'une pyrite nettoyée faisant apparaître les principaux modes de vibration du doublet S-S²⁻ : Ag, Eg et Tg₃.

Ces spectres caractéristiques de la pyrite serviront de référence (absence de composé de surface) pour caractériser l'évolution des états de surface des minéraux utilisés dans les expériences d'oxydation biotique ou abiotique.

3.2 Caractérisations *post-mortem* sous vide des surfaces de pyrite

En complément des analyses IR et Raman dont la résolution spatiale est l'ordre de un à quelques micromètres, deux techniques d'analyse à haute résolution ($\ll 1\mu\text{m}$) ont été employées : MEB et XPS. toutefois, leur utilisation exige des vides poussés et/ou des préparations d'échantillons particulières (métallisation), ce qui ne permet pas de suivre les transformations minéralogiques et chimiques des échantillons *in situ* et en temps réel.

3.2.1 Microscopie Electronique à Balayage : MEB

Conçue dès 1929, la Microscopie Electronique à Balayage permet, à travers un balayage par un faisceau électronique, d'imager la surface d'un échantillon. Ce-dernier est placé sous vide ($<10^{-8}$ Torr) et est bombardé par des électrons émis par un filament de Tungstène chauffé à la température thermoionique et accélérés par un champ électrique créé entre le whelnet et l'anode (Figure C2. 15). Les électrons secondaires issus de l'échantillon sont transformés en photons par un scintillateur relié par fibre optique, à un photomultiplicateur. L'image est restituée par un moniteur.

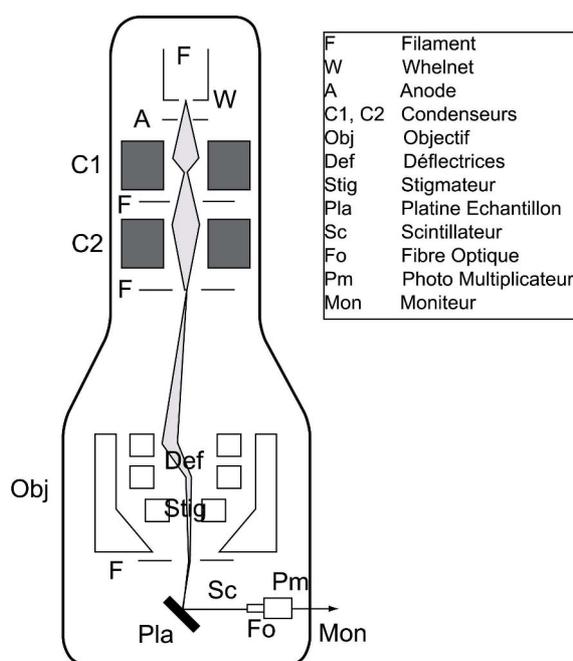


Figure C2. 15 : Schéma de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage.

Des microanalyses peuvent également être obtenues en collectant les rayons X émis par l'échantillon sous l'impact du faisceau électronique. On obtient ainsi une cartographie de la répartition des éléments.

Des surfaces de grains de pyrite oxydés par traitement biotique ou abiotique ont été imagées sur un MEB HITACHI S2500 + EDS (service commun de la Faculté des Sciences et Techniques, Henri Poincaré, Nancy I) équipé d'un filament de tungstène, permettant de décrire précisément les figures de corrosion du minéral. La résolution maximale est de 2,5 Å correspondant à un grossissement de x200 000. Des cartographies élémentaires (O, Fe, S) n'ont pu être obtenues que sur des grains oxydés à l'air présentant des phases d'altération suffisamment nombreuses et développées.

3.2.2 Spectroscopie de Photoélectrons X : XPS

La Spectrométrie de Photoélectrons X ou XPS a été développée dans les années cinquante par l'équipe du professeur K. Siegbahn. Cette technique est basée sur les variations des énergies de liaison des atomes photo-ionisés en fonction de leur environnement chimique. C'est une technique de surface (90% de l'information collectée provient des quelques premiers Å) qui permet d'accéder à des informations quantitatives sur la nature chimique de l'échantillon. L'analyse des surfaces par XPS se fait, sous vide poussé ($<10^{-9}$ Torr), par l'irradiation d'une surface d'échantillon « propre » (sans bactérie) à l'aide d'un faisceau d'électrons X mono ou polychromatique et la récupération des électrons émis par effet photoélectrique (Figure C2. 16).

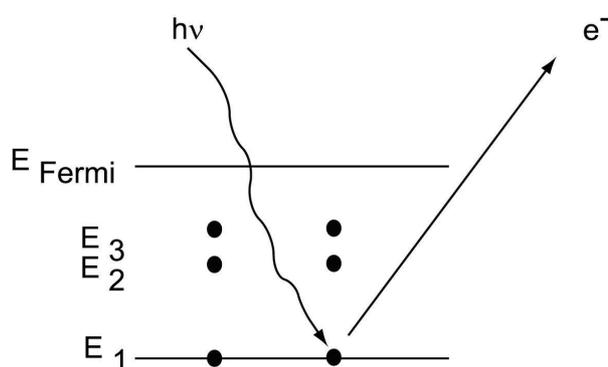


Figure C2. 16 : Emission d'un photoélectron en XPS

Comme le libre parcours moyen dans la matière sans interaction pour un photon est plus grand (de l'ordre du micromètre) que pour un électron (de l'ordre du nanomètre), il est

donc possible d'ioniser les échantillons jusqu'à une profondeur de l'ordre du micromètre. Les électrons provenant de la première dizaine de nanomètres de la surface du matériau sont collectés, sans perte d'énergie. Le principe de la conservation de l'énergie permet d'écrire le bilan énergétique suivant, lors de l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$:

$$E_{\text{liaison}} = h\nu - E_{\text{cinétique}} - W_{\text{sortie}}$$

avec $h\nu$: Energie incidente du faisceau de rayons X.

$E_{\text{cinétique}}$: Energie cinétique de l'électron à la sortie de l'échantillon.

E_{liaison} : Energie de liaison de l'électron dans l'atome.

W_{sortie} : Travail de sortie des électrons.

Pour déterminer l'énergie de liaison que possédait l'électron avant son éjection, caractéristique de la molécule à laquelle il appartenait, il suffit de déterminer son énergie cinétique à la sortie. Dans le spectromètre XPS, un système de lentille attire l'électron vers un analyseur hémisphérique qui se comporte comme un filtre en énergie. Soumis à un champ électrique donné (entre deux plaques), l'électron possède une trajectoire caractéristique dans cet analyseur, ce qui permet de déterminer son énergie cinétique.

Cette spectroscopie de surface, à ultra haute résolution (profondeur d'analyse de 10\AA), a été appliquée ponctuellement pour une caractérisation moléculaire des premières couches d'oxydation en surface de pyrites oxydées.

Les analyses ont été effectuées au Centre de Recherches sur la Matière Divisée (CRMD-CNRS, Orléans) sur un spectromètre possédant 2 sources RX (Mg : 1253,6eV et Al : 1486,6eV) et 2 sources UV (HeI : 21,2 eV, HeII : 40,8 eV). Le détecteur hémisphérique possède une résolution de $\pm 0,2$ eV et la surface analysée (sous un vide limite de $3-4 \cdot 10^{-11}$ torrs) est de 1 à 15mm^2 . Les orbitales 1s du carbone et de l'oxygène ainsi que les orbitales $2p_{3/2}$ du soufre et du fer ont été analysées sur différents échantillons. Les orbitales de l'azote et du sodium ont également été considérées pour vérifier l'état de propreté des échantillons et la non-pollution par une contamination extérieure (trace de doigts...). Un premier balayage (en énergie) global de l'échantillon est réalisé pour identifier les éléments présents, et les orbitales choisies sont ensuite détaillées. Plusieurs énergies de liaison, correspondant à différentes molécules, ont ainsi pu être détectées dans chaque orbitale (Figure C2. 17). Un logiciel d'acquisition permet de déterminer l'environnement chimique des atomes étudiés selon des méthodes non linéaires rappelées par Toniazzo (1998).

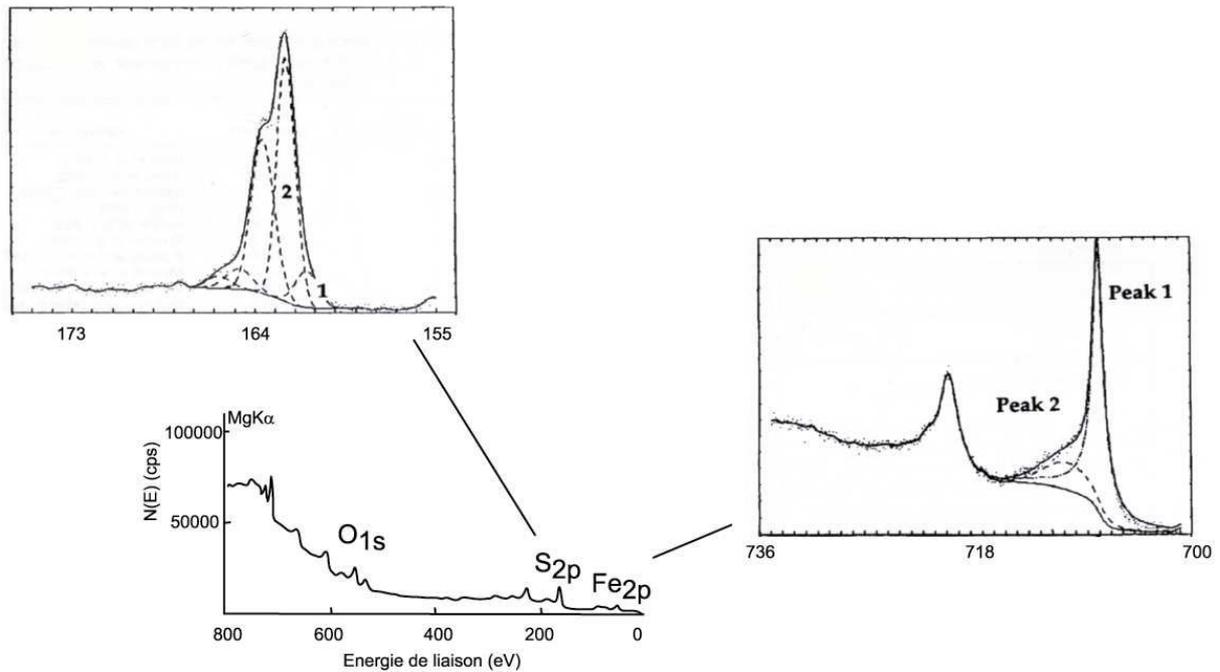


Figure C2. 17 : Exemple de spectres XPS réalisé sur une cassure fraîche de pyrite (d'après Eggleston, 1996). Le détail des orbitales S $2p_{3/2}$ et Fe $2p_{3/2}$ est donné à partir du spectre de balayage général en énergie. Les pointillés indiquent les pics de décomposition du signal global de l'orbital.

Deux paramètres majeurs doivent être pris en compte dans l'interprétation quantitative des spectres XPS :

- la contribution de chaque espèce par rapport à l'aire totale de chaque orbitale.
- la contribution de chaque espèce par rapport au signal total XPS en corrigeant l'aire des pics par un facteur de sensibilité déterminé par Scofield (1976) à 1 pour C(1s), 0.09 pour Fe($2p_{3/2}$), 0.90 pour S($2p_{3/2}$) et 0.34 pour O(1s).

Les données obtenues par XPS viennent compléter celles des spectroscopies Raman et Infra-Rouge en caractérisant la composition de la couche d'oxydation de manière à la fois plus précise (échelle atomique) et plus globale, sur une zone de 50 μ m de côté. La surface balayée par le faisceau est d'ailleurs comparable aux zones analysées par sonde ionique. D'autre part, l'XPS pourrait apporter des informations sur la spéciation du fer qui viendraient en complément de l'identification moléculaire des composés de surface par spectroscopie Raman.

4 Isotopie de l'interface bactérie/minéral : Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires, SIMS

Cette technique étant la plus contraignante au niveau de la préparation des échantillons (sous vide, surface sans bactérie, film conducteur en surface), et la plus destructrice compte tenu de la taille réduite des composés analysés (quelques centaines de nanomètres), intervient en dernier lieu dans la caractérisation de l'interface bactérie/minéral de grains oxydés et permet d'accéder à la composition isotopique des produits d'oxydation de surface.

4.1 Principe de la sonde ionique

La sonde ionique (SIMS) permet de mesurer directement les répartitions élémentaires et isotopiques dans des échantillons solides par des analyses ponctuelles et peu destructrices sans traitement chimique préalable. Le principe de cette spectrométrie est de bombarder un échantillon à l'aide d'un faisceau d'ions primaires (Cs^+ ou O^-) pour collecter et analyser les ions secondaires émis par cet celui-ci. Ce type de spectrométrie de masse, apparue dans les années 60, s'est développée dans le domaine de Sciences de la Terre plus récemment avec notamment la mise au point de sondes ioniques de nouvelle génération à haute sensibilité comme la sonde ionique Caméca 1270 (Figure C2. 18). Cette-dernière autorise des analyses *in situ* de minéraux pour presque tous les éléments de l'hydrogène à l'uranium (Rollion-Bard, 2001).

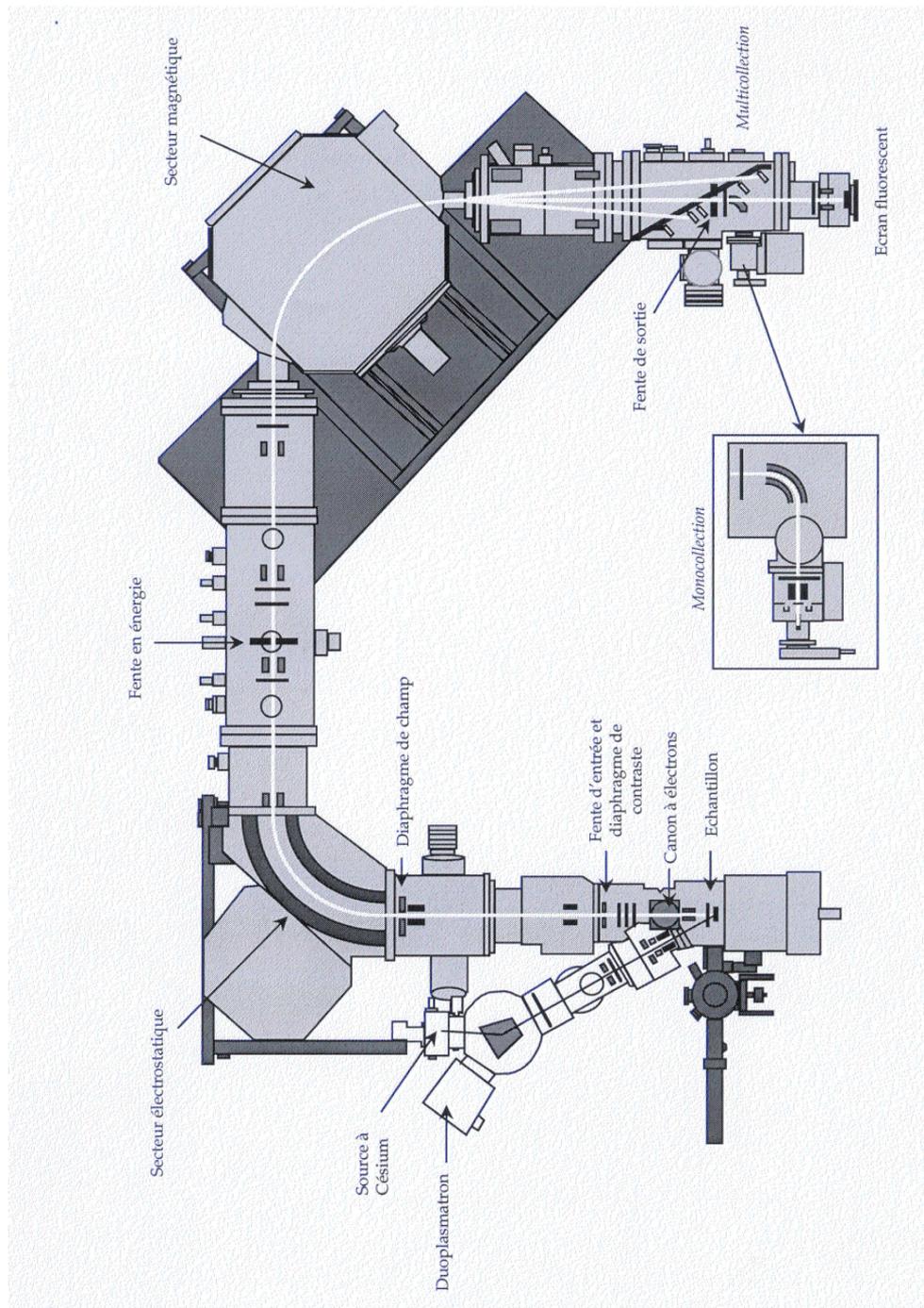


Figure C2. 18 : Schéma d'une sonde ionique Caméca 1270 (documents Caméca).

Lors de cette étude, des analyses de la composition isotopique en oxygène ont été réalisées avec la sonde ionique Caméca 1270 du CRPG. Cette sonde possède deux sources d'ions primaires différentes : un Duoplasmatron (ions primaires O^- , O_2^- , O_2^+ issus d'un plasma provenant d'un flux de O_2) et une source à Césium (ions primaires Cs^+).

Le choix de la source dépend de la potentialité de l'élément à analyser à s'ioniser sous forme d'ions négatifs (ions primaires positifs) ou positifs (ions primaires négatifs) (Figure C2. 19).

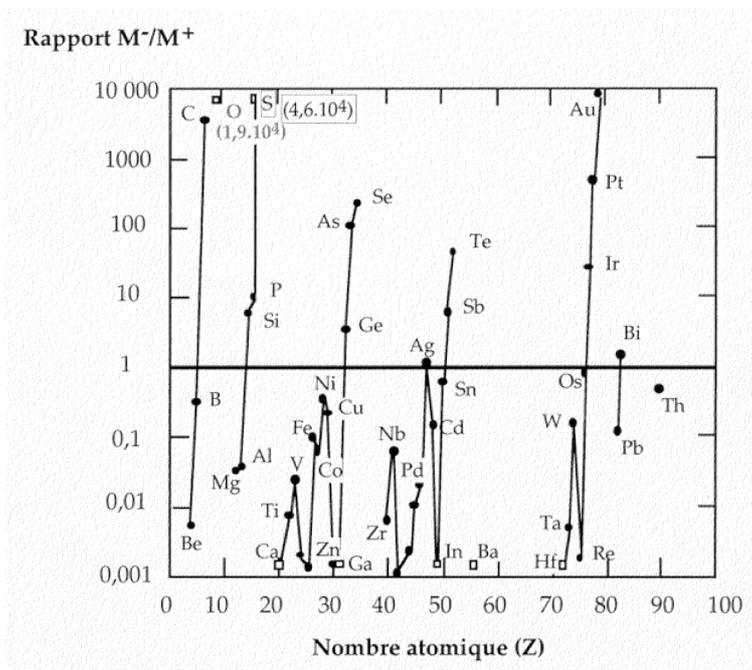


Figure C2. 19 : Ionisation des éléments (d'après Storms et al, 1977) (documents Caméca).

Les analyses d'oxygène se font à partir de la source à Césium, cet élément s'ionisant sous forme négative et cela permet également d'éviter toute interférence avec les ions primaires du Duoplasmatron (O^-). Les ions Cs^+ sont produits à partir d'une pastille de chromate de césium ($Cs_2Cr_2O_7$) chauffée par un filament (Figure C2. 20). Le gaz sublimé est ensuite ionisé au contact d'une plaque de tungstène chauffée à $1100^\circ C$ et envoyé dans la colonne primaire de la sonde. Un secteur magnétique (PBMF pour Primary Beam Mass Filter) ainsi qu'un système optique de lentilles permettent respectivement de purifier le faisceau d'éventuels ions formés à partir des parois métalliques de la machine et de focaliser et régler l'intensité du faisceau primaire. La taille minimale des faisceaux est d'environ $0,2\mu m$ pour Cs^+ et $5\mu m$ pour O^- mais on travaille en général avec des faisceaux d'une dizaine de microns de diamètre.

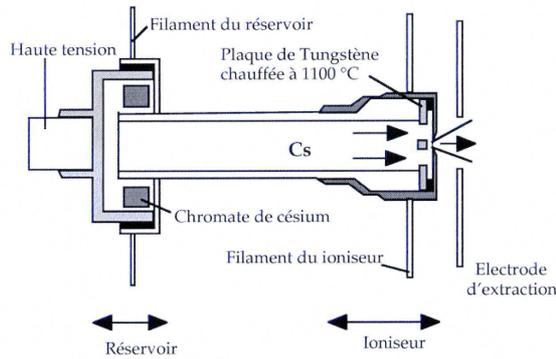


Figure C2. 20 : Source Césium d'une sonde ionique caméca 1270 (documents Caméca).

Bien que la source Césium permette une étude plus fine et une meilleure résolution de masse, son utilisation est cependant plus contraignante. Il faut en effet utiliser un canon à électrons pour compenser les charges positives accumulées en surface d'échantillons isolants (Figure C2. 21) suite au bombardement par les ions Cs^+ , qui sont susceptibles de dévier le faisceau primaire de la surface de l'échantillon. La sonde ionique 1270 du CRPG est équipée d'un canon à électron à incidence normale (NEG, Normal incidence Electron Gun). Les électrons envoyés par le NEG n'atteignent pas l'échantillon mais forment un nuage en surface qui compense cette accumulation positive.

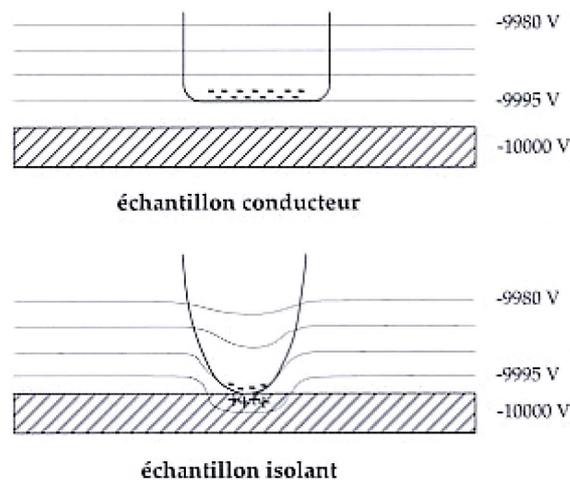


Figure C2. 21 : Accumulation de charges positives à la surface de l'échantillon (documents Caméca).

L'échantillon à analyser doit présenter une surface plane et conductrice (métallisée à l'or ou au carbone), monté dans un porte-échantillon perpendiculaire à l'axe optique de la machine. Il est introduit dans la machine par un sas permettant de conserver un vide dans la chambre d'analyse meilleur que 10^{-8} torrs.

L'échantillon à analyser, est bombardé avec les ions primaires produits dans la source, accélérés dans la colonne primaire et focalisés sur la zone à analyser.

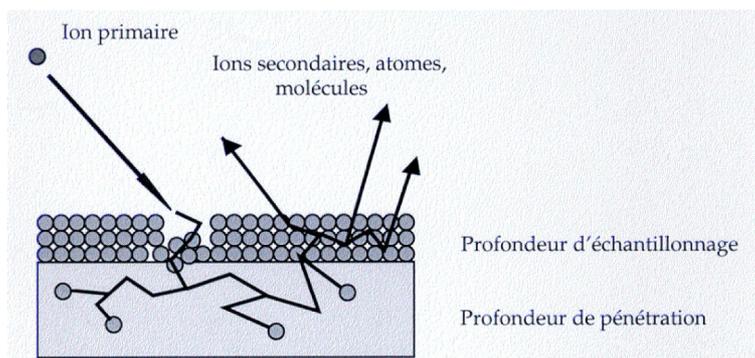


Figure C2. 22 : Principe du bombardement ionique (documents Caméca).

Ce bombardement conduit à des collisions en cascade (Figure C2. 22) qui éjectent les atomes de surface de la zone ciblée qui émet une partie des éléments qui la constitue sous forme d'ions secondaires (Potts *et al.*, 1995). En fait, différents éléments de charge positive, négative ou neutre sont éjectés au niveau de l'échantillon (Aleon, 2001) (1) des ions primaires rétrodiffusés provenant du faisceau primaire ou (2) des atomes neutres, (3) des photons et (4) des ions secondaires provenant de l'échantillon. La profondeur affectée par ces collisions est de l'ordre de quelques couches atomiques et la durée d'une collision engendrée par un ion primaire est d'environ 10^{-12} à 10^{-14} s. Entre deux impacts d'ions primaires (10^{-10} s), on considère que le système revient à un état d'équilibre. Toutefois, le processus d'ionisation de l'échantillon est complexe et dépend principalement de la nature de l'ion et de l'état de surface de l'échantillon. Plusieurs modèles ont été développés pour expliquer ce phénomène, comme celui de Andersen et Hinthorne (1973) basé sur un plasma dense ou celui de Slodzian (1980) basé sur les cassures de liaison.

Une fois les ions secondaires produits, ceux-ci sont accélérés par un champ électrique présent entre l'échantillon et la première lentille. Ils rentrent dans le spectromètre de masse (Figure C2. 23) où ils seront filtrés en énergie et en masse.

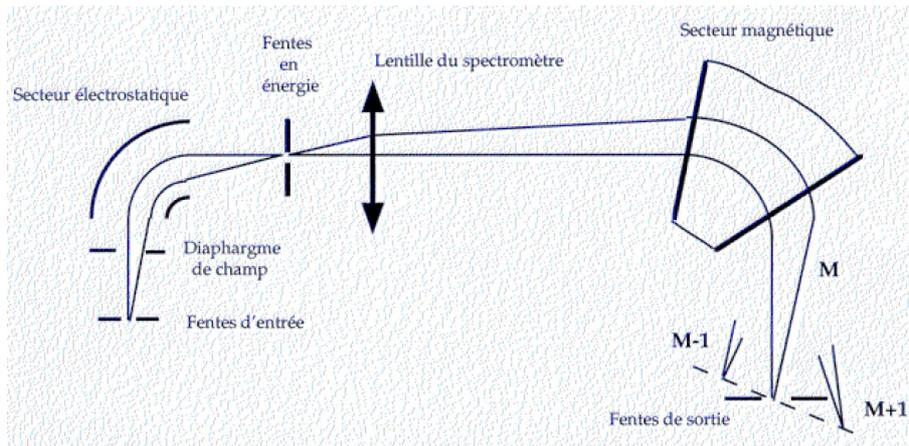


Figure C2. 23 : Spectromètre de masse (documents Caméca).

Le faisceau d'ions passe dans le secteur électrostatique de champ \vec{E} (ESA pour Electrostatic Sector Analysis) et une fente qui permet de filtrer les ions en fonction de leur énergie cinétique (Figure C2. 24). Ainsi, les ions de même masse focalisent en un même point quelque soit leur énergie alors que les ions de masses différentes sont déviés à la faveur d'une différence d'énergie. De cette manière, certains ions primaires ayant été accélérés après impact sur l'échantillon sont séparés des ions secondaires à analyser. Une différence de potentiel V est appliquée entre deux plaques hémisphériques. Les ions ont une trajectoire circulaire dont le rayon R augmente avec l'énergie initiale de l'ion : $R = 2\frac{V}{E}$

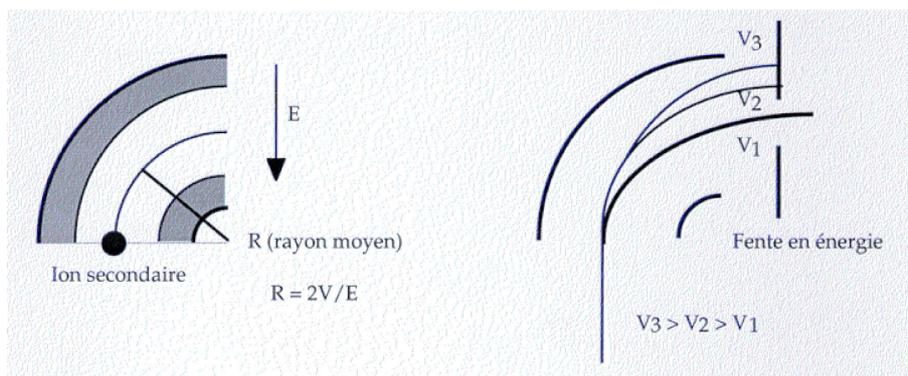


Figure C2. 24 : Secteur électrostatique de la sonde ionique Caméca 1270 (documents Caméca).

Ces ions secondaires doivent alors être séparés selon leur masse pour quantifier les rapports isotopiques. Chaque ion, de masse m et de charge q , possède une énergie cinétique

$E_k = \frac{1}{2}mv^2$. Après refocalisation par une lentille, ils passent dans le secteur magnétique du spectromètre de masse (Figure C2. 25) où ils sont soumis à une force $\vec{F} = qv\vec{B}$ (\vec{B} champ magnétique). Leur trajectoire est circulaire de rayon $r = \frac{1}{B}\sqrt{2mvq}$.

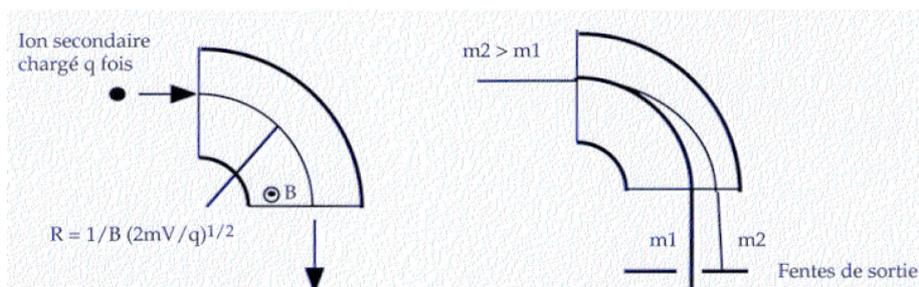


Figure C2. 25 : Secteur magnétique de la sonde ionique Caméca 1270 (documents Caméca).

L'aimant du spectromètre définit en général la résolution de masse de la machine pour séparer deux masses très proches comme le ^{18}O et H_2^{16}O par exemple. On définit le pouvoir de résolution de masse (prm) comme l'inverse de la différence de masse relative entre deux espèces calculée en général à 10% de l'intensité :

$$\text{prm} = \frac{m}{\Delta m} \quad \text{avec } m : \text{masse et } \Delta m : \text{différence de masse.}$$

Pour obtenir des pics bien résolus, il faut alors que le PRM soit au moins égal à la largeur de la fente de sortie de l'aimant, la largeur des pics étant dépendante de la largeur de la fente de sortie.

Les ions ainsi sélectionnés sont dirigés soit sur un écran fluorescent en imagerie, soit sur un système de comptage dans le cas d'une analyse. Le système de détection est composé de cages de Faraday (FC pour Faraday Cup) et de multiplicateurs d'électrons (EM pour Electron Multiplier). Les détecteurs à cages de Faraday sont utilisés pour des signaux intenses. Avant toute série d'analyses, un calibrage du bruit de fond et du gain des cages de Faraday est effectué. Le bruit de fond est déterminé en isolant le détecteur de la colonne secondaire et en mesurant le nombre de coups enregistrés. Le gain est quant à lui déterminé à partir de l'option « Built-in amplifier » du programme CIPS pilotant la sonde ionique. Le signal brut enregistré est corrigé du bruit de fond et du gain de la cage de Faraday d'après :

$$I_{\text{réelle}} = \frac{I_{\text{mesurée}} - \text{bdf}}{\text{gain}} \quad \text{avec bdf : bruit de fond.}$$

Les multiplicateurs d'électrons (EM) sont quant à eux utilisés pour détecter des signaux de faible intensité. Leur domaine de fonctionnement linéaire se trouve pour des intensités inférieures à 10^6 cps. Pour rester dans ce domaine et limiter le vieillissement des multiplicateurs d'électrons, on limite en général le signal à $5 \cdot 10^5$ cps. Les EM sont constitués d'une série de dynodes. La première convertit un ion qui vient impacter sa surface en environ 10^8 électrons (Aleon, 2001). Les dynodes suivantes servent à amplifier à chaque étape le signal électronique (Figure C2. 26).

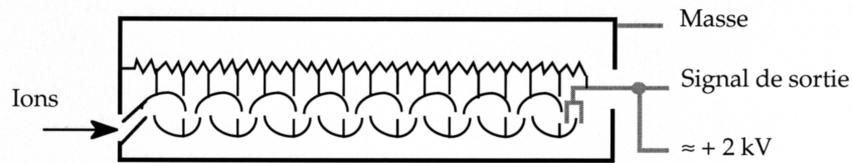


Figure C2. 26 : Schéma d'un multiplicateur d'électrons (d'après un document Cameca).

Le rapport ion/électron de chaque dynode dépend de l'ion incident, de la masse et de l'état d'usure du multiplicateur d'électrons. Ils sont donc également calibrés à chaque début de séance à l'aide du PHA (Pulse Height Analyser) qui fournit la distribution en amplitude des pics du multiplicateur d'électrons, donnée par l'impulsion des ions sur la première dynode (Figure C2. 27). Cette distribution dépend principalement de la haute tension appliquée au multiplicateur.

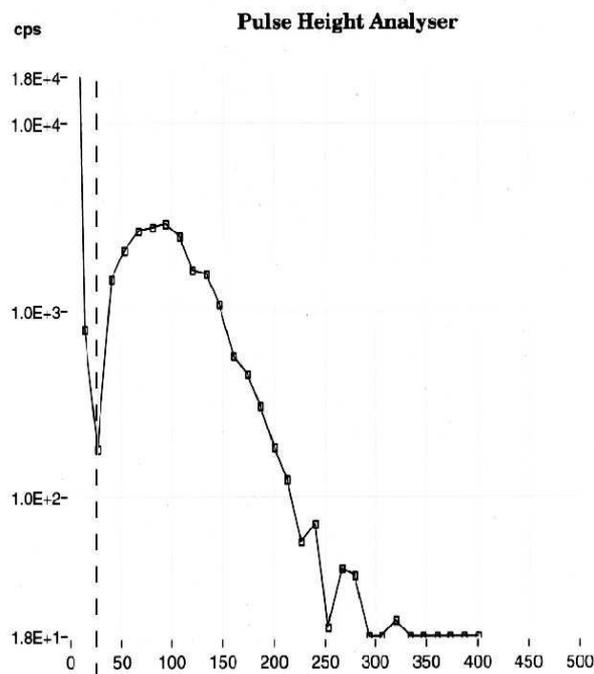


Figure C2. 27 : Pulse Height Analyser

En dessous d'un certain seuil de haute tension, le signal enregistré correspond à un bruit de fond électronique. La haute tension appliquée au multiplicateur est choisie au niveau de ce seuil.

De plus, le signal obtenu est corrigé du temps mort du multiplicateur d'électrons. En effet, il n'est pas possible de différencier deux ions impactant de manière trop rapprochée. Si un deuxième ion impacte la première dynode avant que l'amplification du signal du premier ion ne soit terminée, ce second signal viendra se rajouter au premier. Ainsi, on applique une correction à l'intensité brute obtenue à chaque analyse :

$$I_{\text{réelle}} = \frac{I_{\text{mesurée}}}{1 - I_{\text{mesurée}} \cdot \tau} \quad \text{avec } \tau : \text{ temps mort du multiplicateur d'électrons.}$$

4.2 Fractionnement de masse

Lors de l'ionisation de l'échantillon, une partie seulement de la surface analysée est éjectée. Le rapport des isotopes mesuré n'est pas directement représentatif du rapport réel, c'est le fractionnement dit instrumental. Il est défini comme le rapport entre le rapport des isotopes mesurés à la sonde et le rapport vrai. Il peut également être exprimé en ‰ et représente alors la différence entre le δ mesuré à la sonde et le δ vrai : $\delta_{\text{inst}} = \delta_{\text{mesuré}} - \delta_{\text{réel}}$.

Il est en général négatif, les isotopes légers étant préférentiellement émis lors du bombardement par le faisceau ionique. Ce fractionnement instrumental est fonction de divers paramètres :

- les conditions d'analyse (valeur de la lentille à immersion, de la fente en énergie, seuil du multiplicateur d'électrons...).
- l'élément analysé : en général, plus l'élément analysé est léger, plus le fractionnement instrumental est important.

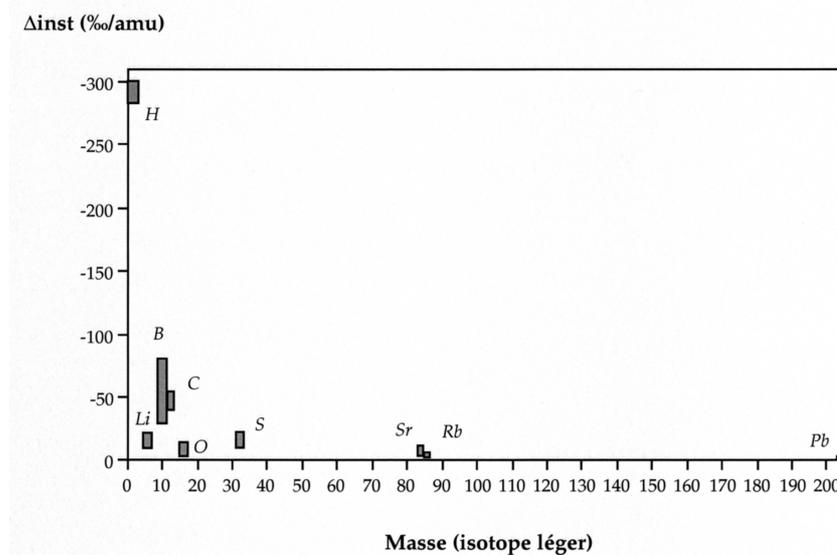


Figure C2. 28 : Gamme de fractionnement instrumental (Δ_{inst}) couramment rencontré en fonction de l'élément étudié (masse de l'isotope léger) (d'après Rollion-Bard, 2001).

- le réseau cristallin du matériau analysé : effet de matrice. Au cours d'une même session d'analyse, le Δ_{inst} pour les isotopes d'un élément sera différent en fonction de la matrice analysée (quartz et magnétite pour l'oxygène par exemple).

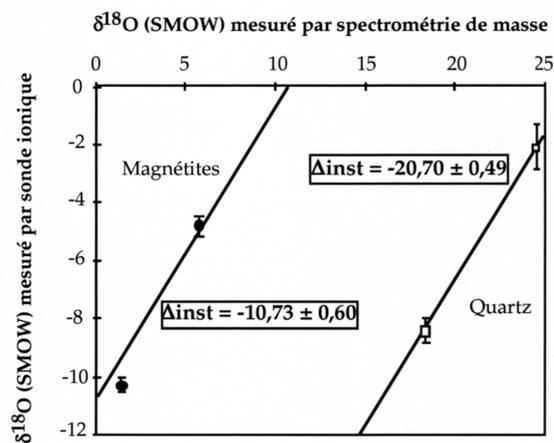


Figure C2. 29 : Fractionnement instrumental mesuré pour les isotopes de l'oxygène, au cours d'une même session d'analyse, dans une matrice de quartz et de magnétite (d'après Rollion-Bard, 2001).

Une série de calibrages est donc nécessaire et est effectuée au début et en cours de session d'analyses sur des échantillons standards, de composition isotopique connue et de même réseau cristallin que l'échantillon à analyser. Ces standards sont analysés dans les mêmes conditions (intensité primaire, balayage, ouverture de la fente d'entrée...) que les échantillons.

4.3 Profils en profondeur

Contraintes analytiques - Extension latérale et verticale des composés de surface

Les analyses d'échantillons minéraux de composition homogène par sonde ionique sont classiquement effectuées après stabilisation du signal lorsque l'intensité de l'élément atteint un palier. Le fractionnement instrumental est ainsi mieux contraint, les analyses sur les standards utilisés étant réalisées dans les mêmes conditions instrumentales et à même intensité de signal primaire et secondaire. Lors de cette étude, les mesures effectuées avaient pour objectif de déterminer les compositions isotopiques des composés d'oxydation présents en surface de pyrite oxydées et dont l'épaisseur moyenne déterminée par Toniazzo (1998) est voisine d'une centaine de nanomètres (100-200nm). Cette faible épaisseur ne permet pas d'obtenir un signal stable et constant tout au long de l'analyse en raison de la vitesse de décapage du faisceau primaire (Cs^+). Celle-ci, préalablement calibrée par Microscopie à Force Atomique pour les principaux types de matériaux rencontrés, indique que ces composés de surface sont totalement détruits en quelques minutes après passage du faisceau de sonde (Figure C2. 30).

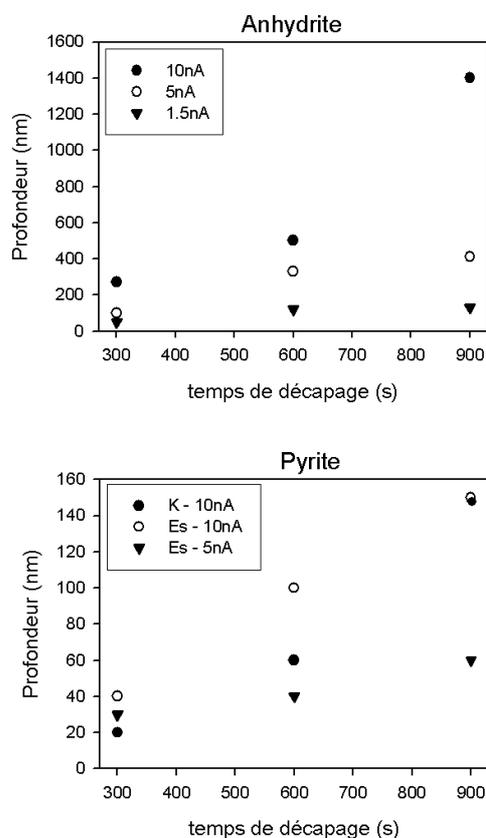


Figure C2. 30 : Etalonnage de la vitesse de décapage par un faisceau de sonde ($\varnothing = 10\mu\text{m}$, balayage $50 \times 50\mu\text{m}$) de surfaces minérales polies de sulfate et de pyrite en fonction de l'intensité primaire du faisceau ionique.

Ainsi, la surface d'un sulfate (anhydrite, CaSO_4), plus tendre que celle de la pyrite sera décapée assez rapidement et creusée sur une profondeur pouvant atteindre, après 15 minutes, $1,5\mu\text{m}$ pour une intensité du faisceau primaire de 10nA (couramment utilisée lors d'analyses en oxygène en sonde ionique). Dans les mêmes conditions d'analyse, la surface de la pyrite K utilisée tout au long de ce travail présente des profondeurs de décapage dix fois moins intenses (150nm). Ces décapages de sulfates correspondent à des volumes de matériau arraché de la surface présentés dans le tableau suivant.

Tableau C2. 4 : Morphologie de l'impact du faisceau de sonde sur une surface d'anhydrite et volume de matériel éjecté équivalent.

Intensité (nA)	Temps (s)	Impact du faisceau de sonde			Volume décapé (μm^3)
		Profondeur (nm)	L (μm)	I (μm)	
10	900	1400	94	77	10133
	600	500	96	73	3504
	300	270	95	71	1829
5	900	410	95	79	3077
	600	330	93	80	2455
	300	100	91	78	710
1.5	900	130	88	74	847
	600	120	81	72	700
	300	50	79	66	261

Toniazzo (1998) avaient déterminé le volume de bosses de composés de surface de pyrites naturelles et bio-oxydées allant de $0.001\mu\text{m}^3$ à $0.083\mu\text{m}^3$. Ces valeurs comparées à celles obtenues Tableau C2. 4 indiquent qu'il est nécessaire de se placer à des intensités de faisceau primaire relativement basses pour permettre une analyse de la composition isotopique en oxygène des composés de surface. Le signal enregistré sera en effet de courte durée et assez faible. Toutefois, la pyrite FeS_2 ne contenant pas d'oxygène dans sa maille cristalline, ce signal transitoire reste exploitable, les produits d'oxydation de surface étant quant à eux, riches en oxygène.

Conditions d'analyse et détermination du $\delta^{18}\text{O}$ des composés de surface

Les profils en profondeurs ont été effectués pour dégager ce signal en oxygène. Le volume à analyser étant faible comparativement au volume potentiellement décapé par le faisceau de sonde en conditions « classiques », l'intensité du faisceau primaire est fixée à une valeur assez faible (de l'ordre du nA) et l'analyse est faite en balayage sur des zones de 10 à $50\mu\text{m}$. La vitesse de décapage est ainsi réduite permettant d'augmenter le temps d'analyse des composés de surface pour obtenir une reproductibilité suffisante. La détection et le comptage

isotopique est effectué à l'aide d'une cage Faraday pour le ^{16}O (L'2) et d'un multiplicateur d'électrons pour le ^{18}O (H2). Le diaphragme de champ à l'entrée de la colonne secondaire est fermé de 1000 à 2500 pour éliminer les effets de bord d'échantillon. Au cours de l'analyse, un trou se forme. La surface de l'échantillon ne peut plus être considérée comme plane et les ions émis par les bords de cette zone sont éliminés.

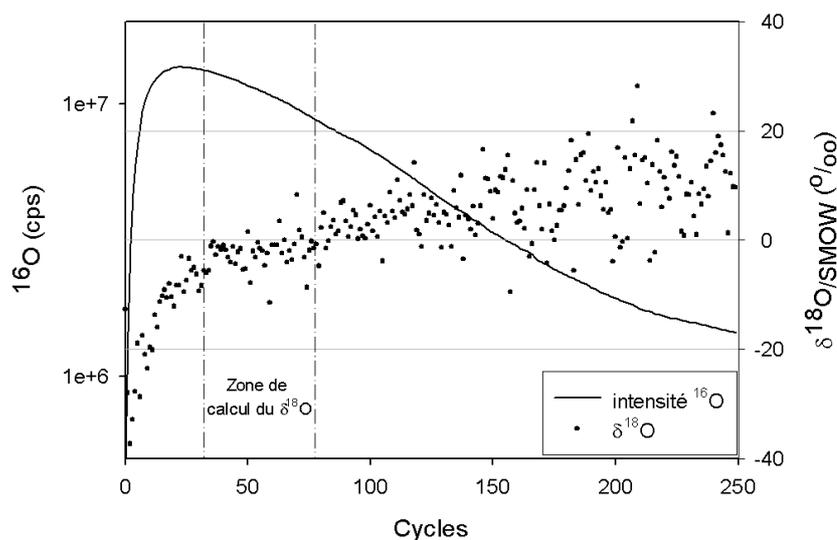


Figure C2. 31 : Profil d'intensité de l'oxygène et détermination du $\delta^{18}\text{O}$ de composés de surface sur une pyrite bio-oxydée lors d'un profil en profondeur réalisé à la sonde ionique 1270.

La Figure C2. 31 illustre la méthode de calcul du $\delta^{18}\text{O}$ des produits d'oxydation de surface lors de profils en profondeur réalisés sur des grains de pyrite. Le signal en intensité des isotopes analysés marque un maximum attribué aux composés de surface, dont la composition isotopique est donnée par le léger plateau de $\delta^{18}\text{O}$ mesuré correspondant.

Reproductibilité des standards

Des standards de sulfates, polis et montés dans de l'araldite, sont analysés au début de chaque session d'analyse pour vérifier la stabilité de la sonde et la reproductibilité du fractionnement instrumental sur deux échantillons de même matrice mais de $\delta^{18}\text{O}$ différent (Figure C2. 32).

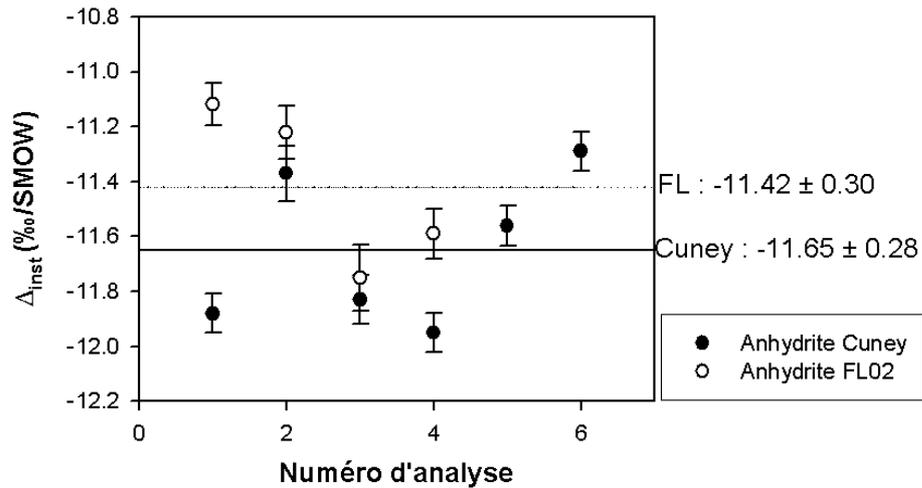


Figure C2.32 : Fractionnements instrumentaux (Δ_{inst}) déterminés sur deux sulfates polis de matrice similaires (anhydrite) en début de session d'analyse. La reproductibilité des mesures est de $\pm 0.30\%$ et les Δ_{inst} sont identiques (dans les barres d'erreur).

Par ailleurs, le fractionnement instrumental étant dépendant des conditions d'analyse, un standard d'anhydrite est monté, non poli, sur la même feuille d'indium que les échantillons de pyrite et est régulièrement analysé au cours de chaque session, dans les mêmes conditions que les échantillons (Figure C2.33). Les Δ_{inst} sont variables d'une session à l'autre et, les grains analysés n'étant pas polis, les erreurs sont assez importantes, en général de l'ordre de $\pm 1\%$.

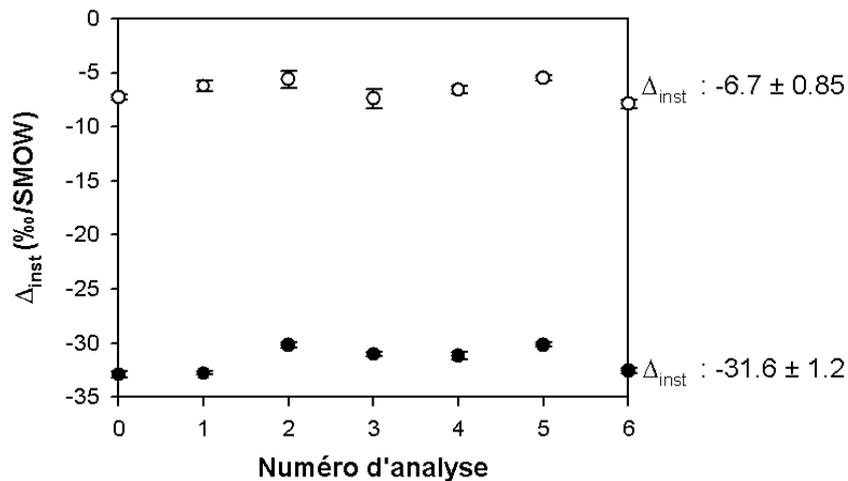


Figure C2.33 : Fractionnements instrumentaux (Δ_{inst}) déterminés une anhydrite non polie montée sur la même feuille d'indium que les échantillons de pyrite à analyser au cours de deux sessions d'analyse distinctes.

4.4 Imagerie isotopique

Principe et méthodologie

La technique d'imagerie isotopique sur des microparticules a été développée au CRPG par Aléon (2001). Les grandes lignes de cette méthode d'analyse sont reprises ici et appliquées aux mesures des compositions isotopiques des composés de surface de grains de pyrite oxydée.

En mode imagerie, le faisceau primaire Cs^+ de la sonde est réglée en microsonde, c'est à dire que l'on utilise un petit faisceau (à très faible intensité primaire, de l'ordre de quelques pA) qui balaye la surface de l'échantillon. Le faisceau, de diamètre inférieur à $1\mu\text{m}$, est refocalisé dans la colonne secondaire en mode transfert dynamique (Dynamic Transfer Operating System, DTOS) en balayant les déflecteurs de l'optique de transfert en synchronisation avec le balayage primaire. Ce mode permet également de ne pas fermer le diaphragme de champ et diminue les risques d'induire un fractionnement instrumental supplémentaire. Les faisceaux d'ions secondaires ^{16}O et ^{18}O sont comptabilisés simultanément, à chaque position du balayage, dans deux multiplicateurs d'électrons. L'image est ensuite reconstruite électroniquement en associant une position sur l'image à chaque point d'impact des ions sur les multicollecteurs selon un principe de balayage aller-retour de type télévision (Figure C2. 34) : les lignes impaires à l'aller et les lignes paires au retour.

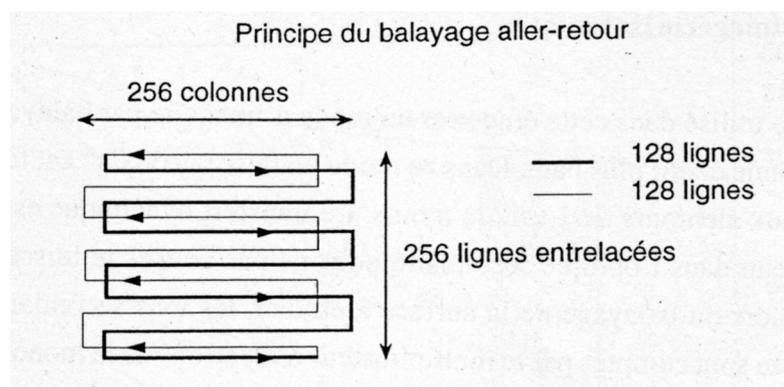


Figure C2. 34 : Principe du balayage aller-retour pour la reconstruction d'images isotopiques

L'image reconstruite est en 256×256 pixels. Les mesures sont effectuées sur des séries de 30 cycles de 180s en multicollecion sur deux multiplicateurs d'électrons (EM et H1). Les résultats sont sous forme d'une image par isotope et par cycle. Ces images sont traitées sous Visilog 5.1. sous Unix en sommant 3 cycles à chaque étape. Les images additionnées sont

lissées et seuillées de manière à isoler les composés de surface dont on cherche à calculer les rapports isotopiques. Une image binaire est alors reconstruite et appliquée aux images brutes (non lissées) additionnées pour extraire les données d'intensité brute pour chaque isotope. Le $\delta^{18}\text{O}$ est ensuite recalculé.

Reproductibilité des standards

A chaque début de session, des standards sur bague polie sont analysés en ponctuel pour vérifier la stabilité de la sonde. Par la suite, le Δ_{inst} est déterminé, en mode imagerie, sur des grains de standards d'anhydrite montés dans la même feuille d'indium que les échantillons. Les mesures par imagerie étant relativement longues, les mesures présentées Figure C2. 35 correspondent à l'évolution du Δ_{inst} au cours de trois jours d'analyse. La variabilité est importante compte tenu du mode d'analyse et de la microtopographie des grains.

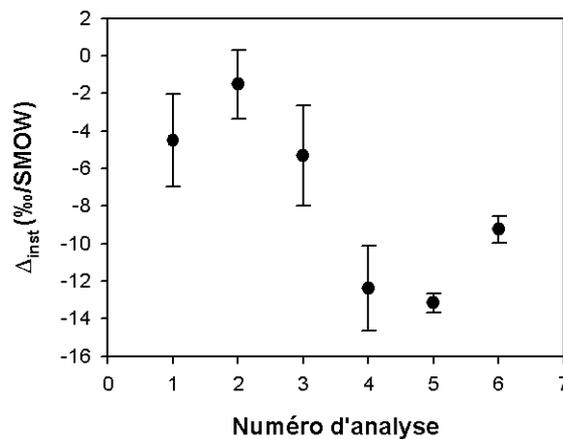


Figure C2. 35 : Evolution au cours d'une session d'imagerie du Δ_{inst} pour l'oxygène sur des grains d'anhydrite.

**Caractérisation de
l'hétérogénéité réactionnelle
de surface de pyrites
biooxydées**

**C
H
A
P
I
T
R
E
3**

CHAPITRE 3

PARTIE I : CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION	117
1 NATURE CHIMIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION	117
1.1 IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX PRODUITS D'OXYDATION EN SURFACE DE LA PYRITE.	117
1.2 LES SULFATES DE SURFACE.	118
1.3 LES OXY-HYDROXYDES DE FER	126
1.4 AUTRES COMPOSES SOUFRES	129
2 DIVERSITE CHIMIQUE ET SPATIALE INTER- ET INTRA-GRAIN	131
PARTIE II : INFLUENCE DES FACES MINERALES SUR LA NATURE CHIMIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION FORMES	136
1 METHODE D'ESTIMATION DES FACES OU ORIENTATIONS CRISTALLINES LOCALES	136
2 INFLUENCE DU FACIES CRISTALLOCHIMIQUE SUR LES PROCESSUS LOCAUX D'OXYDATION DE LA PYRITE	141
2.1 FACIES CRISTALLOCHIMIQUES IDENTIFIES	141
2.2 REPARTITION DES COMPOSES DE SURFACE	142
2.3 FACIES CHIMIQUES/MINERALOGIQUES CARACTERISTIQUES	143
PARTIE III : INFLUENCE DE L'AGENT OXYDANT SUR LA NATURE DES PRODUITS D'OXYDATION	149
1 CARACTERISATION SEMI-QUANTITATIVE DES ASSOCIATIONS DE PRODUITS D'OXYDATION EN SURFACE DE PYRITES.	150
2 OXYDATION DE LA PYRITE PAR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	151
3 OXYDATION ABIOTIQUE AQUEUSE	152
4 OXYDATION A L'AIR	154
5 TYPES DE SULFATES EN FONCTION DU TRAITEMENT	156
6 NATURE DES OXYDES DE FER FORMES	157
7 INFLUENCE COMBINEE TRAITEMENT/GROUPE CRISTALLIN	159
8 SYNTHESE : VARIABILITE LIEE AU TRAITEMENT ?	162
PARTIE IV : SYNTHESE SUR LES MECANISMES D'OXYDATION DE SURFACE	165
1 TRANSFERT D'ELECTRONS AU SEIN DU MINERAL	165
2 FORMATION DES COMPOSES	168
2.1 DISSOLUTION DE LA PYRITE : FORMATION SOUFRE	168
2.2 PROCESSUS ELECTROCHIMIQUE	168
2.3 OXYDES DE FER	174
3 SCHEMA D'OXYDATION DE LA PYRITE	180
PARTIE V : BIOSIGNATURE CHIMIQUE ?	182

INTRODUCTION

Des travaux antérieurs entrepris sur le système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité chimique des surfaces minérales et d'étudier l'influence globale de ces composés sur l'oxydation bactérienne de la pyrite (Mustin, 1992). Toniazzo (1998) a montré, en couplant des méthodes d'analyse de surface (spectroscopies IR, Raman et XPS), que la « couche d'oxydation » de la pyrite était constituée de bosses mono- ou polyphasiques de quelques centaines de nanomètres de hauteur et de diamètre. Elles se composent d'un assemblage de soufre élémentaire S₈, de polysulfures, d'oxydes de fer et de sulfates ferreux et ferriques. Leur distribution spatiale est également non homogène, certaines zones des surfaces minérales étant totalement dépourvues de produits d'oxydation. De plus, cette hétérogénéité chimique et spatiale des composés d'oxydation est associée à la présence de sites de surface à réactivité variable contrôlant plus ou moins l'adhésion bactérienne (Meline, 1995). Tous ces résultats conduisent à considérer dorénavant la surface des grains de pyrite non comme un support homogène subissant l'action bactérienne, mais comme un acteur à part entière interagissant fortement avec les bactéries.

Cette étude s'inscrit donc dans la continuité de ces travaux avec pour premier objectif d'affiner la compréhension des mécanismes de surface lors de l'oxydation des pyrites, en conditions biotiques ou abiotiques, en utilisant au maximum des techniques d'analyse *in vivo* et *in situ*. Afin de déterminer des signatures chimiques spécifiques de ces processus à l'échelle micrométrique, la surface de pyrites bio- a ou chimio-oxydées (Fe³⁺ ou H₂O₂ comme seul agent oxydant) a ainsi été caractérisée par spectroscopies de surface (IR, Raman ou XPS). Une démarche statistique, sur un ensemble de grains, a été privilégiée. Ces minéraux ont été comparés à des grains témoins oxydés à l'air libre ou au préalable nettoyés de tout composé de surface.

Quelques notions et termes seront utilisés dans la suite de ce manuscrit pour décrire la surface minérale (Figure C3. 1). On parlera ainsi :

- de **site réactionnel** pour désigner les loci de surface à réactivité (chimique) homogène.
- d'une **zone réactionnelle** pour désigner une partition spatiale de la surface minérale présentant une réactivité particulière (ensemble de sites réactionnels).

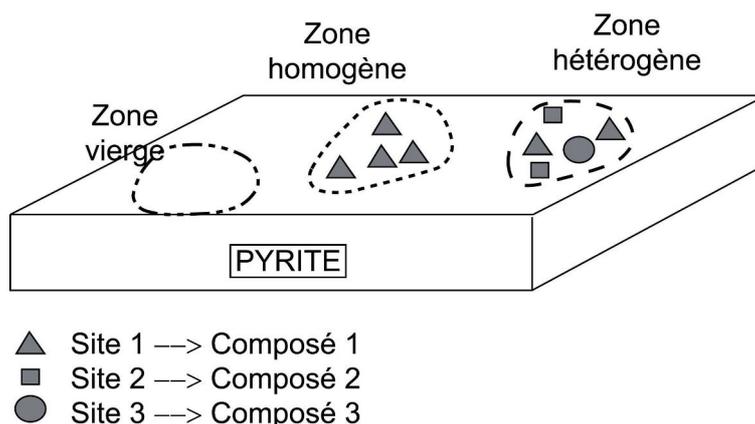


Figure C3. 1 : Sites et zones réactionnels en surface du minéral.

Un site est monotype et génère toujours le même composé alors qu'une zone réactionnelle peut être vierge (absence de sites réactionnels ou sites non réactifs), homogène (ensemble de sites réactionnels de même nature) ou hétérogène (ensemble de sites réactionnels différents).

L'analyse à petite échelle imposant une démarche statistique, différentes zones du minéral ont été caractérisées pour dégager la nature et les proportions relatives des sites et des composés de surface. Les influences respectives des agents oxydants employés et des faces cristallographiques du minéral ont été étudiées. Elles permettent d'aboutir à une première caractérisation des processus de surface spécifiquement associés à la bio-oxydation de la pyrite.

Leur aptitude à fournir d'éventuelles biosignatures de surface sera discutée en regard des résultats obtenus.

Partie I : Caractérisation spectroscopique des produits d'oxydation

1 Nature chimique des produits d'oxydation

1.1 Identification des principaux produits d'oxydation en surface de la pyrite.

Les expériences d'oxydation biotique et abiotique de grains de pyrite K en milieu sulfaté acide ($\text{pH} < 2$) ont permis d'identifier, par spectroscopies IR, Raman et XPS, les produits de surface précédemment mis en évidence par Blight *et al.* (2000), Mc Guire *et al.* (2001), Mustin (1992), Toniazzo (1998) et Toniazzo *et al.* (1999b).

La spectroscopie Raman permet ainsi de détecter en surface des grains, la présence (simultanée) de :

- sulfates ferreux ou ferriques,
- oxy-hydroxydes de fer,
- soufre élémentaire S_8 ,
- polysulfures,
- thiosulfates.

La spectroscopie XPS permet également d'identifier ces principaux composés d'oxydation. En effet, si les énergies de liaison caractéristiques de la pyrite se situent à 162,2 et 162,0eV pour l'orbitale $\text{S}(2\text{p}_{3/2})$ et à 706,7eV et 706,6eV sur l'orbitale $\text{Fe}(2\text{p}_{3/2})$ respectivement, des composés d'oxydation de surface sont également observables sur ces orbitales $\text{S}(2\text{p}_{3/2})$, $\text{Fe}(2\text{p}_{3/2})$ ainsi que sur l'orbitale (1s) de l'oxygène. Ainsi, de la même manière qu'en spectroscopie Raman, l'XPS permet de détecter :

- des polysulfures S_nS^{2-} ($n < 5$) identifiables à 163,4 et 163,2eV [$\text{S}(2\text{p})$].
- des sulfates SO_4^{2-} , à 531,5eV [$\text{O}(1\text{s})$] et 168,2 - 169,3eV et 168,2 - 169,4eV [$\text{S}(2\text{p})$] (liaison S-O) et 710,4 - 711,8 et 710,6 - 711,7eV sur $\text{Fe}(2\text{p})_{3/2}$ (liaison Fe(III)-S)
- des sulfates ou des oxydes de fer(II) à 708,6 et 709,2eV [$\text{Fe}(2\text{p})_{3/2}$] (liaison Fe(II)-O).
- des oxydes de fer(III) à 713,01 et 713,3eV sur $\text{Fe}(2\text{p})_{3/2}$ (liaison Fe(III)-O).

Le Tableau C3. 1 récapitule les principaux déplacements Raman et énergies de liaison XPS correspondant aux produits d'oxydation précédemment cités.

Tableau C3.1 : Principaux produits d'oxydation identifiés par spectroscopie Raman et XPS sur des surfaces de pyrite bio- ou chimio-oxydée (Demoisson, 2006; Nesbitt and Muir, 1994; Nesbitt *et al.*, 1998)

Composé	Formule chimique	Principaux déplacements Raman (cm ⁻¹)	Energies de liaison XPS (eV)		
			S(2p)	Fe(2p _{3/2})	O(1s)
Sulfates	SO ₄ (Fe)	620 - 984 - 1014 - 1020	168,1	708,8 - 709,2	532
Thiosulfate	S ₂ O ₃	630 - 1017	164,2 ?	--	--
Soufre élémentaire	S ₈	80 - 150 - 220 - 475	163,4 - 164,0	--	--
Oxydes de fer (II)	Fe(O,H,Cl)	245 - 300 - 311 - 373 - 385	--	709,5 - 709,0	--
Oxydes de fer (III)	Fe ₂ O ₃	215 - 284	--	710,3 - 710,5 - 710,8	--
Polysulfures	S _n ²⁻ (n<5)	466	163,6 - 163,4	--	--

Si les sulfates (produits ultimes de l'oxydation des sulfures) peuvent être considérés comme les composés majoritaires de surface détectables lors de l'oxydation de la pyrite, la contribution surfacique des autres composés n'est pas négligeable. Ils peuvent correspondre à des intermédiaires réactionnels des voies d'oxydation du soufre (S₈, S₂O₃²⁻, S_nS²⁻) ou à des composés issus de réactions spécifiques (oxydes).

1.2 Les sulfates de surface.

Signature Infra-Rouge et Raman

Aucune différence notable n'a pu être établie, en IR, entre les sulfates d'origine biologique ou chimique ; les conformations du groupe SO₄ paraissent semblables (Figure C3.2).

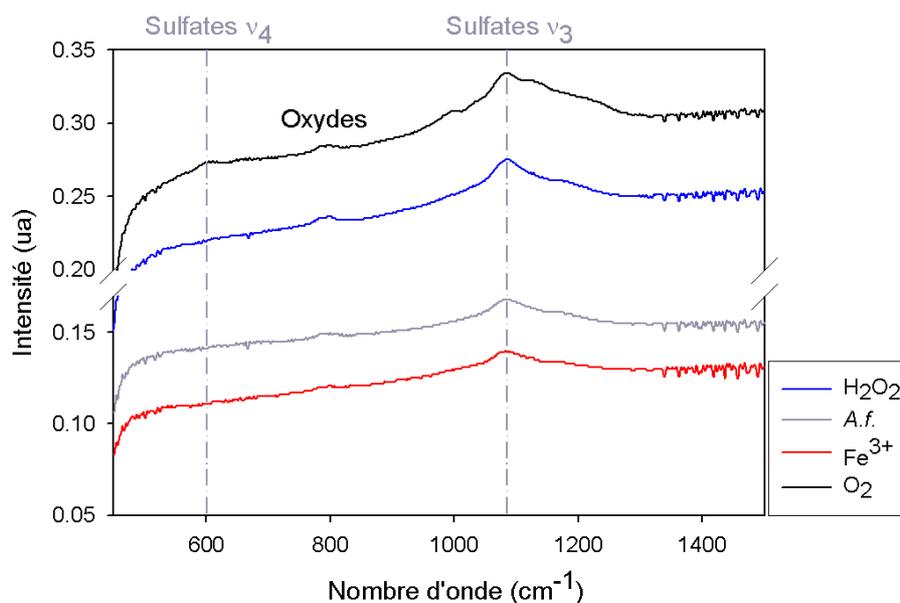


Figure C3.2 : Spectres Infra-Rouge des poudres de pyrites K obtenues à partir de grains de granulométrie 160-250µm oxydés selon différentes voies (aqueuse ou à l'air libre).

La spectroscopie Infra-Rouge est en fait très sensible aux vibrations anti-symétriques des liaisons moléculaires, mettant ainsi principalement en évidence la vibration ν_3 du groupement SO_4 (anti-symétrique de la liaison S-O). Or cette-dernière, qui est en général peu résolue, se révèle non discriminante dans ce cas.

La spectroscopie Raman, plus sensible aux vibrations symétriques (ex : ν_1 de la liaison S-O), est être mieux adaptée pour étudier ces sulfates de surface. La vibration d'élongation principale (ν_1) d'un groupement sulfate en solution (molécule libre de symétrie T_d) est observable par un pic à 984 cm^{-1} (Figure C3. 4). Elle est accompagnée d'une bande moins intense à 620 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation $\delta_{\text{S-O}}$ (ν_4) de la liaison S-O. Des micro-analyses Raman, *in vitro*, de lixiviats sulfatés acides (Toniazzo, 1998) présentent ces pics caractéristiques de la liaison S-O (ν_1 , ν_4). De même, les analyses Raman de surfaces de pyrites oxydées, en traitement biotique ou abiotique, mettent en évidence ces vibrations caractéristiques à 980 cm^{-1} et à 620 cm^{-1} (Figure C3. 3). Ces signatures spectrales correspondent donc à des sulfates libres de solution ayant précipités sur la surface minérale, dont la symétrie n'est pas affectée.

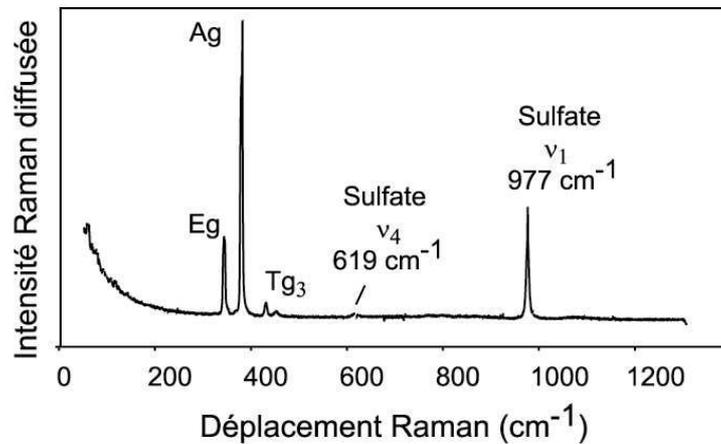


Figure C3. 3: Spectre Raman caractéristique d'un sulfate de solution en configuration « parapluie » (T_d) précipité sur une surface de pyrite. Les vibrations du doublet S-S²⁻ de la pyrite sont identifiés par Ag, Eg et Tg₃.

La labilité de ces sulfates très hydratés ($\text{SO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n > 3$) ne permet pas de les considérer comme des signatures de surface pérennes des processus d'oxydation biotique ou abiotique.

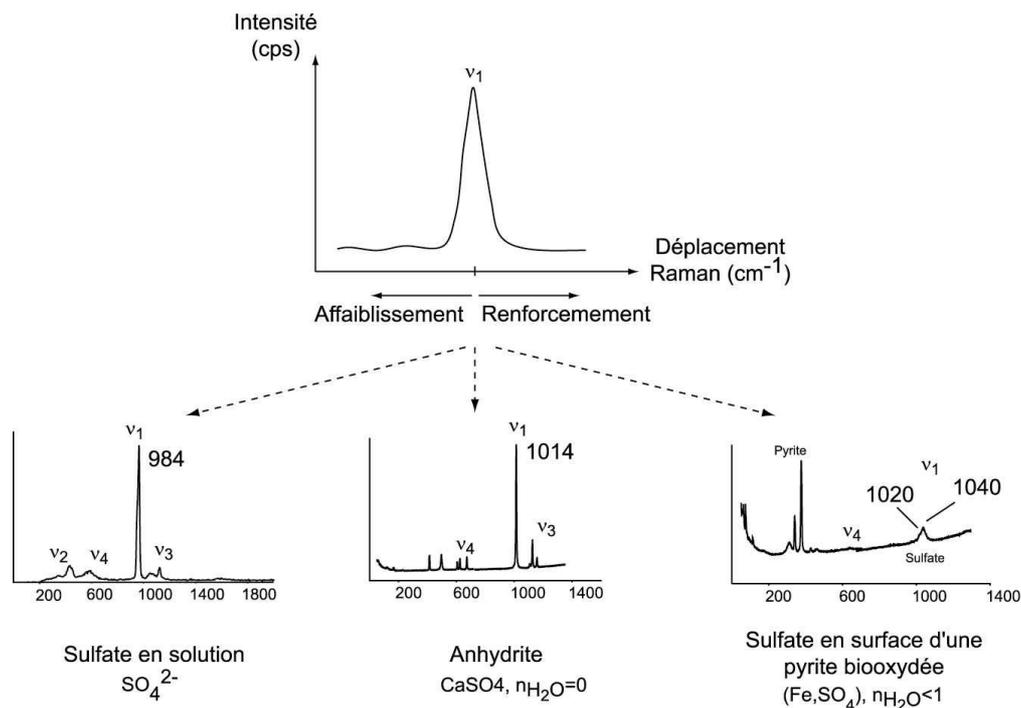


Figure C3. 4 : Déplacement des vibrations d'élongation v_1 de la liaison S-O d'une molécule de sulfate et spectres caractéristiques de trois types de sulfates.

En revanche, la majorité des spectres Raman, réalisés sur les composés de surface, laissent apparaître des vibrations d'élongation v_1 des groupements sulfates décalées vers les hautes fréquences (de 984 à 1030 cm^{-1}). Ce déplacement, imputable à un renforcement de la liaison S-O (Figure C3. 4), signerait ainsi une contrainte forte exercée par l'environnement chimique du groupement sulfate sur cette liaison et pourrait être attribué à :

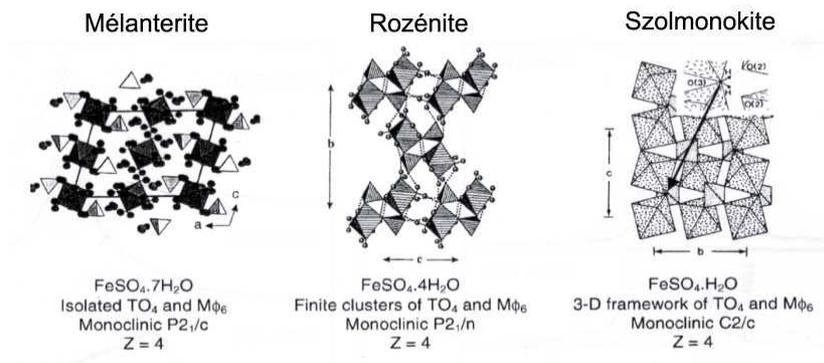
- l'effet d'un cation (contre-ion) sur la liaison S-O.
- à une hydratation moindre, voire absente comme pour l'anhydrite.
- à une liaison forte avec le minéral sous-jacent.

Toutes ces hypothèses ne sont pas nécessairement incompatibles entre elles. Cependant, le taux d'hydratation semble être l'hypothèse la plus probable. En effet, ce déplacement ne peut être imputé à une liaison avec les cations présents en solution (Mg^{2+} , K^+), les grains témoins oxydés à l'air libre présentant également des v_1 décalées vers les hautes fréquences. Par ailleurs, les cations disponibles en surface de la pyrite (Fe^{2+} , Cu^{2+} en impuretés), ont peu d'influence sur le déplacement de la v_1 d'un groupement sulfate, à hydratation constante. Ainsi, les v_1 de la chalcantinite ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ou de la mélantérite ($\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) s'observent respectivement à 975 cm^{-1} et 976 cm^{-1} (Chio *et al.*, 2005). La nature du contre-ion associé aux groupements sulfates n'est donc, *a priori*, pas responsable du déplacement observé vers les hautes fréquences.

En revanche, les spectres Raman réalisés sur une surface d'anhydrite (CaSO_4) indiquent une vibration principale ν_1 à 1014cm^{-1} alors qu'elle se situe à 1007cm^{-1} dans le cas du gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 984cm^{-1} pour un sulfate en solution ($n\text{H}_2\text{O} > 5$). La ν_1 à 1020cm^{-1} des sulfates de surface produits lors de l'oxydation de la pyrite signerait ainsi une très faible hydratation (voire nulle) potentiellement associée à une forte « cristallinité ». En effet, Chio et al., (2005) ont montré que les signatures Raman des sulfates de fer (II) étaient caractéristiques de leur degré d'hydratation (Tableau C3. 2).

Tableau C3. 2 : Déplacement de la vibration d'élongation (ν_1) de sulfates en fonction de leur degré d'hydratation (d'après Chio et al., 2005).

Sulfate de fer(II) $\text{FeSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	n H ₂ O	ν_1 (cm ⁻¹)
Mélanterite	7	977
Rozenite	4	990
Szolmonokite	1	1018



En milieu acide, le sulfate de fer (II) monohydrate présente la meilleure stabilité. Une séquence de transformations minérales conduisant à la szomolnokite a été suggérée par Jambor et al. (1999) pour les sulfates de formule générique $\text{Fe}^{2+}\text{SO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$: $(n=7) \rightarrow (n=5) \rightarrow (n=4) \rightarrow (n=1)$. Par conséquent, les produits d'oxydation riches en sulfates présentant une vibration d'élongation proche de 1020cm^{-1} sont très peu hydratés (de type szomolnokite), stables en conditions acides et sûrement fortement contraints par la surface de pyrite sous-jacente. Ces composés « anhydres » sont donc susceptibles d'être préservés à long terme sur les surfaces minérales et constituent un indice d'oxydation de la pyrite détectable par micro-spectroscopie Raman.

Une analyse plus détaillée des sulfates présents à la surface de grains de pyrite bio- ou chimio-oxydés a donc été entreprise.

Tableau C3. 3 : Quatre grands types de sulfates de surface identifiés dans les spectres Raman réalisés sur des surfaces de pyrites K oxydées, pour tout type de traitement.

Type	Symétrie et définition	ν_1	ν_2	ν_3	ν_4	Commentaires
I	T'_d , $n > 3$ Précipité "mou"	984 [977-990] [+++; ><]	450 [+, ><]	1100 [e, < >]	605 [+, ><]	Na, K → 977 Cu, Fe → 990
II	C_{3v} , $n \leq 1$ Cations durs Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}	[1017-1023] [+++; ><]	450 [e, ><]	1075 - 1100 - (1200) [e, < >] - [+++; ><] - [±; ><]	625 - 650 [±; ><] - [e, ><]	
III	C_{2v} , C_s , $n?$ Cations durs Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} Liaison avec la surface	1006 (ν_3') [++, ><]	450 ? [e, ><]	1095 (ν_3') - 1163 (ν_3 vraie) [++, > <]	625 [++, ><]	ν_2 difficile à discerner
IV	C_{3v} , $n \leq 1$ Cations durs Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}	[1020-1040] [++, ><]	? [e, ><]	1060 - 1075 - 1095 - 1125 [++, ><]	[600 - 650]	ν_2 masquée par les oxydes

[+];[+++] intensité des bandes
[><];[<>] finesse des bandes

Au cours des différentes expériences réalisées dans cette étude, quatre grands types de conformation du groupement sulfate, en surface de pyrites oxydées, ont pu être identifiés à partir des vibrations ν_1 , ν_2 , ν_3 et ν_4 observées en Raman (Tableau C3. 3) :

- **type I** correspondant à un sulfate à symétrie T'_d en configuration « parapluie » qui possède toutes les caractéristiques d'un sulfate de solution, fortement hydraté ($n_{H_2O} > 3$), qui aurait précipité sur la surface. La position de la ν_1 est fonction du cation associé au sulfate et peut varier de 977 à 990 cm^{-1} respectivement en présence d'éléments alcalins (Na^+/K^+) ou de métaux de transition (Cu^{2+}/Fe^{2+}).
- **type II** correspondant à un sulfate de symétrie C_{3v} , $n_{H_2O} \leq 1$ dans lequel un oxygène de la molécule de sulfate est contraint par un cation dur de type Cu^{2+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+} lié à la surface minérale. Il provient de l'oxydation totale d'un atome de soufre d'un doublet S-S²⁻ qui reste lié à la surface de la pyrite par l'intermédiaire d'un cation (Figure C3. 30), après rupture du doublet. La nature exacte du cation ne peut cependant pas être précisée. La ν_1 reste fine et intense, bien que décalée vers les hautes fréquences. C'est le type de sulfates le plus fréquemment rencontré dans les spectres Raman.
- **type III** correspondant à un sulfate de symétrie C_{2v} qui se traduit par une intensité Raman similaire des ν_1 et ν_3 . Deux atomes d'oxygène du sulfate sont liés à des cations durs (Fe^{2+} , Cu^{2+}) appartenant à la surface de la pyrite. Le degré d'hydratation de ces groupements ne peut pas être déterminé.
- **type IV** correspondant à un sulfate de symétrie 0, $n_{H_2O} \leq 1$. Ce dernier type traduirait l'adsorption de plusieurs molécules de sulfates autour d'un même cation (Fe^{2+} ou

Cu^{2+}) sur des composés de type oxydes (*a priori* de l'hématite) précédemment formés en surface de la pyrite dans une configuration similaire à celle décrite par Ostergren (2000). Cette configuration se traduit par un massif peu différencié dans lequel se retrouvent des ν_1 et ν_3 dégénérées.

Les signatures Raman de ces quatre grands types de sulfates rencontrés sur des surfaces de pyrites oxydées sont répertoriées dans la Figure C3. 5, ainsi que les conformations moléculaires associées.

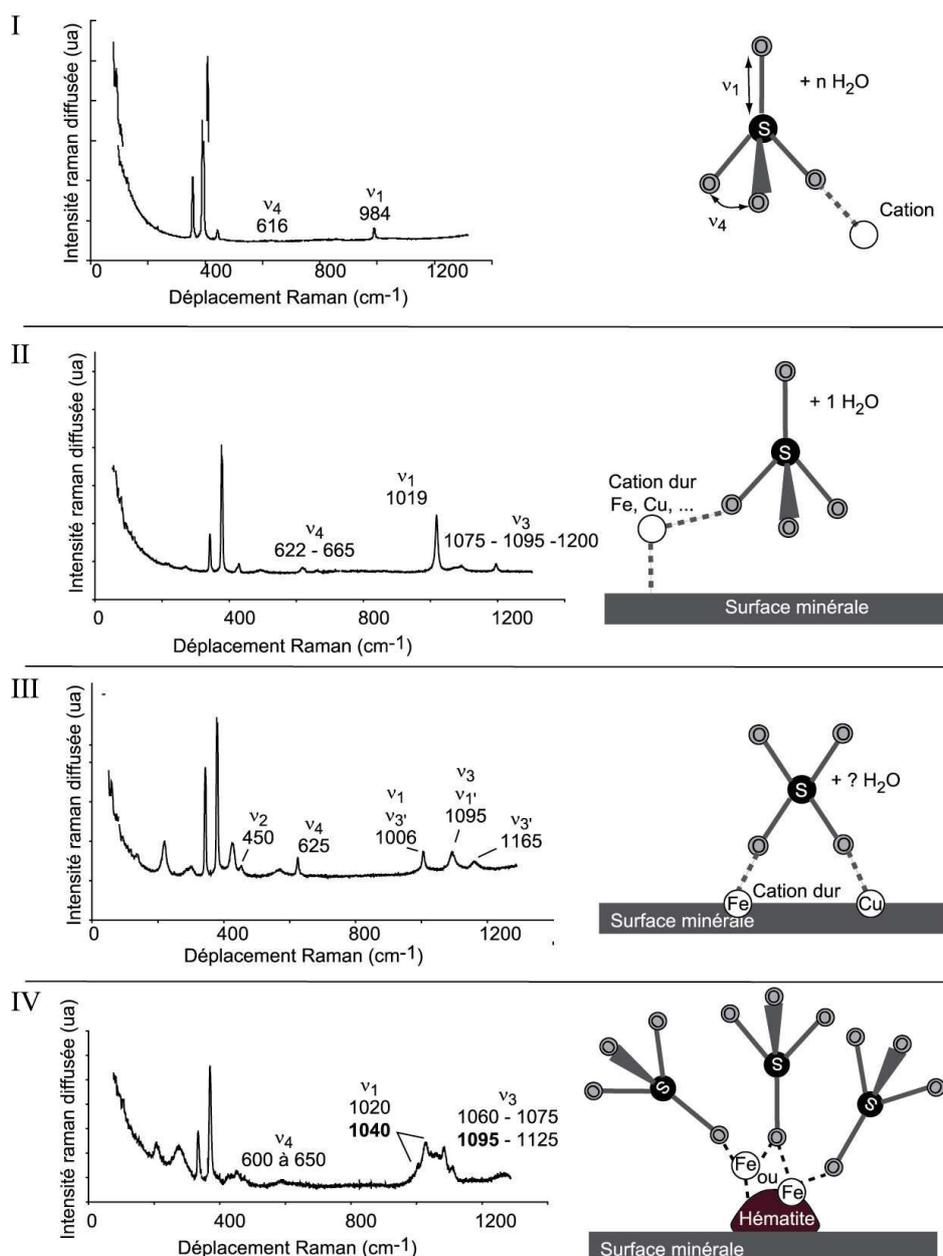


Figure C3. 5 : Signature Raman et conformation moléculaire des 4 types de sulfates rencontrés sur les surfaces de pyrite K oxydée.

Par ailleurs, il est important de noter qu'aucune trace de jarosite n'a été détectée en surface de pyrites oxydées, quelle que soit l'expérience d'oxydation considérée. Bien que ce composé soit souvent décrit comme le produit majeur de l'oxydation des sulfures de fer en milieu naturel (Bevilaqua *et al.*, 2002; Ettler *et al.*, 2003; Rye *et al.*, 2003), il résulte de transformations secondaires des sulfates libérés par cette oxydation, et est fortement dépendant des conditions physico-chimiques environnementales. Les jarosites ne peuvent donc pas être considérées comme des signatures directes de l'oxydation de la pyrite. Elles se forment secondairement en solution, et ne se retrouvent pas en surface de pyrites oxydées.

Signature XPS

Les énergies de liaison caractéristiques des molécules de sulfates sont facilement identifiables par XPS (orbitale S_{2p}) et apparaissent comme les composés majoritaires présents en surface (65% de l'orbitale du soufre). Ils sont accompagnés de soufre élémentaire ou de polythionates, de polysulfures et d'oxydes de fer, ce qui confirme les résultats obtenus par spectroscopie Raman (Figure C3. 6). Des résultats similaires ont été obtenus sur des grains oxydés à l'air libre (Figure C3. 12, paragraphe 2) ainsi que lors d'expériences antérieures de bio-oxydation de la pyrite K (Toniazzo, 1998).

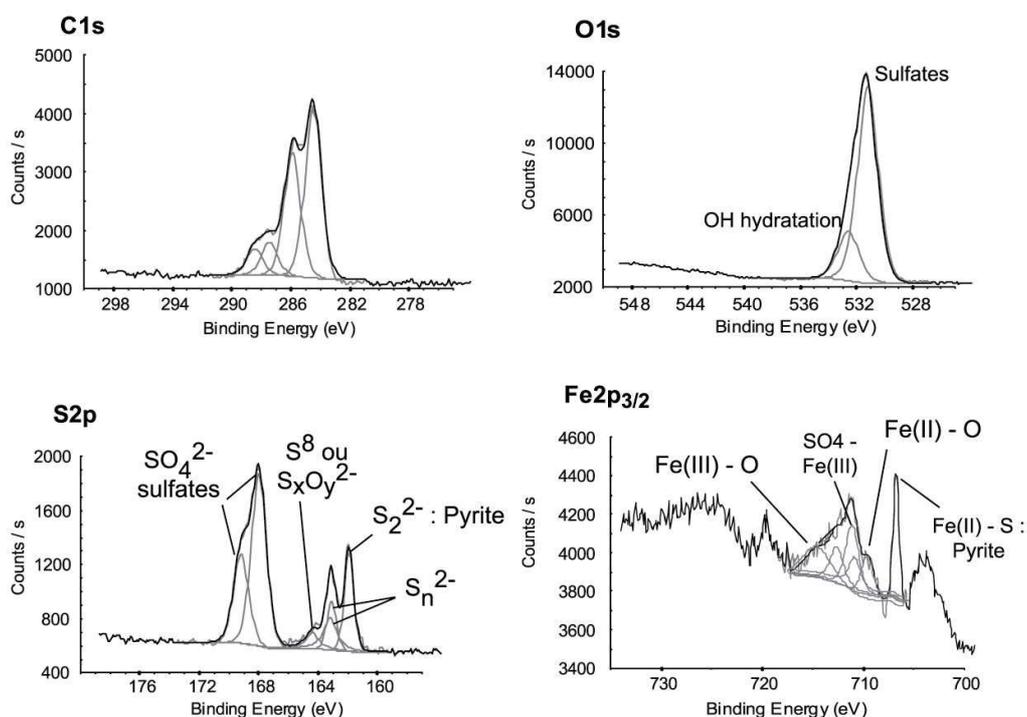


Figure C3. 6 : Spectres XPS d'un grain de pyrite K biooxydée 60 jours (53-80µm). Orbitales du carbone, oxygène, soufre et fer. Mise en évidence de produits d'oxydation de la pyrite.

L'utilisation d'un balayage d'une zone de 50x50µm en XPS permet d'obtenir une représentation globale et semi-quantitative de la couche d'oxydation de la pyrite. L'information provient des 10 premiers Angström (90% du signal) et l'XPS donne une estimation assez fiable du taux de recouvrement apparent (2D) de surface, estimé ici à 31,4‰ (Tableau C3. 4). En revanche, elle ne fournit pas d'informations à l'échelle du site actif car la zone balayée par le faisceau primaire est trop grande et la résolution latérale n'atteint que 2 à 5µm.

Tableau C3. 4 : Résultats de l'analyse XPS d'une zone de 50x50µm en surface d'un grain de pyrite biooxydée.

Orbitale	Energie de liaison	Aire du pic (%)	Aire Totale (%)	Composante
C(1s)	284.6	48.0	26.2	
	286.01	35.4	19.3	
	287.57	9.2	5.0	
	288.55	7.4	4.0	
	Σ	100.0	54.6	
O(1s)	531.44	80.5	17.2	OH ⁻
	532.72	19.5	4.2	
	Σ	100.0	21.4	
S(2p)	162.16	21.6	2.7	S ₂ ²⁻
	163.32	0.0	0.0	S _n ²⁻
	168.23	65.1	8.2	SO ₄ ²⁻
	169.42	0.0	0.0	SO ₄ ²⁻
	164.62	0.0	0.0	S ₈ ou S _x O _y ²⁻
	163.42	13.3	1.7	S _n ²⁻
Σ	100.0	12.6		
Fe(2p)_{3/2}	706.73	96.7	4.3	Fe(II) - S
	709.42	0.4	0.0	Fe(II)-O
	710.83	0.3	0.0	Fe(III)-S
	711.28	0.8	0.0	Fe(III) - O
	712.62	0.5	0.0	Fe(III) - O
	714.32	1.2	0.1	
Σ	100.0	4.4		
Recouvrement			31.4	

Toutefois, l'XPS apporte des renseignements complémentaires de ceux obtenus par spectroscopie Raman. Le pic observé à 710,8eV sur l'orbitale Fe(2p)_{3/2} est caractéristique d'une liaison Fe-S et est souvent attribué à des sulfates ferriques. L'énergie de liaison observée à 709,4eV est quant à elle identifiée comme une liaison Fe(II)-O dans un environnement sulfates ou oxydes. Elle pourrait être attribuée à des oxydes de fer (II) ou des sulfates ferreux même s'il n'est pas possible de conclure précisément sur la nature de ces molécules. La contribution de ces probables sulfates ferreux semble cependant moins marquée dans les premiers nanomètres de surface qu'analyse l'XPS que dans les couches plus

« profondes » analysées en spectroscopie Raman. Ainsi, sulfates ferreux et ferriques cohabitent en surface de pyrites oxydées. Ces derniers étant plus hydratés (conformation sulfate de type I) et dans les couches les plus superficielles du minéral oxydé, ils seraient précipités sur des sulfates ferreux (de type II) bien ancrés sur la surface de la pyrite. Une organisation spatiale des sulfates en surface d'un grain de pyrite oxydée peut ainsi être définie de la manière suivante (Figure C3. 7) :

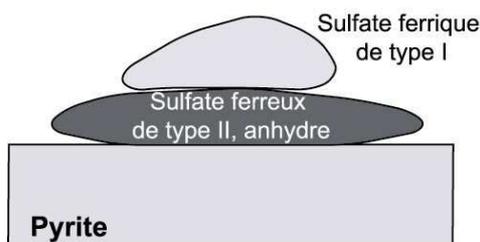


Figure C3. 7 : Organisation de sulfates ferreux et ferriques en surface de pyrite d'après les spectres XPS.

En résumé, si la spectroscopie Infra-Rouge ne permet pas de caractériser les sulfates de surface issus de la bio- ou chimio-oxydation de la pyrite, la spectroscopie Raman a permis d'identifier 4 types de sulfates. Bien que les types II, III et IV correspondent à des sulfates liés à la surface de la pyrite par un cation, la nature de ce cation n'influe pas ou peu sur la signature Raman de chaque famille de sulfates. Seul l'XPS serait susceptible d'apporter des informations relatives à ce cation (Fe^{2+} ou Fe^{3+} par exemple) mais l'interprétation des énergies de liaison en question (709,4eV et 710,8eV) reste encore débattue. En revanche, le degré d'hydratation de ces sulfates de surface influe de manière plus directe sur la signature Raman.

1.3 Les oxy-hydroxydes de fer

Signature Raman

Les vibrations principales des liaisons Fe-O en spectroscopie Raman sont caractéristiques de chaque oxyde de fer (Figure C3. 8). Sur l'ensemble des spectres réalisés, 4 types d'oxydes de fer ont été identifiés :

- l'hématite, Fe_2O_3 (37% des spectres réalisés).
- la goethite, $\alpha\text{-FeOOH}$ (7% des spectres réalisés)
- la lépidocrocite, $\gamma\text{-FeOOH}$ (7% des spectres réalisés)
- l'akaganéite, $\beta\text{-FeOOH}(\text{Cl})$ (6% des spectres réalisés)

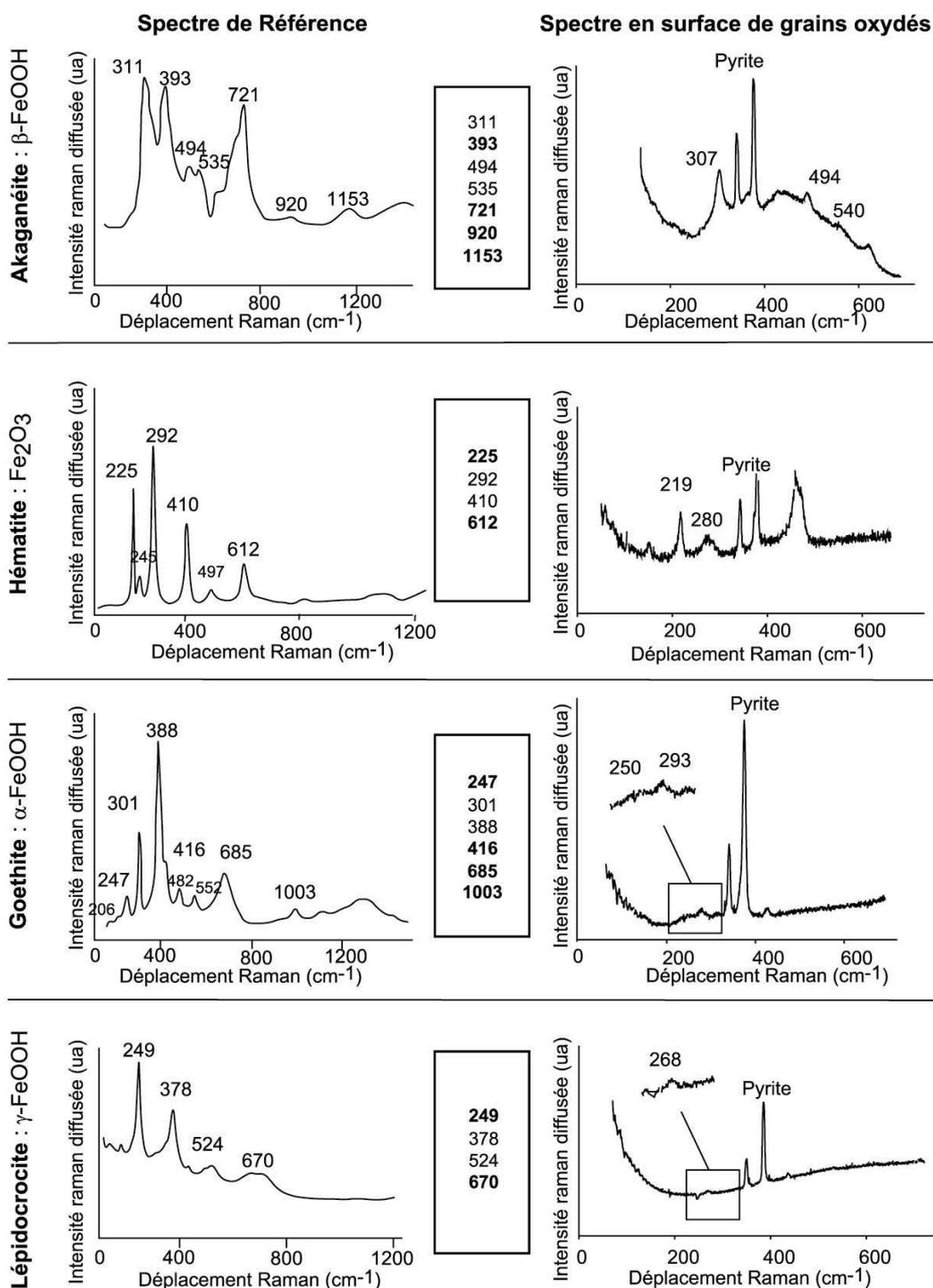


Figure C3. 8 : Signature Raman, de référence ou en surface de pyrites K oxydées, des quatre types d'oxydes de fer rencontrés

L'hématite est majoritaire dans les spectres Raman quelles que soient les conditions d'oxydation, y compris sur les témoins oxydés à l'air libre (Figure C3. 9). Toutefois, elle peut être associée (à l'échelle du micron) à d'autres oxydes de type lépidocrocite ou goethite. Par ailleurs, les fractions non négligeables de goethite, lépidocrocite et akaganéite monophasiques pourraient indiquer l'existence de plusieurs voies réactionnelles distinctes.

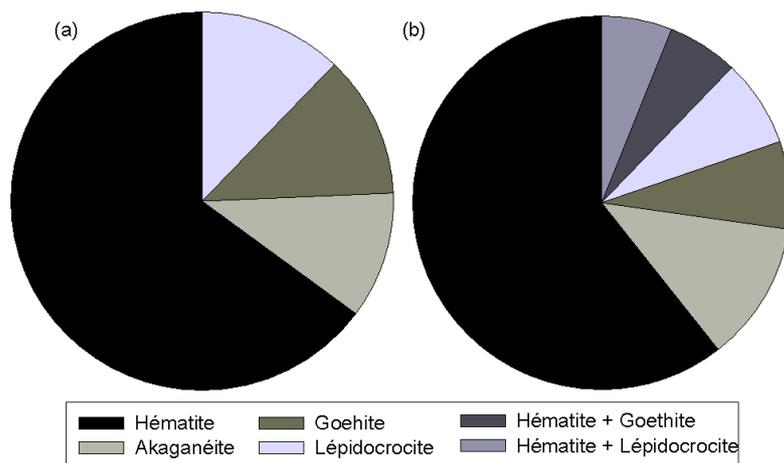


Figure C3. 9 : Nature (a) et associations (b) des oxydes rencontrés dans les spectres Raman de pyrite oxydées par différents agents.

L'akaganéite est couramment reportée comme produit de la corrosion du fer en milieu chloré, élément qui peut rentrer dans sa composition à hauteur de 2 à 10% massique. Bien qu'il existe de nombreux spectres de référence d'oxy-hydroxydes de fer dans la littérature, les différentes formes d'akaganéite répertoriées sont effectivement majoritairement chlorées (Holm *et al.*, 1983; Riveros and Dutrizac, 1997; Stahl *et al.*, 2003). Or, cet oxyde est détecté dans les spectres Raman (6% des spectres totaux). Il se formerait donc dans un milieu exempt de chlore. En effet, les bandes Raman à 315cm^{-1} (ν_s Fe-O) et 390cm^{-1} (ν_o Fe-O) sont caractéristiques de ce composé. Seule la bande Raman intense à 721cm^{-1} n'est jamais observée. Cette gamme de fréquence correspond à la zone de jonction des deux spectres ($50\text{-}730$ et $680\text{-}1300\text{cm}^{-1}$) et n'est donc pas imagée dans de bonnes conditions. Les vibrations observées peuvent donc correspondre à de l'akaganéite qui aurait cristallisé sans chlore ou en présence d'un autre ion dans une conformation similaire à celle décrite par Blgham *et al.*, (1990). Ces anions pourraient, dans notre cas, être des sulfates, majoritaires dans le milieu, ou des OH^- observables vers 3000cm^{-1} en spectroscopie Raman.

L'origine de ces oxydes de fer et leur association avec les autres composés de surface sera discutée ultérieurement (partie IV).

Signature XPS

La présence d'oxydes de fer est également détectée en XPS sur les grains biooxydés et oxydés à l'air. Des énergies caractéristiques de liaisons Fe(III)-O à $711,3$ eV et $712,6$ eV sur l'orbitale Fe ($2p_{3/2}$) ou à $532,7$ eV sur l'orbitale O (1s) sont identifiées (Figure C3. 6). La liaison Fe (II)-O à 709 eV ($\text{Fe}2p_{3/2}$) est également notée. Son interprétation est toujours

débatue et pourrait être attribuée aussi bien à une liaison Fe-O d'un oxyde ferreux qu'à une liaison entre un ion ferreux de surface de pyrite et un oxygène d'un sulfate (type II ou III).

1.4 Autres composés soufrés

Signature Raman

Trois autres types de composés soufrés sont observés fréquemment (Figure C3. 10) :

- du soufre élémentaire, S_8
- des polysulfures, S_n-S^{2-}
- des thiosulfates, $S_2O_3^{2-}$

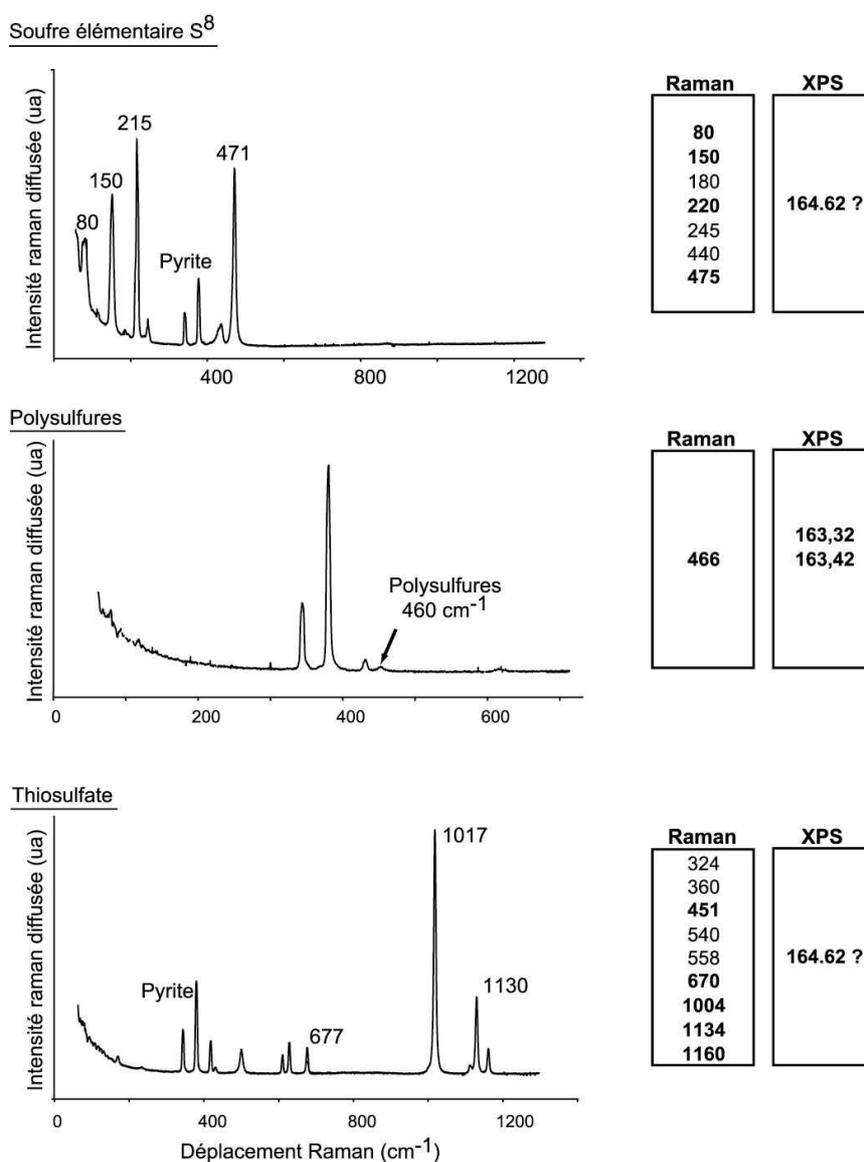


Figure C3. 10 : Spectres Raman caractéristiques des trois types de composés soufrés rencontrés, en complément des sulfates, en surface de pyrite K oxydée ainsi que leurs déplacements Raman (en cm^{-1}) et énergies de liaison XPS (en eV) caractéristiques.

Dans la littérature, le **soufre élémentaire** est décrit comme un produit final ou un intermédiaire réactionnel de l'oxydation de la pyrite, que ce soit par processus électrochimique ou lors d'une simple dissolution. Il est distribué sous forme de petits monticules de quelques microns détectables par Microscopie à Force Atomique (AFM) en surface de pyrites oxydées (Toniazzi, 1998) ou d'arséno-pyrite (Mc Guire *et al.*, 2001). Toutefois, sa contribution au signal global de surface est en général faible.

Les **polysulfures** S_n^{2-} ($n < 5$) sont décrits comme étant les principaux intermédiaires réactionnels lors de l'oxydation de monosulfures (sans doublet S-S) et ont été identifiés en présence de soufre élémentaire S_8 par Toniazzi *et al.* (1999b). Il s'agirait d'espèces de type S_n-S^{2-} dont la forme la plus stable serait S_4-S^{2-} (Mycroft *et al.*, 1990) en surface de pyrite naturelles.

Les **thiosulfates** (Figure C3. 10) sont, quant à eux, plus couramment décrits comme des espèces métastables précédant la formation de soufre S^0 ou de sulfates lors de l'oxydation de bisulfures de fer (Mckay and Halpern, 1958) comme la pyrite.

Toutefois, la présence majoritaire de polysulfures par rapport au thiosulfate (rapport 20 pour 1) indiquerait un comportement hétérogène (bi-modal ?) de la pyrite lors du processus d'oxydation. En fonction de l'arrangement atomique de la maille de la pyrite, certaines faces du minéral se comporteraient comme un disulfure (voie des thiosulfates) ou comme un monosulfure (voie des polysulfures). Ces deux voies ont été détaillées Chapitre I (Partie I paragraphe 3.1).

Signature XPS

Encore une fois, les résultats obtenus par XPS concordent avec ceux de la spectroscopie Raman. Ils montrent nettement la présence de différents composés soufrés, notamment des polysulfures à 163,3 eV sur l'orbitale $S2p_{3/2}$. En revanche, la distinction entre le soufre élémentaire et les polythionates ($S_xO_y^{2-}$) est moins évidente mais leur présence est indiscutable (164,6 eV).

Conclusion

La concordance entre les informations Raman et XPS est bonne et les résultats sont en accord avec les analyses antérieures réalisées sur des poudres fines de 32-53 μ m et 53-80 μ m (Toniazzi, 1998). Les surfaces de pyrite de granulométrie 160-250 μ m (utilisées dans cette étude) sont donc représentatives du comportement global du minéral au cours de la (bio)oxydation. Seule la quantité de phases oxydées est différente, la densité de sites semble

en revanche conservée. Comme l'a montré Toniazzo (1998), une zone de 5 μ m de côté constitue une surface « moyenne » représentative de la totalité des grains. Par conséquent, les recouvrements sont invariants pour des surfaces d'analyse supérieures (10x10 μ m ou 50x50 μ m par exemple). Il est possible de considérer que les échantillons analysés dans cette étude sont représentatifs du comportement moyen de tous les grains.

2 Diversité chimique et spatiale inter- et intra-grain

Signatures Raman

Les traitements biotiques et abiotiques présentent une grande variabilité, inter-grain et intra-grain, de signatures spectrales. On peut ainsi référencer à l'échelle du micron, quels que soient les grains et les traitements (Figure C3. 11) :

- des spectres « vierges », dépourvus de bandes, en dehors de celles caractéristiques de la pyrite (Ag et Eg), indiquant une absence de composés de surface, correspondant à des zones faiblement ou non réactives du minéral.
- des spectres « monophasiques » indiquant des zones à réactivité homogène, correspondant à un seul type de sites réactifs et produisant un seul composé : soufre élémentaire, polysulfures, oxydes de fer ou sulfates ferreux ou ferriques.
- des spectres « polyphasiques » présentant des bandes correspondant à un mélange de 2, 3 ou 4 des composés précédemment cités et révélateurs de zones à réactivité hétérogène. Dans ce cas, il existe sans doute une hétérogénéité de distribution de ces sites réactifs à une échelle inférieure au micron (non détectable par spectroscopie Raman).

Tous les spectres obtenus sont, en fait, constitués d'une combinaison plus ou moins complexe des spectres élémentaires, que l'on peut rencontrer indifféremment sur la surface d'un grain, de plusieurs grains ou dans différentes modalités d'oxydation. La résolution latérale de l'ordre du micromètre du faisceau laser indique une hétérogénéité spatiale micrométrique à sub-micrométrique en surface des grains de pyrite oxydées. Cette hétérogénéité a également été mise en évidence par Demoisson (2006) en présence de Cr(VI). De plus, la sensibilité du Raman étant limitée à la détection d'une couche d'épaisseur minimale de 10 à 100nm, les composés détectés ont par conséquent une extension verticale non négligeable. Les spectres polyphasiques pourraient ainsi être la conséquence d'une organisation 3D complexe des produits d'oxydation que ce soit par leur extension latérale ou verticale. Toutefois, les mesures effectuées restent qualitatives à l'échelle du site, l'irradiance des composés étant mal contrainte sur des surfaces à cassure conchoïdale.

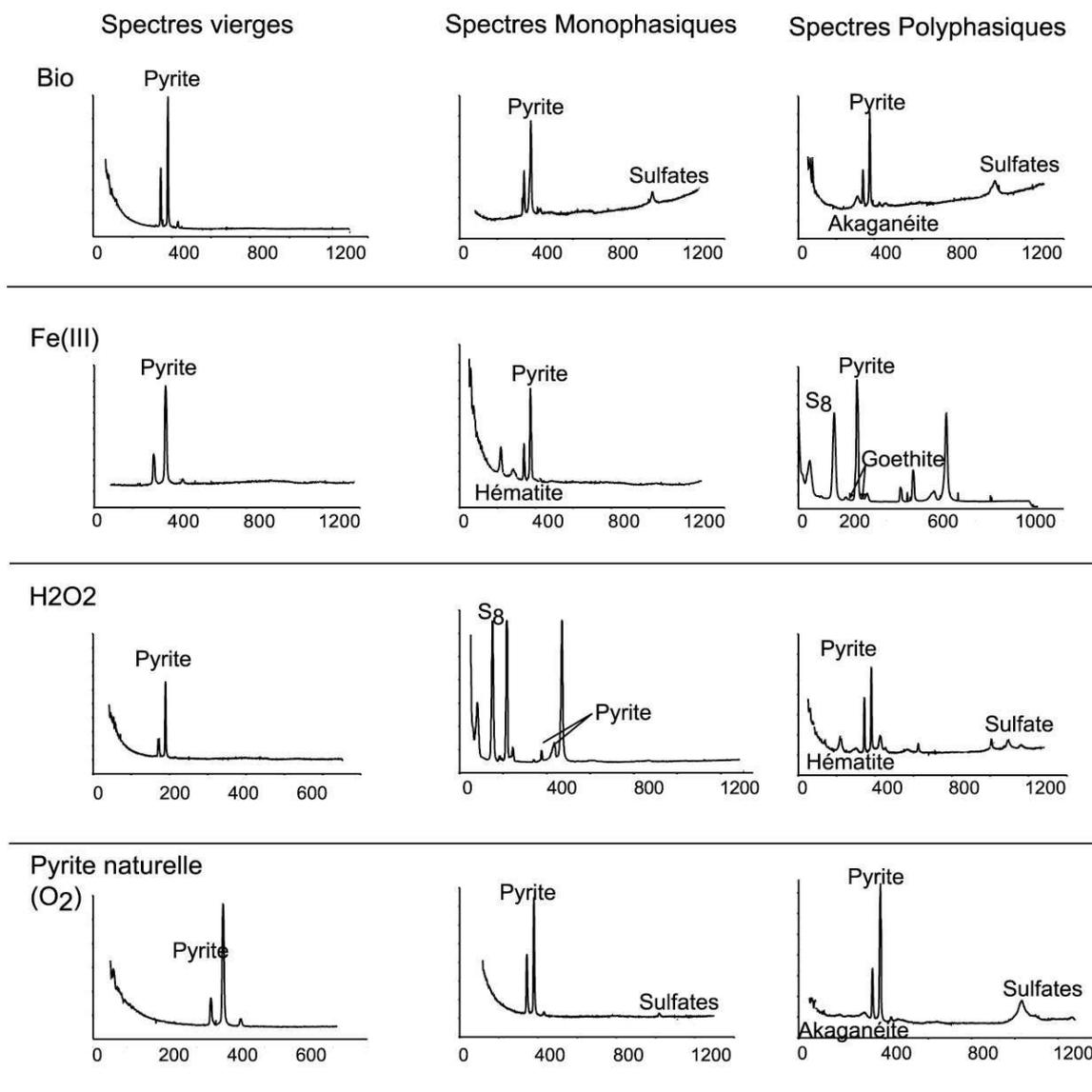


Figure C3. 11 : Quelques exemples de spectres Raman (vierges, mono- ou polyphasiques) « typiques » obtenus sur des surfaces de pyrite K oxydée biotiquement ou abiotiquement.

Les combinaisons potentielles de ces composés de surface en fonction de paramètres discriminants, tels que les modalités d'oxydation ou les caractéristiques minéralogiques de la pyrite, seront discutées ultérieurement (Parties II et III de ce chapitre).

Signatures XPS

Cette hétérogénéité spatiale et chimique micrométrique est confirmée par les analyses, en XPS, des orbitales (1s) de l'oxygène, (2p_{3/2}) du soufre et (2p_{3/2}) du fer des composés de surface de grains oxydés à l'air (Figure C3. 12).

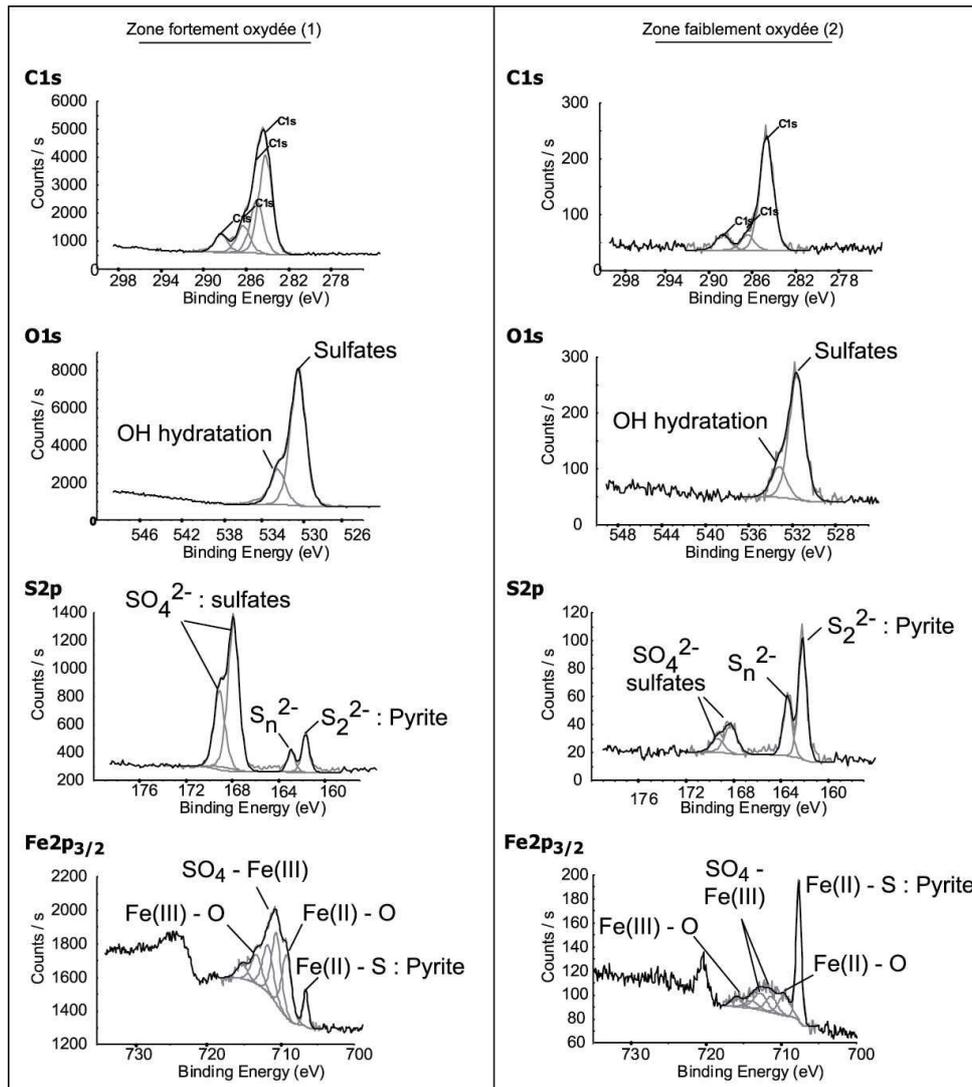


Figure C3. 12 : Spectres XPS des orbitales C(1s), O(1s), Fe(2p)_{3/2}, S(2p) sur deux grains de granulométrie 160-250µm oxydés à l'air libre.

Les deux grains, issus du même aliquot de pyrite broyée et oxydée à l'air libre, mettent en évidence les mêmes produits de surface mais en proportions variables (Tableau C3. 5). La chimie des composés est identique, en revanche les extensions verticales de ces produits sont différentes. Les recouvrements de surface calculés sont ainsi de 34,5% et 22,1%.

Tableau C3. 5 : Tableau récapitulatif des énergies de liaison observées par XPS sur les orbitales C(1s), O(1s), S(2p) et Fe(2p)_{3/2} sur deux grains de pyrite K naturelle. Les liaisons correspondantes sont données ainsi que les pourcentages de participation de ces énergies de liaison au pic total de l'orbitale ou du spectre complet.

Orbitale	Energie de liaison		Aire du pic (%)		Aire totale (%)		Composantes
	Zone 1	Zone 2	Zone 1	Zone 2	Zone 1	Zone 2	
C(1s)	284.6	284.6	50.4	78.8	44.58	38.10	
	285.43		26.8		0.00	20.23	
	286.69	286.35	13.6	10.5	5.95	10.29	
	288.79	288.63	9.2	10.7	6.06	6.96	
Σ			100	100	56.59	75.58	
O(1s)	531.53	531.53	79.3	80.1	7.90	11.98	OH ⁻
	533.46	533.16	20.7	19.9	1.96	3.12	
	Σ		100	100	9.85	15.10	
S(2p)	161.98	162.15	15.6	48.9	8.32	1.26	S ₂ ²⁻ S _n ²⁻ SO ₄ ²⁻ SO ₄ ²⁻
	163.23	163.43	0.0	24.2	15.77	0.00	
	168.22	168.23	84.4	18.4	3.13	6.85	
	169.43	169.33	0.0	8.5	5.53	0.00	
Σ		100	100	32.75	8.11		
Fe(2p) _{3/2}	706.62	706.73	7.5	44.9	0.16	0.01	Fe(II) - S Fe(III)-O Fe(II) - O Fe(III) - S Fe(III) - O Fe(III) - O
		708.65		15.2	0.00	0.00	
	709.19		24.4		0.05	0.05	
	710.59	710.39	27.5	11.9	0.04	0.05	
	711.74	711.84	21.3	14.6	0.05	0.04	
	713.3	713.01	13.1	6.5	0.02	0.03	
	715.23	715.07	6.3	6.8	0.02	0.01	
Σ		100	100	0.36	0.20		
Recouvrement					34.48	22.13	

Les sulfates de fer sont les composés majoritaires de l'oxydation de la pyrite. Cependant, il semble y avoir plus de sulfates mis en évidence par l'orbitale 2p_{3/2} du soufre que de fer lié au sulfate. Les spectres de l'orbitale de l'azote N(1s) présentent un pic pouvant être attribué à des amino-sulfates (données non montrées) expliquant en partie la proportion de sulfates manquants. D'autre part, la proportion de sulfates est calculée à partir de la liaison Fe(III)-S attribuée à des sulfates ferriques. La liaison Fe(II)-O pourrait, si elle traduit un environnement sulfate, expliquer une part manquante de sulfates comme étant des sulfates ferreux moins visibles dans cette couche superficielle analysée en XPS.

PARTIE I : PRINCIPAUX RESULTATS

- Les jarosites ne peuvent pas être considérées comme des produits directs de l'oxydation de la pyrite et ne sont jamais rencontrées en surface de pyrites (bio)oxydées en milieu acide.
- Présence d'une forte **hétérogénéité chimique** des produits d'oxydation en surface de pyrites oxydées (tout traitement confondu) :
 - au moins 5 types de composés ont été identifiés : sulfates principalement de fer, oxy-hydroxydes de fer, soufre élémentaire, polythionates et polysulfures.
 - mise en évidence de 4 oxydes : hématite, goethite, akaganéite, lépidocrocite
 - mise en évidence de 4 types de sulfates (notés I à IV) de conformation moléculaire caractéristique
- Présence d'une forte **hétérogénéité spatiale** des produits d'oxydation qui ont une organisation micrométrique à sub-micrométrique, inférieure au diamètre moyen du faisceau laser Raman.
- Pour comprendre les processus élémentaires de surface, il est indispensable de travailler à échelle submicrométrique.

Partie II : Influence des faces minérales sur la nature chimique des produits d'oxydation formés

En raison de l'orientation des doublets S-S²⁻ dans la maille cristalline de la pyrite, la circulation d'électrons n'est pas homogène au sein du minéral et engendre des réactivités des faces différentes (Guevremont *et al.*, 1998a; Ndlovu and Monhemius, 2005). De plus, la nature de l'atome terminal (Fe ou S) de ces faces peut induire l'expression en surface de certains sites réactifs et donc le développement de produits d'oxydation différents.

La réactivité de la pyrite est donc différente en fonction de la face cristallographique et peut être, pour partie, source de l'hétérogénéité de surface rencontrée et décrite précédemment. Il pourrait donc exister une relation entre la face cristallographique, ou plus généralement l'orientation cristalline moyenne d'une zone réactionnelle, et la nature chimique des produits d'oxydation détectés.

La spectroscopie Raman étant très sensible aux vibrations de ces doublets S-S²⁻, elle peut être utilisée pour déterminer leur orientation et ainsi obtenir une estimation de l'orientation cristalline moyenne d'une zone réactionnelle du minéral corrélativement à la signature spectrale des composés de surface.

1 **Méthode d'estimation des faces ou orientations cristallines locales**

Cette méthode a été développée par Gornay (2002) au Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME). On rappelle que toute molécule possède une polarisabilité α qui, sous l'action d'un champ E , crée un dipôle μ tel que $\vec{\mu} = \alpha \vec{E}$ où α est donc une constante de proportionnalité entre le champ appliqué par le laser incident et le dipôle induit par ce champ.

Cette polarisabilité anisotrope peut être traduite par un tenseur d'ordre 3 dont la représentation dans l'espace est une ellipsoïde :

$$\begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix}$$

Les modes de vibration de la pyrite (Ag, Eg, Tg₁, Tg₂ et Tg₃) peuvent être déterminés à partir de la matrice de polarisabilité, exprimée en fonction des diagonales du cube.

Soient x, y et z les orientations cristallines du cube de pyrite. Les projections, dans le plan (x,y) des champs électriques incident et diffusé définissent respectivement un angle Φ et θ avec l'axe x. Le moment dipolaire, induit par le champ électrique incident, définit un angle σ avec l'axe z et un angle ψ l'axe x (Figure C3. 13).

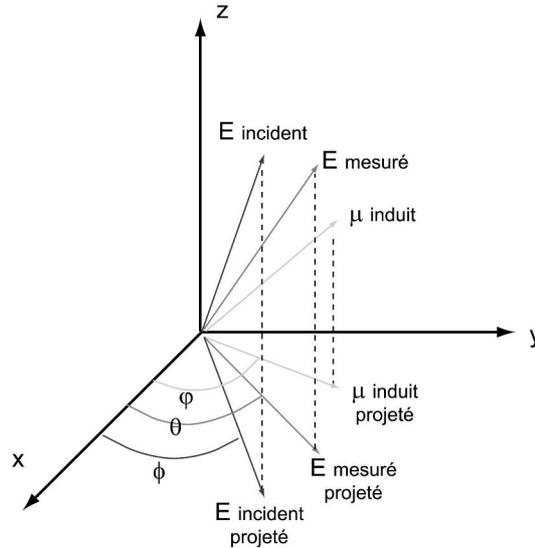


Figure C3.13 : Grandeurs et orientations du système analysé : x,y,z les orientations cristallines de la pyrite et φ,θ,φ les angles définis par les projections en (x,y) des champs électriques et dipôle induit avec l'axe x.

Si l'on se place dans le cas où le laser est parallèle à l'axe z, d'après Gornay (2002) :

- Pour Ag, on a les conditions :

$$\begin{cases} \alpha_{xx} + \alpha_{yy} - 2\alpha_{zz} = 0 \\ \alpha_{xx} - \alpha_{yy} = 0 \\ \alpha_{xy} = \alpha_{yz} = \alpha_{xz} = 0 \end{cases} \text{ ce qui induit une matrice de polarisabilité de la forme : } \begin{pmatrix} a & 0 & 0 \\ 0 & a & 0 \\ 0 & 0 & a \end{pmatrix}$$

- Pour Eg, on a les conditions :

$$\begin{cases} \alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz} = 0 \\ \alpha_{xy} = \alpha_{yz} = \alpha_{xz} = 0 \end{cases} \text{ ce qui induit une matrice de polarisabilité de la forme :}$$

$$\begin{pmatrix} b & 0 & 0 \\ 0 & b & 0 \\ 0 & 0 & -2b \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} c & 0 & 0 \\ 0 & -c & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \text{ ou après normation } \begin{pmatrix} b & 0 & 0 \\ 0 & b & 0 \\ 0 & 0 & -2b \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} -b\sqrt{3} & 0 & 0 \\ 0 & b\sqrt{3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

- Pour Tg, on a les conditions :

$$\begin{cases} \alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz} = 0 \\ \alpha_{xx} = \alpha_{yy}, \alpha_{xx} + \alpha_{yy} = 2\alpha_{zz} \end{cases} \text{ ce qui induit } \alpha_{xx} = \alpha_{yy} = \alpha_{zz} = 0 \text{ et une matrice de}$$

polarisabilité :
$$\begin{pmatrix} 0 & d & d \\ e & 0 & d \\ e & e & 0 \end{pmatrix}$$

L'irradiance, qui est l'intensité diffusée mesurée, peut être définie par le carré de la norme du champ électrique mesuré $\left| \overrightarrow{E}_{\text{mesuré}} \right|^2$. Ce qui induit :

- Ag : $I_{\text{diffusé, mesuré}}^{\text{Ag}}(\psi, \theta) = \left| \overrightarrow{\mu}_{\text{induit}}^{\text{Ag}} \right|^2 \cos^2(\psi - \theta) = a^2 \cos^2(\psi - \theta) = a^2 \cos^2(\varphi - \theta)$

- Eg : c'est un état dégénéré d'ordre 2, il faut additionner :

$$I_{\text{diffusé, mesuré}}^{\text{Eg1}}(\phi, \theta) = b^2 \cos^2(\phi - \psi)$$

$$I_{\text{diffusé, mesuré}}^{\text{Eg2}}(\phi, \theta) = 3b^2 \cos^2(\phi - \psi)$$

- Tg : c'est un état dégénéré d'ordre 3 :

$$I_{\text{diffusé, mesuré}}^{\text{Tg1}}(\phi, \theta) = 0$$

$$I_{\text{diffusé, mesuré}}^{\text{Tg2}}(\phi, \theta) = 0$$

$$I_{\text{diffusé, mesuré}}^{\text{Tg3}}(\phi, \theta) = (d \cdot \sin\phi \cdot \cos\theta + e \cdot \cos\phi \cdot \sin\theta)^2$$

Ainsi, en connaissant les matrices de polarisabilité de chaque mode de vibration, les angles définis par le champ électrique incident et le moment dipolaire induit avec les orientations cristallines, il est possible d'estimer les valeurs des rapports des pics Ag/Eg en fonction des faces cristallines du minéral.

Plus généralement, les rapports d'intensité entre les modes de vibration de la pyrite sont donc dépendants de l'orientation du cristal, du champ électrique incident et de l'angle de mesure. L'angle d'incidence entre le faisceau laser et la surface du minéral analysé n'a pas d'influence sur le signal Raman effectué, contrairement à l'angle existant entre le faisceau laser et les axes cristallins (Gornay, 2002). Toutes les analyses doivent donc être effectuées sur des zones « plates » des grains orientés perpendiculairement au faisceau laser incident et en minimisant la taille du spot sur l'échantillon.

Les coefficients de polarisabilité ont été déterminés en se plaçant dans le cas où le faisceau laser est parallèle à l'axe z sur une face (001) par Gornay (2002). En choisissant

arbitrairement b égal à 1, a est alors égal à 2,23 ce qui permet de calculer les normes des moments dipolaires des pics A_g et E_g ainsi que les valeurs théoriques des rapports d'intensité

données par $\frac{\|\vec{u}_{A_g}\|^2}{\|\vec{u}_{E_g}\|^2}$ quelle que soit la face, en considérant ces coefficients valables pour toute

face. Dans le cas où le champ incident est parallèle à z , deux mesures effectuées par rotation de l'échantillon de 45° dans le plan (x,y) peuvent permettre de donner une orientation cristalline du plan mesuré.

La détermination exacte des faces cristallines d'une pyrite à partir des spectres Raman nécessite, en réalité, (i) de connaître l'orientation du champ électrique incident et (ii) d'enregistrer les spectres en position VV (polarisation verticale, le polariseur est parallèle au champ incident) et VH (polarisation horizontale, le polariseur est perpendiculaire au champ incident) pour chaque orientation du champ incident, en plus des deux mesures à 45° . Ici, les mesures effectuées ne tiennent pas compte de l'orientation du champ électrique incident. Tous les spectres sont réalisés sans polarisation ce qui correspond à une polarisation verticale. Les rapports mesurés directement à partir des spectres ne peuvent donner qu'une idée de l'orientation cristalline de la face analysée, les valeurs des rapports calculés de la sorte n'étant pas totalement discriminant. Des regroupements d'orientations cristallines des surfaces analysées ont été effectuées en fonction des calculs des rapports A_g/E_g et A_g/E_{g45° exprimés.

D'autre part, l'irradiance dépend également de la réflectivité du minéral ce qui implique que les rapports des pics ne peuvent pas être déterminés précisément par le calcul.

Pour simplifier les calculs, et en première approximation, on considèrera que les analyses ont été effectuées avec le laser parallèle à l'axe z afin de comparer les couples A_g/E_g et A_g/E_{g45° mesurés à ceux des faces cristallines connues de la pyrite et dont les rapports sont déterminées théoriquement à partir des matrices de polarisabilité.

Ainsi, pour une face (321) dont le vecteur directeur est décrit par $\begin{pmatrix} 3 \\ 2 \\ 1 \end{pmatrix} \frac{1}{\sqrt{14}}$, un vecteur orthogonal à cette orientation cristalline (Figure C3. 14) répondra au critère :

$$\begin{pmatrix} 3 \\ 2 \\ 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = 0 \Leftrightarrow 3x + 2y + z = 0$$

Une solution de cette équation peut être donnée par $v_1 : \begin{pmatrix} -2 \\ 3 \\ 0 \end{pmatrix} \frac{1}{\sqrt{13}}$

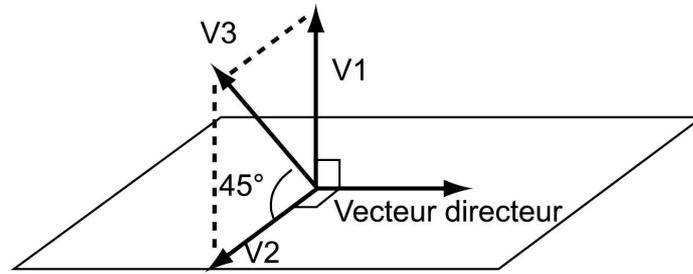


Figure C3. 14 : Représentation des vecteurs normaux et directeurs des orientations cristallines utilisés pour le calcul théorique des rapports A_g/E_g et $A_g/E_{g_{45^\circ}}$ des vibrations principales du doublet $S-S^{2-}$ de la pyrite.

Pour cette face, le moment dipolaire induit par l'excitation par le laser est décrit pour les vibrations principales A_g et E_g comme suit :

$$\vec{u}_{A_g} = \begin{pmatrix} a & 0 \\ a & a \\ 0 & a \end{pmatrix} (v_1) \quad \text{et} \quad \vec{u}_{E_g} = \left[\begin{pmatrix} b & 0 \\ b & b \\ 0 & -2b \end{pmatrix} + \frac{1}{\sqrt{3}} \begin{pmatrix} -b & 0 \\ b & b \\ 0 & 0 \end{pmatrix} \right] (v_1) \quad \text{avec } a = 2.23 \text{ et } b = 1.$$

Le rapport des intensités défini par $\frac{\|\vec{u}_{A_g}\|^2}{\|\vec{u}_{E_g}\|^2}$ vaut dans ce cas 2,798.

Après rotation de 45° , on considère le vecteur orthogonal à la nouvelle orientation v_3 . Ce vecteur est calculé comme étant la somme de v_1 et de v_2 , vecteur orthogonal à v_1 et au vecteur directeur de la face considérée. Ici, on a donc :

$$\begin{pmatrix} 3 \\ 2 \\ 1 \end{pmatrix} \wedge (v_1) = v_2 \Leftrightarrow v_2 : \begin{pmatrix} -3 \\ -2 \\ 13 \end{pmatrix} \frac{1}{\sqrt{182}}$$

$$(v_1) + (v_2) = v_3 \Leftrightarrow v_3 : \begin{pmatrix} -5 \\ 1 \\ 13 \end{pmatrix} \frac{1}{\sqrt{195}}$$

$$\text{D'où : } \left(\frac{\|\vec{u}_{A_g}\|^2}{\|\vec{u}_{E_g}\|^2} \right) (45^\circ) = 1,42$$

La face (321) est ainsi déterminée en partie par un couple de rapport $A_g/E_g = 2,8$ et $A_g/E_{g_{45^\circ}} = 1,42$.

Ces calculs seront appliqués par la suite aux différentes faces connues du pyritoèdre pour rapprocher ces valeurs théoriques de celles obtenues par spectroscopie Raman sur des surfaces de pyrites oxydées.

2 Influence du faciès cristallographique sur les processus locaux d'oxydation de la pyrite

2.1 Faciès cristallographiques identifiés

Dans cette étude, nous avons appliqué cette méthode d'estimation à 131 échantillons (grains de pyrite K oxydée) provenant des 4 traitements biotiques et abiotiques. Ces grains minéraux, naturels et non polis, expriment des faces variables à travers des cassures naturelles conchoïdales, peu représentatives des faces du cube ou du pyritoèdre. Les échantillons, sélectionnés sous loupe binoculaire et présentant des faces relativement planes et oxydées, sont montés sur une feuille d'indium et analysés en spectroscopie Raman :

- une première fois, entre 50 et 1300 cm^{-1} réparti sur deux plages d'analyse (50-730 cm^{-1} et 680-1300 cm^{-1}) afin de déterminer la nature des composés de surface.
- une deuxième fois, sur une plage de 50 à 730 cm^{-1} , après rotation de l'échantillon de 45° dans le plan d'analyse, afin de définir l'orientation cristalline majeure de la zone analysée.

Les rapports avant et après rotation (Ag/Eg et Ag/Eg_{45°}, respectivement) peuvent être ainsi déterminés et comparés aux valeurs théoriques de ces mêmes rapports pour les faces majeures connues de la pyrite.

Six groupes de rapports Ag/Eg et Ag/Eg_{45°}, notés A à F, ont ainsi été déterminés en complément des valeurs données par Gornay (2002) pour les faces « classiques » de la pyrite (Tableau C3. 6).

Tableau C3. 6 : Caractéristiques Raman et détermination des faciès cristallographiques sur 121 des 131 grains de pyrite oxydée analysés.

Face ou Faciès	Mesuré		Théorique		Orientation potentielle associée	Occurrence (%)
	Ag/Eg	Ag/Eg ₄₅	Ag/Eg	Ag/Eg ₄₅		
FACE (100) (210) (111)			1.32	5.29		
		--	1.32	5.29	--	--
			5.29	5.29		
FACIES A B C D E F	3.5	1.5	3.7	1.55	(220)	16
	4.5	2.4				6
	2.2	2.8				30
	2.7	1.5	2.8	1.42	(123)	27
	3.9	2.7	3.7	2.33	(322)	24
	4.2	3.5				8

Etant donné le peu de faces (111), (210) et (001) observées (4 au total), les interprétations ont été établies sur la base des groupes (ou faciès cristallographiques) A à F.

Les faciès A à F ne possèdent pas les caractéristiques nettes de faces minéralogiques bien définies et correspondent sûrement à des combinaisons de faces réelles. Leur fréquence indique une hétérogénéité minérale à échelle sub-micronique et une organisation polycristalline des grains de pyrite, chaque particule correspondant à un assemblage de petits mono-cristaux. Toutefois, le faciès B semble avoir une orientation cristalline proche d'une face (210) alors que le faciès F se rapprocherait d'une (111). Ces deux groupes doivent donc être constitués d'un assemblage polycristallin exprimant majoritairement ces faces réelles. Les autres faciès, en particulier C et D et dans une moindre mesure E, ne sont pas très discriminants. Une série d'analyses plus précises sur des monocristaux seraient nécessaires pour lever toute ambiguïté.

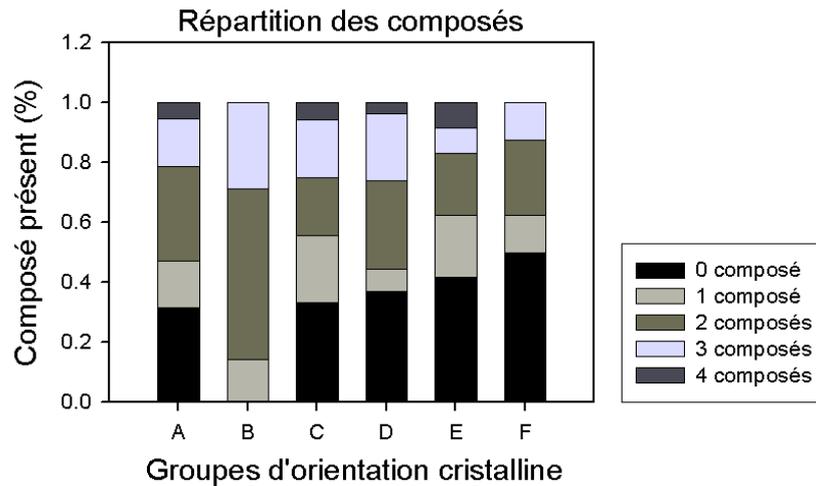
2.2 Répartition des composés de surface

Malgré ce manque de précision dans la détermination réelle des orientations cristallographiques, quelques tendances sont néanmoins remarquables.

Les spectres Raman montrent la présence, sur tous les groupes identifiés, de zones mono-, bi- ou tri-phasiques (Figure C3. 15). Environ un tiers des spectres réalisés sur les groupes A, C et D correspondent à des zones vierges et 5 à 10% à des zones quadri-phasiques. Seuls les groupes B et F se distinguent en ne présentant aucune zone à 4 composés. Par ailleurs, les signatures Raman sur le groupe B ne présentent aucune zone vierge alors que le groupe F en compte environ la moitié. Cette répartition qualitative des composés de surface et de leur association en fonction de l'orientation cristalline des surfaces minérales sous-jacentes reflète à la fois :

- une distribution en patchs micrométriques à sub-micrométriques des composés de surface,
- et une variation locale en termes de quantité ou de réactivité de sites d'oxydation au sein d'une même zone.

Ainsi, le groupe B développerait en surface plus de sites et/ou plus réactifs que ceux du groupe F. Toutefois, ces deux groupes sont les moins bien représentés (respectivement n=7 et 8), et l'interprétation des résultats est sans doute biaisée.



Groupe	Spectres				
	0 composé	1 composé	2 composés	3 composés	4 composés
A	0.32	0.16	0.32	0.16	0.05
B	0.00	0.14	0.57	0.29	0.00
C	0.33	0.22	0.19	0.19	0.06
D	0.37	0.07	0.30	0.22	0.04
E	0.42	0.21	0.21	0.08	0.08
F	0.50	0.13	0.25	0.13	0.00

Figure C3.15 : Répartition du nombre de composés sur les groupes Ag/Eg - Ag/Eg_{45°} déterminés par spectroscopie Raman sans distinction de leur nature chimique.

Les comportements de ces différents groupes vis à vis de l'oxydation, en termes d'associations minérales, résultent plus ou moins directement de l'organisation de la maille cristalline de la pyrite et de la circulation d'électrons non isotrope qu'elle engendre. Si tous les groupes identifiés semblent susceptibles de présenter chacun des composés ou toute combinaison des 4 produits majeurs d'oxydation, leur répartition spatiale résulteraient de l'organisation des sites d'oxydation en surface du minéral.

2.3 Faciès chimiques/minéralogiques caractéristiques

La Figure C3.16 et le Tableau C3.7 expriment, pour chaque groupe cristallographique, les associations de produits d'oxydation rencontrées.

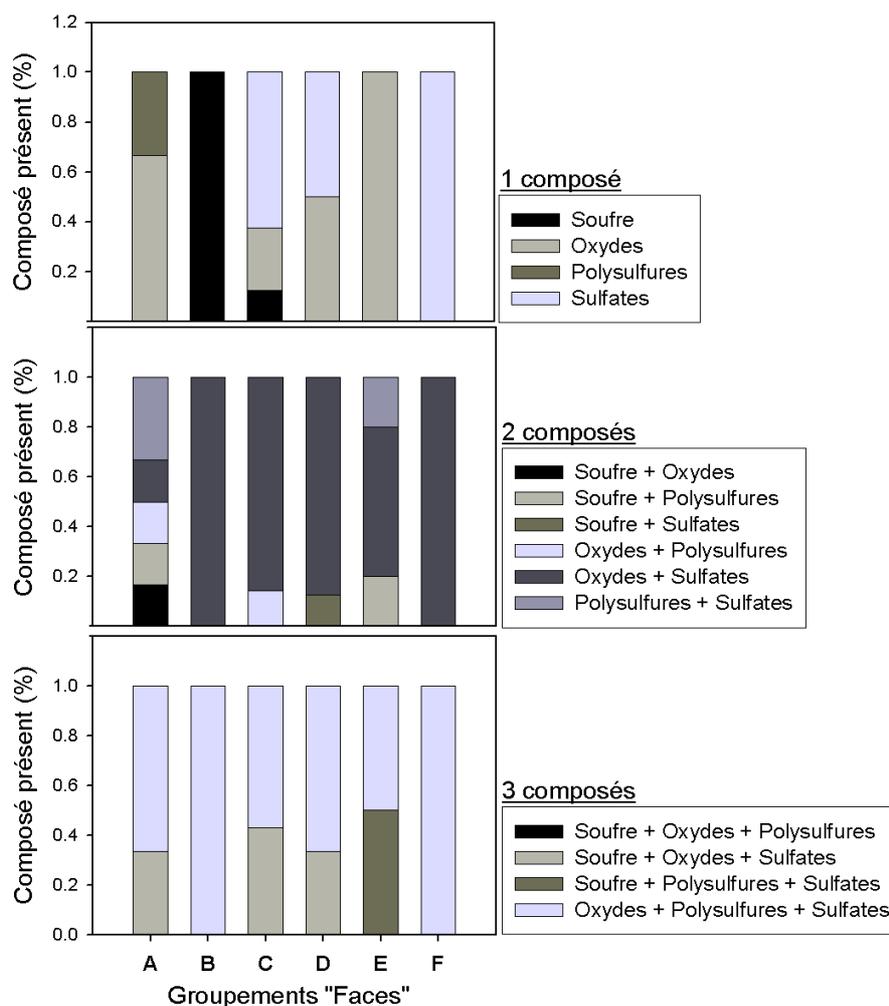


Figure C3. 16 : Répartition sur chaque groupe de faces des associations de composés de surface déterminés par spectroscopie Raman.

Tableau C3. 7 : Récapitulatif des assemblages majeurs de produits d'oxydation en surface de pyrite en fonction des groupes cristallochimiques identifiés.

Groupement	Assemblage de composés				
	0 composé	Monophasé	Biphasé	Type de sulfates	Oxydes
A	+	Oxydes (70%) Polysulfures (30%)	Oxydes + autres (30%) Polysulfures + oxydes (20%) Polysulfures + autres (50%)	II (+ III + IV)	Hématite 50% Lépidocrocite 30% Akaganéite 20%
B	∅	Soufre (100%)	Oxydes + Sulfates (100%)	II + III	Hématite 85%
C	+	Sulfates (65%) Oxydes (25%) Soufre (10%)	Oxydes + Sulfates (90%) Oxydes + Polysulfures (10%)	II (+ IV)	Hématite 85% Akaganéite Goethite
D	+	Oxydes (50%) Sulfates (50%)	Sulfates + Oxydes (90%) Sulfates + Soufre (10%)	II + III + IV	Hématite 85%
E	++	Oxydes (100%)	Oxydes + Sulfates (60%) Polysulfures + autres soufrés (40%)	II (+ III)	Hématite 80% Akaganéite 20%
F	+++	Sulfates (100%)	Oxydes + Sulfates (100%)	II + III	Hématite 85%

Il en ressort que les assemblages polyphasiques ne sont pas discriminants vis à vis des groupes identifiés en raison (i) d'un nombre insuffisant de spectres et (ii) de la « disparition » de l'information pertinente dans l'hétérogénéité d'assemblages rencontrés. En revanche, les zones analysées présentant des faciès monophasiques marqués semblent définir des « pôles » de réactivité. Les groupes B, E et F, et dans une moindre mesure le groupe A, sont de ce point de vue, les plus intéressants. Ils correspondent également aux zones les mieux définies en termes d'orientation cristalline. Deux points semblent tout de même se dégager :

▪ Expression de sites de surface et des processus associés :

Les groupes B, E et F sont respectivement recouverts majoritairement de soufre, d'oxydes et de sulfates, traduisant une expression de sites de surface, pour chaque groupe, globalement homogène. La présence d'oxydes et de sulfates sur les groupes E et F peut également être considérée comme le reflet d'un processus électrochimique d'oxydation de la pyrite par Fe^{3+} . En revanche, la production de soufre sur les zones de type B pourrait correspondre (i) à une dissolution aqueuse de la pyrite ou (ii) à une attaque moléculaire par l'oxygène atmosphérique dissous ou par le peroxyde d'hydrogène par exemple.

La nature et la réactivité de ces sites de surface peuvent être liées à la terminaison cristallographique locale (dominante fer ou soufre). Ainsi, le groupe B pourrait posséder une terminaison soufre alors que les groupes E et F seraient potentiellement à terminaison fer. Les faces (111) de la pyrite, qui semblent majoritaires dans le groupe F, sont d'ailleurs à terminaisons fer ou soufre.

En revanche, aucune corrélation ne peut être établie entre la nature des sulfates produits et le faciès cristallographique de la zone sous-jacente (Tableau C3. 8). Les sulfates de type IV, directement associés à des oxydes ne sont, par exemple, pas représentés sur le groupe E qui favorise pourtant majoritairement la formation en surface d'oxydes de fer.

Tableau C3. 8 : Répartition des types de sulfates rencontrés en spectroscopie Raman en fonction des groupes cristallins réalisés.

Type sulfates	Faciès cristallochimique					
	A (n=9)	B (n=6)	C (n=11)	D (n=12)	E (n=7)	F (n=4)
II	0.78	0.83	0.91	0.50	0.86	0.75
III	0.11	0.17	0.00	0.33	0.14	0.25
IV	0.11	0.00	0.09	0.17	0.00	0.00

▪ Réactivité des sites et réactivité globale de la zone réactionnelle :

Les expériences de Demoisson (2006) ont montré que les stades précoces de l'oxydation de la pyrite se traduisaient par une forte production d'oxydes de fer en surface (en particulier d'hématite). La présence de phases oxydes stables (hématite ou goéthite) ou moins stables (akaganéite et lépidocrocite) sur les groupes E et F pourraient ainsi correspondre à des stades précoces d'oxydation (sites à oxydation retardée ou plus lente). Par ailleurs, la réactivité des sites monophasiques du groupe E (développant des oxydes) est sûrement moindre que celle des sites monophasiques du groupe F (développant des sulfates).

Malgré la très forte variabilité de ses associations de composés, le faciès du groupe A est marqué par la présence nette de phases individualisées polysulfures ou oxydes qui traduisent des états précoces ou peu avancés des processus d'oxydation de la pyrite. D'autre part, si la signature moyenne en surface de pyrite est de l'hématite, ce groupe présente toute la panoplie d'oxydes identifiés, ce qui confirme la faible réactivité de ses sites de surface.

Une séquence de réactivité relative des zones réactionnelles de surface des groupes A, E et F, vis-à-vis de l'oxydation électrochimique, pourrait ainsi être établie avec : $r_F > r_E > r_A$.

Il est, par contre, plus délicat de conclure sur la réactivité des zones de type B, même si l'absence de zones vierges tendraient à traduire une relativement forte réactivité. En effet, ce faciès cristallographique présente un phénotype particulier, avec une forte présence de soufre élémentaire qui pourrait être attribuable à un processus d'oxydation spécifique.

Les caractéristiques des groupes discriminants sont données par le Tableau C3. 9.

Tableau C3. 9 : Récapitulatif des faciès chimiques et réactivités majeurs déterminés sur les faciès cristallographiques A, B, E et F déterminés par spectroscopie Raman.

Faciès cristallographiques	Faciès chimique associé		Réactivité relative des sites de surface
	Produit sulfuré	Oxydes	
A	Polysulfures	++	±
B	Soufre	+	++(+)
E	Polysulfures + Sulfates + Soufre	+++	+
F	Sulfates	+	++

Des analyses statistiques (ACP, Anova) ont été réalisées sur ces résultats par une approche globale (ensemble des points) ou plus spécifique (par orientation cristalline), mais ne s'avèrent pas concluantes en raison respectivement (1) d'un trop grand nombre de paramètres en jeu et (2) d'un nombre insuffisant de points de mesure.

Ainsi, la détermination de la réactivité globale d'une face ou orientation cristalline passe par la recherche de zones monophasiques, présentant un seul type de sites réactionnels. Ces zones monophasiques apportent en effet des informations à la fois (i) sur la nature et l'occurrence de ces sites réactionnels de surface, liés au réseau cristallin et donc à la nature de l'atome terminal de la face ou orientation cristalline et (ii) sur la réactivité de ces sites à travers le développement de phases traduisant un état plus ou moins avancé de l'oxydation.

PARTIE II : PRINCIPAUX RESULTATS

- La nature et le nombre de sites réactionnels exprimés en surface d'une face ou orientation cristalline majeure sont liés à l'organisation du réseau cristallin du minéral.
- Les réactivités de ces sites varient d'une face ou orientation cristalline à l'autre et contrôlent, au moins pour partie, la nature et les associations des produits d'altération.
- La détermination de la réactivité globale d'une face ou d'une orientation cristalline dans le cas de grains minéraux à cassure conchoïdale passe par la recherche de zones réactionnelles homogènes qui permettent de raisonner à l'échelle du site actif.

Cependant, deux réserves importantes peuvent être émises sur ces résultats :

- la détermination des orientations cristallines n'est pas suffisamment précise pour établir une classification robuste des zones en fonction de leur réactivité.
- l'hétérogénéité de surface étant très importante, le nombre d'analyse demeure insuffisant.

Le travail réalisé ici donne en réalité une indication sur l'hétérogénéité de surface développée par le minéral, fonction de la réactivité différentielle de ses faces et de leur abondance surfacique.

Par ailleurs, les interprétations proposées ici ne prennent en considération que les orientations cristallines comme paramètre influant sur les composés de surface. Or, il est évident que la nature de l'oxydant influence aussi les associations minérales développées en surface. Une déconvolution de ces deux paramètres est nécessaire pour conclure sur l'influence réelle de la face cristallographique de la pyrite sur la production de composés oxydés de surface (Partie III).

Pour améliorer la signification des résultats précédents et la fiabilité des interprétations, il faudrait réaliser au préalable, sur des faces bien déterminées (cristal synthétique ?) et sur de nombreux grains mis en contact avec différents agents oxydants, un quadrillage minutieux tous les 2-3 μ m.

Partie III : Influence de l'agent oxydant sur la nature des produits d'oxydation

Comme il a été montré précédemment (Partie I de ce chapitre), la simple nature chimique des produits d'oxydation ne peut suffire à caractériser un processus d'oxydation, ni à distinguer les oxydations biotiques et abiotiques, que ce soit en milieu aqueux ou à l'air libre. En revanche, l'existence d'intermédiaires réactionnels de type $S_2O_3^{2-}$ ou S_n^{2-} révèle une hétérogénéité réactionnelle du minéral qui peut se comporter, localement, comme un disulfure ou un monosulfure de fer. Le schéma réactionnel dichotomique proposé par Sand *et al.* (1999) expliquant les voies d'oxydation électrochimiques des sulfures par des ions ferriques, n'est pas validé ici, au moins au niveau des processus de surface.

Par ailleurs, l'organisation et la répartition des produits d'oxydation traduit une hétérogénéité de surface du minéral à une échelle sub-micrométrique pouvant être, pour partie, définie par la nature cristallographique de la zone analysée (Partie II de ce chapitre). Ainsi, l'étude de zones homogènes, ne présentant qu'un type de sites réactionnels et donc qu'un type de produit d'oxydation, permet de déterminer la réactivité globale moyenne d'une face ou d'une orientation cristallographique. En revanche, ces zones homogènes apportent-elles des informations suffisantes pour déterminer le comportement moyen des grains de pyrite en présence d'un oxydant ainsi que pour distinguer les oxydations biotiques et des processus abiotiques ? En d'autres termes, un processus d'oxydation se caractérise-t-il par le développement d'un produit unique ou d'un cortège minéralogique ?

La spectroscopie Raman, possédant une résolution d'analyse micrométrique et une bonne sensibilité, permet de décrire aussi bien la nature chimique des produits d'oxydation en surface de pyrite que leurs associations éventuelles. Cette partie III s'attachera donc à décrire pour chaque traitement, à travers les résultats obtenus par spectroscopie Raman, les cortèges minéralogiques développés en surface de pyrites oxydées.

1 Caractérisation semi-quantitative des associations de produits d'oxydation en surface de pyrites.

La contribution du soufre élémentaire étant faible dans les spectres Raman réalisés, seuls les polysulfures, oxydes et sulfates ont été pris en compte pour caractériser, de manière semi-quantitative, la couche d'oxydation. Ainsi, pour chaque spectre Raman réalisé, les intensités des vibrations principales de ces trois composés ont été déterminées. Une approximation de leur abondance relative est ainsi obtenue, en prenant comme référence les vibrations ν_1 de chaque composé (466 cm^{-1} pour les polysulfures, 215, 230 ou 311 cm^{-1} pour les oxydes et de 977 à 1030 cm^{-1} pour les sulfates) et en supposant en première approximation :

- que les vibrations principales de chaque composé sont comparables
- que pour des phases pures, les intensités Raman de ces vibrations principales sont similaires
- que pour des associations de composés, à une échelle sub-micrométrique (inférieure à la résolution Raman), les intensités des vibrations principales de chaque phase sont proportionnelles aux abondances relatives de chacun des composés.

Il est évident que ces hypothèses ne reflètent pas la réalité, en raison notamment de la différence de réflectivité de chaque composé et donc de la variabilité de l'irradiance de la phase observée. L'information spectrale reste donc semi-quantitative, mais peut néanmoins être utilisée pour avoir une estimation des proportions relatives des produits d'oxydation dans les zones analysées. Ainsi, pour chaque spectre Raman et par traitement oxydant, les abondances relatives des produits d'oxydation ont été reportées dans un diagramme triangulaire de pôles purs (100%) polysulfures, oxydes et sulfates. Cette représentation permet de visualiser les associations les plus probables et les proportions relatives des phases oxydées pour des pyrites soumises à différents traitements. Par ailleurs, si cette méthode de représentation engendre nécessairement une erreur sur les réelles abondances relatives des composés, elle permet néanmoins de dégager les comportements majeurs des surfaces de pyrites en réponse à l'action d'un agent oxydant précis.

2 Oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*

La Figure C3. 17 présente les spectres Raman caractéristiques de surfaces de pyrites biooxydées. Les produits d'oxydation sont en majorité composés d'oxydes (hématite, akaganéite) et/ou de sulfates.

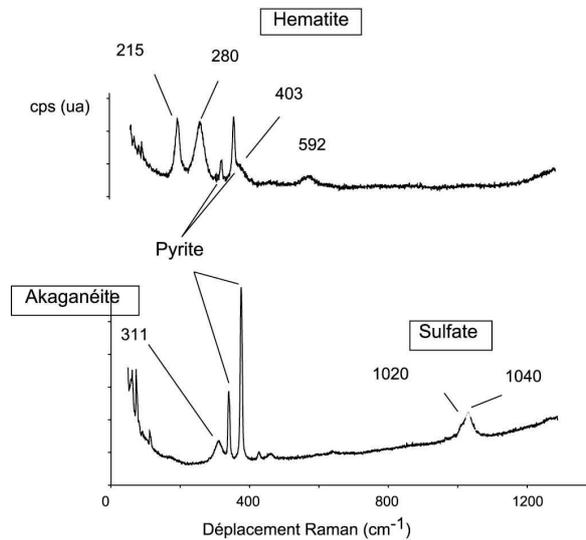


Figure C3.17 : Spectres Raman caractéristiques de surfaces de pyrites K biooxydées.

Le diagramme triangulaire suivant (Figure C3. 18) permet de visualiser les associations fréquemment rencontrées en surface de pyrites biooxydées. La « couche d'oxydation » est principalement composée de bosses micrométriques monophasiques.

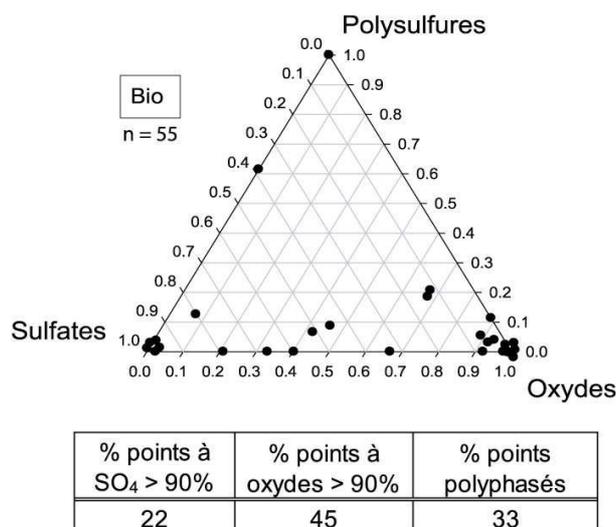


Figure C3.18 : Diagramme triangulaire reflétant la composition chimique de la couche d'oxydation de surfaces de pyrites K biooxydées par *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

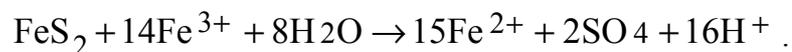
Les zones monophasiques d'oxydes ou de sulfates représentent environ les deux tiers des observations réalisées. Les zones monophasiques de polysulfures ne sont observées que dans 4% des spectres. Le tiers restant est majoritairement composé d'un assemblage bi- ou triphasique dominé par le couple oxydes-sulfates (83% des points intermédiaires contient moins de 20% de polysulfures).

Ainsi, si les produits d'oxydation identifiés sont les mêmes d'un traitement à l'autre (Partie I de ce chapitre), une signature biologique est caractérisée par des zones réactionnelles composées, à échelle micrométrique, de sulfates de type II (Tableau C3. 10) ou d'oxydes de type hématite organisés en bosses monophasiques.

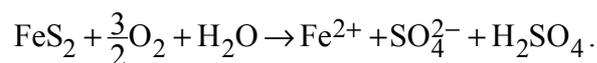
3 Oxydation abiotique aqueuse

On rappelle que, dans ce travail, deux agents d'oxydation abiotique ont été employés pour identifier les types d'oxydation aqueuse de la pyrite :

- **l'ion Fe^{3+}** : l'introduction, en milieu stérile et acide ($pH < 2$), d'une forte quantité de sulfate de fer (III) simule la régénération des ions ferriques en solution par les bactéries et favorise la réaction :



- **le peroxyde d'hydrogène H_2O_2** : cette attaque aqueuse fait intervenir des radicaux libres et un oxygène que l'on peut qualifier de « moléculaire », assurant cette fois l'oxydation de la pyrite par une réaction similaire à la suivante :



Il est ainsi possible d'évaluer, comme pour la bio-oxydation, l'influence de ces agents oxydants sur la composition des couches et zones d'oxydation de la pyrite. La Figure C3. 19 illustre les spectres Raman des composés de surface couramment rencontrés dans les expériences abiotiques en solution.

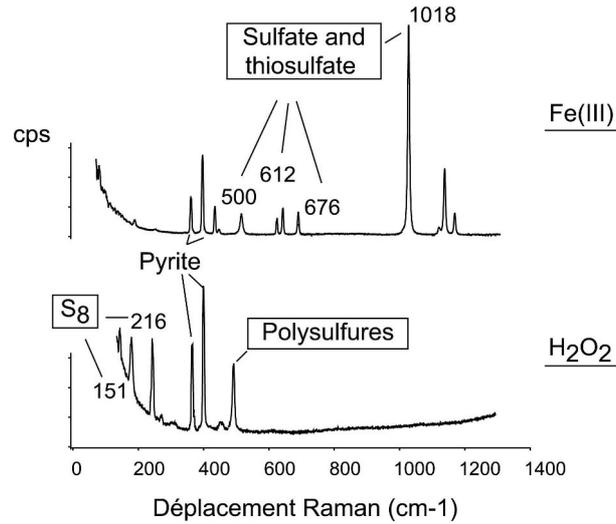


Figure C3. 19 : Spectres Raman caractéristiques des zones réactionnelles prépondérantes sur les surfaces de pyrite K lors d'oxydation abiotique aqueuse par des ions ferriques ou du peroxyde d'hydrogène.

L'oxydation électrochimique de la pyrite par les ions ferriques conduit également à une prédominance de composés oxydes de fer (hématite) et sulfates de type II (Tableau C3. 10), organisés en bosses mono- ou biphasées. Cependant, la présence des polysulfures de surface n'est plus négligeable (Figure C3. 20), et résulte certainement d'un degré d'avancement moindre des réactions électrochimiques. Même si ces résultats sont globalement comparables à ceux obtenus lors des bio-oxydations, les surfaces oxydées de pyrite présentent :

- moins de zones monophasiques.
- plus de composés intermédiaires de type polysulfures et thiosulfates.

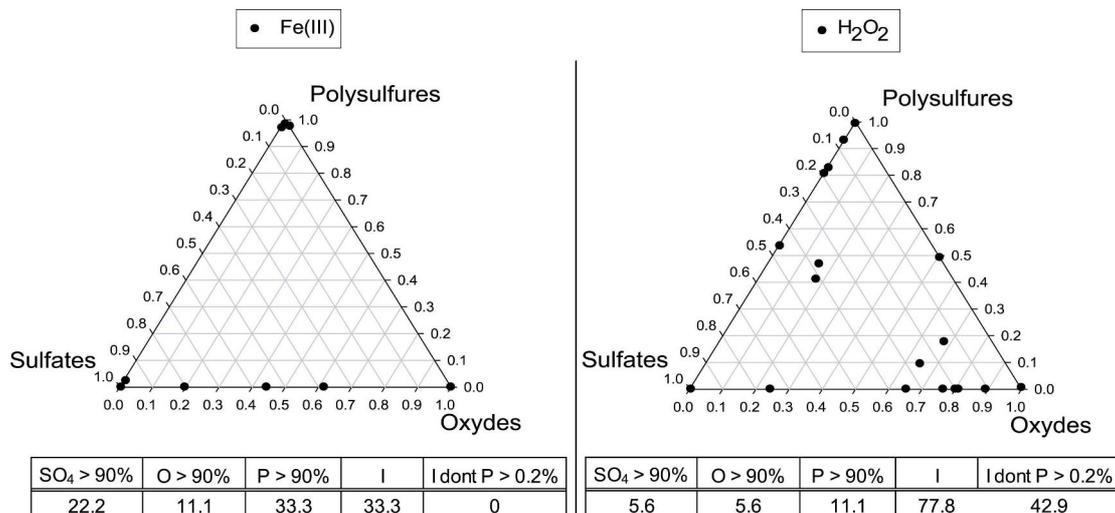


Figure C3. 20 : Diagramme triangulaire reflétant la composition chimique moyenne de la couche d'oxydation de surfaces de pyrites K oxydées abiotiquement en solution acide ($n_{Fe^{III}} = 24$; $n_{H_2O_2} = 26$).

L'oxydation de la pyrite par le peroxyde d'hydrogène donne un profil significativement différent. Les zones réactionnelles monophasiques composées d'oxydes et de sulfates deviennent l'exception. La variabilité de la composition des composés détectés est nettement plus importante et aucune tendance ne se dégage. L'oxydation paraît ainsi moins efficace, et les intermédiaires réactionnels de type polysulfures sont fortement représentés.

Ainsi, l'oxydation abiotique par des ions ferriques se rapproche d'une bio-oxydation, traduisant la régénération de ces ions par les bactéries en solution. La signature chimique est semblable mais moins marquée et les produits d'oxydation monophasiques stables (sulfates et oxydes type hématite) sont ainsi moins présents. En revanche, l'oxydation moléculaire par H_2O_2 est radicalement différente en termes de produits d'oxydation de surface, plus variés et plus soufrés, ainsi qu'en termes d'associations polyphasiques de ces composés.

4 Oxydation à l'air

Les produits d'oxydation de surface sur les grains de pyrite oxydés à l'air (témoins), sont visibles directement par microscopie optique sous la forme de cristaux géométriques et apparaissent en relief. D'autres zones caractéristiques, d'aspect plus sombre, « piquées », présentent les mêmes produits d'oxydation, et pourraient correspondre aux « racines » des cristaux observés. Elles seraient révélées après décrochage de ces derniers (Figure C3. 21).

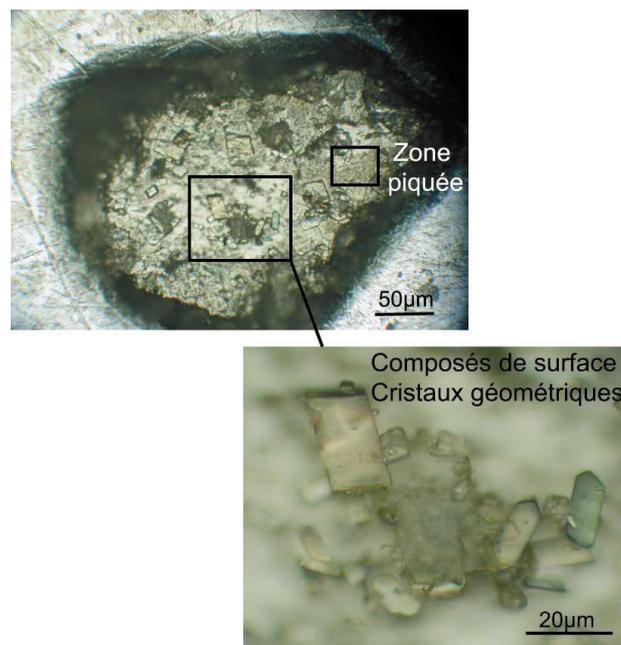


Figure C3. 21 : Photographie en microscopie optique (x100) de la surface d'un grain de pyrite K naturelle oxydée à l'air libre.

Ces « racines » constituent une piste intéressante pour la caractérisation de signatures biologiques ou chimiques. En effet, elles semblent profondément ancrées dans la surface des pyrites, et y laissent de manière pérenne les traces des produits d'oxydation. Ces signatures particulières se retrouvent dans les traitements biotiques ou abiotiques en solution qui présentent des zones piquées similaires, déjà mises en évidence par Toniazzo (1998) ou Demoisson (2006).

La Figure C3. 22 présente une association caractéristique de produits d'oxydation présents en surface d'une pyrite oxydée à l'air libre. Les cristaux sont constitués d'une association de sulfates et d'oxydes de fer (hématite dans le cas présent) et l'intensité de leurs vibrations principales (ν_1) est en général très forte en comparaison des vibrations A_g et E_g du doublet $S-S^{2-}$ de la pyrite. Leur extension verticale est donc très importante en raison de l'absence de phase aqueuse et de décrochage de ces composés de la surface.

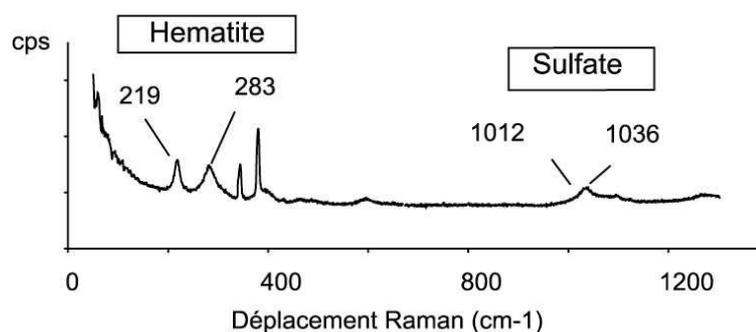
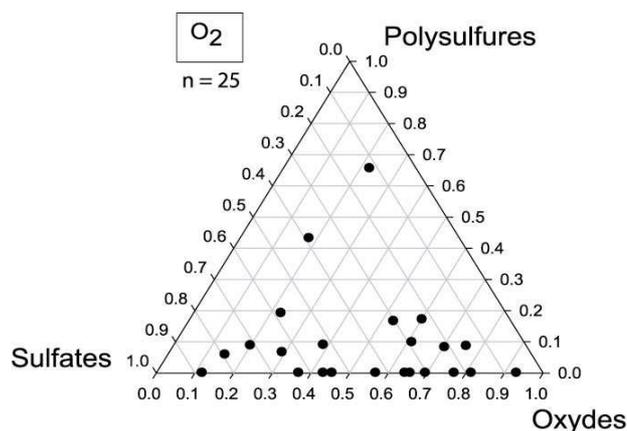


Figure C3. 22 : Spectres Raman caractéristiques de surface de pyrite K oxydée à l'air libre.

Les spectres Raman indiquent que les zones oxydées sont quasi-exclusivement biphasées, formées d'un mélange d'oxydes de fer et de sulfates (Figure C3. 23). Les associations polyphasiques sont rarement riches en polysulfures (91.9% des spectres polyphasiques ont une teneur en polysulfures inférieure à 20%).



SO ₄ > 90%	O > 90%	P > 90%	Polyphasé (dont P>0.2)
0	4.3	0	95.7 (9.1)

Figure C3. 23 : Diagramme triangulaire reflétant la composition chimique de la couche d'oxydation de surfaces de pyrites K oxydées à l'air libre.

Les produits d'oxydation de la pyrite à l'air libre sont donc essentiellement biphasés, et résultent de la formation concomitante de sulfates et d'oxydes de fer sur des sites réactifs de taille inférieure au micromètre. La distinction avec les traitements biologiques quasi-exclusivement monophasiques est ainsi nette.

5 Types de sulfates en fonction du traitement

La spectroscopie Raman a permis de distinguer 4 types de sulfates observés en surface de pyrite après bio- ou chimio-oxydation. La nature des groupes cristallins a semblé peu discriminante vis-à-vis de ceux-ci. En revanche, à l'exception des sulfates de type I, précipités sur la surface, le détail des sulfates développés en fonction du traitement oxydant est plus révélateur de mécanismes réactionnels (Tableau C3. 10). En effet, les sulfates de type II, bien que majoritaires pour tous les traitements, sont réellement caractéristiques des oxydations biotiques et par du fer (III) et sont à relier au processus électrochimique d'oxydation de la pyrite.

Tableau C3. 10 : Répartition des types de sulfates rencontrés en spectroscopie Raman en fonction des traitements appliqués (n représente le nombre de spectres).

Type sulfates	Traitement			
	Bio (n=11)	Fer (n=8)	H ₂ O ₂ (n=15)	O ₂ (n=26)
II	1	1	0.60	0.73
III	0	0	0.33	0.12
IV	0	0	0.07	0.15

En revanche, les sulfates de type III (Tableau C3. 10) semblent caractéristiques de l'attaque par du peroxyde d'hydrogène et représentent un tiers des sulfates rencontrés sur les grains ayant subi cette oxydation. Une des caractéristiques majeures de ce traitement est la rapidité et la « violence » de la réaction d'oxydation soulignée par l'importance des composés intermédiaires (soufre élémentaire et polysulfures) rencontrés sur les surfaces. Dans ce cas précis, le système anode/cathode de la pyrite ne se met pas réellement en place au contraire des autres traitements aqueux. Ce type III de sulfates pourrait ainsi indiquer l'absence de « pile » et de circulation électronique bien développée au sein du réseau cristallin de la pyrite.

Enfin, la forte association oxydes/sulfates des grains oxydés à l'air libre est également visible à travers la nature des sulfates développés. Le type IV est quasi-exclusivement rencontrés sur ces témoins oxydés à l'air libre (Tableau C3. 10). La très forte couverture de surface de ces grains favorise en effet l'adsorption de sulfates sur des oxydes précédemment formés. Les composés « en relief » observables en microscopie optique (Figure C3. 21) témoignent de l'imbrication de ces deux types de produits d'oxydation. Les sulfates de type IV s'observent ainsi sur des surfaces fortement couvertes et passivées avec de nombreux composés qui n'ont pas été éliminés des surfaces minérales ni remis en solution.

Ces sulfates de type IV ne constituent donc pas une bonne piste pour la détermination de bio- ou chimio-signatures, en raison de leur probable forte labilité due (1) à leur extension verticale importante et (2) à une faible contrainte exercée par la surface de pyrite. En revanche, le sulfate de surface de type II (ν_1 à 1020 cm^{-1}), qui semble caractéristique d'un processus d'oxydation électrochimique et fortement représentatif de la bio-oxydation, pourrait constituer une bonne biosignature.

6 Nature des oxydes de fer formés

Les oxydes ont été jusqu'ici considérés dans leur ensemble. Cependant, 4 types d'oxydes de fer ont été distingués dans les spectres Raman réalisés (Partie I de ce chapitre) avec par ordre d'abondance l'hématite, la goethite, l'akaganéite et la lépidocrocite.

Les deux traitements *A.f.* et Fe^{3+} sont très proches et ne présentent que des phases oxydes individualisées. Les grains biooxydés présentent un taux de recouvrement en akaganéite ($\beta\text{-FeOOH}$) supérieur à ceux de pyrites oxydées chimiquement. Ces dernières sont légèrement plus recouvertes par de la goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$) ou de la lépidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) (Figure C3. 24). L'akaganéite n'est pas très stable dans les conditions expérimentales

développées ici, et sa formation majoritaire dans les traitements biologiques pourrait s'expliquer par une stabilisation par des polymères bactériens (Nesterova *et al.*, 2003). L'association hématite/lépidocrocite est plus caractéristique des deux autres oxydants (H_2O_2 et O_2). Toutefois, l'oxydation à l'air libre est la seule à favoriser des zones associant hématite et goethite.

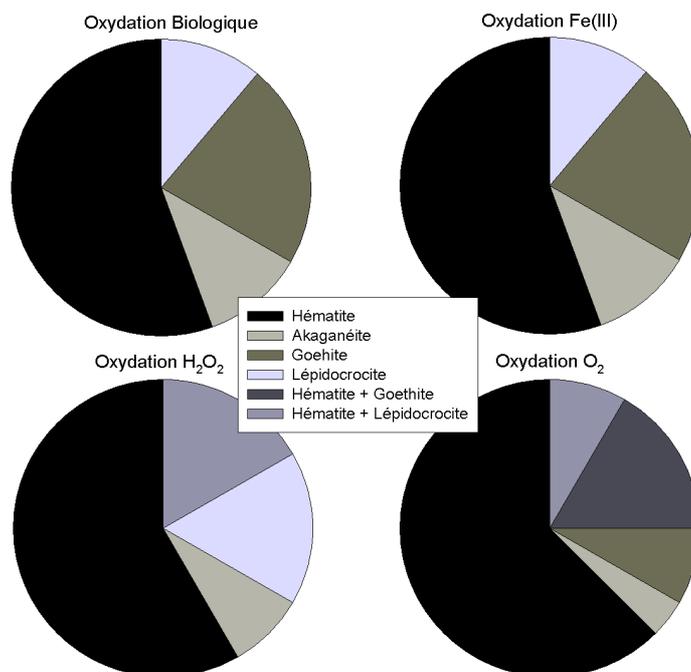


Figure C3. 24 : Nature et association des oxydes rencontrés dans les spectres Raman de pyrite oxydées en fonction des agents oxydant.

Si l'hématite et la goethite constituent les produits finaux de l'oxydation, l'akaganéite, précurseur d'hématite et de goethite, ainsi que la lépidocrocite sont des intermédiaires réactionnels métastables. La présence de goethite ou d'hématite dans les spectres Raman peut indiquer des chemins réactionnels différents mais aboutis, alors celle de lépidocrocite et d'akaganéite indiquerait des oxydations incomplètes. Ainsi :

- les réactions d'oxydations biologiques, par les ions ferriques et à l'air conduisent principalement à la formation d'hématite et de goethite passant aussi bien par de l'akaganéite que de la lépidocrocite. La forte présence d'akaganéite dans les traitements biologiques pourrait être attribuée à la présence de polymères bactériens.
- les réactions d'oxydation par H_2O_2 semblent passer préférentiellement par un intermédiaire lépidocrocite et aboutissent exclusivement, d'après les spectres réalisés, à de l'hématite.

Encore une fois, le traitement par le peroxyde d'hydrogène se démarque d'un processus électrochimique. Plusieurs interprétations sont possibles pour expliquer ces variations :

- Les chemins réactionnels et les sites réactifs de surface sont identiques. En revanche, les cinétiques des réactions diffèrent et ne permettent pas toujours d'aboutir à une oxydation totale.
- Le potentiel électrochimique de l'agent oxydant conditionneraient l'expression de certains sites réactifs. Les traitements biologiques, par des ions ferriques et à l'air libre, pourraient activer des sites d'oxydation produisant de l'hématite et de la goethite alors que le peroxyde d'hydrogène n'activerait que des sites conduisant à la formation d'hématite.
- L'oxydation par H_2O_2 donnerait naissance à certaines associations minérales spécifiques ne favorisant pas la stabilité de goethite.

7 Influence combinée traitement/groupe cristallin

La nature de l'agent oxydant en présence de pyrite joue un rôle évident sur les assemblages de composés d'oxydation. Il a également été montré (partie II de ce chapitre) que la nature des orientations cristallographiques exprimées pouvait être un paramètre majeur déterminant la quantité, la nature et la répartition de ces composés. Cependant, le nombre de spectres réalisés par groupe cristallin et par traitement n'est pas suffisant pour déconvoluer finement les deux paramètres (Figure C3. 25).

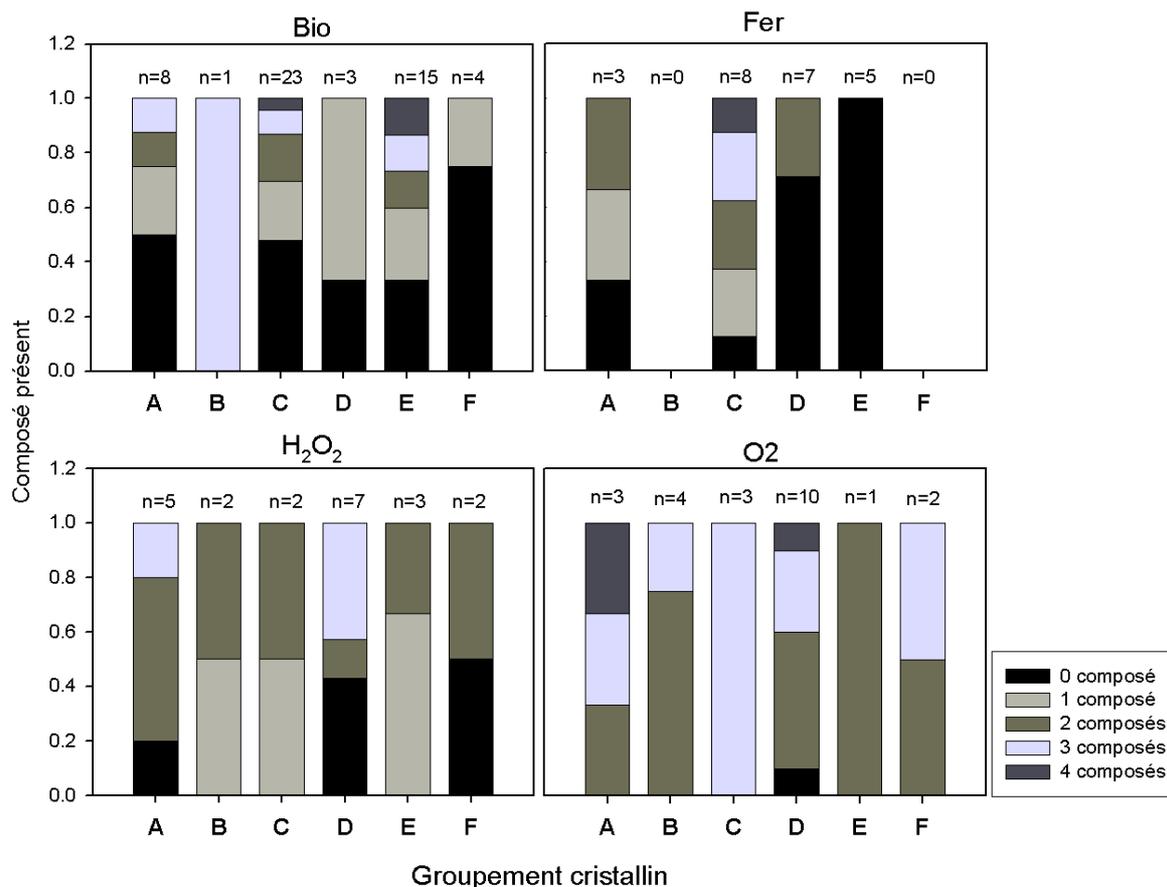


Figure C3. 25 : Récapitulatif des combinaisons de composés observés sur les différents groupes cristallins identifiés en fonction du traitement oxydant.

Les caractéristiques bien marquées de certaines zones minérales se retrouvent quel que soit le traitement oxydant. Par exemple le groupe B présente une composante soufre bien marquée et le groupe A une composante polysulfures (Figure C3. 26). Pour ce groupe (A), l'influence du traitement peut également se percevoir. Les polysulfures s'expriment principalement lors d'une oxydation par du fer(III) plutôt que pour une bio-oxydation, marquant ainsi un degré d'avancement des réactions plus important en présence de bactéries qui régénèrent les ions ferriques en solution. D'autre part, il est évident que les témoins d'oxydation à l'air, de par la présence très marquée des couples oxydes/sulfates masquent totalement l'influence minéralogique.

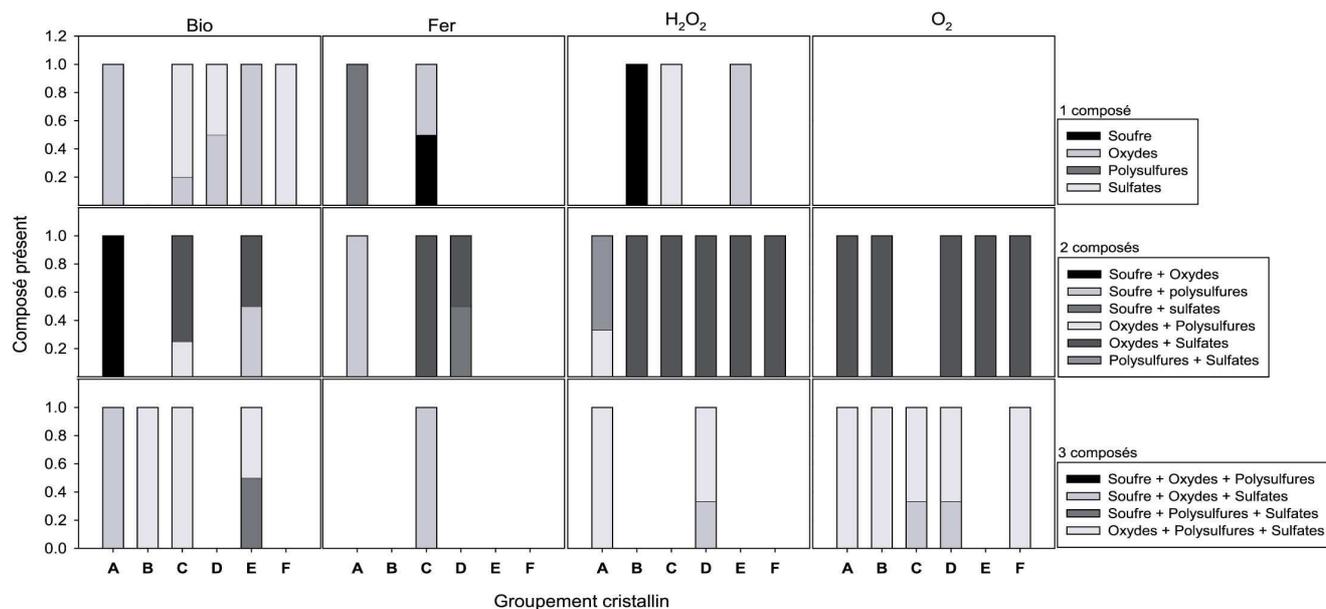


Figure C3.26 : Synthèse sur la répartition des composés de surface sur des grains de pyrite oxydés par voie biotique ou abiotique et comparés aux témoins naturels d'oxydation à l'air libre.

Le nombre trop faible de spectres réalisés ne permet pas de conclure réellement sur l'impact conjugué de la cristallographie et du traitement oxydant appliqué. Quelques comportements atypiques sont tout de même notés (comme pour le groupe A) et permettent de mettre en évidence l'importance de la terminaison des faces analysées et des sites qu'elle exprime. Une analyse systématique et cartographique de diverses faces du minéral soumises aux différents traitements permettraient d'obtenir une meilleure caractérisation des processus. Les grains utilisés ici étant naturels et non polis, il est plus délicat de mener à bien un tel procédé analytique.

Seule l'influence de l'agent oxydant peut être caractérisée correctement à l'aide de la technique utilisée et met en évidence l'intérêt de rechercher les zones réactionnelles homogènes (spectres monophasiques) en surface de pyrite pour :

- déterminer la réactivité globale d'une face ou d'une orientation cristallographique,
- caractériser les processus locaux
- déterminer les abondances relatives de ces spectres monophasiques par rapport à celles des spectres polyphasiques afin d'identifier l'agent oxydant en présence : biologique si fortement monophasique ou abiotique si faiblement monophasique.

Ce dernier point semble d'un intérêt majeur dans la perspective de déterminer des biosignatures. Le système *A.f./pyrite* présente une très forte hétérogénéité de surface chimique, spatiale ou même morphologique et isotopique (Chapitre 4 et 5). Dans ce cas, il est

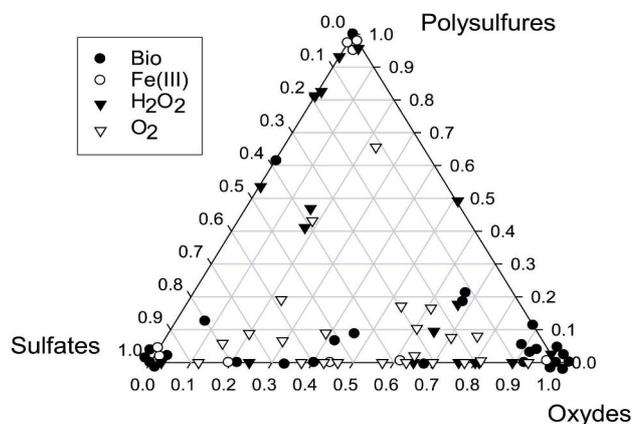
indispensable de s'affranchir de cette hétérogénéité pour remonter aux processus locaux et différencier le biotique de l'abiotique. Les zones monophasiques qui ne représentent que 20% de la totalité des zones analysées (Tableau C3. 11) deviennent l'exception à « traquer » et à interpréter.

Tableau C3. 11 : détail de l'expression des combinaisons de composés, en pourcentage, en fonction des différents traitements.

Face	Spectres				
	0 composé	1 composés	2 composé	3 composés	4 composés
Bio	0.42	0.25	0.13	0.11	0.05
Fe(III)	0.20	0.15	0.19	0.08	0.04
H ₂ O ₂	0.20	0.12	0.42	0.19	0.00
O ₂	0.19	0.00	0.44	0.44	0.08

8 Synthèse : variabilité liée au traitement ?

Il ressort des résultats précédents que la nature chimique même des composés n'est pas réellement discriminante vis-à-vis de l'oxydant en solution. En revanche, la présence ou l'absence d'association de ces composés semble l'être discriminante (Figure C3. 27).



Traitement	Assemblage de composés			
	0 composé	Monophasé	Biphasé	Triphasé
Bio	++	Oxydes (60%) Sulfates (40%)	Oxydes + Sulfates (60%)	Oxydes + Sulfates + Polysulfures (70%)
Fe(III)	++	Oxydes (25%) Sulfates (25%) Polysulfures (25%) Soufre (25%)	Oxydes + Sulfates (60%)	Soufre + oxydes + Sulfates (100%)
H ₂ O ₂	+	Oxydes (33%) Sulfates (33%) Soufre (33%)	Polysulfures + Sulfates (40%) Oxydes + Sulfates (40%)	Oxydes + Sulfates + Polysulfures (80%) Soufre + oxydes + Sulfates (20%)
O ₂	ε	∅	Oxydes + Sulfates (100%)	Oxydes + Sulfates + Polysulfures (80%) Soufre + oxydes + Sulfates (20%)

Figure C3. 27 : Diagramme triangulaire présentant la répartition des composés majoritaires (polysulfures, oxydes de fer et sulfates ferreux et ferriques) identifiés par spectroscopie Raman en fonction des traitements oxydants.

- Les pyrites biooxydées présentent des zones d'oxydation de surface monophasiques à dominante oxydes (hématite) ou sulfates de type II. Les quelques zones polyphasiques sont également constituées d'un mélange presque exclusif de ces deux composés. L'oxydation biologique est donc complète et peut passer indifféremment par des intermédiaires réactionnels thiosulfate ou polysulfures qui peuvent être observés sur un même grain à quelques micromètres de distance. Ce résultat est en contradiction avec les modèles évoqués dans la littérature (Sand *et al.*, 1999) privilégiant la voie thiosulfate pour les disulfures de fer comme la pyrite. Les mesures semblent au contraire indiquer que les deux voies cohabitent sur un même grain et que certains sites de surface présentent une réactivité de disulfures et d'autres de monosulfures.
- Les traces chimiques de l'oxydation abiotique par les ions ferriques sont assez proches de celles observées pour les oxydations biologiques, avec une présence majoritaire de sulfates de type II et/ou d'oxydes que ce soit dans les zones réactionnelles monophasiques ou polyphasiques. La bio-oxydation est sans doute gouvernée, au moins pour partie, par un processus électrochimique entretenu par la régénération des ions ferriques en solution par les bactéries.
- La répartition des produits sur les surfaces de pyrites oxydées par H₂O₂ est relativement homogène mais avec une occurrence plus marquée de polysulfures, traduisant une oxydation incomplète du disulfure. En effet, la concentration de l'agent oxydant induit une réaction violente et rapide mais incomplète.
- L'oxydation à l'air conduit également à la formation de produits d'oxydation mixtes, constitués d'un mélange assez homogène et équilibré de sulfates et d'oxydes. Les zones oxydées sont en général très étendues et visibles en microscopie optique. L'absence de milieu aqueux favorise la formation d'amalgames oxydes/sulfates de type IV, *a priori* peu susceptibles d'être conservés à long terme sur les surfaces de pyrite.

PARTIE III : PRINCIPAUX RESULTATS

- La nature chimique des produits d'oxydation ne semble pas être significativement influencée ni dépendante du traitement et de l'agent oxydant mis en jeu.
- Si les zones homogènes développant des produits d'oxydation monophasiques traduisent la réactivité globale d'une face vis-à-vis de l'oxydation, ce sont les **associations** de ces composés d'oxydation qui sont discriminantes vis à vis du traitement oxydant.
- La bio-oxydation et l'oxydation par les ions ferriques sont similaires, indiquant une forte influence du processus électrochimique dans la bio-oxydation, les bactéries en suspension réoxydant les ions ferreux en ions ferriques.
- La **bio-oxydation** de la pyrite par *A.f.* est caractérisée par une prédominance de bosses **monophasiques de sulfates de type II** ou d'**hématite**. L'akaganéite stabilisée par des polymères bactériens peut également être un indice d'oxydation biotique.
- La **sulfates de type II** pourraient constituer une biosignature contrairement aux sulfates de type III (caractéristiques de l'oxydation par H_2O_2) et des types IV (labiles et caractéristiques d'oxydation en milieu non aqueux).

Partie IV : Synthèse sur les mécanismes d'oxydation de surface

Les résultats obtenus par spectroscopies de surface, Infra-Rouge, XPS mais surtout Raman, mettent en évidence la très forte hétérogénéité, chimique et spatiale, des surfaces de pyrites oxydées. De nombreux paramètres, le plus souvent interdépendants, sont à l'origine de cette distribution non aléatoire des différents produits d'oxydation. Il semble que la réactivité générale moyenne d'une face, ou orientation cristallographique dans le cas de grains naturels à cassure conchoïdale, puisse être déduite de l'étude de zones monophasiques de surface, rendant compte des processus locaux à l'échelle (sub-micrométrique) du site actif. En revanche, l'identification de l'agent oxydant majeur (biotique ou abiotique) passe par la détermination et l'évaluation des proportions des différents cortèges minéralogiques (spectres monophasiques et polyphasiques) des produits d'oxydation formés sur l'ensemble des orientations cristallographiques d'un grain naturel de pyrite.

1 *Transfert d'électrons au sein du minéral*

Les données présentées dans ce chapitre permettent d'établir un premier schéma résumant les processus d'oxydation de surface de la pyrite. Pour cela, il est important de rappeler que la pyrite est un minéral semi-conducteur. Son oxydation se fait grâce à un transfert d'électrons des anodes vers des cathodes du minéral où un oxydant en solution les récupère et passe à l'état réduit : $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ou encore $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$.

L'oxydation du soufre de la pyrite passe par une déstabilisation du doublet S-S^{2-} et la formation de polysulfures et autres composés intermédiaires de type S-S-OH ou S-S-O et S-S-O_3 (Rimstidt and Vaughan, 2003). Le champ de force des premiers nanomètres de l'échantillon est alors modifié (Demoisson, 2006), ce qui se traduit dans les signatures Raman par un glissement des fréquences Ag et Eg respectivement de 6 et 3 cm^{-1} vers les bas nombres d'onde. Cette observation a été faite, dans les premiers stades de l'oxydation, en présence de chrome (VI) (Demoisson, 2006) et d'uranyle (Aubriet, 2005). En revanche, dans le cas d'une simple dissolution de la pyrite, en absence d'oxydant (sous barbotage d'argon par exemple), ce glissement n'est pas significatif. La présence en solution d'un élément oxydant semble donc effectivement « attirer » les électrons du minéral déstabilisant le doublet S-S^{2-} de la

pyrite, dont les modes de vibration en spectroscopie Raman sont alors perturbés. Le glissement Ag/Eg observé pourrait être représentatif de zones anodiques du minéral en cours d'oxydation.

Par ailleurs, un minéral de pyrite bien cristallisé est donné à 380 et 344 cm^{-1} respectivement pour Ag et Eg. Or les analyses de surface d'une pyrite K naturelle indiquent que ces vibrations sont à 379 et 343 cm^{-1} témoignant de l'état globalement déstabilisé des premières couches du minéral. Compte-tenu de la résolution analytique, les points de 378 à 381 cm^{-1} ainsi que ceux compris entre 342 et 345 cm^{-1} ne sont pas considérés comme significativement déplacés par rapport à un état de surface naturel de pyrite K.

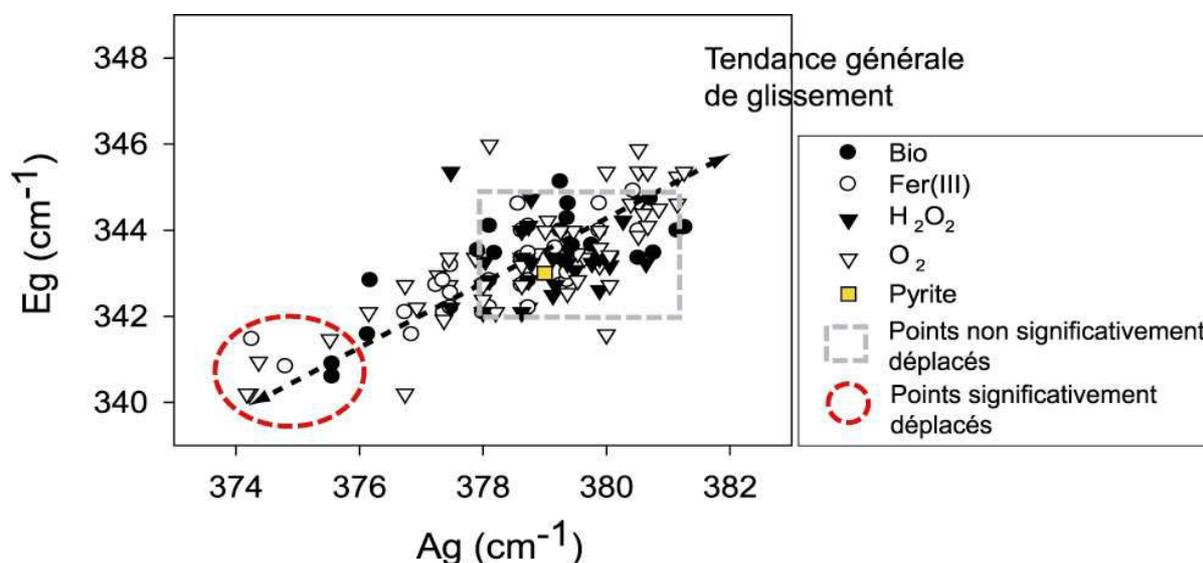


Figure C3. 28 : Glissement des modes de vibration Ag et Eg observés sur des spectres Raman réalisés sur des surfaces de pyrites K oxydés par voies biotique ou abiotique.

Dans le cadre de nos expériences, les grains minéraux ont été analysés après 60 jours d'expérience. Ils marquent une oxydation plus aboutie et les intermédiaires réactionnels sont *a priori* moins fréquents. La grande majorité des points analysés présentent effectivement des positions des modes de vibration Ag et Eg très proches de l'état initial de la pyrite K utilisée (Figure C3. 28). Quelques points se distinguent tout de même par un déplacement relativement conséquent de ces deux vibrateurs, même si de moindre ampleur que dans les expériences de Demoisson (2006). Ces zones seraient ainsi potentiellement des anodes du minéral en cours d'oxydation et pour lesquelles le doublet S-S²⁻ de la pyrite est déstabilisé. Pour chacun de ces points « précoces », un signal d'oxyde, et plus précisément d'hématite, est enregistré. D'autres composés ont été identifiés comme de petits massifs de sulfates ou encore des polysulfures mais le signal principal de ces zones est l'hématite. La plupart de ces

observations sont établies sur des zones « orangées/marron » des grains analysés qui indiquent des phases de surface ou des zones « piquées » de la pyrite. Cette distinction avait également été faite par Demoisson (2006). Il ressort également que le traitement par le peroxyde d'hydrogène, considéré comme le pôle d'oxydation moléculaire, ne présente pas de shift particulier du couple Ag-Eg. La réaction est en effet trop violente pour laisser une circulation électronique s'installer au sein du minéral dont ce déplacement semble caractéristique.

Trop peu de points présentant ces caractéristiques sont observés pour déterminer précisément la nature du groupe cristallin qui les porte. Une majorité de C semble se dégager, mais ce groupe étant le plus exprimé de manière générale, aucune précision ne peut être apportée sur ce point.

La présence d'un oxydant en solution, qui a pour rôle d'extraire les électrons de la pyrite, favorise donc la déstabilisation du doublet S-S²⁻ de la pyrite. Ceci est observé en présence :

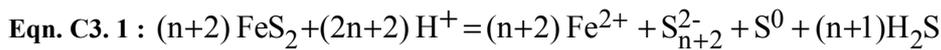
- d'un excès de fer (III) en solution, oxydant en solution qui favorise le transfert des électrons dans le réseau cristallin de la pyrite,
- sur les témoins oxydés à l'air libre. Dans ce cas, les surfaces sont couvertes par de nombreux produits d'oxydation pouvant avoir de fortes extensions latérales et verticales. Les premières couches de la surface des grains de pyrite peuvent donc être considérées comme fortement déstabilisées,
- et en présence de bactéries. Ces dernières jouent ainsi un rôle dans le transfert d'électrons au sein de la pyrite. Deux hypothèses peuvent être avancées :
 - elles régénèrent les ions ferriques en solution, et ce transfert électronique est entretenu par le couple Fe³⁺/ Fe²⁺. C'est le mécanisme de bio-oxydation classiquement décrit comme « indirect » (Crundwell, 2003).
 - elles récupèrent directement « à la source » les électrons ayant été transférés aux cathodes minérales. Dans ce cas, seules les bactéries adhérentes au minéral (mécanisme direct) sont impliquées.

Cette dernière hypothèse sera discutée plus largement au cours du Chapitre 4 à travers une approche d'observation *in vivo* du processus de bio-oxydation de la pyrite et une co-localisation des bactéries et de la microtopographie de la surface minérale.

2 Formation des composés

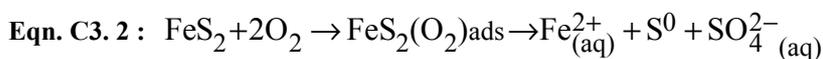
2.1 Dissolution de la pyrite : formation soufre

Même si la réaction est très lente, la dissolution de la pyrite, sans intervention d'agent oxydant, est effective en solution et peut conduire à la formation de composés de surface tels que du soufre et des polysulfures (Lowson, 1982):

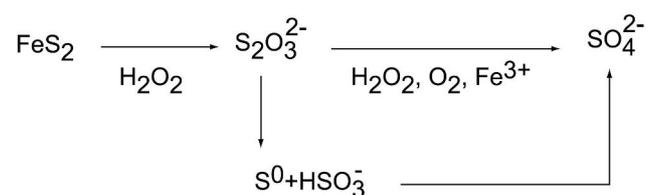


Cette réaction est en général minoritaire, compte tenu de la constante de solubilité K_s donnée à $10^{-10,4}$. Cependant, elle peut être considérée comme indépendante de l'agent oxydant en solution et donc intervenant pour tout traitement aqueux. Une part des composés observés lors d'expériences d'oxydation de la pyrite en solution peuvent ainsi avoir pour origine la dissolution de la pyrite. Ce composé, bien que minoritaire dans nos observations, est présent pour tous les traitements et pourrait provenir pour partie de la dissolution de la pyrite.

Le soufre élémentaire est également décrit, en présence d'un oxydant en solution, comme un produit des stades précoces d'oxydation. McKay & Halpern (1958) reportent ainsi la formation de soufre après adsorption d'une molécule d'oxygène en surface de la pyrite :



Il peut également provenir du processus de transformation des intermédiaires thiosulfates en phase stable (sulfates) (Mishra et al.) :



Cette séquence de réactions peut ainsi traduire la présence relativement marquée de soufre élémentaire dans le traitement par le peroxyde d'hydrogène, pour lequel l'oxydation est rapide et violente, et de ce fait incomplète.

2.2 Processus électrochimique

Sulfates de solution

Les équations globales (C1. 16 et C1. 18) présentées au Chapitre 1 font état du produit final « sulfates » à travers deux réactions :

- $\text{FeS}_2 + 3.5 \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \text{--->} \text{Fe}^{2+} + 2 \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+$ ($K_{\text{bio}} = 8.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
($K_{\text{abio}} \sim 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
- $\text{FeS}_2 + 14 \text{Fe}^{3+} + 8 \text{H}_2\text{O} \text{--->} 15 \text{Fe}^{2+} + 2 \text{SO}_4^{2-} + 16 \text{H}^+$ ($K_{\text{bio}} = K_{\text{abio}} \sim 2.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Cette dernière réaction, faisant intervenir des ions ferriques, a donné lieu au développement de nombreux modèles depuis celui de Moses et al., (1987), traduisant l'oxydation d'au moins un soufre du doublet S-S²⁻ de la pyrite. Ces modèles s'appuient sur le fait qu'il est, en général, plus facile de rompre les liaisons Fe-S que le doublet disulfure (Eggleston *et al.*, 1996; Guevremont *et al.*, 1998b; Herbert, 1999; Moses and Herman, 1991; Moses *et al.*, 1987). Ils font intervenir un complexe hydraté activé en surface de la pyrite, conduisant à l'extraction d'un S-SO₃²⁻ dont les oxygènes proviennent des molécules d'eau d'hydratation du complexe :

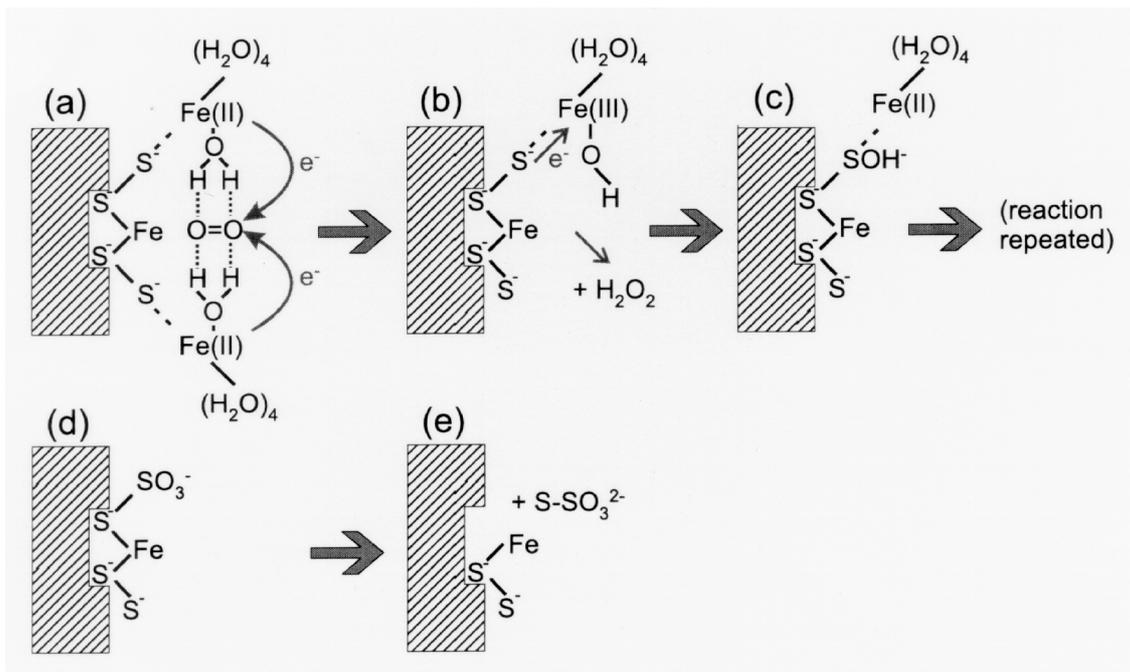
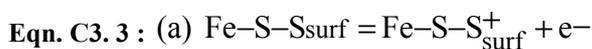
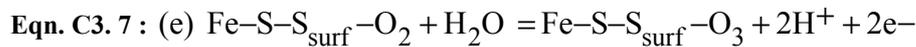
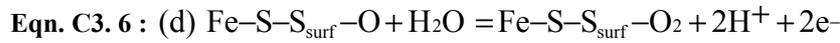
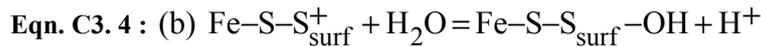


Figure C3. 29 : Représentation schématique des processus d'oxydation en surface de pyrite (Herbert, 1999 d'après Moses et al., 1987 et Moses & Herman, 1991).

Rimstidt & Vaughan (2003) complètent le modèle précédent en proposant une succession de stades intermédiaires lors de l'interaction de 4 molécules d'eau avec les atomes de soufre de la pyrite :





La dernière étape est fortement dépendante du pH. Ainsi, pour des pH relativement basiques (>4), le groupe terminal S-SO₃ s'ionise complètement, rendant la liaison S-S plus robuste que la liaison Fe-S. Dans ce cas, une molécule de thiosulfate (S₂O₃²⁻) est libérée en solution.

Au contraire, à pH acide, le groupe S-SO₃ aura tendance à retenir un proton, ce qui provoque le transfert d'un électron vers le doublet S-S²⁻. Dans ce cas, la liaison Fe-S devient moins fragile que la liaison S-S. Une quatrième attaque nucléophile (après (b), (d) et (e)), par adsorption de molécule d'eau, intervient alors :



Ces modèles font état d'une dissolution incongruente de la pyrite avec un excès de soufre libéré par rapport à la stœchiométrie initiale de la pyrite. Ces processus, qui peuvent être fortement actifs à l'anode, expliqueraient ainsi à la fois la formation de pores dans le minéral et la forte présence en solution de sulfates issus de l'oxydation. D'autre part, le déplacement des vibreurs Ag et Eg de la pyrite, observé sur plusieurs zones de surface de pyrites oxydées, s'appuie sur la rupture d'une liaison S-S et concorderait avec l'équation (f) du modèle de Rimstidt et Vaughan (2003) qui traduit l'oxydation du soufre de la pyrite en milieu acide.

Sulfates de surface

Les spectres Raman présentés précédemment ont montré la présence en surface de pyrite de 4 grands types de sulfates de symétrie et d'hydratation variable, traduisant des processus locaux différents de ceux décrits pour la formation de sulfates en solution. Est-il possible de décrire la formation de ces sulfates en surface de pyrite ?

Les sulfates de **type I** correspondent à la précipitation de sulfates de solution sur la surface de pyrite. Leur formation ne pose donc pas de problème particulier.

Les sulfates de **type II** peuvent être formés par un mécanisme se rapprochant de celui donné par Rimstidt & Vaughan (Figure C3. 30). Dans ce cas, il ferait intervenir un cation appartenant à la surface de pyrite (Fe^{2+} ou Cu^{2+}) ou provenant de la solution (Fe^{3+} , Cu^{2+}) qui stabiliserait le sulfate nouvellement formé en surface du minéral :

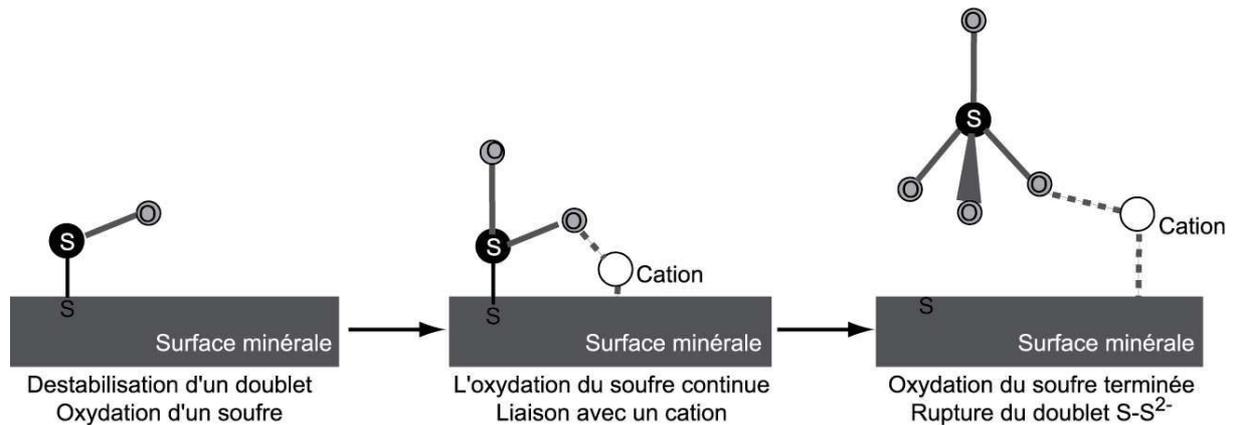
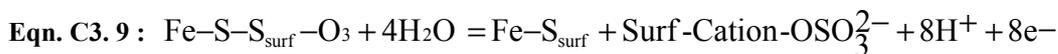


Figure C3. 30 : Formation supposée d'un sulfate de type II en surface de pyrite.

L'équation suivante (modifiée d'après Rimstidt & Vaughan, 2003) pourrait ainsi traduire la formation de ces sulfates de type II :



Les sulfates de **type III** sont, quant à eux, doublement contraints au niveau de la surface minérale. La symétrie de leur signature Raman (ν_1 et ν_3 de même intensité) indique en effet que deux atomes d'oxygène sont liés à un cation dur appartenant à la pyrite (Fe^{2+} ou Cu^{2+}). Un processus similaire, mais plus complexe, à celui évoqué pour les sulfates de type II pourrait être avancé expliquant la liaison en surface de deux atomes d'oxygène du sulfate.

Les sulfates de **type IV** sont à rapprocher des modèles de Ostergren et al., (2000) qui décrivent l'adsorption de plomb associé à des sulfates en surface de goethite (Figure C3. 31), ou de Hug (1997) dans lequel des sulfates monodentates peuvent s'adsorber directement en surface d'hématite .

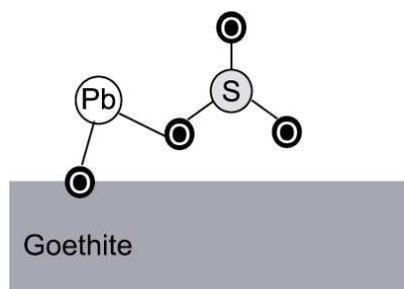


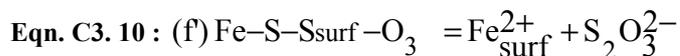
Figure C3. 31 : Liaison d'une molécule de sulfates en surface de goethite par l'intermédiaire de Pb adsorbé (d'après Ostergren *et al.*, 2000).

Les amas observés étant quasiment millimétriques, de nombreux sulfates pourraient ainsi être chacun liés par un atome d'oxygène aux surfaces d'oxydes de fer (principalement de l'hématite dans notre cas). L'encombrement stérique serait de ce fait très important, expliquant la perte de symétrie et les dégénérescences des vibreurs de la liaison S-O observées en spectroscopie Raman.

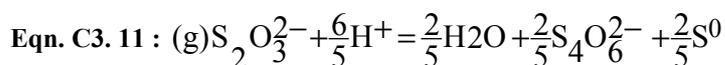
Les sulfates identifiés dans ces amas pourraient aussi bien être des sulfates auqueux précipités et stabilisés au niveau des oxydes que des sulfates formés directement au voisinage des oxydes et qui ne seraient jamais passés en solution.

Thiosulfates

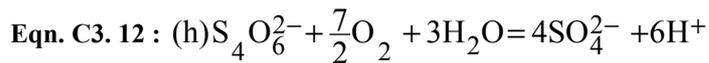
La suite de réactions intermédiaires évoquées précédemment (Rimstidt and Vaughan, 2003) peut également conduire à la formation de thiosulfates. Les équations (a) à (e) (Eqn. C3. 3 à Eqn. C3. 8) restent identiques. Seule une réaction (f') prend le relais pour donner cette molécule de thiosulfate.



Cependant, cette équation est décrite pour l'oxydation de la pyrite en conditions relativement basiques et traduisent la rupture de liaisons Fe-S plutôt que de liaisons S-S. Ces molécules ont d'ailleurs été observées par Demoisson (2006) lors de l'oxydation de la pyrite par du chrome (VI) en conditions basiques. En effet, les thiosulfates sont très instables en conditions acides et se dismutent rapidement en soufre élémentaire et tétrathionates :



Les tétrathionates peuvent ensuite être oxydés en sulfates :



Lors des expériences d'oxydation biotiques ou abiotiques de cette étude, ces thiosulfates ont été identifiés à plusieurs reprises, malgré le caractère très acide des solutions de lixiviation. Ils pourraient ainsi indiquer des zones :

- d'oxydation incomplète où le processus n'a pas été mené à terme.
- de pH local supérieur à la valeur globale de solution (1-2).
- étroitement liées au réseau cristallin de la pyrite dans une configuration similaire à celle des sulfates de type II ou III, ce qui permettrait une stabilisation des molécules dans un environnement peu propice à leur développement.

Polysulfures

Alors que les polysulfures traduisent en général l'oxydation du soufre de monosulfures (type chalcopyrite ou galène), leur présence en surface de pyrites oxydées est indéniable dans nos expériences. Outre leur caractère d'intermédiaires réactionnels reflétant une oxydation non encore aboutie de la pyrite, ces composés traduiraient :

- une organisation non homogène du réseau cristallin de la pyrite et l'expression en surface de sites de type monosulfures.
- une oxydation incomplète du soufre de la pyrite et la rupture des doublets S-S²⁻ plutôt que de liaisons Fe-S.

En résumé, les sulfates formés lors de l'oxydation de la pyrite, proviendraient de la rupture de liaisons :

- S-S avec intermédiaires réactionnels polysulfures
- Fe-S avec intermédiaires réactionnels thiosulfates dans des conditions locales potentiellement plus basiques.

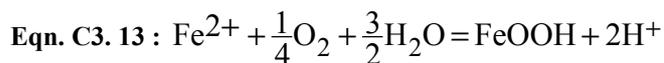
Les sulfates de surface (de type II, III et peut-être IV) identifiés par spectroscopie Raman seraient quant à eux directement formés en surface de la pyrite et stabilisés par l'intermédiaire de liaisons avec des cations du minéral ou associés à la pyrite. Dans tous les cas, les mécanismes présentés ici font intervenir une circulation d'électrons et des réactions redox. La présence d'un oxydant en solution est nécessaire mais ne se limite pas nécessairement aux ions ferriques. Ainsi, l'oxygène dissous ou les bactéries adhérentes peuvent également jouer le rôle d'oxydant récupérant les électrons au niveau des cathodes de surface de la pyrite, favorisant ainsi l'oxydation des doublets S-S²⁻.

2.3 Oxydes de fer

2.3.1 Formation des oxydes de fer en solution acide

De manière générale, les divers oxydes rencontrés se forment par (1) précipitation directe à partir de la solution ou (2) réarrangements internes à l'état solide (Figure C3. 32) :

- la **goethite** et l'**akaganéite** se forment par précipitation de formes solubles du Fe(III) fournies par la dissolution d'un précurseur, l'hydrolyse de sels ferriques ou l'oxydation/hydrolyse de solutions de sulfate ferreux :



- la **lépidocrocite** se forme par l'oxydation de solutions de Fe(II) avec présence d'un intermédiaire rouille verte ou dans quelques rares cas, par précipitation d'espèces de Fe(III) à faible poids moléculaire.
- l'**hématite** se forme par déshydratation et réorganisation de ferrihydrite. Une précipitation directe ou une décomposition thermique d'oxy-hydroxydes de fer, comme la goethite ou l'akaganéite sont également possible.

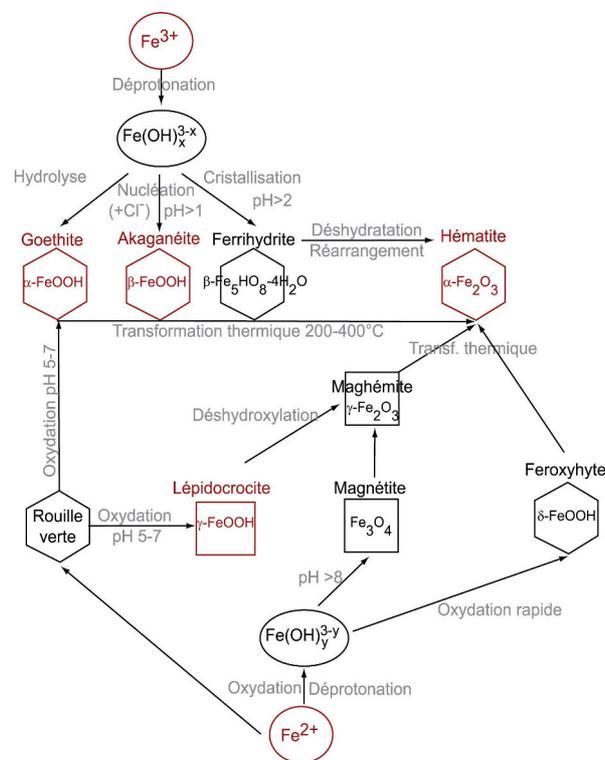


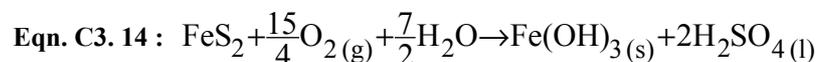
Figure C3. 32 : Représentation schématique de la formation et transformations possibles des principaux oxydes de fer (modifié d'après Cornell et Swchertmann, 1996). Les espèces présentes dans les spectres Raman sont marquées en rouge.

Les conditions de température ambiante et de pH acide excluent la présence de certaines phases comme des rouilles vertes. La formation d'akaganéite, de goethite et de lépidocrocite peut s'expliquer par les raisons évoquées ci-dessus.

L'akaganéite qui est en général considérée comme contenant du chlore dans son réseau cristallin, pourrait être dans notre cas (où le milieu est exempt de chlore) stabilisée par la présence de polymères organiques (d'origine bactérienne ou résiduel dans les traitements abiotiques).

En revanche, les températures sont en théorie trop faibles pour supposer une transformation de la goethite ou de l'akaganéite en hématite. D'autres phases instables, comme la lépidocrocite (identifiée sur quelques spectres Raman) ou les ferrihydrite ou feroxyhyte (non identifiées en Raman) pourraient faciliter la présence d'hématite. En effet, parmi les 4 oxydes de fer identifiés dans nos expériences par spectroscopie Raman, 2 sont considérés comme stables (goethite et hématite) et 2 comme instables (akaganéite et lépidocrocite). Les transformations principales entre ces phases sont en général reportées pour des températures ou contraintes mécaniques importantes (transformation thermique, broyage intense, conditions hydrothermales...). Quelques points sont cependant extrapolables aux conditions expérimentales développées ici :

- à basse température et dans un milieu riche en sulfate ferreux, la lépidocrocite est un précurseur de goethite par dissolution/reprécipitation. Les ions ferreux favorisent en effet la dissolution de lépidocrocite, tout comme l'ajout de fer métallique dans le milieu. Ces conditions sont réunies dans nos expériences, même si cette réaction est plus favorable pour des pH basiques et des températures supérieures à 80°C. Blight (2000) reporte ainsi la formation de lépidocrocite à partir de pyrite en milieu acide dans des micro-environnements définis par des biofilms:



- à basse température, l'hématite peut se former par deshydroxylation. L'akaganéite, qui est connue pour être stable en conditions acides pour des températures supérieures à 70°C, se déstabilise rapidement en présence d'hématite ou de goethite. Elle se transforme alors, via un processus de dissolution/reprécipitation, en l'un de ces deux produits. Une faible fraction d'hématite peut se former simultanément à de l'akaganéite, accélérant ainsi la déstabilisation de cette dernière. Même si les spectres Raman réalisés ici ne montrent jamais une association directe akaganéite/hématite à

une échelle inférieure au micron, la transformation de l'akaganéite en hématite pourrait tout de même avoir lieu.

- en conditions plus basiques et pour des températures supérieures (70°C), l'akaganéite peut se transformer en goethite et/ou en hématite suivant un mécanisme de dissolution/reprécipitation. L'hématite n'est pas considérée comme dépendante du pH au contraire de la goethite. La présence de cette-dernière dans les spectres Raman pourrait ainsi être signe de conditions locales relativement basiques.

2.3.2 Production bactérienne d'oxydes de fer

Les traitements (biotiques ou abiotiques) présentent une proportion non négligeable d'oxydes de fer en surface, stables et bien cristallisés. Cette présence d'oxydes de fer à pH 1, généralement occultée par la prédominance de sulfates dissous et leur non-stabilité supposée dans de telles conditions d'acidité, a été cependant reportée depuis quelques années (Descostes *et al.*, 2004; Giannetti *et al.*, 2001; Kappler and Newman, 2004). Certains auteurs, comme Blight (2000) (détail Chapitre 1), s'attachent à expliquer la formation de ces composés, notamment lors d'oxydation par *A.f.*, par le développement de biofilms en surface du minéral. Les paramètres physico-chimiques au sein de ces biofilms sont considérés comme radicalement différents des conditions globales du milieu réactionnel, et les pH locaux peuvent être supérieurs favorisant la formation d'oxydes de fer.

Afin de déterminer des conditions de pH plus basiques en surface des pyrites, des observations ont été réalisées en Microscopie Confocale à Balayage Laser en présence en solution d'Oregon Green (OG). Ce fluorochrome présente une très faible la fluorescence à pH acide et alors que celle-ci est plus marquée à pH neutre lors d'une excitation par un laser à 514 nm (Figure C3. 33).

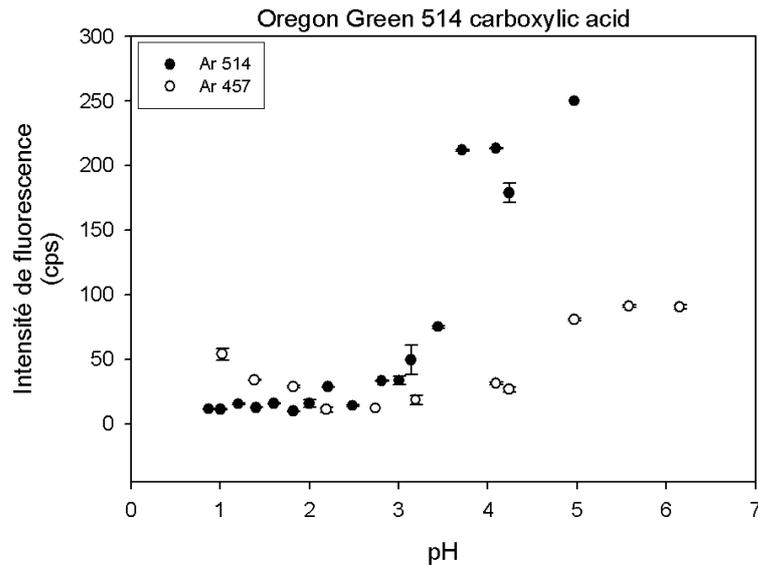


Figure C3.33 : Fluorescence en CLSM d'une solution contenant $8\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'Oregon Green 514 carboxylic acid à deux longueurs d'onde du laser d'excitation (Ar 514nm et Ar 457nm).

Certaines images réalisées avec l'OG, pour une longueur d'onde d'excitation à 514nm, indiquent des zones de surface des échantillons de pyrite où le marquage est net (Figure C3.34), signe de conditions de pH moins acides que celles de la solution environnante.

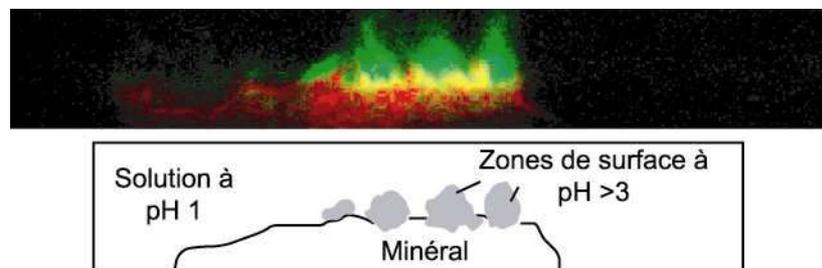


Figure C3.34 : Coupe en Z d'une image réalisée par CLSM. La surface du minéral est marquée par la réflexion du laser et apparaît en rouge sur cette figure. Les marquages verts sont issus de l'Oregon Green molécule sensible au pH et répartie de manière homogène dans la solution. La fluorescence (zones vertes) indiquerait un pH plus élevé que celui en solution (1,8) dans laquelle aucune fluorescence apparaît.

Cette observations confirmerait la présence de conditions locales en surface à pH plus basique qui pourraient être liées à des biofilms (Blight *et al.*, 2000), induisant une précipitation d'oxy-hydroxydes de fer à proximité des cellules bactériennes. La formation d'oxydes ferriques est par ailleurs présentée comme un avantage pour les microorganismes, pour qui les ions ferriques sont considérés comme des inhibiteurs de croissance (Pesic and Kim, 1993; Toro *et al.*, 1988).

Cependant, plusieurs points de cette étude indiquent que toute la lumière n'a pas été faite sur les mécanismes à l'origine de la formation de ces composés lors de la bio-oxydation de la pyrite :

- les observations de la Figure C3. 34 sont plus une exception qu'une généralité et l'Oregon Green ne met pas en évidence la présence systématique de conditions de pH local très différentes de celles de la solution globale.
- *Acidithiobacillus ferrooxidans* ne produit pas systématiquement de biofilms en surface des grains. Les observations réalisées par Microscopie Confocale à Balayage Laser (détaillées au chapitre 4) montrent en effet des bactéries identifiables et isolables en surface de grains, ainsi qu'une très rare fluorescence à l'acridine orange, fluorochrome permettant de marquer des polymères et biofilms bactériens.
- les traitements abiotiques présentent également de fortes quantités d'oxydes de fer de surface non imputables à des modifications des conditions physico-chimiques locales dues à des biofilms.

Par ailleurs, Jambor et al., (1999) précise que, quand les surfaces spécifiques des pyrites sont faibles (cristaux > 200 μ m), l'oxydation de la pyrite par les ions ferriques est ralentie et que des composés riches en fer (III) peuvent se former. Dans notre cas, la granulométrie des pyrites choisies (100-250 μ m), contrainte par la nécessité de disposer de surfaces suffisamment planes et développées pour les analyses isotopiques, est plus élevée que lors d'études précédentes (Mustin, 1992; Toniazzo, 1998) dans lesquelles moins d'oxydes de fer étaient observés. Ainsi, la forte présence d'oxydes en surface de pyrites oxydées, révélées par spectroscopie Raman, pourrait être liée à la fois :

- à la présence de bactéries induisant des conditions locales en surface différentes de celles de la solution environnante. Néanmoins, cette explication ne peut être généralisée à tous les grains biooxydés (raisons évoquées précédemment) ni aux pyrites oxydées abiotiquement.
- à la granulométrie moyenne (200 μ m) des minéraux utilisés dans les expériences.

Il n'est donc pas évident d'associer un type d'oxyde en surface des pyrites à l'action des bactéries, d'autant que de nombreux oxydes sont également observés dans le cas d'oxydations abiotiques. Seule une forte présence d'akaganéite, non chlorée et stabilisée par des polymères organiques, pourrait signer une bio-oxydation.

2.3.3 Production abiotique d'oxydes de fer

Témoins d'oxydation à l'air libre

Les oxydations prises comme témoins dans cette étude, à savoir des grains de pyrite oxydés à l'air libre depuis plusieurs années, ne répondent pas aux mêmes critères ni aux mêmes paramètres environnants que ceux des traitements en solution. L'oxydation est supposée se faire à travers un film d'eau vapeur adsorbée en surface des échantillons, au sein duquel les conditions physico-chimiques sont différentes d'une eau libre globalement à pH 1. Une dissociation de ces molécules d'eau en surface d'un échantillon produisant des radicaux OH^* permettrait à ces molécules de se concentrer (dans un faible volume) et d'interagir bien plus rapidement en surface avec les produits de la corrosion, favorisant ainsi la formation d'oxydes.

Les grains n'étant pas stériles, une contamination biologique n'est pas à exclure. Cependant, l'absence de milieu aqueux ne plaide pas en faveur d'une telle hypothèse.

Oxydations abiotiques en solution : Fe^{3+} et H_2O_2

Les traitements abiotiques aqueux sont réalisés en conditions stériles. L'absence de microorganismes en solution est régulièrement vérifiée entre lame et lamelle sous microscopie optique. La formation d'environnements locaux particuliers isolés de la solution globale par des biofilms est donc exclue.

La forte concentration d'ions ferriques (1000ppm) en solution dans le traitement par du fer (III) pourrait laisser penser à une saturation de l'élément et à une simple précipitation d'oxydes de fer sur la surface. Cette hypothèse ne peut *a priori* pas être totalement négligée. Cependant, ces oxydes apparaissent également lors des traitements avec du peroxyde d'hydrogène, donc sans apport initial conséquent de Fe^{3+} . La forte présence d'oxydes de fer en surface des grains ne peut donc être totalement imputée à une précipitation due à la présence d'ions ferriques en solution. D'autre part, l'existence de sulfates de type IV, qui se développent à partir d'oxydes préformés en surface des minéraux, tend à démontrer que ces derniers sont relativement stables et ne résultent pas d'une simple précipitation à partir de la solution.

Dans le cas de l'oxydation par H_2O_2 , les molécules de peroxyde d'hydrogène peuvent se dissocier en surface de la pyrite et induire ainsi une forte concentration en radicaux OH^* à proximité de la surface. Ces radicaux peuvent s'associer avec le fer de la pyrite ou les ions ferreux et ferriques dissous pour former des oxydes.

Il est également possible de supposer que l'oxydation, même en milieu aqueux, se passe selon un processus semblable à celui d'une oxydation à l'air. Les radicaux OH formés au sein de cette couche d'eau, par dissociation des molécules d'eau ou de peroxyde d'hydrogène, seraient immédiatement « piégés » en réagissant pour former des oxydes de fer.

Par ailleurs, Guevremont *et al.*, (1998b) présentent un mécanisme d'oxydation de certaines zones de la pyrite déficientes en soufre, directement par les molécules d'eau. Des phases $\text{Fe}^{3+}\text{-O}$ se forment en surface de la pyrite, et favorise le transfert d'électrons. Cette phase $\text{Fe}^{3+}\text{-O}$ est peut-être à l'origine d'une part des observations Raman lors d'une oxydation biotique ou abiotique en solution.

3 Schéma d'oxydation de la pyrite

Un premier schéma synthétisant les processus de surface lors de la (bio)oxydation de la pyrite peut être établi à partir des observations Raman détaillées dans ce chapitre (Figure C3. 35). La circulation d'électrons entre les anodes et les cathodes du minéral guident l'oxydation. Les produits des réactions se développent au niveau des sites actifs de surface du minéral dont le nombre et la réactivité sont définis par la nature de la face cristalline qui les porte. Les agents oxydants majeurs présents dans le milieu peuvent induire une réponse spécifique du minéral en activant certains sites réactionnels ou en favorisant une attaque électrochimique ou radicalaire.

L'effet réel des bactéries adhérentes reste à affiner et sera discuté lors du chapitre suivant par observations *in vivo* en Microscopie Confocale à Balayage Laser.

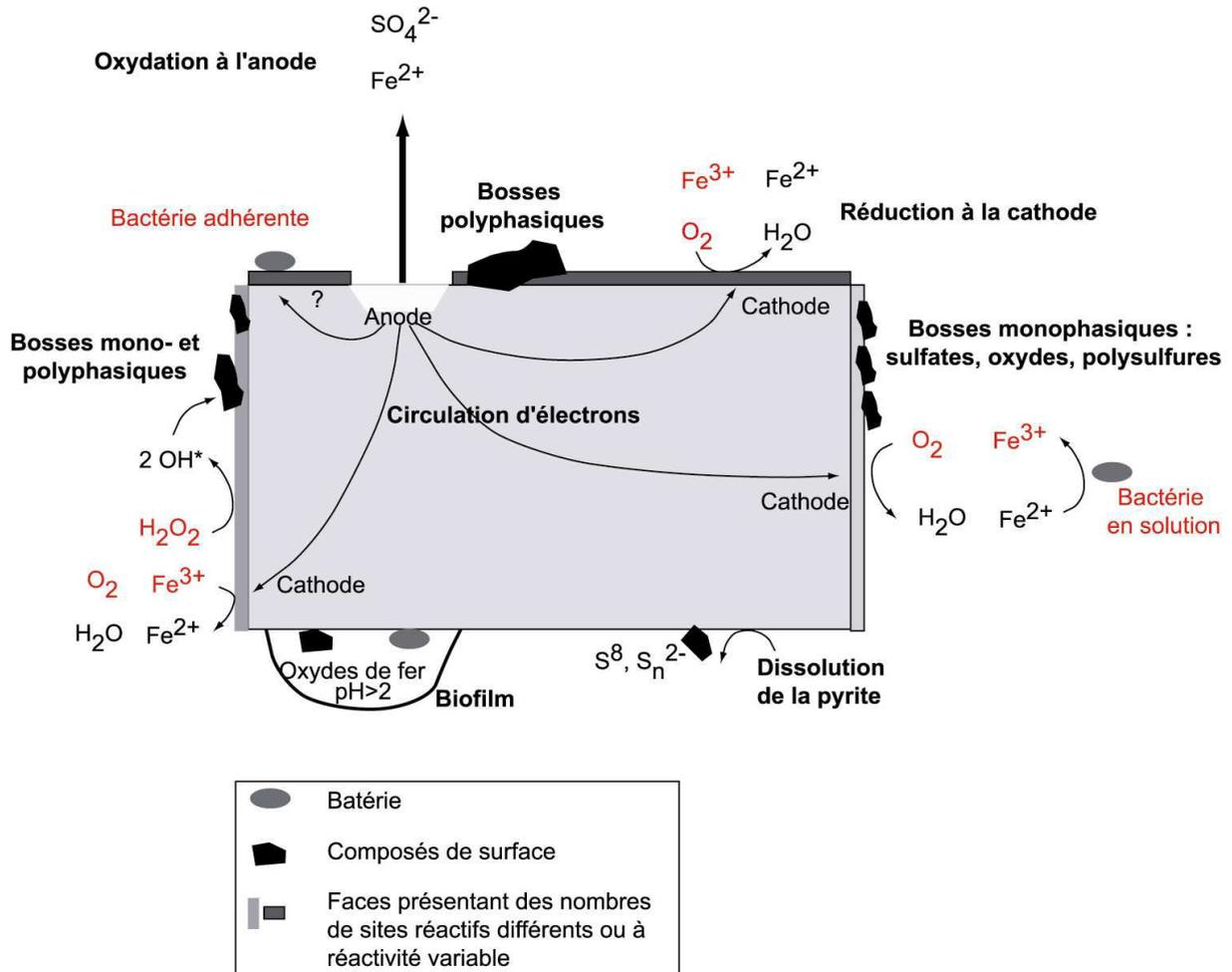


Figure C3.35 : Schéma de synthèse des processus de surface lors de la (bio)oxydation de la pyrite à partir des informations obtenues par spectroscopie Raman. Les agents oxydants sont indiqués en rouge.

Partie V : Biosignature chimique ?

Quel que soit l'agent oxydant au contact de la pyrite, la nature des composés de surface est la même. Des sulfates, des oxydes de fer, des polysulfures et du soufre élémentaire sont observés sur les grains oxydés de pyrite et ne peuvent constituer, à eux seuls, une bio- ou chimio-signature. Seul le type de sulfate (II pour la bio-oxydation) semble caractéristique d'un agent oxydant. En revanche, ces composés traduisent un état d'avancement du processus d'oxydation, qui dépend, au moins pour partie, de l'agent oxydant. Les traitements biologiques, exprimant principalement des produits finaux stables des réactions (sulfates et hématite) semblent signer des oxydations plus complètes que celles par Fe^{3+} ou H_2O_2 . Cependant, il est nécessaire de tenir compte également de la nature de la face cristallographique analysée qui semble contrôler le nombre mais également la réactivité des sites réactionnels de surface.

Par ailleurs, l'influence d'un agent oxydant se traduit par les assemblages des composés de surface et les cortèges minéralogiques observables en surface de pyrite oxydée. Il semble ainsi que la prédominance de bosses monophasiques (oxydes de fer ou sulfates) reflète des processus d'oxydation très spécifiques qui n'activeraient qu'un seul type de sites actifs au niveau des zones réactionnelles de surface. Cette « absence » d'assemblage de produits d'oxydation paraît caractéristique des processus de bio-oxydation. En contrepartie, les traitements abiotiques sont plus hétérogènes (majoritairement polyphasiques) et donc moins spécifiques. Seule l'oxydation par des ions ferriques se rapproche des résultats de bio-oxydation, reflétant l'effet « indirect » des bactéries en suspension qui oxydent les ions ferreux mis en solution à partir de la pyrite initiale.

Une biosignature chimique en surface de pyrites oxydées par *Acidithiobacillus ferrooxidans* consisterait donc en la mise en évidence (i) du processus d'oxydation abouti et (ii) d'une absence d'assemblage de produits d'oxydation (Figure C3. 36).

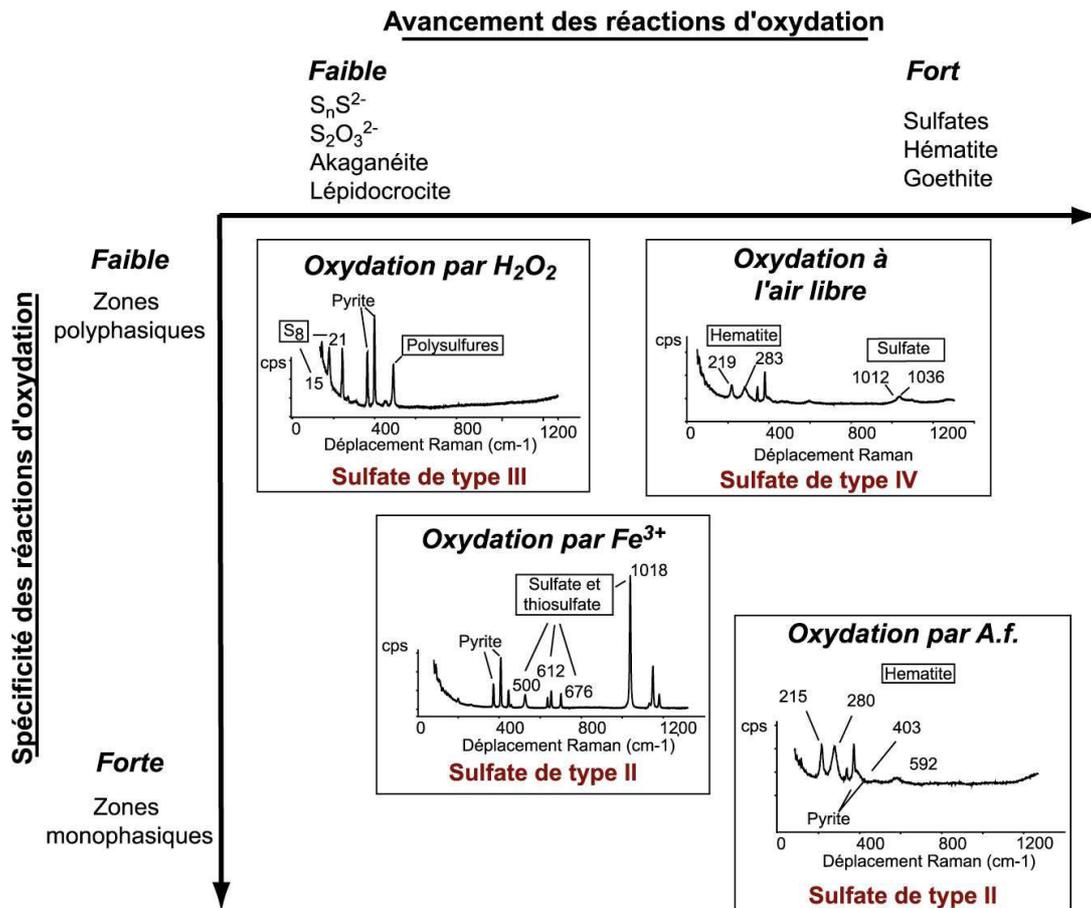


Figure C3. 36 : Diagramme synthétisant la spécificité (prédominance de zones mono ou polyphasiques) et l'avancement (prédominance d'intermédiaires réactionnels ou de phases stables) des réactions d'oxydation de la pyrite en présence de différents agents oxydants. Le type de sulfate le plus caractéristique de chaque traitement est noté en rouge.

Afin d'étudier le comportement des surfaces de manière globale et locale (à l'échelle du site actif, une approche statistique lors de l'analyse des surfaces de pyrites oxydées semble indispensable. La distinction biotique/abiotique de la nature de l'agent oxydant passe nécessairement par la caractérisation de :

- zones réactionnelles homogènes (spectres monophasiques) de surface de pyrite qui apportent des informations sur la nature chimique des produits d'oxydation de surface (état d'avancement du processus d'oxydation) et sur la réactivité de la face cristallographique analysée.
- zones réactionnelles hétérogènes (spectres polyphasiques) dans le but de déterminer les cortèges minéralogiques développés à échelle micrométrique sur les surfaces de pyrite, et donc de définir la réactivité globale de l'ensemble des grains vis-à-vis d'un agent oxydant.

**Mécanisme de corrosion de
la pyrite par
*Acidithiobacillus ferroxidans***

**C
H
A
P
I
T
R
E
4**

CHAPITRE 4

PARTIE I : OBSERVATION <i>IN VIVO</i> DU SYSTEME	188
1 OXYDATION ABIOTIQUE	188
1.1 MORPHOLOGIE DE LA SURFACE MINERALE	188
1.1.1 Oxydations abiotiques en solution	188
1.1.2 « Témoins » d'oxydation à l'air libre.	190
1.2 MISE EN EVIDENCE D'UNE PASSIVATION DE SURFACE	191
2 OXYDATION PAR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	193
2.1 MORPHOLOGIE DE LA SURFACE DE PYRITES BIO-CORRODEES.	193
2.1.1 Les figures de corrosion	193
2.1.2 Lien entre les figures de corrosion et les faces cristallines du minéral.	194
2.2 ADHESION BACTERIENNE	197
2.2.1 Paramètres descriptifs d'une surface de pyrite en cours de bio-oxydation	198
2.2.2 Estimation des taux de recouvrements	200
2.2.3 Sites d'adhésion de surface	209
2.3 ADHESION BACTERIENNE/FIGURES DE CORROSION	210
2.3.1 Recouvrement bactérien des figures de corrosion	210
2.3.2 Localisation des bactéries dans les figures de corrosion et circulation d'électrons	213
2.3.3 Isothermes d'adsorption	217
PARTIE II : MODELISATION ET ANALYSE GEOSTATISTIQUE DES SURFACES DE PYRITES CORRODEES	221
1 PRINCIPE DES VARIOGRAMMES 2D	221
2 ANALYSE GEOSTATISTIQUE DE GRAINS BIO-OXYDES	223
3 MODELISATION 3D DE LA SURFACE DE PYRITE EN COURS DE BIO-OXYDATION : RESULTATS DE CARBONNE ET AL (2005).	228
PARTIE III : SYNTHESE SUR LE MECANISME DE BIO-CORROSION DE LA PYRITE PAR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	230
PARTIE IV : BIOSIGNATURE MORPHOLOGIQUE ?	234

INTRODUCTION

Les études antérieures sur la bio-oxydation de la pyrite ont permis de décrire le processus de manière globale à partir d'un suivi cinétique des paramètres en solution (conditions physico-chimiques, espèces solubilisées, croissance bactérienne...). Or depuis quelques années, une prise de conscience s'est faite sur la nécessité d'affiner ces données globales par une modélisation des processus locaux au niveau de l'interface bactérie/minéral. Le chapitre 3, à partir des résultats obtenus par spectroscopie Raman, a confirmé l'hétérogénéité spatiale et chimique de surface rencontrée sur des grains de pyrite oxydée. Un premier lien a pu être établi entre la nature et la distribution des produits d'oxydation et les traitements oxydants en amont ainsi qu'avec les orientations cristallines exprimées par le minéral.

Dans ce chapitre, la microscopie confocale à balayage laser apporte de nouvelles informations sur le système bactérie/minéral au cours du processus d'oxydation. Elle permet, à travers des observations *in vivo*, de localiser simultanément les différents agents (minéraux et bactéries) et d'affiner la compréhension du rôle de chacun au cours le développement de la corrosion.

Partie I : Observation *in vivo* du système

Les caractérisations des processus d'oxydation de la pyrite, par voie biotique ou abiotique, sont en général réalisées à partir d'observations et d'analyses indirectes du système :

- suivi des conditions physico-chimiques du milieu,
- suivi des lixiviats,
- analyses de surface de pyrites oxydées (Chapitre 3),
- observations MEB *post-mortem* des bactéries en surface des minéraux après fixation des cellules.

La Microscopie Confocale à Balayage Laser (CLSM) permet d'observer directement le système *in vivo* à travers des marquages cellulaires appropriés, et d'atteindre une description plus fine des interactions bactéries/minéral en cours de lixiviation.

1 Oxydation abiotique

1.1 Morphologie de la surface minérale

1.1.1 Oxydations abiotiques en solution

Le traitement abiotique par des ions ferriques dissous (après 20 mois d'oxydation) n'induit pas en surface de pyrite de figures de corrosion particulières ni orientées. La surface peut être décrite comme « piquée ». Les fractures et faiblesses initiales du minéral, issues de contraintes mécaniques antérieures (broyage, choc), sont révélées (Figure C4. 1). D'autre part, ces morphologies sont réparties de manière plus ou moins uniforme sur les surfaces de pyrites oxydées.

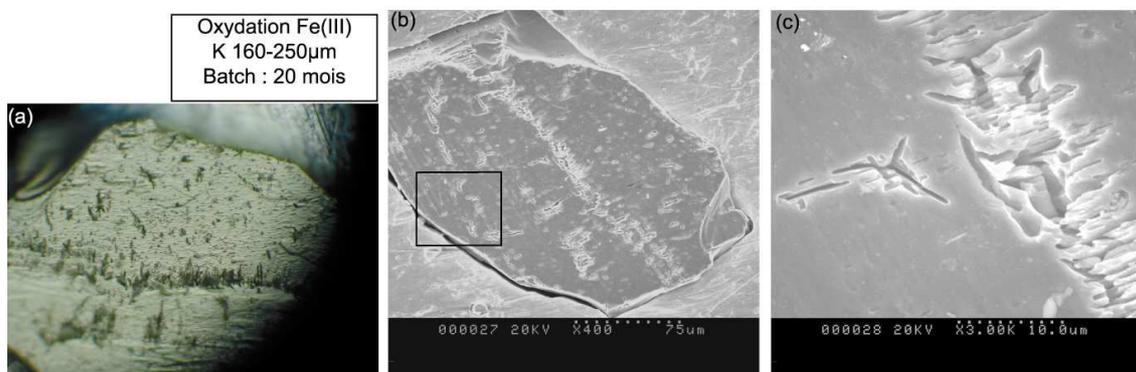


Figure C4. 1 : Images d'une surface de pyrite oxydée par traitement abiotique (Fe^{3+}) pendant 20 mois. (a) : photographie en microscopie optique (x200) ; (b) et (c) : images MEB du même grain.

Les oxydations par le peroxyde d'hydrogène sont plus violentes. Les composés de surface révélés par les études en spectroscopie Raman (cf Chapitre 3), des polysulfures et du soufre élémentaire, indiquent une oxydation incomplète. La concentration de l'agent oxydant (3%) provoque une forte réaction en surface du minéral. Les morphologies imagées sont ainsi plus caractéristiques et intenses (Figure C4. 2) et se rapprochent de figures géométriques. Cependant, elles demeurent assez éparses et leur organisation semble aléatoire.

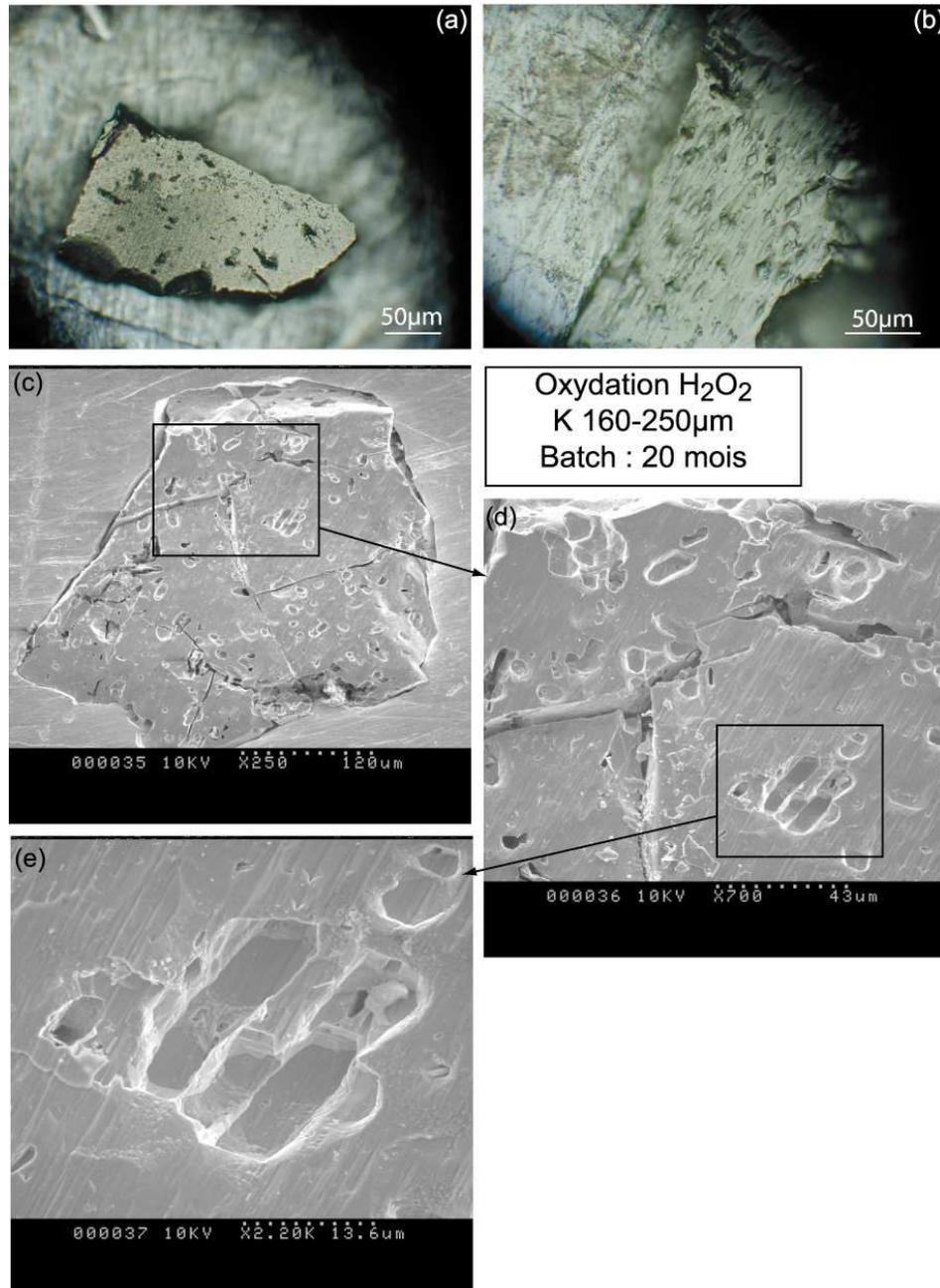


Figure C4. 2 : Images d'une surface de pyrite oxydée par traitement abiotique H_2O_2 pendant 20 mois. (a) et (b) : photographie en microscopie optique (x200) ; (c), (d) et (e) : images MEB.

Dans les deux traitements (Fe^{3+} et H_2O_2), les morphologies de corrosion observées ne présentent pas de géométrie ni de répartition spatiale caractéristiques.

1.1.2 « Témoins » d'oxydation à l'air libre.

Les grains de pyrites naturelles considérés comme témoins d'oxydation à l'air libre n'ont pas été oxydés par voie aqueuse. Les produits d'oxydation se forment à partir d'une pellicule superficielle d'eau vapeur adsorbée en surface des minéraux. Ces produits sont très développés et ont des extensions latérale et verticale supérieures à celles des composés observés sur des grains oxydés par voie aqueuse. Ils sont d'ailleurs visibles directement par microscopie optique sous forme de cristaux géométriques en relief des pyrites (Figure C4. 3). Il est fort probable que de tels cristaux ne puissent pas se développer dans un environnement aqueux. Il n'est donc pas étonnant de ne retrouver de produits d'oxydation millimétriques que sur des surfaces de pyrites naturelles oxydées à l'air sans contact avec une solution.

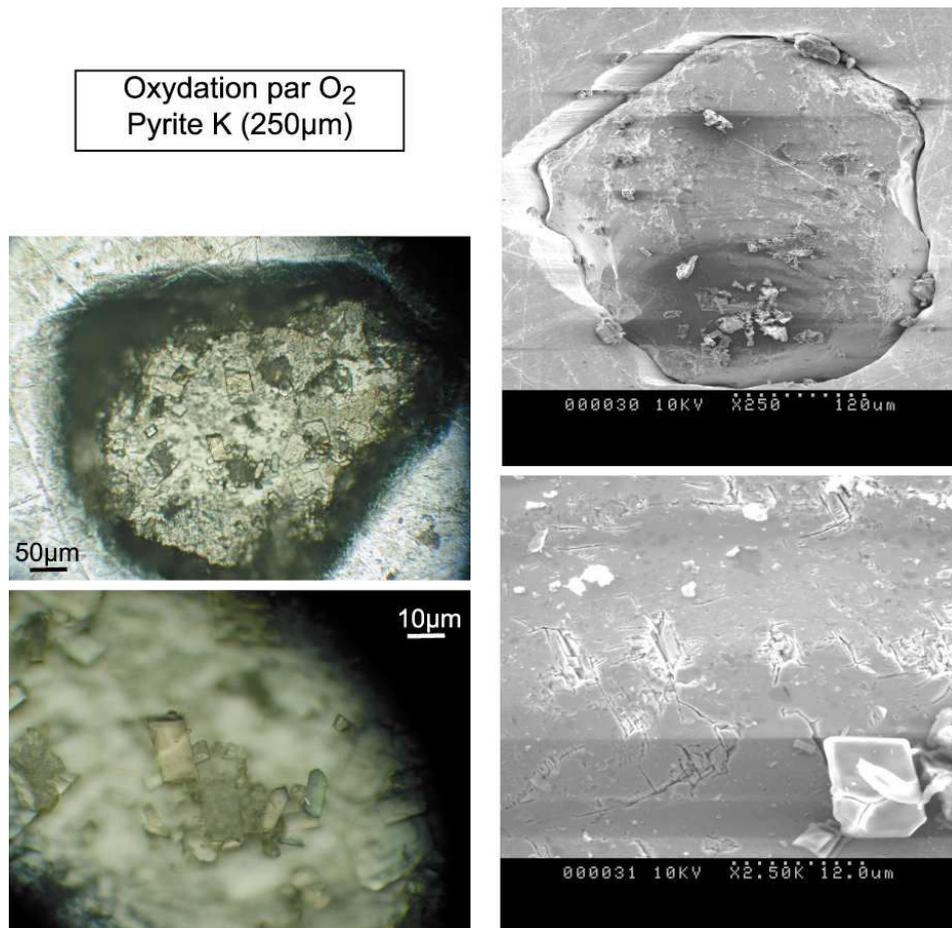


Figure C4. 3 : Images d'une surface de pyrite oxydée par traitement abiotique à l'air. (a) et (b) : photographie en microscopie optique (x200) ; (c) et (d) : photographies MEB du même grain.

Des cartographies d'éléments (réalisées par MEB) sur ces sels de surface indiquent une forte proportion d'oxygène (Figure C4. 4). Ces cristaux correspondent aux associations d'oxydes de fer et de sulfates de type II ou IV définis au chapitre précédent.

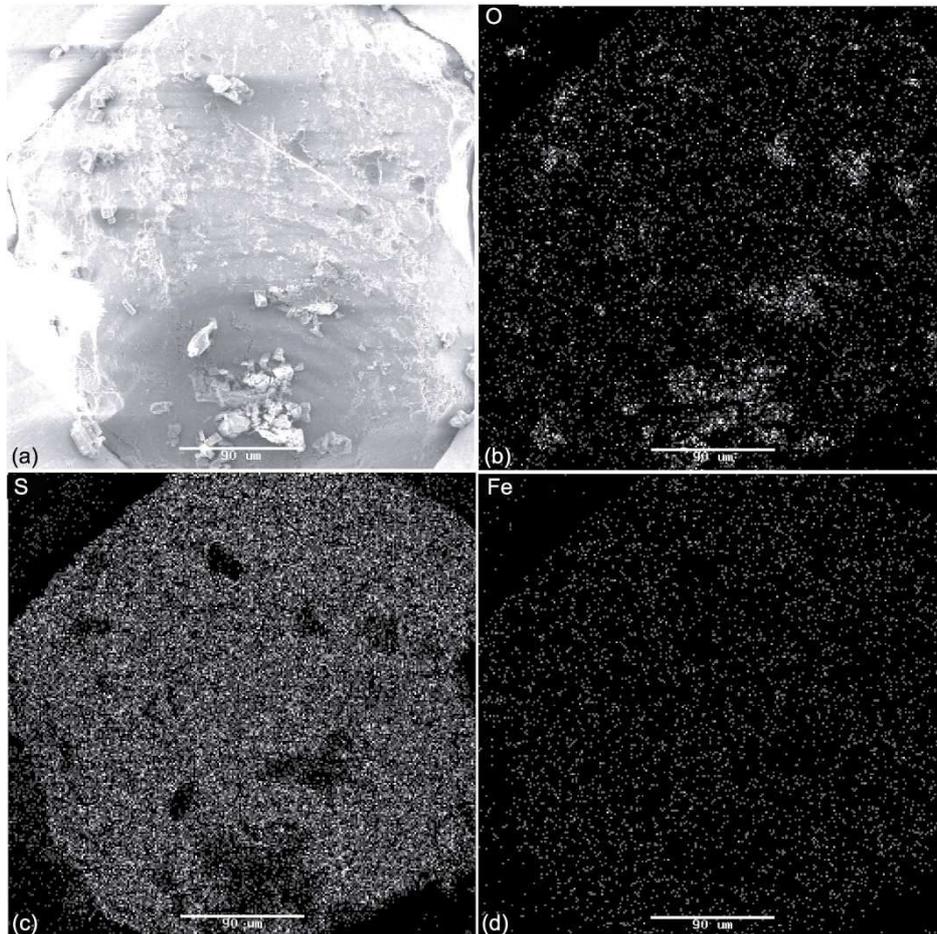


Figure C4. 4 : Image (a) et cartographies MEB en oxygène (b), soufre (c) et fer (d) sur une surface de pyrite naturelle oxydée à l'air. Les barres d'échelle représentent 90µm.

De telles cartographies n'ont été réalisables que sur des grains de pyrites oxydées à l'air libre, en raison des trop faibles extensions latérale et verticale des produits de surface développés au cours de traitements abiotiques aqueux.

1.2 Mise en évidence d'une passivation de surface

Les minéraux observés par CLSM, issus d'oxydations biotiques ou abiotiques, sont préparés selon le même protocole. Les préparations contiennent à l'état final $1,5\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'Oregon Green (OG) et $0,7\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Sulforhodamine B (SRB). La SRB, choisie pour sa capacité à marquer les cellules bactériennes, permet également de mettre en évidence des

composés hydrophobes présents à la surface des minéraux. Une fluorescence marquée de la SRB est observée sur certains grains oxydés par voie aqueuse abiotique (Figure C4. 5), plus particulièrement au niveau de fissures du minéral qui correspondent aux zones préférentielles d'oxydation en l'absence de bactéries.

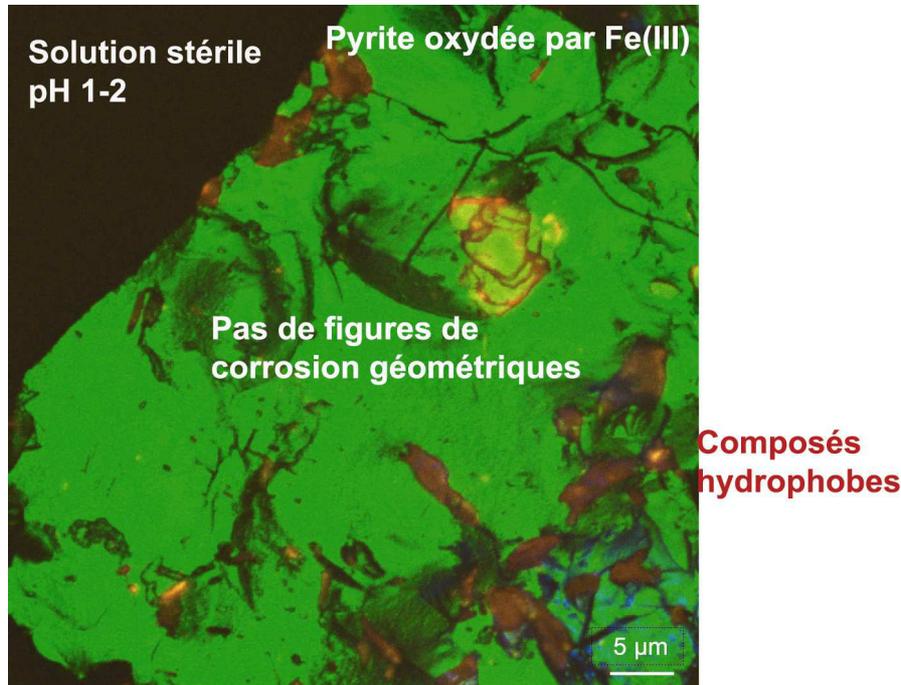


Figure C4. 5 : Image de la surface d'un grain de pyrite oxydée par des ions ferriques en solution observé par Microscopie Confocale à Balayage Laser. Des composés hydrophobes de surface sont marqués par la sulforhodamine B.

L'enchaînement de réactions anodiques (oxydation du doublet $S-S^{2-}$) déterminé par Rimstidt & Vaughan (2003) met en évidence la formation de nombreux intermédiaires réactionnels comme des polysulfures et divers polythionates. Ces molécules hydrophobes ont été identifiées (par spectroscopie Raman) quelque soit le traitement oxydant et pourraient être effectivement révélées par la SRB. Les dimensions des zones marquées sur la Figure C4. 5 (plusieurs microns) semblent incompatibles avec la morphologie connue des produits d'oxydation de surface (quelques centaines de nanomètres d'extensions latérale et verticale). Elles indiqueraient de ce fait des zones de surface passivées à forte concentration de produits d'oxydation.

Ces zones sont en revanche beaucoup plus rares sur des surfaces bio-oxydées. Quelques images laissent apparaître des remplissages de fractures mais, en général, la SRB ne se fixe de manière remarquable que sur les cellules bactériennes. Cette absence de marquage sur les surfaces bio-oxydées pourrait impliquer que :

- la SRB, en se fixant sur les cellules bactériennes, ne serait pas assez concentrée pour marquer des zones contenant ces composés réactionnels hydrophobes. Cependant, la SRB est toujours visible en solution et est donc encore en excès dans le milieu. Cette hypothèse ne peut donc pas être retenue.
- les processus d'oxydation bactérienne sont plus localisés que les processus abiotiques, la perforation plus intense et les intermédiaires réactionnels moins nombreux, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par spectroscopie Raman (Chapitre 3). Il y aurait donc moins de zones de surface passivées.

2 Oxydation par *Acidithiobacillus ferrooxidans*

2.1 Morphologie de la surface de pyrites bio-corrodées.

2.1.1 Les figures de corrosion

Contrairement aux observations réalisées sur des surfaces de pyrites oxydées par voie abiotique, les pyrites bio-corrodées présentent de nombreuses figures de corrosion dont les dimensions, la morphologie et la répartition sur la surface des pyrites ne semblent pas aléatoires. Des images CLSM ont été réalisées sur des grains de granulométrie 53-80 μm issus de réacteurs en batch, après 24 mois d'oxydation (Figure C4. 6). La variabilité observée quant à la densité et à la répartition de ces figures, sur des grains de pyrite issus du même aliquot et du même réacteur, traduisent l'hétérogénéité de surface intra- et inter-grains inhérente à l'utilisation de grains naturels à cassure conchoïdale.

Les **dimensions** de ces figures de bio-corrosion sont relativement importantes (largement supérieures au micron) et peuvent atteindre jusqu'à 20 μm de long. Par conséquent, elles ne sont pas imputables à des empreintes de bactéries adhérentes sur les surfaces de pyrite.

Par ailleurs, ces figures de corrosion ont des **géométries** très particulières : triangulaires, rectangulaires et, dans la plupart des cas, pseudo-hexagonales. Ces géométries reflètent le système cristallin de la pyrite (cubique). Les perforations pseudo-hexagonales pourraient ainsi résulter de la combinaison d'un axe 3 et d'un miroir, éléments de symétrie présents dans le système cubique.

Enfin, quel que soit le grain imagé, ces figures de corrosion sont **orientées** et se développent dans une même direction qui correspond à une orientation cristalline issue de la combinaison de divers éléments de symétrie du minéral.

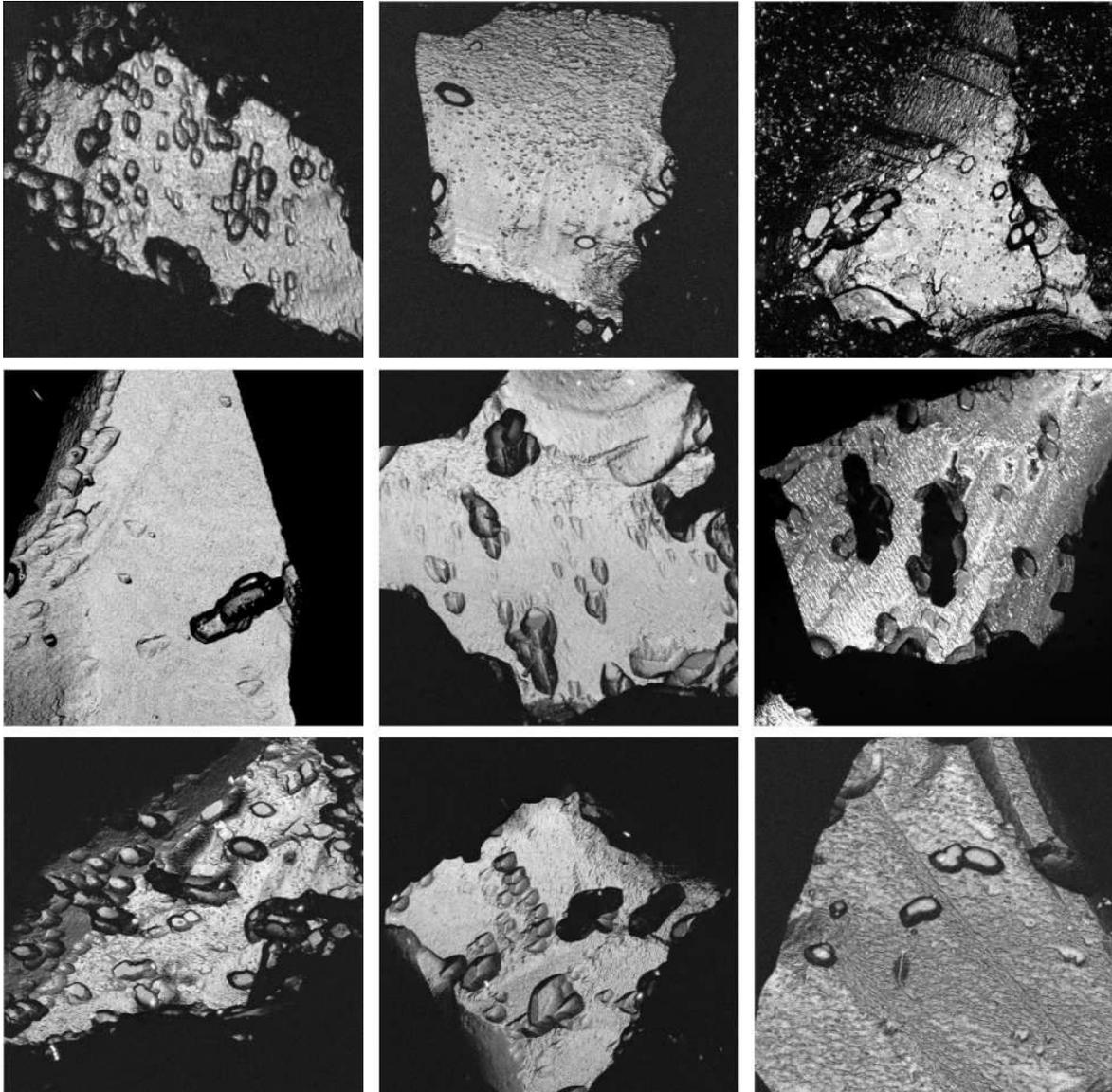


Figure C4. 6 : Images CLSM réalisées sur des surfaces de pyrite K de granulométrie 53-80 μm en contact avec des inocula de *A.f.*. Mise en évidence de figures de corrosion perforantes, géométriques et orientées.

2.1.2 Lien entre les figures de corrosion et les faces cristallines du minéral.

Comme il a été établi au Chapitre 3, les analyses Raman ne permettent pas de définir de manière précise et non ambiguë la nature cristallographique exacte des faces exprimées par le minéral. Elles fournissent seulement une indication de l'orientation cristallographique

majeure des zones observées sur les grains. D'autre part, compte tenu de la profondeur et de la géométrie des figures de corrosion, il n'est pas possible de réaliser des spectres Raman de qualité autorisant un calcul précis des rapports Ag/Eg avant et après rotation de 45° sur le fond ou les parois de ces figures.

En revanche, l'observation à grande échelle des minéraux (CLSM ou MEB) permet d'estimer, dans certains cas, les orientations cristallines des faces des grains et de les relier aux morphologies des figures de corrosion qui s'y développent. Ces dernières semblent reproduire le schéma global des imperfections des grains. La figure suivante illustre la morphologie d'une figure de corrosion dont les parois semblent s'être développées en miroir des chevrons (kinks) observables en surface du grain.

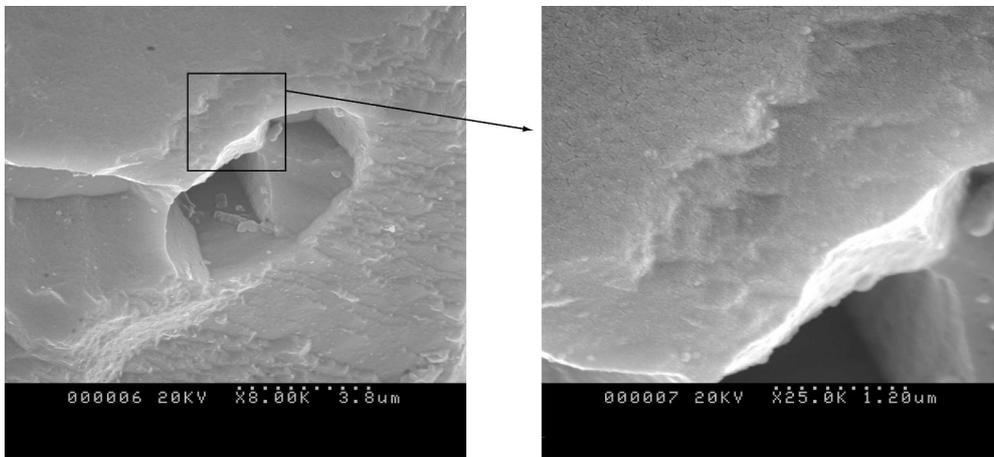


Figure C4. 7: Images MEB d'un grain de pyrite bio-oxydée en batch durant 26 mois (granulométrie 53-80µm). Les parois de la figure de corrosion sont orientées de la même manière que les marches observées sur la surface du minéral initial.

La dissolution progressive des minéraux par oxydation et corrosion perforante se réalise dans le cadre fixé par le système cristallin de la pyrite. Ainsi, les géométries et les orientations des figures de corrosion reflètent l'organisation interne de la face cristallographique sur laquelle elles se développent (Figure C4. 8). Pour la pyrite à hémicubique sans axe 4 :

- une forme triangulaire serait associée à une face (111) perpendiculaire aux axes de symétrie 3 de la maille cristalline.
- une forme losangique (voire carrée) correspondrait aux faces (100), représentant les faces du cube, et perpendiculaires aux axes 2.
- une forme pseudo-hexagonale correspondrait à une pseudo-symétrie 6 obtenue par l'association d'un axe 3 et d'un miroir, que l'on pourrait retrouver sur des faces (210).

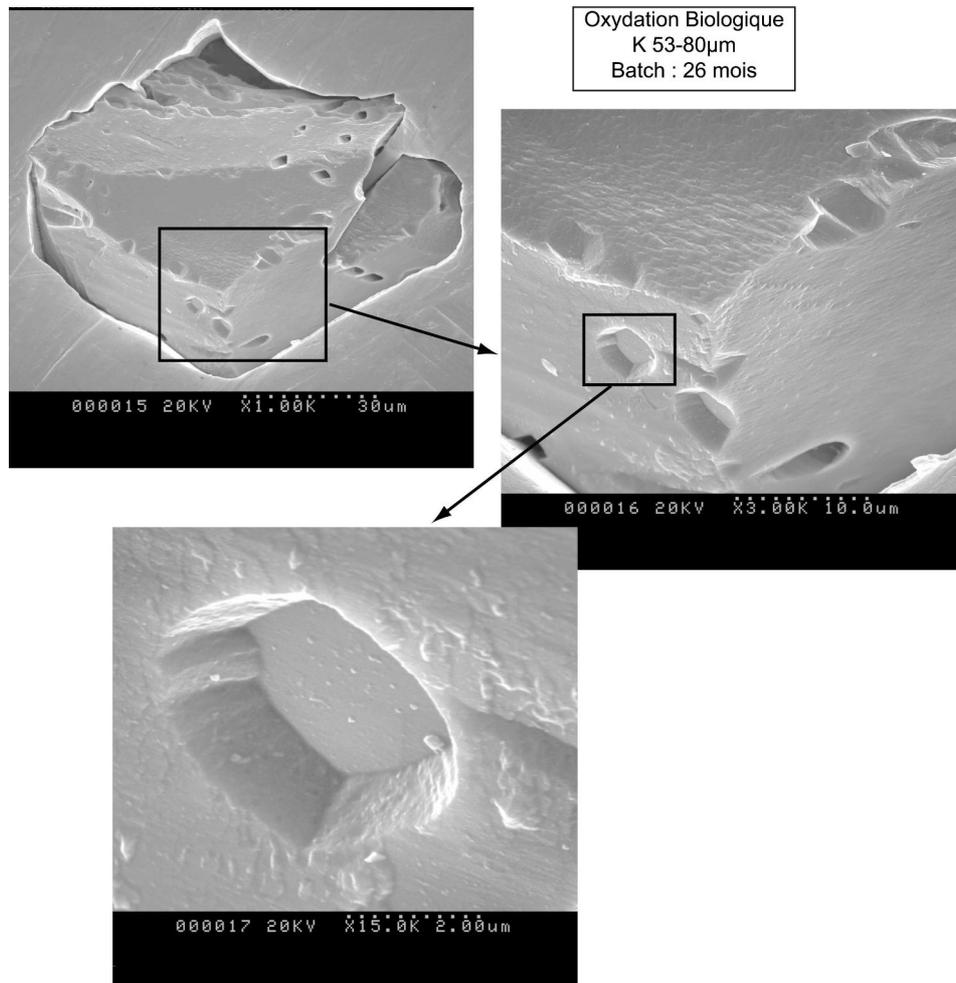


Figure C4. 8 : Images MEB d'un grain de pyrite bio-oxydée en batch durant 26 mois (granulométrie 53-80µm). Orientations cristallographiques et morphologies des figures de corrosion associées.

Le grain observé Figure C4. 8 présente une forme générale de diploèdre pentagonal. Il est donc possible de déterminer approximativement les orientations cristallographiques majeures de ses différentes faces et de les corrélérer à la géométrie des figures de corrosion (Figure C4. 9).

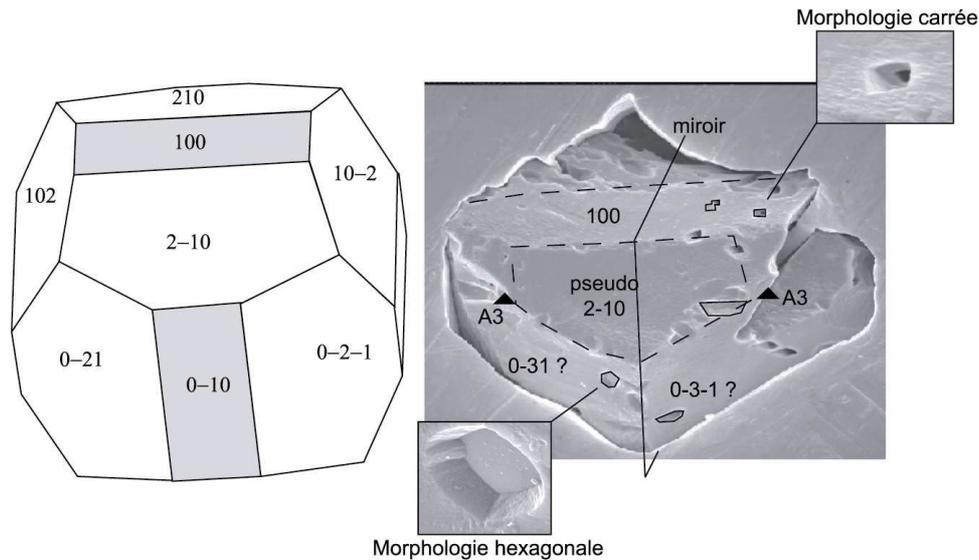


Figure C4. 9 : Identification possible de faces d'un grain de pyrite naturelle à partir de la morphologie des figures de corrosion qui s'y développent.

La nature des faces ou orientations cristallines contrôle donc la morphologie et l'extension des figures de corrosion. Certains auteurs ont suggéré que ces figures reflétaient directement les dimensions des bactéries adhérentes ou des biofilms que ces bactéries auraient pu développer (Edwards *et al.*, 2001; Rodriguez-Leiva and Tributsch, 1988). Les observations réalisées ici sont en contradiction avec ces hypothèses et attestent que les morphologies des figures de corrosion sont le reflet des orientations cristallines des faces sur lesquelles elles se développent. Les bactéries ne joueraient qu'un rôle indirect en limitant la passivation des surfaces de pyrite et en favorisant le développement de la corrosion et la formation de figures de corrosion géométriques et profondes.

2.2 Adhésion bactérienne

Des études antérieures ont montré, par des méthodes indirectes, que le minéral possédait, en surface, des sites particuliers à forte affinité pour l'adhésion bactérienne (Dziurla, 1995; Meline, 1995). Elles n'ont toutefois pas pu préciser le rôle respectif des agents (bactéries et minéral) dans le processus d'adhésion.

Trois types d'expériences d'adhésion bactérienne ont alors été réalisés sur des surfaces de pyrites (1) non corrodées nettoyées, (2) non corrodées non nettoyées et (3) préalablement bio-corrodées et non nettoyées. Les déterminations des taux d'adhésion sont effectuées par un suivi direct par CLSM.

2.2.1 Paramètres descriptifs d'une surface de pyrite en cours de bio-oxydation

Les projections 2D des plans focaux de surfaces de pyrites oxydées imagées par CLSM permettent d'accéder à des informations sur les taux et lieux d'adhésion bactérienne, malgré la perte d'information volumique que ce type de représentation entraîne.

La Figure C4. 10 schématise une image CLSM réalisée sur le système *Af*/pyrite en cours de bio-corrosion.

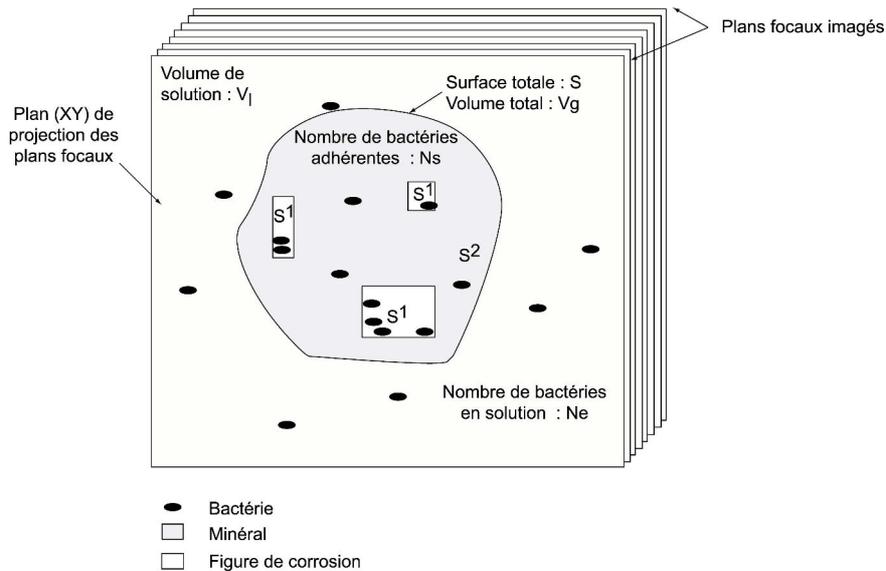


Figure C4. 10 : Schéma représentatif d'une image réalisée par Microscopie Confocale à Balayage Laser sur des grains minéraux mis en contact avec des bactéries.

Soit S la surface totale développée par le minéral dans le plan de projection 2D d'observation. Cette surface se décompose en deux sous parties :

- S^1 surface des figures de corrosion. L'ensemble constitué par ces surfaces est noté Ω^1 .
- S^2 surface non corrodée du minéral d'un ensemble noté Ω^2 .

On peut ainsi exprimer la surface d'un grain j par :

$$\text{Eqn. C4. 1 : } S_j = \sum_{i=1}^n S_i^1 + S^2$$

n étant le nombre de figures de corrosion développées en surface du minéral.

Le nombre de bactéries adhérentes sur une surface minérale, noté N_s , se calcule directement par analyse d'image en estimant le pourcentage de la surface du grain occupée par les bactéries.

Le recouvrement d'une surface minérale par les bactéries est donné par :

$$\text{Eqn. C4. 2 : } \theta_j = \frac{N_S \cdot S_{\text{bact}}}{S_j}$$

avec S_{bact} : surface d'une bactérie.

Il peut être décomposé en deux « sous-recouvrements », l'un pour les figures de corrosion (θ_j^1) et l'autre pour la surface non corrodée du minéral (θ_j^2),

$$\text{Eqn. C4. 3 : } \theta_j^1 = \frac{N_S^1 \cdot S_{\text{bact}}}{\sum_{i=1}^n S_i^1} \quad \text{et} \quad \theta_j^2 = \frac{N_S^2 \cdot S_{\text{bact}}}{S^2}$$

Ces paramètres sont liés par la relation suivante :

$$\text{Eqn. C4. 4 : } \theta_j^1 + \theta_j^2 = \theta_j \cdot \left(\frac{S}{S^1} + \frac{S}{S^2} \right) - S_{\text{bact}} \cdot \left(\frac{N_S^2}{S^1} + \frac{N_S^2}{S^2} \right)$$

ou plus simplement par :

$$\text{Eqn. C4. 5 : } \theta_j = d \cdot \theta_j^1 + (1-d) \cdot \theta_j^2$$

avec, d le degré de corrosion d'un grain, qui correspond à la surface globale occupée par les n figures de corrosion d'un grain j relativement à la surface totale du grain :

$$\text{Eqn. C4. 6 : } d_j = \left(\sum_{i=1}^n S_i^1 \right) / S$$

Ces différents paramètres sont récapitulés dans le Tableau C4. 1. Dans un souci de simplification des notations la moyenne d'un paramètre X sera exprimée par \bar{X} .

Tableau C4. 1: Récapitulatif des principaux paramètres descriptifs du système et de l'adhésion de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur des surfaces de pyrite.

Paramètre	Information apportée	Expression
j	indice d'un grain	$j \in [1-n_{\max}]$
i	indice des figures de corrosion d'un grain j	$i \in [1-n]$
S	Surface totale du grain après projection des plans focaux (en μm^2)	$S_j = \sum_{i=1}^n S_i^1 + S^2$
S^1	Surface d'une figure de corrosion en μm^2	—
S^2	Surface non corrodée d'un grain j en μm^2	—
N_s	Nombre de bactéries adhérentes	$N_s = a \cdot \frac{(1-\theta)}{\theta} \cdot N_e$
θ	Recouvrement global de la surface S d'un grain - $0 < \theta < 1$	$\theta_j = d \cdot \theta_j^1 + (1-d)\theta_j^2$
θ_j^1	Recouvrement des figures de corrosion $0 < \theta_j^1 < 1$	$\theta_j^1 = \frac{N_s^1 \cdot S_{bact}}{\sum_{i=1}^n S_i^1}$
θ_j^2	Recouvrement de la surface non corrodée S^2 $0 < \theta_j^2 < 1$	$\theta_j^2 = \frac{N_s^2 \cdot S_{bact}}{S^2}$
d_j	Degré de corrosion du grain j - $0 < d_j < 1$	$\sum_{i=1}^n S_i^1 / S$

n_{\max} : nombre maximum de grain dans le réacteur

2.2.2 Estimation des taux de recouvrements

Tous les grains utilisés dans ces expériences proviennent d'un aliquot de pyrite de granulométrie restreinte (53-80 μm). La taille moyenne et donc la surface géométrique des minéraux imagés peuvent être considérées comme semblables d'un grain à l'autre et sans influence sur les taux de recouvrement bactérien. De même, tous les minéraux préalablement bio-corrodés (de granulométrie 53-80 μm) proviennent du même réacteur au sein duquel les grains étaient en contact avec un inoculum bactérien de concentration donnée.

Surfaces non corrodées et nettoyées

La moyenne du taux de recouvrement bactérien sur des surfaces de pyrites propres non corrodées augmente avec la concentration bactérienne initiale (Figure C4. 11) mais présente des valeurs relativement basses qui n'excèdent que très rarement 10%. La dispersion des valeurs est relativement importante, en particulier pour les fortes concentrations ($> 1.10^8$ bactéries.mL⁻¹). Elle ne correspond pas ici à l'estimation d'une propagation d'erreur analytique, le comptage bactérien étant direct, mais à une réelle hétérogénéité des minéraux à une échelle micrométrique. En effet, les différentes faces du minéral sont susceptibles de présenter un recouvrement bactérien variable, que l'on retrouve sur les images CLSM réalisées sur un ensemble *a priori* aléatoire de faces de grains de pyrite.

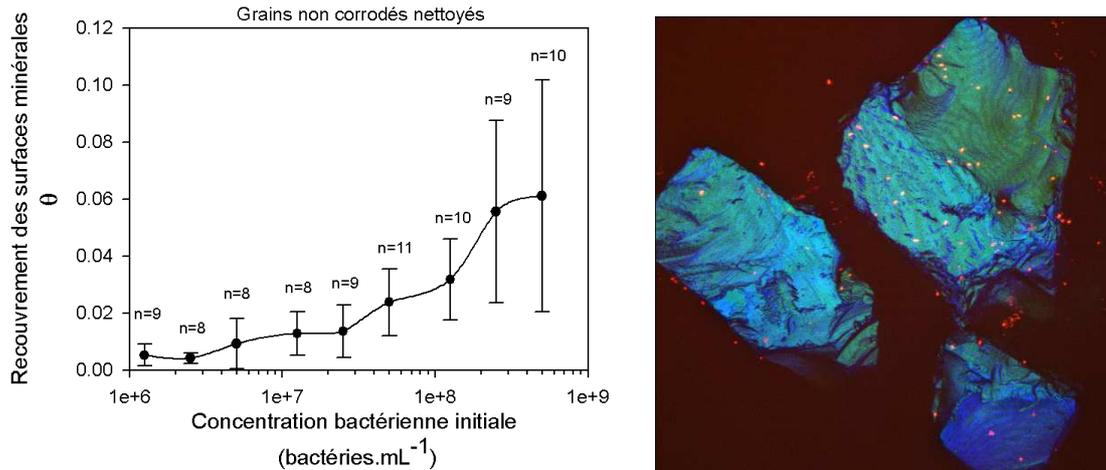


Figure C4.11 : Evolution du taux de recouvrement des surfaces minérales de grains de pyrite non corrodés et nettoyés en fonction de la concentration bactérienne initiale de l'inoculum. Le nombre de répétition par point est donné par n=X pour chaque point. Un exemple d'image CLSM réalisée sur 3 grains (granulométrie 53-80µm) pour un inoculum à 5.10⁷ bactéries.mL⁻¹ est donné.

Ces faibles taux de recouvrement sont en accord avec les données des études précédentes (Tableau C4. 2) : 0.1 à 1% soit 10⁶bactéries.mg⁻¹ déterminé par Méline (1995) (comptage en cellule de Thoma ou NPP), ou 0.75 à 2.25% (méthode ELIFA) (Dziurla, 1995). En essayant de saturer les surfaces minérales en bactéries, Ohmura (1993) obtenait des taux de recouvrement de pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* compris entre 20 et 45%, pour un inoculum à 10⁹ bactéries.mL⁻¹.

Tableau C4. 2 : Estimation des taux de recouvrements de surfaces de pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* obtenus dans cette étude et comparés aux données de la littérature.

Granulométrie	Concentration bactérienne de l'inoculum	Méthode	Adhésion (bactéries/mg)	Recouvrement de la surface (%)	Nombre de bactéries/grain (moy [min-max])	Référence	
53-80µm	1.10 ⁹			20 - 45		Ohmura (1993)	
	1.5.10 ⁷	Cellule de Thoma	9.10 ⁵	1.3	350	Dziurla (1995)	
	5.10 ⁷	Cellule de Thoma	1.8.10 ⁶	2.6	700		
	1.5.10 ⁷	ELIFA	4.10 ⁵ à 1.2.10 ⁶	0.75 - 2.25	170-500	Méline (1995)	
		Thoma et NPP	1.10 ⁶	0.1-1			
			CLSM	9,6.10 ⁵	0.5	74 [10-121]	Cette étude
		2,5.10 ⁶		7,5.10 ⁵	0.4	58 [17-155]	
		5.10 ⁶		1,7.10 ⁶	0.9	131 [9-478]	
		1,25.10 ⁷		1,6.10 ⁶	1.3	126 [34-332]	
		2,5.10 ⁷		2,0.10 ⁶	1.4	151 [13-519]	
	5.10 ⁷	3,6.10 ⁶		2.4	280 [15-665]		
	1,25.10 ⁸	6,2.10 ⁶		3.2	480 [117-1324]		
	2,5.10 ⁸	8,6.10 ⁶		5.6	664 [268-1203]		
	5.10 ⁸	7,6.10 ⁵	6.1	584 [258-1079]			

Les taux de recouvrement bactérien des surfaces de pyrite présentés sont donc comparables aux données précédemment reportées. En revanche, elles résultent

d'observations directes, et non d'estimations effectuées à partir de comptages des bactéries restant en solution après contact avec le minéral.

Surfaces non corrodées non nettoyées

La présence de produits d'oxydation en surface des minéraux semble favoriser le processus de bio-corrosion de la pyrite par *Acidithiobacillus ferroxidans* (Mustin *et al.*, 1993; Toniazzo, 1998). Ces composés serviraient de source d'énergie initiale aux bactéries et la surface des pyrites serait ainsi « nettoyée » avant l'initiation du processus d'oxydation. En revanche, aucune information ne permet de prédire si ce lessivage des composés de surface est réalisé par des bactéries adhérentes ou « libres » en solution. En d'autres termes, les bactéries adhèrent-elles sur des produits d'oxydation de surface et ceux-ci jouent-ils un rôle prépondérant dans l'affinité des bactéries pour la surface ?

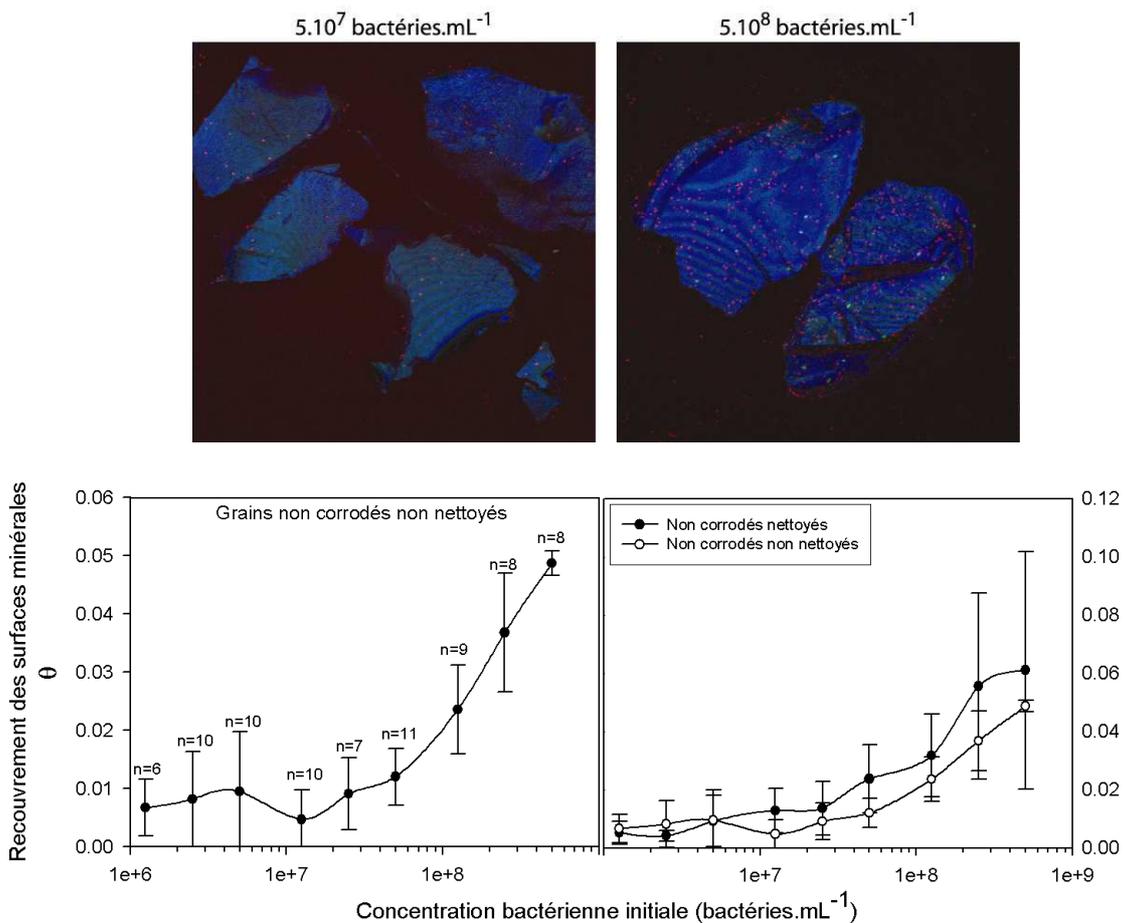


Figure C4.12 : Images CLSM sur des surfaces de pyrite non corrodée non nettoyée en contact avec deux inocula bactérien différents et calcul du recouvrement bactérien de ces surfaces (moyenne±sd) en fonction de la concentration bactérienne initiale. Les données sont comparées à celles obtenus sur des pyrites non corrodées nettoyées pour des inocula bactériens initiaux identiques.

Comme l'indique la Figure C4. 12, les taux de recouvrements bactériens sur des surfaces minérales nettoyées de leurs produits d'oxydation de surface, sont similaires à ceux des surfaces non nettoyées. Les sites d'adhésion bactérienne seraient donc distincts de ceux où se développent les produits d'oxydation de surface. Un léger effet inhibiteur des composés de surface sur l'adhésion est même noté, les taux de recouvrement moyens étant légèrement supérieurs sur les grains nettoyés que sur ceux non nettoyés.

Les images confocal permettent de mettre en évidence la position de bactéries en surface de grains minéraux. En revanche, les colorants utilisés ne marquent pas systématiquement les composés de surface. Il est donc difficile de co-localiser les bactéries et les produits d'oxydation de surface d'un même grain. Toutefois, sur certains grains, ces phases sont visibles en microscopie optique et leur localisation peut être comparée à celle des bactéries adhérentes (Figure C4. 13).

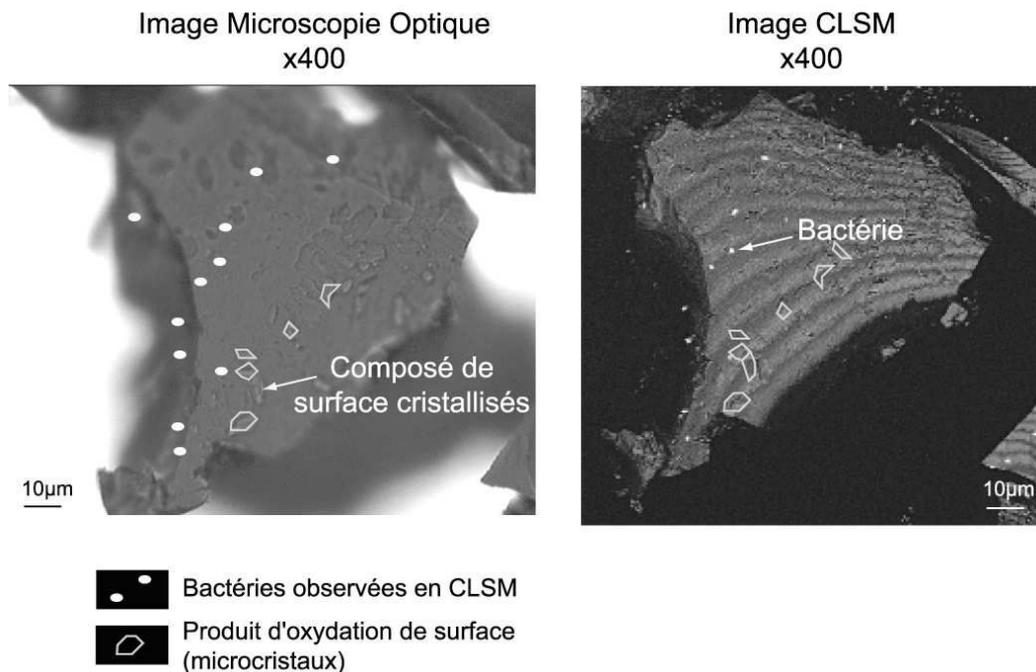


Figure C4. 13 : Images en microscopie optique et confocale à balayage laser d'un grain de pyrite non nettoyé mis en contact avec un inoculum bactérien à 5.10^7 bactéries.mL⁻¹. Des phases de surface bien cristallisées (composés d'oxydation de surface) sont identifiées et leur position sur les surfaces sont comparées à celles des bactéries adhérentes au minéral.

Il semble que les bactéries adhérentes occupent des sites de surface du minéral différents et nettement séparés des zones présentant ces phases oxydées. Bien que cette observation ne puisse pas être généralisée à tous les grains, la similarité des taux de

recouvrement obtenus sur des grains propres ou nettoyés, confirme l'absence de « co-localisation » entre les sites d'adhésion bactérienne et les sites où se développent les phases de surface.

Si l'on replace toutes ces observations dans le cadre d'un processus de corrosion minérale, trois sites de surface liés à la circulation interne des électrons sont distinguables :

- des anodes, sites de dissolution du minéral,
- des cathodes, siège des réactions de réduction et zones protégées de la surface du minéral,
- des sites intermédiaires de dépôt de phases oxydées de surface.

En supposant que l'adhésion bactérienne est liée à ces circulations locales d'électrons, les cellules adhérentes pourraient « demeurer » dans des zones leur fournissant l'énergie (électrons) dont elle ont besoin : les cathodes. En effet, *Acidithiobacillus ferrooxidans* utilise la pyrite comme source d'énergie pour sa respiration cellulaire. Elle est donc en recherche perpétuelle d'électrons à transférer à l'oxygène (accepteur final) par l'intermédiaire des protéines membranaires de sa chaîne respiratoire ce qui la place logiquement au niveau des cathodes du minéral.

D'autre part, une trop forte présence de produits d'oxydation en surface des minéraux entraînerait une passivation de surface et pourrait freiner l'accès des bactéries aux sites « énergétiques », limitant ainsi l'adhésion. Cette passivation de surface expliquerait donc les taux d'adhésion légèrement plus faibles enregistrés sur les grains non nettoyés (Figure C4. 12).

Surfaces préalablement bio-corrodées

Les différences des taux de recouvrement entre les grains au préalable bio-corrodés et les grains non corrodés sont significatives (13,4% au lieu de 6,1% en moyenne à 5.10^8 bactéries.mL⁻¹), malgré le recoupement des barres d'erreur dû à la très forte hétérogénéité naturelle existant d'un grain à l'autre (Figure C4. 14).

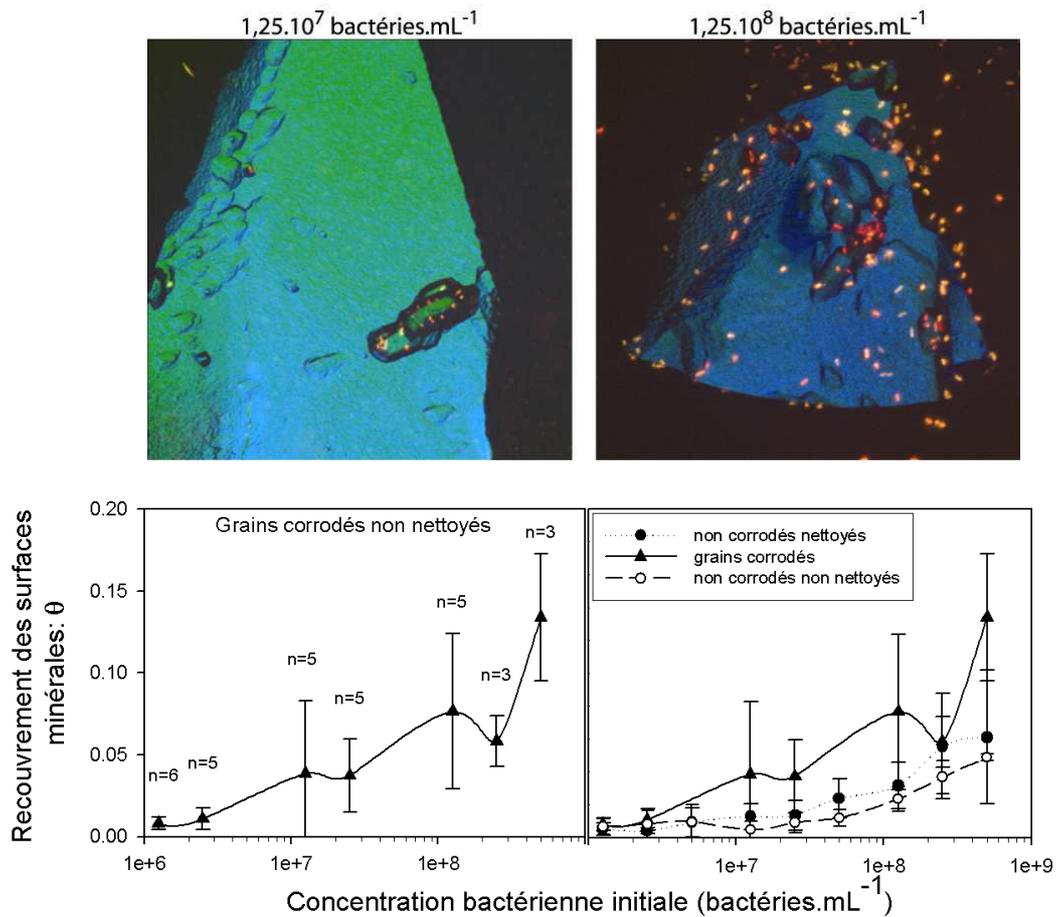


Figure C4. 14 : Images CLSM et évolution du taux de recouvrement des surfaces minérales de grains de pyrite préalablement bio-corrodés (moyenne±sd) en fonction de la concentration bactérienne initiale en solution. Le nombre de répétition par point est donné par n=X. Les données de recouvrement sur des grains de pyrite non corrodés sont rappelés pour comparaison.

Le Tableau C4. 3 récapitule les résultats obtenus au cours des trois traitements. Cette augmentation de recouvrement des surfaces par les bactéries, dans le cas de grains corrodés, peut être attribuée à :

- (1) l'augmentation de surface engendrée par la corrosion perforante qui n'est pas totalement traduite sur les projections 2D.
- (2) une augmentation significative du nombre, ou de l'affinité, de sites d'adhésion pour les bactéries au niveau des zones corrodées.

Tableau C4. 3 : Recouvrements bactériens sur des surfaces de grains non corrodés (nettoyés ou non) et corrodés en fonction de la concentration bactérienne initiale. Le degré moyen de corrosion et le recouvrement des zones corrodées (θ_1) sont indiqués pour les grains corrodés.

Densité bactérienne initiale (bactéries.mL ⁻¹)	θ (%) Non corrodés Nettoyés	θ (%) Non corrodés Non nettoyés	Grain corrodés		
			θ (%)	Degré de corrosion $\Sigma S^1/S$	θ^1 (%)
1,25.10 ⁶	0,5	0,7	0,8	0.094	5,3
2,5.10 ⁶	0,4	0,8	1,1	0.095	6,8
5.10 ⁶	0,9	1,0			
1,25.10 ⁷	1,3	0,5	3,9	0.145	9,9
2,5.10 ⁷	1,4	0,9	3,7	0.219	6,9
5.10 ⁷	2,4	1,2			
1,25.10 ⁸	3,2	2,4	7,6	0.106	12,7
2,5.10 ⁸	5,6	3,7	5,8	0.078	11,1
5.10 ⁸	6.1	4.9	13.4	0.199	23.0

Hypothèse (1) :

La surface géométrique exprimée sur les grains corrodés est sous-estimée par cette méthode de calcul sur les projections tomographiques (en XY) alors que les figures de corrosion se propagent principalement en Z au sein du minéral. Lors du processus de corrosion par propagation de pores, la surface spécifique exprimée par le minéral augmente de manière importante sans variation globale de granulométrie (Mustin *et al.*, 1992b) et sans effet sur la surface projetée des grains. Les pourcentages de recouvrement bactérien sont donc légèrement surestimés.

En général, les figures de corrosion ont une forme de pyramide tronquée ou d'obélisque à base hexagonale irrégulière. Les surfaces supplémentaires engendrées par la formation de ces figures de corrosion ainsi que le volume de matériel dissous au cours de l'oxydation peuvent être estimés à partir des images CLSM.

Les parois de la figure de corrosion sont considérés comme l'association de 2 types de trapèzes répétés 2 fois pour le premier (grands côtés de longueur b) et 4 fois pour le deuxième (petits côtés de longueur t). Les données directement mesurables à partir des images CLSM sont les ensembles (a,b,c), (a',b',c'), (t,t') et h (Figure C4. 15).

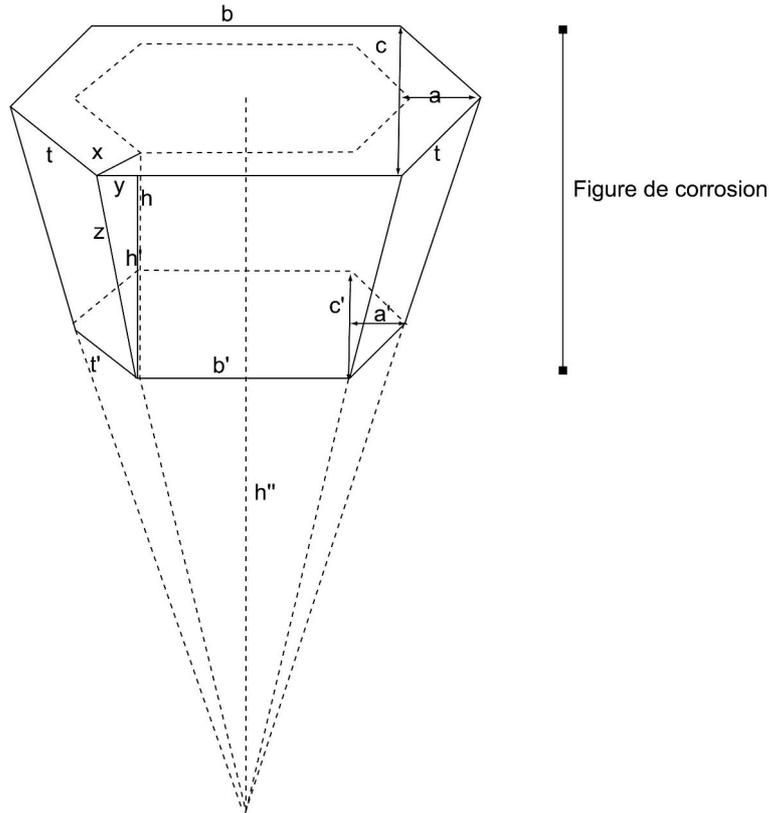


Figure C4. 15 : Forme théorique générale d'une figure de corrosion : obélisque à base hexagonale irrégulière. a, b, c : grandeurs mesurées expérimentalement permettant d'estimer l'augmentation de surface minérale exprimée par corrosion et de volume de matériel arraché.

L'aire développée par les parois de la figure de corrosion peut alors être exprimée en fonction de ces grandeurs comme suit :

$$\text{Eqn. C4. 7 : } S_{\text{petit trapèze}} = h' \cdot \frac{t+t'}{2} = \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{c-c'}{2}\right)^2 + h^2 - \left(\frac{b-b'}{2}\right)^2} \cdot \sqrt{a'^2 + c'^2} \cdot \sqrt{a^2 + b^2}$$

$$\text{Eqn. C4. 8 : } S_{\text{grand trapèze}} = h' \cdot \frac{b+b'}{2} = \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{c-c'}{2}\right)^2 + h^2 - \left(\frac{b-b'}{2}\right)^2} \cdot (b+b')$$

$$\text{Eqn. C4. 9 : } S_{\text{totale}} = 2S_{\text{grand trapèze}} + 4S_{\text{petit trapèze}} + S_{\text{fond}}$$

$$= c' \cdot (a'+b') + \sqrt{\left(\frac{c-c'}{2}\right)^2 + h^2 - \left(\frac{b-b'}{2}\right)^2} \cdot [b+b' + 2\sqrt{a'^2 + c'^2} \cdot \sqrt{a^2 + b^2}]$$

L'augmentation de surface ΔS exprimée après la formation d'un trou de corrosion est donnée par :

Eqn. C4. 10 :

$$\Delta S = S_{\text{totale}} - S_{\text{initiale}} = c' \cdot (a' + b') + \sqrt{\left(\frac{c-c'}{2}\right)^2 + h^2} - \left(\frac{b-b'}{2}\right)^2 \left[b + b' + 2\sqrt{a'^2 + c'^2} \cdot \sqrt{a^2 + b^2} \right] - c \cdot (a + b)$$

Le volume V de matériel arraché peut s'estimer à :

Eqn. C4. 11 :

$$V = \frac{c \cdot (a + b) h''}{3} - \frac{(h'' - h) \cdot c' \cdot (a' + b')}{3} = \frac{h}{3} \left[\frac{\sqrt{b'^2 + c'^2}}{\sqrt{b'^2 + c'^2} - \sqrt{b^2 + c^2}} (c \cdot (a + b) - c' \cdot (a' + b')) + c' \cdot (a' + b') \right]$$

Il est souvent délicat sur les images de distinguer nettement le fond de la figure de corrosion et de déterminer précisément les paramètres précédemment évoqués. Toutefois, il est possible de considérer, en première approximation, que les figures de corrosion se rapprochent de prismes à base hexagonale. Dans ce cas, on a alors :

Eqn. C4. 12 : $V = S_{\text{base}} \cdot h$

Eqn. C4. 13 : $S_{\text{réelle}} = S_{\text{base}} + \sum_{i=1}^6 S_i$ avec S_i les surfaces de chaque côté du prisme.

Ce calcul, réalisé sur quelques figures de corrosion imagées, permet d'avoir une estimation de l'erreur commise sur la détermination des surfaces (Tableau C4. 4).

Tableau C4. 4 : Calcul de la surface « réelle » développée par les parois des figures de corrosion du minéral en comparaison des surfaces basales des figures de corrosion de plusieurs images CLSM. Le volume des morphologies est également donné.

Profondeur (µm)	Surface projetée (µm ²)	Surface réelle (µm ²)	N _s ¹	% erreur	Volume (µm ³)
1.64	23.2	30.3	3.2	24	49.8
2.46	26.5	53.7	13.4	51	132.2
0.984	20.9	19.1	10.7	9	18.8
3.116	103.5	142.2	16.5	27	443.1

L'erreur de calcul sur les surfaces projetées peut atteindre 50%. Cette erreur peut être corrigée seulement sur une faible partie des images réalisées. Une représentation statistique des morphologies de corrosion, corrigées de cette erreur, ne peut donc pas être obtenue. D'autre part, le nombre de bactéries imagées dans ces figures de corrosion ne peut être estimé de manière fiable. En effet, les parois des figures de corrosion les plus profondes présentent un nombre inconnu de bactéries adhérentes car empilées verticalement.

Par la suite, tous les calculs (taux de recouvrement et surface des figures de corrosion) seront établis à partir des projections des plans focaux. L'erreur commise peut être considérée comme globalement identique d'un grain à l'autre. Cette approximation reste toutefois valable pour la plupart des grains, notamment lorsque les figures de corrosion sont peu profondes. La sous-estimation de la surface réelle du minéral ne biaise donc pas réellement les déterminations des taux de recouvrements bactériens des surfaces minérales.

Hypothèse (2) :

Peut-on pour autant attribuer le doublement du taux de recouvrement moyen des pyrites bio-corrodées, par rapport à celui établi pour les non corrodées, à cette seule approximation de la surface minérale ? En effet, si les phases oxydées de surface ne semblent pas influencer l'adhésion bactérienne, il est indéniable que les figures de corrosion sont rapidement et fortement colonisées par les bactéries (Cf. θ^1 , Tableau C4.2). Une étude approfondie de la localisation des bactéries dans ces figures de corrosion pourrait permettre de déterminer l'affinité spécifique des cellules microbiennes pour ces régions particulières.

2.2.3 Sites d'adhésion de surface

Méline (1995) a proposé un modèle dans lequel l'adhésion de *A.f.* sur la pyrite était gouvernée par l'expression de sites en surface du minéral favorisant ou non l'adhésion bactérienne. Les résultats obtenus ici par CLSM sont en accord avec ce modèle précédemment établi. Les sites à fort potentiel d'adhésion correspondraient à des cathodes minérales, susceptibles de fournir aux bactéries les électrons nécessaires à la réalisation de leur métabolisme.

Aux plus faibles concentrations, les taux de recouvrement indiquent que toutes les bactéries initialement introduites en solution adhèrent au minéral. En revanche, le nombre de bactéries disponibles pour l'adhésion ne serait pas suffisant pour saturer tous les sites à forte énergie (cathodes) exprimées en surface de la pyrite. L'augmentation progressive du nombre de bactéries libres susceptibles d'adhérer à la surface minérale aboutirait à une saturation progressive de tous les sites, des plus énergétiques vers les moins énergétiques (autres sites que des cathodes).

La proportion de bactéries adhérentes ne dépendrait donc pas seulement de la quantité de bactéries en solution mais également du nombre de sites « actifs » exprimés en surface du minéral.

Dans cette hypothèse, les figures de corrosion, qui correspondent aux anodes du minéral, ne devraient pas être colonisées par les bactéries. Or, toutes les images CLSM réalisées indiquent l'inverse (Figure C4. 16), même lorsque les minéraux sont mis au contact d'un inoculum à faible concentration bactérienne (1.10^6 bactéries.mL⁻¹).

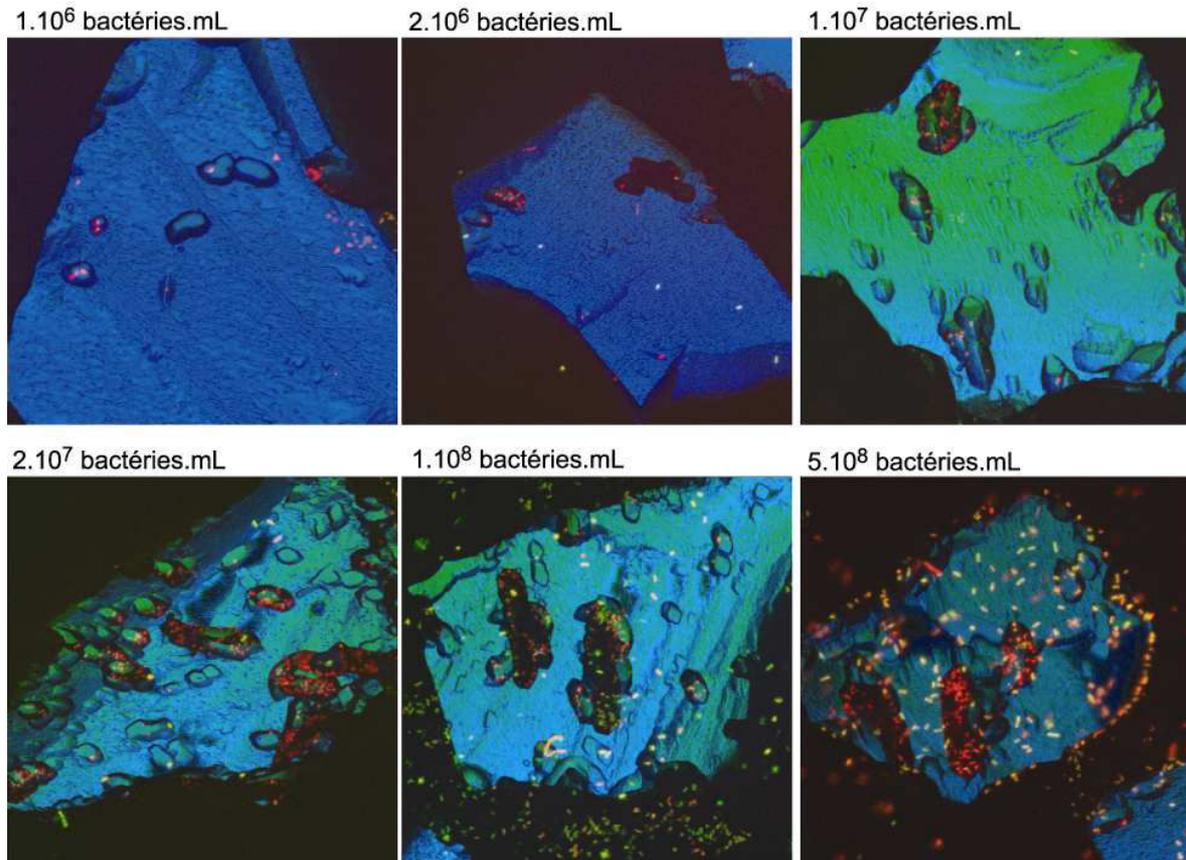


Figure C4. 16 : Observations CLSM de grains de pyrite de granulométrie 52-80 μ m en présence d'inocula de *A.f.* de concentrations bactériennes différentes.

La structure interne et le comportement électrochimique de ces figures de corrosion sont donc sûrement plus complexes et influent de manière significative sur l'adhésion bactérienne.

2.3 Adhésion bactérienne/figures de corrosion

2.3.1 Recouvrement bactérien des figures de corrosion

Le taux de recouvrement bactérien moyen des figures de corrosion (θ^1) a été déterminé pour chaque grain préalablement bio-corrodé. Il augmente avec la concentration initiale de l'inoculum bactérien. Le degré moyen de corrosion des grains ($d = \Sigma S^1/S$) ne présente pas

d'évolution particulière (Figure C4. 17). Il peut être considéré comme constant pour tous les grains et n'influe donc, *a priori*, pas sur les taux de recouvrement bactérien de ces figures.

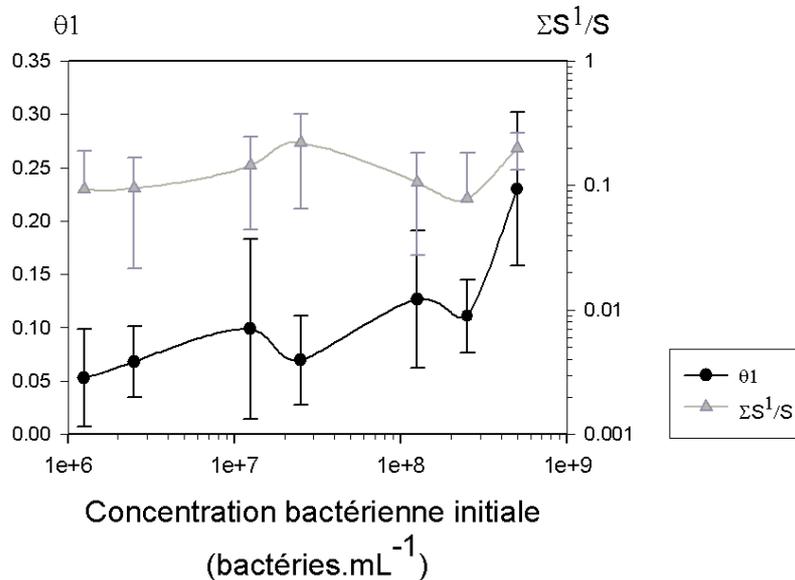


Figure C4. 17: Taux de recouvrement θ^1 des figures de corrosion des grains de pyrite par les bactéries (moyenne \pm sd) en fonction de la concentration bactérienne initiale et degré moyen de corrosion du minéral ($\Sigma S^1/S$).

Les valeurs moyennes de θ^1 sont supérieures aux taux de recouvrement total des mêmes grains déterminés pour chaque concentration bactérienne (de 5,3 à 23,0% pour θ^1 contre 0,8 à 13,4% pour θ). Par ailleurs, la Figure C4. 18 indique que les bactéries adhèrent très vite au niveau des figures de corrosion. Alors que le recouvrement moyen des surfaces de pyrites (θ) augmente avec la concentration bactérienne de l'inoculum de départ, le rapport N_{S1}/N_S , qui traduit la proportion de bactéries adhérentes sur les parois des figures de corrosion par rapport au nombre total de bactéries adhérentes, atteint rapidement un maximum. Ainsi, jusqu'à 60% (en moyenne) des bactéries adhérentes pourraient se retrouver au niveau des figures de corrosion alors que celles-ci ne représentent que 13% (en moyenne) de la surface minérale totale.

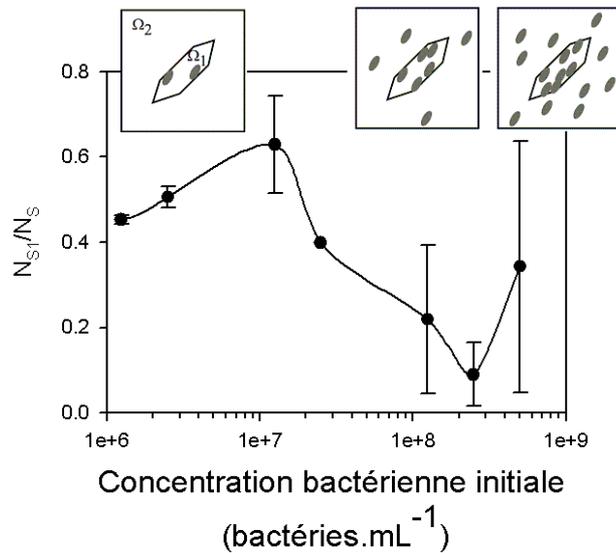


Figure C4.18 : Proportion de bactéries adhérentes dans les figures de corrosion (moyenne \pm sd) par rapport au nombre total de bactéries adhérentes en fonction de la concentration de l'inoculum bactérien.

Les figures de corrosion constituent donc bien des sites à forte énergie très favorables à l'adhésion et associeraient :

- des zones anodiques majeures du minéral, au fond des figures où la dissolution est effective,
- des sites donateurs d'électrons favorables à l'adhésion de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Ces sites seront désormais appelés cathodes « proximales », proches des anodes du minéral (fond des figures de corrosion), par opposition aux cathodes distales (zones protégées de surface) éloignées des zones de dissolution.

Par ailleurs, le nombre de bactéries adhérant dans une figure de corrosion semble limité (Figure C4.19). Cette limite peut être liée à :

- un nombre prédéfini de sites favorables à l'adhésion exprimés par le minéral. Ce nombre de sites serait fonction de la surface des figures de corrosion
- et/ou un effet d'encombrement stérique autour des bactéries. A chaque bactérie adhérente correspondrait une aire ou un volume d'exclusion proportionnel à la taille de la bactérie dans lequel aucune autre bactérie ne pourrait adhérer.

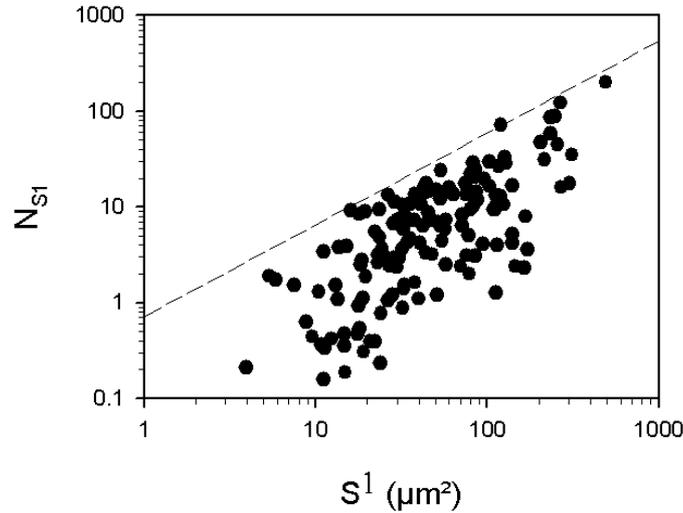


Figure C4. 19 : Corrélation entre le nombre de bactéries adhérentes dans les figures de corrosion et la taille de ces figures de corrosion (μm^2) pour toutes les points d'observation.

Lorsque la densité bactérienne augmente, ces sites seaturent et/ou l'encombrement stérique des bactéries au sein des figures de corrosion devient trop important. L'adhésion ne peut plus s'y produire. Le rapport N_{S1}/N_S diminue alors, indiquant une adhésion sur un deuxième type de site (en théorie moins favorable pour l'adhésion bactérienne) au niveau des zones non corrodées de la surface minérale (Ω^2). Le pourcentage relatif de bactéries présentes dans les figures de corrosion serait ainsi moins important, traduisant une colonisation plus homogène de la surface minérale. Ces sites à moyen ou bas potentiel d'adhésion représenteraient d'autres zones cathodiques du minéral peu actives. Aucune donnée n'a pu être acquise pour juger de la nature exacte ni de l'évolution possible de ces sites avec le temps, la cristalochimie contrôlant le degré de corrosion « acceptable » pour un grain ainsi que le nombre de « sites électrochimiquement actifs ». Il n'est pas à exclure que ces zones puissent à terme évoluer en figure de corrosion nette si un important transfert d'électrons s'établit.

A de très fortes concentrations bactériennes en solution ($>10^8$ bactéries. mL^{-1}), la majorité des sites « actifs » sont saturés et l'adhésion non spécifique se généralise.

2.3.2 Localisation des bactéries dans les figures de corrosion et circulation d'électrons

Il est important de préciser la localisation exacte des bactéries au sein des figures de corrosion afin de mettre en évidence ces sites à haute énergie qui correspondraient à des cathodes proximales du minéral.

Des coupes en Z, au niveau des figures de corrosion, ont été réalisées pour analyser les intensités (i) de réflexion du minéral et (ii) de fluorescence des bactéries, en fonction de la profondeur. La répartition et position réelle des cellules de *A.f.* dans les figures de corrosion est ainsi accessible (Figure C4. 20 et Figure C4. 21). Ces résultats montrent que :

- les bactéries ne se distribuent pas ou peu au fond des figures de corrosion,
- les bactéries se trouvent principalement sur les parois des figures de corrosion,
- la majorité des bactéries est positionnée dans le tiers inférieur des figures de corrosion.

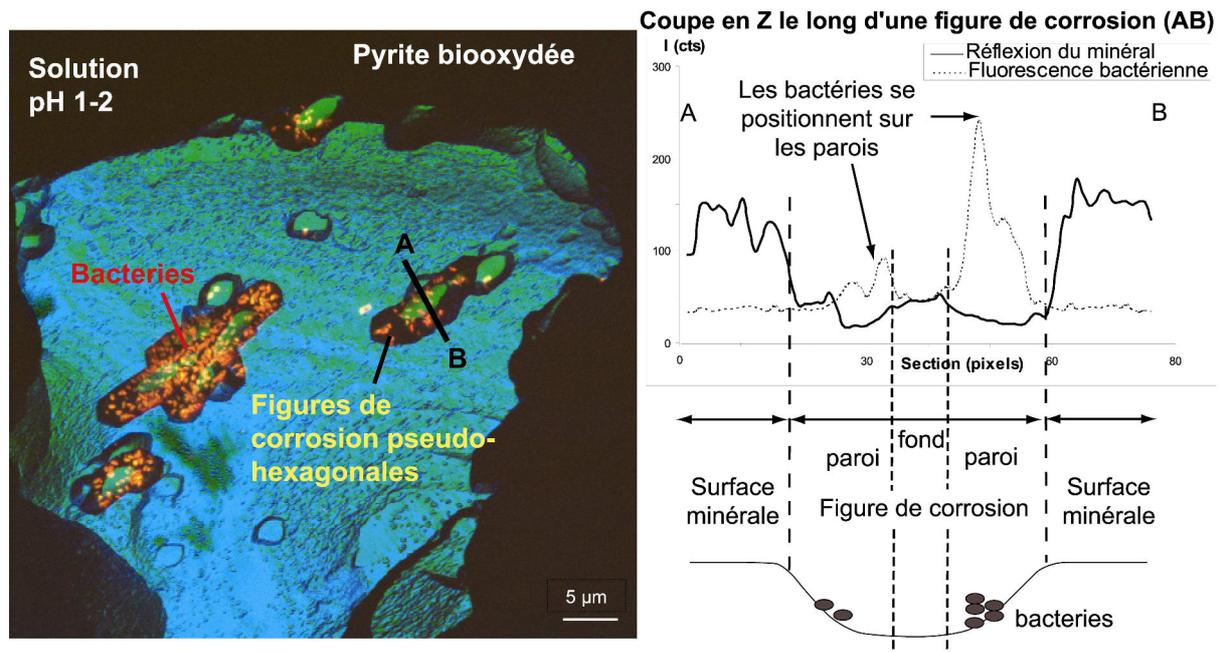


Figure C4. 20 : Localisation des bactéries au sein d'une figure de corrosion. Section verticale (XZ).

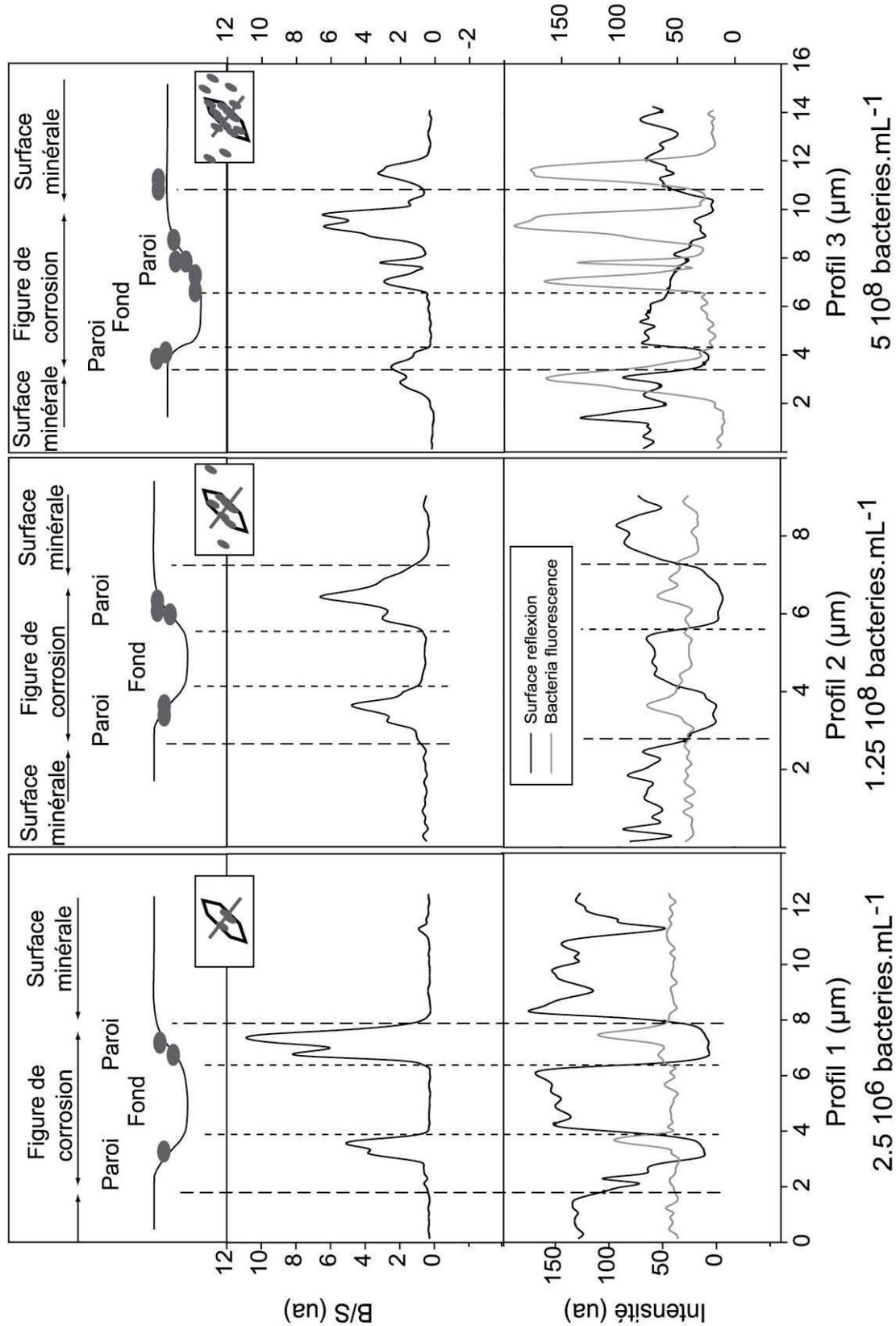


Figure C4.21 : Coupe en Z au niveau de figures de corrosion en surface de grains préalablement bio-oxydés mis en contact avec des inocula de concentration bactérienne différente. B/S : rapport des intensités de fluorescence bactérienne sur celle de réflexion du minéral.

Comme il a été précisé précédemment, les bactéries ont besoin d'une source d'électrons pour réaliser leur métabolisme cellulaire. Les fonds des figures de corrosion correspondraient aux anodes réelles du minéral où la dissolution est effective alors que les parois des figures de corrosion, et en particulier le tiers inférieur, seraient des cathodes proximales offrant des sources directes d'électrons aux bactéries. Un transfert d'électrons à petite échelle s'établirait alors, sur de relativement faibles distances, du fond des figures de corrosion jusqu'à leurs parois.

Par ailleurs, le chapitre 3 a permis d'illustrer la forte hétérogénéité de surface des grains minéraux oxydés, et tout particulièrement la présence en surface de zones dépourvues de composés d'oxydation (spectres Raman vierges). Ces zones sont assimilables à des cathodes minérales distales, protégées de la corrosion. Les bactéries observées sur la surface non altérée de la pyrite (Ω^2) adhèreraient au niveau de ces cathodes « distales ». En revanche, le transfert d'électrons entre les anodes et les cathodes distales serait moins efficace (résistance supérieure).

Les électrons du minéral sont ainsi être transférés selon deux circuits distincts (Figure C4. 22):

- A longue distance (processus distal) : du fond des figures de corrosion vers les cathodes distales où se déroulent des réactions de réduction via l'oxygène dissous, les molécules d'eau ou encore des ions ferriques. Les bactéries présentes en solution entretiennent ce transfert d'électrons par l'oxydation des ions ferreux dissous à partir du minéral en Fe^{3+} . Certaines bactéries pourraient également adhérer au niveau de ces cathodes moins efficaces et participer au maintien la circulation d'électrons.
- A courte distance (processus proximal) du fond vers les parois des figures de corrosion. Ces électrons sont directement récupérés par les bactéries adhérentes au niveau des cathodes proximales qui trouvent ainsi l'énergie nécessaire à leur métabolisme cellulaire sans passer par l'intermédiaire des ions ferreux.

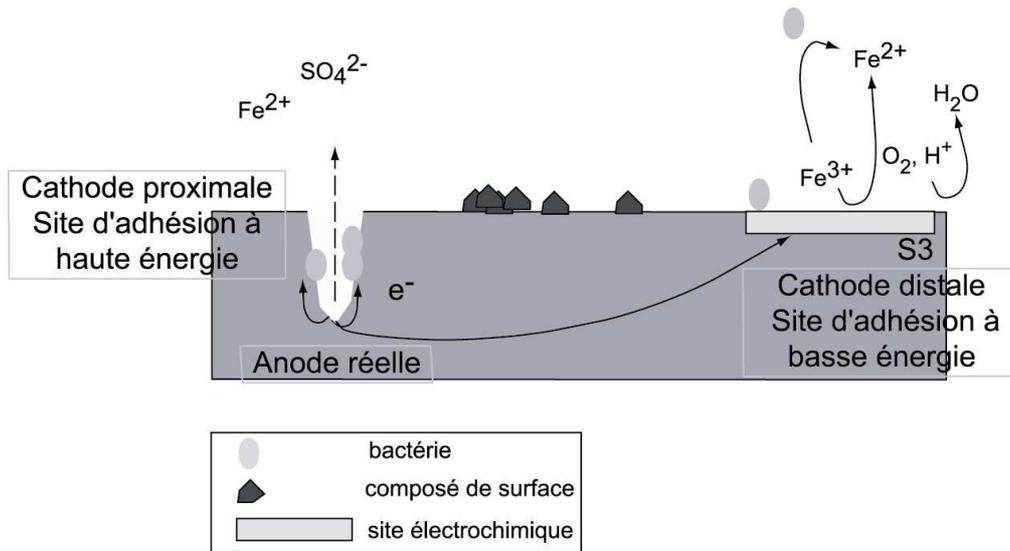


Figure C4. 22 : Schéma de la double circulation d'électrons supposée dans la pyrite et sites potentiels d'adhésion bactérienne.

Les bactéries, adhérant sur des surfaces minérales non initialement corrodées, peuvent ainsi se positionner (i) au niveau de cathodes « distales » du minéral ou (ii) au niveau de cathodes « proximales », zones globalement anodiques, où se développent par la suite les figures de corrosion intenses observées. Cette observation est valable quelles que soient les concentrations de *A.f.* introduites dans le milieu réactionnel. Les cellules adhérentes pourraient être considérées, dans ce cas, comme un indicateur de ces zones électro-actives du minéral.

2.3.3 Isothermes d'adsorption

Ces expériences d'adhésion bactériennes en surface de pyrite mettent en évidence la présence de sites de surface différents, dont deux types ont été distingués et correspondent aux ensembles Ω^1 et Ω^2 . L'évolution des taux de recouvrement des surfaces de pyrites en présence d'inocula bactériens de concentration différentes doit pouvoir être modélisée par des isothermes d'adsorption. Les modèles de Langmuir, simples et modifiés, ont été préférés au modèle de Freundlich qui ne s'appuie pas sur des développements thermodynamiques théoriques (Carter *et al.*, 1995; Grant *et al.*, 1998).

Dans notre cas, où deux sites distincts sont visuellement identifiables, un modèle d'adsorption de Langmuir simple n'est pas approprié. La visualisation de deux sites d'adhésion bactérienne a priori distincts incite à modéliser les données obtenues ici par un modèle de Langmuir multi-sites. Le taux de recouvrement de chaque site (θ_i^*) est alors exprimé par :

$$\text{Eqn. C4. 14 : } \theta_i^* = \frac{\left(b_i \cdot \frac{C_e}{C_s}\right)^n}{1 + \left(b_i \cdot \frac{C_e}{C_s}\right)^n}$$

avec : n : distribution d'énergie du site

b : la constante de Langmuir du site ou affinité.

C_e : concentration bactérienne à l'équilibre

C_s : concentration bactérienne de saturation des sites.

Le recouvrement total des surfaces est donné par :

$$\text{Eqn. C4. 15 : } \theta^* = \alpha_i \sum_i \theta_i^*$$

avec α_i paramètre géométrique correspondant à la surface S_i occupée par l'ensemble Ω^i relativement à la surface totale du grina.

Ces valeurs correspondent à un recouvrement réel en ne considérant que l'occupation des sites d'adhésion effectifs. Les ensembles Ω^1 et Ω^2 ne sont en effet pas constitués totalement de sites d'adhésion et les recouvrements déterminés à partir des images CLSM (θ , θ_1 ou θ_2) correspondent en fait à des recouvrements apparents. Un facteur géométrique existe donc entre θ^* et θ qui tient compte de la surface réelle occupée par les sites actifs sur la surface totale :

$$\text{Eqn. C4. 16 : } \theta^* = \frac{\theta}{\beta}$$

avec β_i le taux de recouvrement maximum d'un ensemble Ω^i . Ce facteur β est, en première approximation, assimilé au nombre maximal de bactéries « empilables » sur la surface. En considérant alors les bactéries comme des sphères qui se répartiraient sur les surfaces minérales selon un empilement hexagonal, β peut s'exprimer selon :

$$\text{Eqn. C4. 17 : } \beta = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} \left(\frac{d}{a}\right)^2$$

avec : d = le diamètre moyen d'une bactérie

a = la distance minimale de repoussement des bactéries entre elles.

En supposant $a = 2d$, β est alors estimé à 23%. Ceci induit une concentration de saturation C_s de $1,8 \cdot 10^{11}$ bactéries.mL⁻¹.

En considérant les recouvrements des sites θ_1^* et θ_2^* des ensembles Ω^1 et Ω^2 , les valeurs calculées directement à partir des images sont modélisées facilement avec des valeurs

de n et b respectivement égales à $1,13 \cdot 10^{-1}$ et $1,85 \cdot 10^{-2}$ pour les sites de Ω^1 (figures de corrosion) et $3,08 \cdot 10^{-1}$ et $2,11 \cdot 10^{-4}$ pour les sites de Ω^2 (surface non corrodée).

La valeur de b pour les sites de l'ensemble Ω^1 supérieure à celle des sites de l'ensemble Ω^2 traduit bien l'adhésion préférentielle des bactéries sur les sites des figures de corrosion. Cependant, les deux sites supposés efficaces pour l'adhésion bactérienne ne sont pas réellement indépendants. En effet, l'occupation des sites de l'ensemble Ω^2 (surface non corrodée de la pyrite) intervient bien avant la saturation des sites de Ω^1 (figures de corrosion). L'occupation très rapide des figures de corrosion par les bactéries rend plus difficile l'accès aux sites les plus énergétiques pour les bactéries restantes en solution. Même si ces sites ne sont pas saturés, les bactéries se stabilisent alors au niveau de cathodes « distales » à potentiel d'électron moindre, mais plus accessibles. La disponibilité des électrons est donc bien le facteur majeur contrôlant l'adhésion.

PARTIE I : PRINCIPAUX RESULTATS

- Les surfaces de pyrite oxydées abiotiquement ne présentent pas de figures de corrosion.
- La bio-oxydation favorise la formation de figures de corrosion géométriques, orientées et relativement peu nombreuses.
- L'adhésion de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur des surfaces de pyrite n'est pas aléatoire ni homogène. Deux types de sites se dégagent :
 - les parois des figures de corrosion
 - les surfaces non corrodées du minéral.
- Les bactéries sont majoritairement adhérentes au niveau de cathodes minérales et mettent en évidence l'existence de deux circulations d'électrons à courte et longue portée.

Partie II : Modélisation et analyse géostatistique des surfaces de pyrites corrodées

Les images réalisées par microscopie confocale à balayage laser permettent d'accéder simultanément à la morphologie des surfaces minérales ainsi qu'à la localisation précise des bactéries adhérentes. Les projections selon Z des coupes XY sont utilisées pour des analyses statistiques de la répartition des figures de corrosion et des bactéries (variogrammes 2D). Elles donnent également accès à une pseudo-visualisation 3D des grains minéraux imagés et une modélisation 3D de ces objets peut être obtenue à l'aide d'un géomodeleur (logiciel gOcad).

1 Principe des variogrammes 2D

Les projections des piles d'images acquises, pour chaque canal d'observation, sont converties en niveau de gris et exportées sous format gif vers un logiciel de géostatistiques (imgeo) selon la méthode décrite par Toniazzo (1998). Chaque pixel α_i est identifié par ses coordonnées dans le plan de l'image (x_i et y_i) ainsi que par son niveau de gris z_i qui contient des informations sur l'intensité de réflexion du minéral ou sur la fluorescence des bactéries (indiquant leur présence ou absence). Une variable aléatoire Z est associée à ces intensités et il est possible de calculer la variance γ_Z de Z en tout point α_j (x_j, y_j, z_j) à une distance h de α_i dans une direction θ donnée :

$$\text{Eqn. C4. 18 : } 2\gamma_Z(\alpha_i, h, \theta) = E \left[\left(Z(\alpha_j) - Z(\alpha_i) \right)^2 \right]$$

avec : $Z(\alpha_i)$: valeur de Z au point α_i

$Z(\alpha_j)$: valeur de Z au point α_j ($\alpha_i + h$)

E : espérance mathématique, moment d'ordre 1 de la variable aléatoire Z .

Le variogramme correspond au tracé de $\gamma_Z(h, \theta)$ en fonction de h dans une direction θ donnée.

$$\text{Eqn. C4. 19 : } \gamma_Z(h, \theta) = \frac{1}{N(h, \theta)} \cdot \sum_{i=1}^{N(h)} \gamma_Z(\alpha_i, h, \theta) = \frac{1}{N(h, \theta)} \cdot \sum_{i=1}^{N(h)} [Z(\alpha_i) - Z(\alpha_i + h)]^2$$

avec $N(h)$: nombre total de points α_i considérés dans le calcul (couples de pixels possibles).

Le variogramme est une fonction croissante selon h , et peut être caractérisé par 3 paramètres : la portée, le plateau (variance maximale) et l'effet pépite.

La Figure C4. 23 donne un exemple de variogrammes obtenus à partir d'une image CLSM d'une surface de pyrite corrodée, dans deux directions de l'espace (0° et 45°).

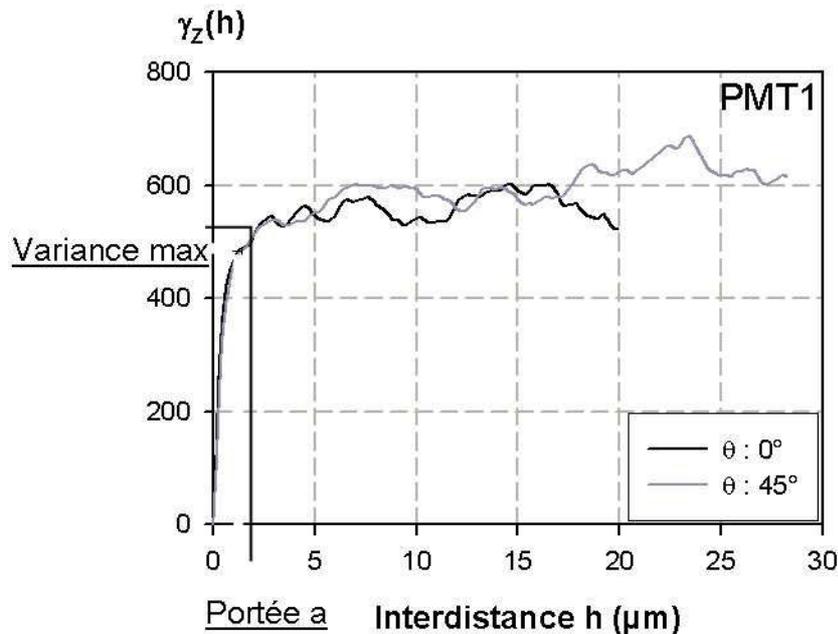


Figure C4. 23 : Tracé caractéristique de variogramme à partir d'une image CLSM réalisée sur une surface de pyrite.

La portée, notée a sur la Figure C4. 23, indique l'interdistance maximale en deçà de laquelle tous les pixels formant une structure sont corrélés et est associée à une variance maximum γ_{\max} . En d'autres termes, elle traduit la zone d'influence des structures observées. En l'absence de structures majeures en surface de pyrite, elle peut être interprétée comme la rugosité de surface, distribuée de manière homogène sur la surface des grains de pyrite. Dans ce cas, la « ligne de base » du signal de variance doit correspondre à γ_{\max} associée à la portée a . Dans le cas contraire, on note un décalage de cette ligne de base due à l'addition, dans une même courbe, de signaux de portées différentes.

Pour les images confocal, la variance maximum γ_{\max} apporte des informations sur l'hétérogénéité des intensités de fluorescence et de réflexion des surfaces observées. Pour un groupe de pixels appartenant à une même structure (fond d'une figure de corrosion, bactérie) la variance est homogène. Les parties décroissantes ou cycliques du variogramme sont dues à la présence de structures périodiques sur les surfaces minérales (effet de trou). La non-

monotonie des variogrammes donne ainsi des informations relatives à la variabilité structurale des surfaces.

Ce mode de représentation (Figure C4. 23) met en évidence la superposition, dans chaque direction, d'au moins deux signaux cycliques (pseudo-périodiques) pouvant être interprétés comme la rugosité de surface et la présence de structures de plus grande portée (les figures de corrosion par exemple). On observe ainsi un effet de structures gigognes, et le calcul de variogrammes à grande échelle inclue nécessairement des informations provenant de structures d'échelles inférieures. La réalisation de variogrammes sur une surface réduite apporte alors des informations sur l'organisation des structures locales de surface mais n'est pas représentative de l'organisation de macro-structures sur l'ensemble du grain.

2 Analyse géostatistique de grains bio-oxydés

Des variogrammes dans 4 directions de l'espace, 0° , 90° , 45° et -45° (Figure C4. 24), ont été calculés à partir d'images de grains de pyrites bio-corrodées.

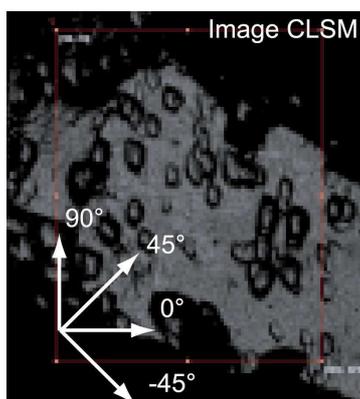


Figure C4. 24 : Directions d'analyse des images CLSM par variogrammes dans 4 directions de l'espace 2D : 0° , 90° , 45° , -45°

Ces variogrammes orientés permettent d'obtenir des informations quantitatives sur la continuité des surfaces de pyrite imagées et apportent des informations sur l'organisation des structures majeures de surface.

Ainsi, la rugosité de surface, de faible portée, se convolue avec les discontinuités structurales de plus grande portée, comme des figures de corrosion plus ou moins développées. Le variogramme doit alors être déconvolué de manière à extraire les données caractéristiques de chaque structure. La Figure C4. 25 montre un variogramme dont l'allure et

la portée, plus importante dans la direction 45° , résultent à la fois de la rugosité de surface et de l'orientation préférentielle des figures de corrosion.

Cette anisotropie structurale indique que la distribution et l'orientation des figures ne sont effectivement pas aléatoires, et qu'elles répondent à des critères minéralogiques, comme l'atteste la portée maximale observée dans la direction 45° .

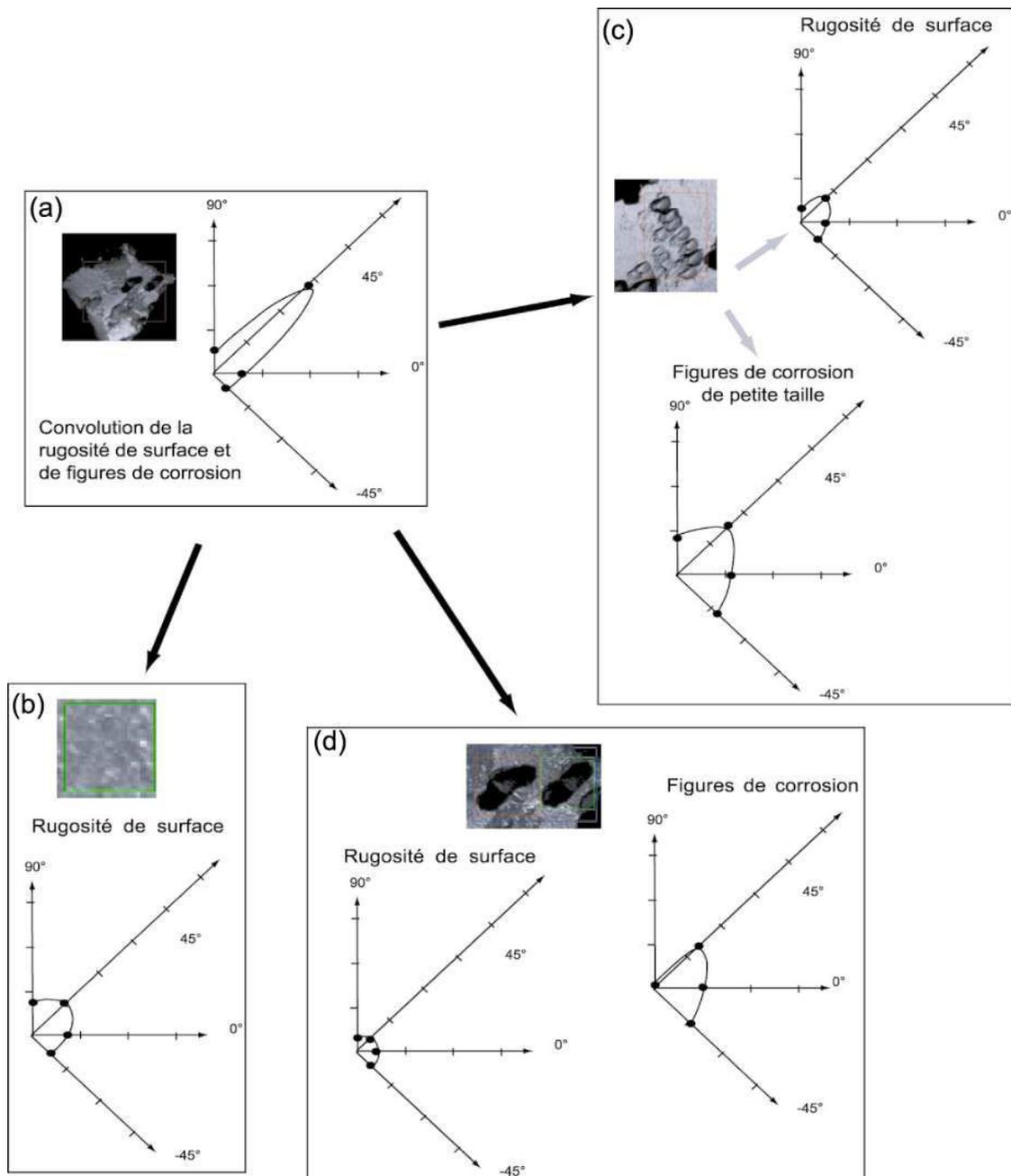


Figure C4. 25 : Diagrammes polaires de la surface d'un grain de pyrite bio-oxydé pour (a) la surface totale du grain, (b) sur une zone sans figure de corrosion (rugosité de surface), (c) un ensemble de « petites » figures de corrosion et (d) un ensemble de « grandes » figures de corrosion. Une graduation correspond à $1\mu\text{m}$.

L'analyse conjointe des images projetées contenant les informations relatives à l'intensité de réflexion du minéral et de fluorescence des bactéries permet de corréler les paramètres structuraux, purement minéraux, à la distribution des bactéries adhérentes.

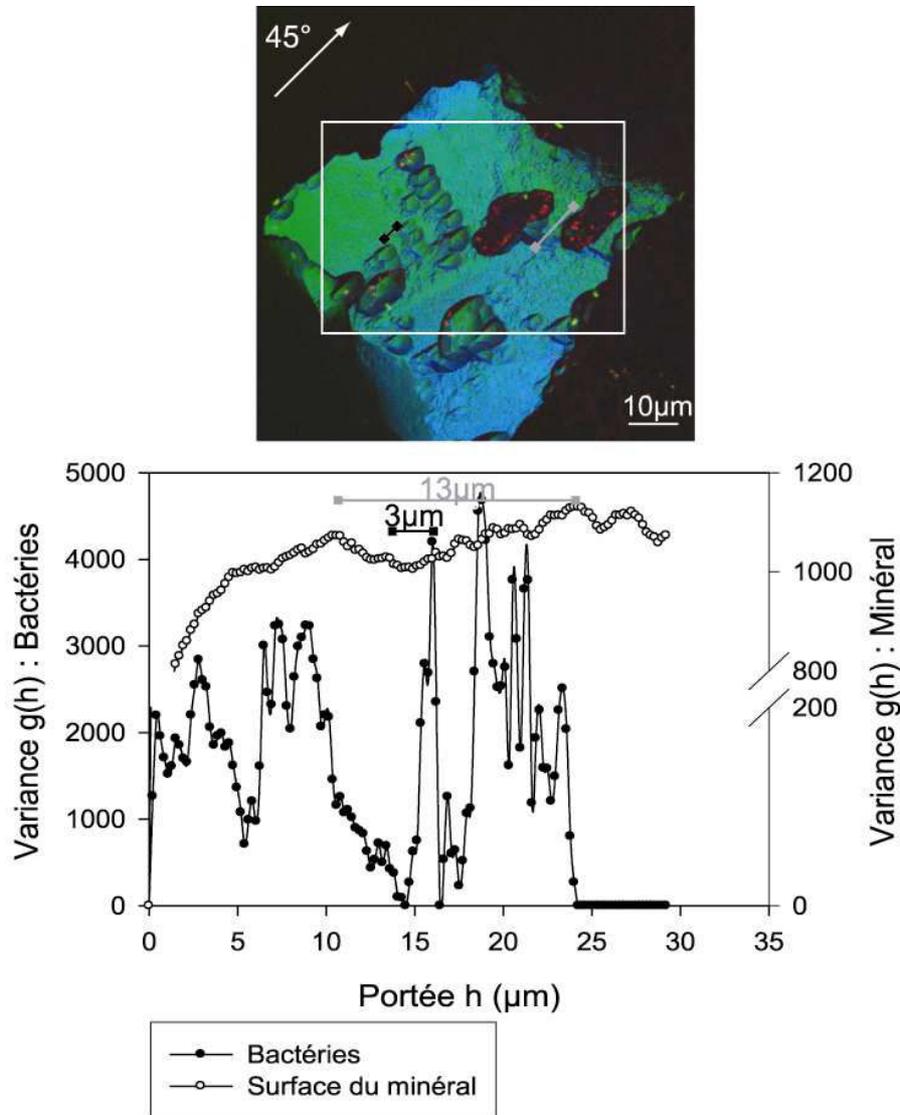


Figure C4.26 : Variogramme d'un grain imagé par CLSM.

Le signal de réflexion de la surface du minéral, sur la figure précédente, met en évidence :

- une période majeure de $13\mu\text{m}$ caractéristique de la distance séparant, dans la direction 45° , deux figures de corrosion profondes.
- une période mineure ($3\mu\text{m}$) correspondant à l'espacement moyen existant entre des figures de corrosion moins développées.

De plus l'absence d'atténuation et d'amortissement des périodes indique que ces structures sont assez régulièrement réparties à la surface du grain dans la direction 45°.

L'analyse sur le même grain de la fluorescence des cellules bactériennes met en évidence une période majeure de 14µm. Cette période correspond à une distribution des bactéries « en paquets » (cluster), chaque groupe étant espacé en moyenne de 14µm. Il est évident que cette similitude de période indique la co-localisation des bactéries et des structures minérales majeures (figures de corrosion de grande dimension) observées par réflexion du laser sur la surface des grains de pyrite.

En revanche, l'absence de portée pour le variogramme « bactérien » traduit un effet pépite, c'est à dire une variance importante à courte distance (bruit ou micro-hétérogénéité à petite échelle). Dans ce cas, cette faible portée est représentative de la taille d'une bactérie (de 0,5 à 1µm).

La Figure C4. 27 correspond au détail de l'une des deux figures de corrosion majeures de l'image précédente. Les points encerclés issus du signal de réflexion du minéral indiquent un effet de trou. L'image est en effet occupée à 50% par la figure de corrosion pour laquelle l'intensité de réflexion est quasi-nulle. Ce variogramme n'apporte pas d'information réellement pertinente car il est réalisé sur une surface ne contenant qu'une seule structure majeure. La résolution pertinente d'analyse a été dépassée. En revanche, le variogramme de fluorescence des bactéries indique la présence de plusieurs groupes de bactéries au sein de cette figure de corrosion avec deux inter-distances remarquables (2 et 4µm). Dans ce cas, ces deux pseudo-périodes traduisent une répartition non homogène des bactéries dans la figure de corrosion : distribution zonée ou anisotrope.

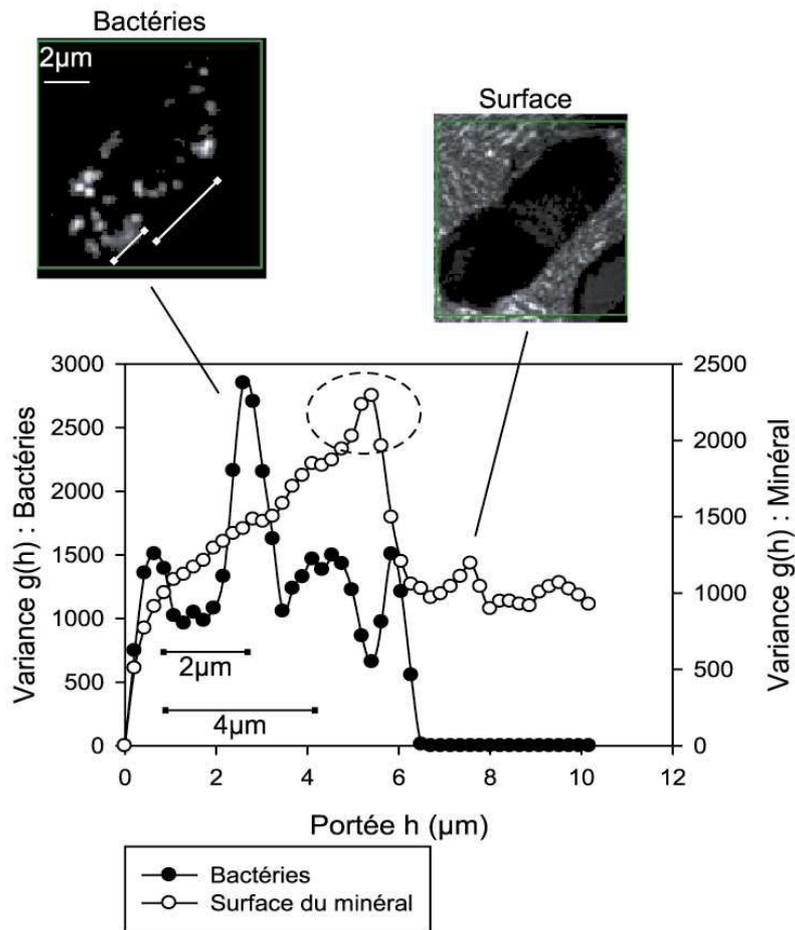


Figure C4. 27 : Variogramme réalisés dans la direction 45° sur les intensités de réflexion du minéral et de fluorescence des bactéries dans le voisinage d'une figure de corrosion.

Conclusion

L'utilisation d'images CLSM a permis de caractériser *in vivo* le processus d'adhésion et de mieux comprendre l'implication des bactéries adhérentes sur le processus de biolixiviation de la pyrite. La localisation non aléatoire de ces bactéries en surface des grains de pyrite peut d'ailleurs être quantifiée par des paramètres géostatistiques. Ces résultats confirment le lien existant entre la position des bactéries adhérentes et le développement d'une corrosion perforante de la pyrite.

Cependant, les techniques d'analyse présentées ici ont les projections dans un plan (X,Y) de structures tridimensionnelles comme données d'entrée. La quantification ainsi obtenue de la surface minérale n'est donc pas totalement représentative de la réalité. Une représentation 3D (X,Y,Z) fidèle du système grain/bactéries adhérentes serait plus adaptée à la caractérisation des paramètres évoqués.

3 Modélisation 3D de la surface de pyrite en cours de bio-oxydation : résultats de Carbonne et al (2005).

Le logiciel gOcad, largement utilisé dans le domaine des géosciences pour la modélisation d'objets 3D géologiques, peut être utilisé ici pour reconstruire, à partir des images tomographiques 2D, la surface minérale en trois dimensions. Une première modélisation 3D des images CLSM de pyrites bio-corrodées a été réalisée par Carbonne et al., (2005).

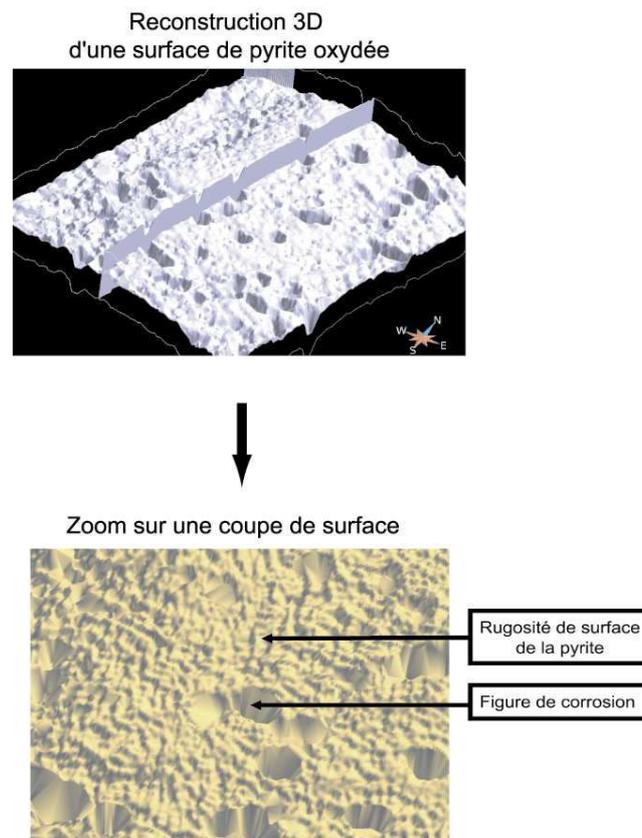


Figure C4. 28 : Reconstruction 3D d'une surface de pyrite en cours de bio-oxydation par le logiciel gOcad à partir d'images tomographiques obtenues par réflexion laser (d'après Carbonne et al., 2005)

Les résultats obtenus sont encourageants sur la possibilité de reconstruire de manière fiable en 3D les objets imaged par CLSM. Ce mode représentation permettra à l'avenir de disposer d'informations précises sur l'organisation de surface du système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite et de réaliser des analyses géostatistiques tridimensionnelles.

PARTIE II : PRINCIPAUX RESULTATS

Les analyses géostatistiques sur des plans 2D (images CLSM) confirment :

- L'orientation des figures de corrosion selon une direction « imposée » par le réseau cristallin de la pyrite : corrélation de l'orientation des figures de corrosion et de la rugosité de surface d'un grain de pyrite.

- La localisation non aléatoire des bactéries sur les surfaces de pyrite et le lien existant entre la répartition des figures de corrosion et la distribution des bactéries adhérentes.

Partie III : Synthèse sur le mécanisme de bio-corrosion de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Les résultats présentés dans ce chapitre, complétés par ceux évoqués lors du chapitre 3, permettent d'envisager un modèle d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* par propagation de pores et corrosion électrochimique. Le transfert d'électrons y est « orchestré » à la fois par les propriétés semi-conductrices du minéral et l'agent biologique. Ce modèle prend en considération deux paramètres :

- le déroulement *in vivo* du processus,
- le développement des pores et figures de corrosion.

Les 3 sites électrochimiques évoqués précédemment seront ici notés S1, S2 et S3 avec :

- S1 : les zones globalement anodiques comprenant les anodes réelles (fond des figures) et des cathodes proximales (parois des figures de corrosion),
- S2 : les zones non réactives de la surface où se développent les produits d'oxydation,
- S3 : les cathodes appelées distales de la pyrite, siège des réactions de réduction des oxydants présents en solution (Fe^{3+} , O_2).

Ce modèle phénoménologique de corrosion biotique de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* est décrit par la

Figure C4. 29.

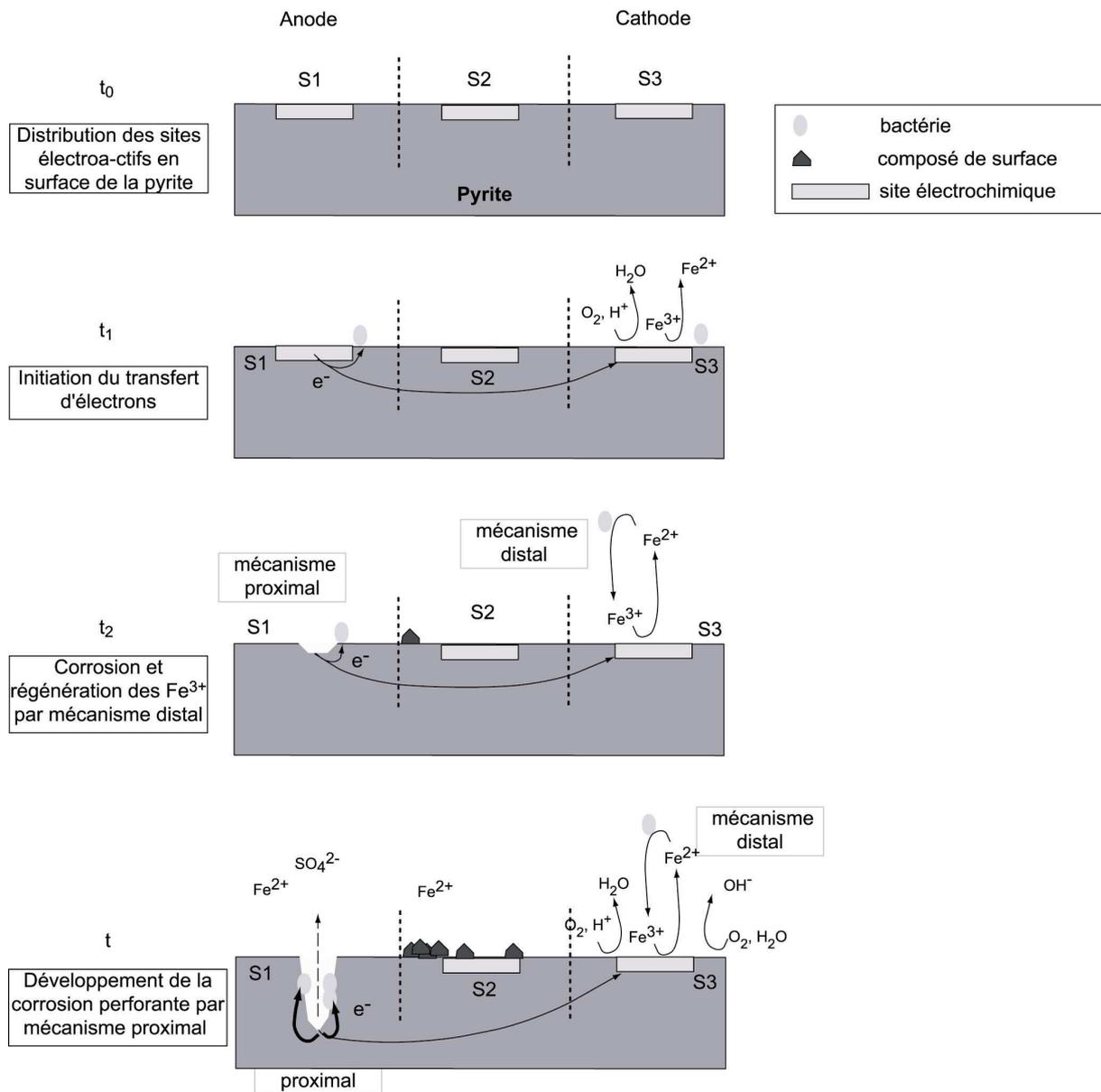


Figure C4. 29 : Modèle du déroulement de la bio-corrosion d'une pyrite en présence de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

t_0 : Etat initial de surface ;

t_1 : Initiation du phénomène de corrosion. Adhésion des bactéries dans les zones anodiques du minéral, marquant des futures cathodes locales ;

t_2 : Instauration du mécanisme distal. Apparition des figures de surface et premiers produits d'oxydation de surface ;

t : Développement des figures de corrosion en profondeur. Le système est auto-entretenu par les bactéries adhérentes. Couplage des mécanismes proximaux et distaux. Absence de passivation de la surface.

Etat initial (t_0 Figure C4. 29)

Le minéral présente des sites de surface à potentiel variable, liés à des imperfections locales du réseau cristallin ou à l'orientation et l'organisation de la maille cristalline laissant apparaître en surface des terminaisons Fe ou S de potentiel différent. Ces sites, définis par le minéral, sont stables et non modulables par le processus futur de bio-corrosion. Les bactéries, une fois introduites dans le milieu, se déplacent en solution selon un mouvement brownien.

Initiation du processus de transfert d'électrons (t_1 Figure C4. 29)

La corrosion ne s'initie qu'à partir du moment où un courant électronique s'établit entre la pyrite et un oxydant. Bien que les bactéries se positionnent très vite en surface de la pyrite, il est difficile d'affirmer que l'initiation de ce courant est due à l'effet de ces bactéries adhérentes. Il semble probable que la présence en solution d'une quantité, même très faible, de fer soit à l'origine de ces premiers transferts d'électrons. Les bactéries adhérentes au niveau des cathodes minérales peuvent alors récupérer directement les électrons en surface de la pyrite. Les couples anodes/cathodes les plus énergétiques et transférant les électrons sur de faibles distances seront favorisés. Ce processus peut être qualifié de **proximal**.

Mise en place du Mécanisme distal - Initiation des figures de corrosion (t_2 Figure C4. 29)

A travers le mécanisme proximal précédemment évoqué et le transfert d'électrons au sein de la maille cristalline, la dissolution du minéral s'amorce et une « piqûre » de la surface apparaît. La figure de corrosion ainsi initiée ne se développerait pas à partir d'un « fingerprint » bactérien. La bactérie se trouve en effet en bordure de cette zone de déstabilisation du minéral, au niveau des cathodes.

Les éléments soufrés et ferreux ainsi libérés en solution sont alors oxydés par voie chimique ou biologique. Des bactéries non adhérentes entretiennent le cycle d'oxydo-réduction du fer et augmentent la concentration d'ions ferriques en solution. Ces ions Fe^{3+} participent alors en masse à l'oxydation de la pyrite en venant se réduire dans les sites S3 cathodiques du minéral. Le transfert d'électrons à longue portée au sein du réseau cristallin de la pyrite est alors également entretenu. Ce dernier mécanisme, qualifié en général d'indirect dans les études sur l'oxydation de la pyrite, sera ici évoqué sous le terme de **mécanisme distal** par opposition au mécanisme proximal précédemment déterminé.

Le processus d'oxydation devient alors auto-entretenu et les deux mécanismes faisant intervenir les bactéries adhérentes et les bactéries en solution deviennent complémentaires. Les produits d'oxydation apparaissent en surface du grain oxydé sur des sites appelés ici S2.

Néanmoins, alors que le mécanisme proximal n'est lié qu'à l'activité directe des bactéries adhérentes sur les sites S1, ce mécanisme distal est fortement dépendant de la disponibilité d'un oxydant en solution (Fe^{3+} ou O_2).

Déroulement de la corrosion par propagation de pores - Système auto-entretenu (t Figure C4. 29).

Le système étant auto-entretenu, l'oxydation se poursuit avec une quantité non négligeable de produits d'oxydation occupant les sites S2. La surface commence à être passivée mais le système parvient néanmoins à subsister à travers une corrosion par propagation de pores. Les bactéries impliquées dans le mécanisme proximal entretiennent un flux d'électrons au sein de la pyrite. La surface développée par le minéral est alors plus importante. Les bactéries adhérentes se retrouvent sur les parois des figures de corrosion dont la géométrie et l'orientation sont contrôlées par la cristallographie du minéral oxydé. A ce point de l'oxydation, il n'est pas à exclure que le mécanisme proximal prenne le pas sur le mécanisme distal, favorisant ainsi le développement de certains pores où le transfert d'électrons est le plus efficace et les bactéries adhérentes le plus actives.

Partie IV : Biosignature morphologique ?

Les résultats présentés dans ce chapitre mettent en évidence le lien étroit existant entre les cellules de *Acidithiobacillus ferrooxidans* et les surfaces de pyrite. Il semble évident à partir des images CLSM que les bactéries ne se distribuent pas de manière aléatoire sur les surfaces minérales. De plus, une surface corrodée nettoyée de toutes traces de cellules biologiques sera colonisée de nouveau de la même manière par un nouvel inoculum bactérien. Cette localisation précise et spécifique des bactéries entraîne une attaque ciblée du minéral et favorise la mise en place et l'expression de chemins électroniques au sein de la maille cristalline. Ces circulations ciblées sont exacerbées par l'intervention des cellules bactériennes qui entretiennent et accentuent le transfert électronique en se positionnant au niveau de certaines cathodes du minéral afin de profiter de cette source d'énergie. Le minéral ne peut pas, pour autant, développer un nombre infini de lignes de champ et de morphologies de corrosion qui déstabilisent son réseau cristallin. L'attaque du minéral se fait donc de manière excessive dans certaines zones localisées. En revanche, une attaque abiotique, par une molécule chimique présente en excès dans la solution sera plus disparate, moins spécifique et, par voie de conséquence, moins accentuée. En effet, une même molécule Fe^{3+} en surface de pyrite ne peut être réduite plusieurs fois consécutivement comme peut l'être une cellule bactérienne qui récupère en continu sa source d'énergie.

Dans un cadre de détermination de biosignatures d'une attaque de pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*, la morphologie de la surface peut constituer un bon critère de détermination. En développant une attaque spécifique, les bactéries vont générer des figures de corrosion profondes, géométriques et peu nombreuses sur la surface minérale. En revanche, une attaque chimique développera les mêmes figures de corrosion, de taille plus réduite mais potentiellement plus nombreuses. La morphologie d'une figure de corrosion ne peut, *a priori*, pas servir de biosignature directement. En effet, celle-ci dépend entièrement du réseau cristallin du minéral attaqué et de la face cristalline oxydée. En revanche, l'organisation générale de la surface minérale, associant des données de degré de corrosion et de dimensions des pores, peut donner des indications sur la présence passée d'activité biologique (Figure C4. 30).

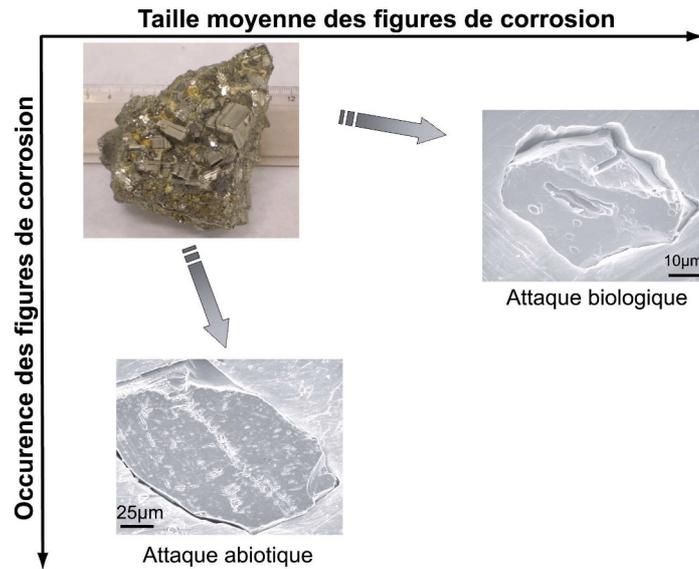


Figure C4. 30 : Critères de différenciation de signatures morphologiques d'altération biotique et abiotique sur des surfaces de pyrite.

D'autre part, dans cette étude, les observations ont été faites à partir d'un minéral très pur et peu réactif. Il est évident qu'un minéral plus réactif ou qu'une pyrite moins pure développera des figures de corrosion d'autant plus nombreuses et marquées que ce soit en attaque chimique ou biologique. Ainsi, une attaque chimique poussée, sur de longues périodes ou par épisodes successifs, pourrait engendrer une morphologie globale de surface non différenciable de celle obtenue après une attaque biologique. La morphologie des figures de corrosion semble un critère intéressant de biosignature mais qui doit être appliqué, avec prudence, sans oublier le contexte global d'étude.

Composition isotopique des produits d'oxydation de la pyrite

C
H
A
P
I
T
R
E
5

CHAPITRE 5

PARTIE I : COMPOSITION CHIMIQUE ET ISOTOPIQUE DES LIXIVIATS	240
1 SUIVI DE LA CHIMIE DES LIXIVIATS LORS DE L'OXYDATION DE LA PYRITE	240
2 DISSOLUTION INCONGRUENTE DE LA PYRITE	244
3 COMPOSITION ISOTOPIQUE DU MILIEU REACTIONNEL	246
3.1 COMPOSITION ISOTOPIQUE DES MOLECULES D'EAU	246
3.2 COMPOSITION ISOTOPIQUE DES SULFATES DISSOUS	248
PARTIE II : COMPOSITION ISOTOPIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION EN SURFACE DE PYRITES OXYDEES	252
1 FRACTIONNEMENT DE MASSE INSTRUMENTAL	252
2 CONTAMINATION BACTERIENNE ?	253
3 IMAGES ISOTOPIQUES : HETEROGENEITE DE SURFACE INTRA-GRAINS	254
4 PROFILS EN PROFONDEUR : MISE EN EVIDENCE D'UNE HETEROGENEITE DE SURFACE INTRA-GRAINS ET INTER-GRAINS	257
4.1 INFLUENCE DES ORIENTATIONS CRISTALLOCHIMIQUES SUR LES $\delta^{18}\text{O}$ DE SURFACE.	257
4.2 MORPHOLOGIE DE LA SURFACE ANALYSEE : MISE EN EVIDENCE DE TUNNELS DE CORROSION	259
4.3 SIGNATURE ISOTOPIQUE « BIOLOGIQUE » DES PRODUITS D'OXYDATION DE SURFACE ?	261
PARTIE III : MANUSCRIT SOUMIS A GCA	264
PARTIE IV : SYNTHÈSE SUR LES MÉCANISMES D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR <i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>	305
1 MÉCANISMES PROXIMAUX ET DISTAUX	305
2 PROCESSUS D'OXYDATION DE SURFACE	307
PARTIE V : BIOSIGNATURE ISOTOPIQUE ?	311

INTRODUCTION

Les résultats décrits dans les chapitres précédents ont permis de proposer un nouveau modèle d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*, à partir d'analyses *in vivo* et/ou non destructives des surfaces de pyrites bio- et chimio-oxydées. Les rôles respectifs de chacun des agents du système (bactéries et minéral) dans le déroulement et la propagation de la corrosion ont également été mis en évidence. Si le moteur de la bio-oxydation a pu être déterminé (transferts directs et indirects d'électrons), les mécanismes de surface opérant au cours de l'oxydation ne sont pas encore bien décrits. Par ailleurs, les résultats obtenus ont montré l'existence d'une très forte hétérogénéité de surface (spatiale et chimique) à échelle sub-micrométrique. Afin de caractériser plus finement les produits d'oxydation et les mécanismes à l'origine de leur formation, il est donc indispensable d'augmenter la résolution d'analyse.

Dans cette optique, l'utilisation d'outils isotopiques peut s'avérer discriminante. En effet, les sources des atomes d'oxygène incorporés dans les produits de la corrosion (en particulier les sulfates) possèdent des signatures isotopiques ($\delta^{18}\text{O}$) facilement distinguables et peuvent permettre de « pister » les chemins réactionnels impliqués dans la bio-oxydation.

Par ailleurs, le vivant favorisant en général l'accélération de processus abiotiques, des fractionnements isotopiques cinétiques importants peuvent avoir lieu au cours des bio-corrosions. Les compositions isotopiques des produits d'oxydation seraient ainsi différenciables de celles de composés formés lors de processus purement abiotiques.

Ce chapitre a donc pour but de présenter les résultats obtenus sur les compositions isotopiques des lixiviats et de la couche d'oxydation de surface de pyrite. Ces analyses « post-mortem » interviennent en fin de cycle analytique sur des échantillons qui ont pu être, au préalable, observés en microscopie ou analysés par spectroscopie Raman.

Partie I : Composition chimique et isotopique des lixiviats

Les systèmes expérimentaux en fermenteurs utilisés constituent des milieux clos dans lesquels différents compartiments interagissent :

- le compartiment « solution » qui constitue le milieu réactionnel,
- le compartiment « minéral »,
- le compartiment « biologique » : l'oxydation de la pyrite par *A.f.* étant non assimilatrice, ces dernières ne sont pas susceptibles d'incorporer des produits d'oxydation ni de constituer un réservoir « isotopique ». Ce compartiment sera donc négligé dans la suite de ce chapitre.

Comprendre les signatures isotopiques des produits d'oxydation en surface de la pyrite (compartiment minéral) passe par une description fine du mécanisme à une échelle plus globale, celle du réacteur. Cette première partie visera à décrire les compositions chimique et isotopique du compartiment « solution ».

1 Suivi de la chimie des lixiviats lors de l'oxydation de la pyrite

Avant inoculation en présence de pyrite, les bactéries ont été cultivées sur milieu sulfate ferreux à raison de 20g.L^{-1} de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans un fermenteur de 3 litres.

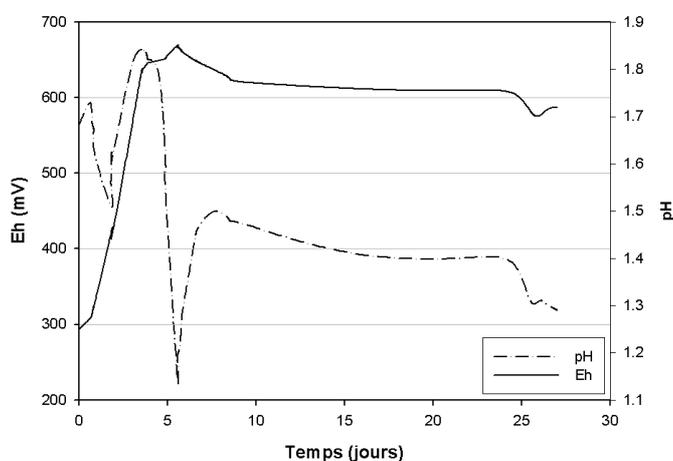


Figure C5. 1 : Suivi des paramètres physico-chimiques lors d'une culture de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur sulfate ferreux

Les bactéries ayant été inoculées en phase stationnaire de croissance, une période de latence est observée au cours des premiers jours de culture (Figure C5. 1). La brusque baisse de pH, associée à une augmentation de Eh (de 3 à 5 jours), indique l'initiation de l'oxydation du sulfate ferreux et les premières précipitations importantes de sulfates ferriques (ex : jarosite).

La biomasse ainsi produite est récupérée par centrifugation et rinçage dans un milieu 70b neuf stérile, dépourvu de source de fer ou de soufre. Elle est ensuite inoculée dans un fermenteur de 1,25 litres à une concentration bactérienne initiale de 5.10^6 bactéries.mL⁻¹ pour une pulpe de pyrite à 2% (20g.L⁻¹), de granulométrie moyenne 53-80µm. Les premiers jours de l'expérience marquent une phase de latence (Figure C5. 2) au cours de laquelle le minéral impose son potentiel (≈ 600 mV). Le processus d'oxydation se met alors en place et les ions ferreux deviennent prédominants dans le milieu. L'augmentation du potentiel (à 17 jours) marque le passage d'un milieu gouverné par les ions Fe²⁺ à une prédominance des ions Fe³⁺ qui sont régénérés par les bactéries en solution. La circulation d'électrons au sein de la pyrite, à laquelle les bactéries adhérentes peuvent participer, devient effective. Parallèlement, le pH diminue très fortement ce qui traduit l'oxydation des sulfures accélérée par les bactéries. Le système se stabilise ensuite (après 30 jours) et un palier de pH et de Eh est enregistré.

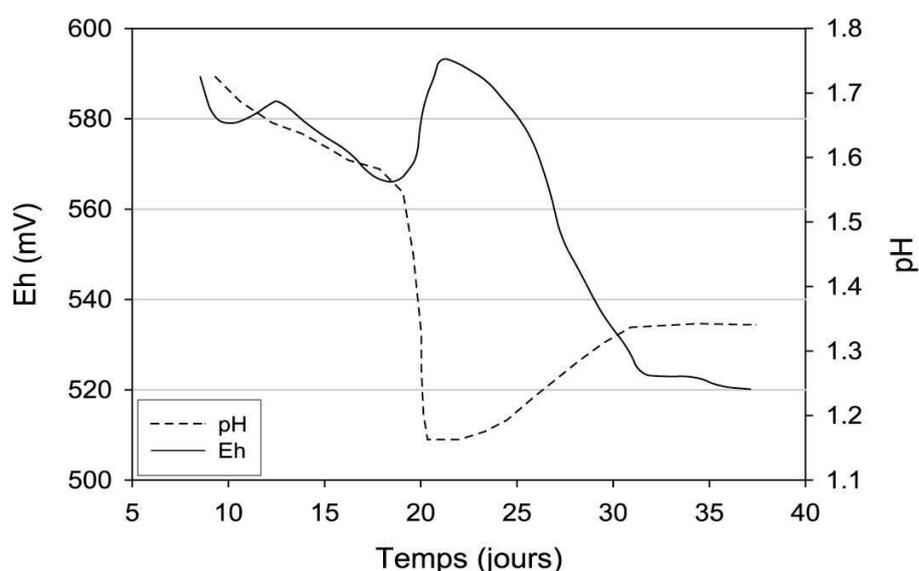


Figure C5. 2 : Suivi des paramètres physico-chimiques lors d'une culture de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur pyrite (Ferm0)

La granulométrie moyenne utilisée dans ce fermenteur (53-80µm) permet une mise en place assez rapide du processus d'oxydation et une production relativement importante de biomasse adaptée à la culture sur pyrite. A la fin de l'expérience, cette biomasse est

récupérée, centrifugée et rincée trois fois dans du milieu neuf stérile, pour être ensuite réinjectée dans les deux fermenteurs, Ferm1 et Ferm2, sur lesquels les analyses (chimiques et isotopiques) de solution et minérales ont été effectuées (Figure C5. 3).

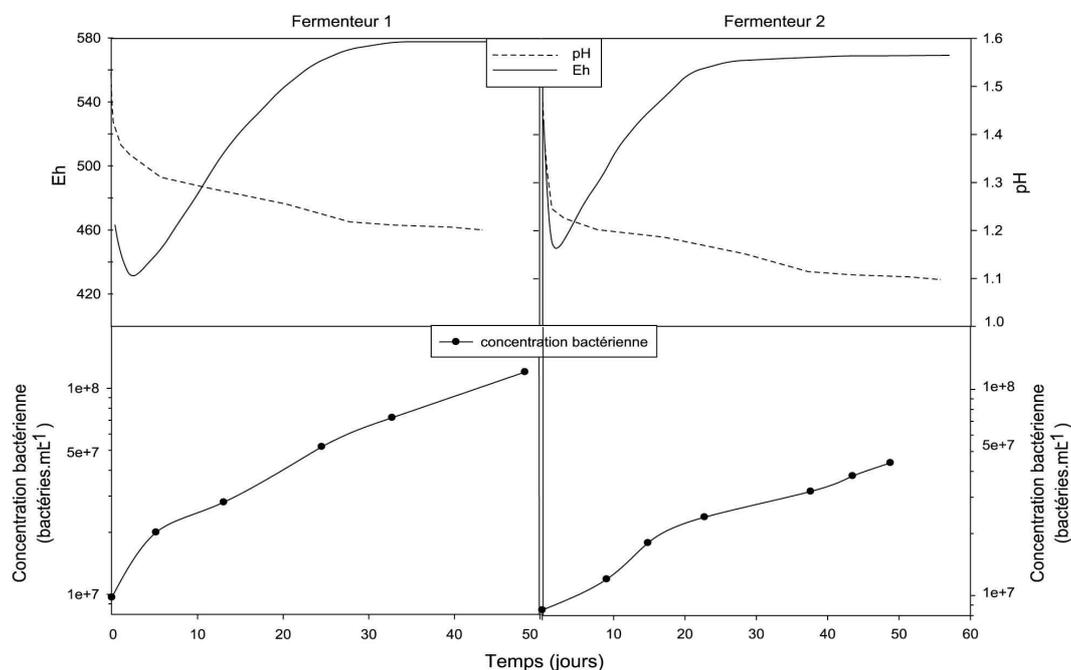


Figure C5. 3 : Suivi des paramètres bio-physico-chimiques lors de deux cultures de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sur pyrite K (Ferm1 et Ferm2).

Les bactéries inoculées dans les deux fermenteurs sont en phase exponentielle et adhèrent très vite aux surfaces minérales (Chapitre 4). La solubilisation de la pyrite s'initie assez rapidement (3-4 jours) comme l'indique l'augmentation rapide des teneurs en éléments dissous (Figure C5. 4).

Dans les deux expériences (Ferm1 et Ferm2), le pourcentage d'oxydation atteint quasiment 10% en fin de cycle (Figure C5. 5). La dissolution est légèrement plus rapide et plus importante pour l'expérience Ferm1 en raison de la taille moyenne des grains (100 μm) inférieure à celle de l'expérience Ferm2 (200 μm). Ces valeurs restent, toutefois, inférieures à celles obtenues par Toniazzi (1998) sur la même pyrite (38% d'oxydation) mais pour une granulométrie de 32-53 μm . En effet, les contraintes liées à l'utilisation de la sonde ionique (surfaces minima d'analyse de 50x50 μm) ont incité à utiliser une majorité de grains dont le diamètre moyen était supérieur à 80 μm .

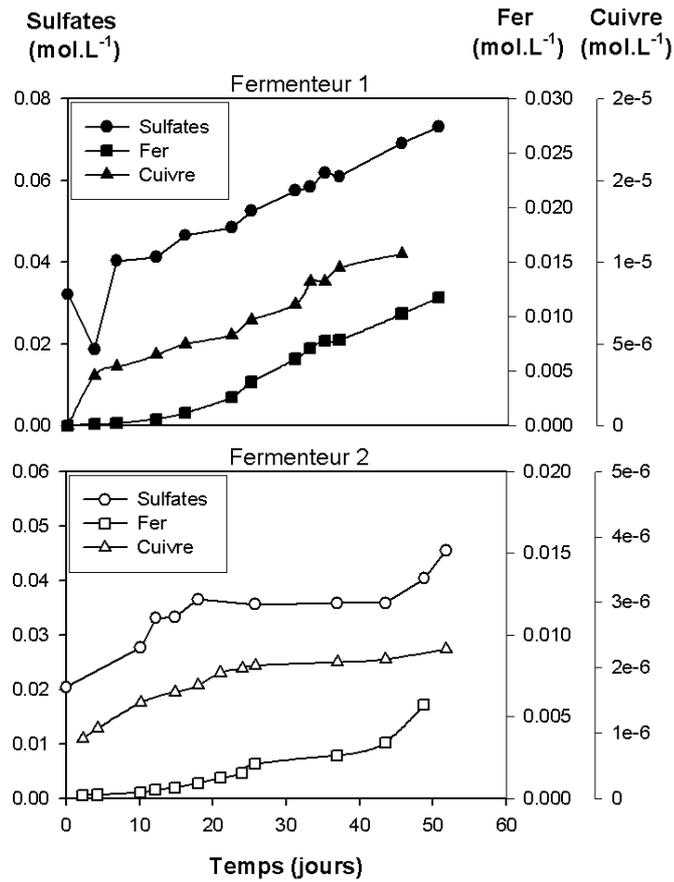


Figure C5. 4 : Suivi des éléments solubilisés lors de l'oxydation de la pyrite K par *Acidithiobacillus ferrooxidans* pour les expériences Ferm1 et Ferm2.

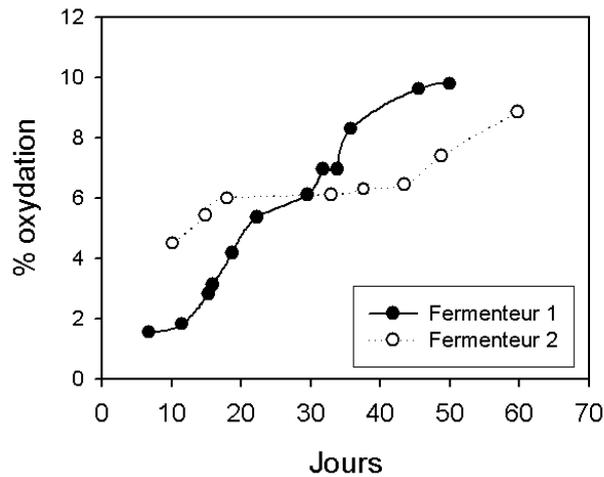


Figure C5. 5 : Pourcentage massique total d'oxydation de la pyrite au cours d'un cycle de biolixiviation par *Acidithiobacillus ferrooxidans*, dans les fermenteurs 1 et 2, calculé d'après les analyses ICP-AES des éléments (Fe, S) solubilisés à partir d'une pulpe de pyrite à 20g.L⁻¹.

2 Dissolution incongruente de la pyrite

Bien que le fer et le soufre de la pyrite puissent être respectivement oxydés, la mise en solution des éléments n'est pas forcément révélatrice du rapport S/Fe de 2 de la pyrite. On définit alors un paramètre R_{ox} (Mustin *et al.*, 1992) traduisant le degré d'oxydation de la pyrite au cours de l'expérience :

$$R_{ox} = \frac{d[SO_4]/dt}{d[Fe]/dt}$$

avec $[SO_4]$ et $[Fe]$ les concentrations respectives (en mol.L⁻¹) des sulfates et du fer solubilisés.

Ce rapport a été calculé à partir des dérivées des courbes expérimentales de solubilisation des éléments sulfates et fer au cours du temps après une régression polynomiale d'ordre 5 :

$$\text{Ferm 1 : } [SO_4] = 2.10^{-9}t^5 - 2.10^{-7}t^4 + 1.10^{-5}t^3 - 3.10^{-4}t^2 + 4,3.10^{-3}t + 4.10^{-4} \quad r^2 = 0.9754$$

$$[Fe] = 9.10^{-10}t^5 - 9.10^{-8}t^4 + 3.10^{-6}t^3 - 3.10^{-5}t^2 + 10^{-4}t + 8.10^{-6} \quad r^2 = 0.9975$$

$$\text{Ferm 2 : } [SO_4] = -2.10^{-9}t^5 + 2.10^{-7}t^4 - 1.10^{-5}t^3 + 2.10^{-4}t^2 - 4.10^{-4}t - 3.10^{-5} \quad r^2 = 0.9855$$

$$[Fe] = -1.10^{-11}t^5 + 3.10^{-9}t^4 - 2.10^{-7}t^3 + 4.10^{-6}t^2 - 1.10^{-5}t + 2.10^{-5} \quad r^2 = 0.9981$$

La Figure C5. 6 indique que la dissolution de la pyrite au cours des expériences Ferm1 et Ferm2 est incongruente et deux phases se distinguent :

- une libération majoritaire du soufre au cours des 15 premiers jours de bio-oxydation.
- un retour vers une dissolution plus congruente en fin d'expérience favorisant la libération de fer.

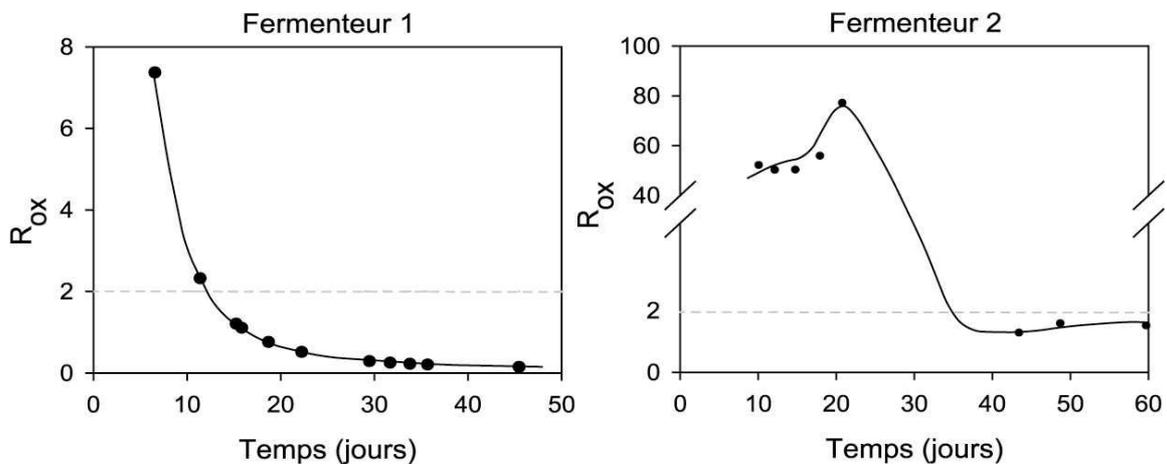


Figure C5. 6 : Evolution du taux d'oxydation au cours de la biolixiviation. La ligne horizontale en pointillées marque le rapport théorique de 2, constant au cours du temps, de la pyrite.

Cette succession de phases d'oxydation, de même que la libération majoritaire de soufre lors de l'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* a déjà été reportée (Toniazzo, 1998; Yu *et al.*, 2001). En revanche, certaines études (Demoisson, 2006; Mustin, 1992) font état d'un R_{ox} faible (inférieur à 2) au cours des premières heures du mécanisme, et donc de la libération majoritaire de fer. Ainsi, l'oxydation de la pyrite par *A.f.* se déroule en trois phases distinctes :

- la mise en solution, au cours des premières heures, d'ions ferreux qui sont rapidement oxydés en ions ferriques par les bactéries en solution.
- l'attaque de la pyrite par les ions ferriques, au cours des 10-15 premiers jours, ce qui initie une circulation d'électrons au sein de la pyrite et favorise l'oxydation, incongruente, d'un soufre des doublets S-S²⁻. Ce processus est entretenu, à longue distance (mécanisme distal) par les bactéries en solution.
- l'amplification par les bactéries adhérentes de certains chemins électroniques dans la pyrite, en récupérant directement les électrons en surface du minéral. Ce mécanisme deviendrait prépondérant après 15 jours d'oxydation. Les bactéries adhérentes favorisent ainsi le développement de figures de corrosion profondes et une mise en solution importante de matériel (dissolution congruente).

3 Composition isotopique du milieu réactionnel

3.1 Composition isotopique des molécules d'eau

La composition isotopique de l'eau du milieu réactionnel des expériences Ferm1 et Ferm2 a été suivie en parallèle de l'analyse du $\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates dissous (Figure C5.7).

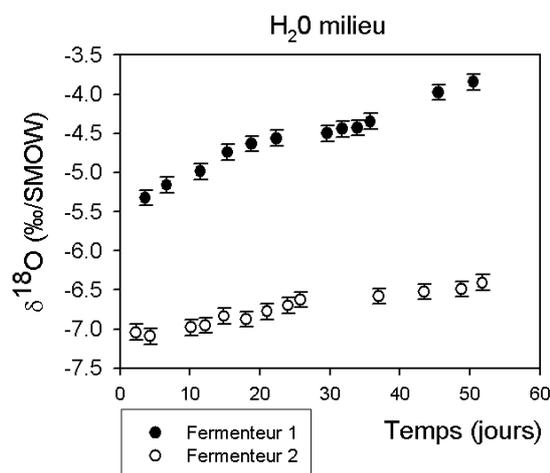


Figure C5.7 : Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ des molécules d'eau lors de deux expériences de biolixiviation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* en fermenteur (moyenne \pm erreur standard).

La valeur moyenne du $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau du milieu réactionnel augmente tout au long de l'expérience, ce qui peut être attribué à :

- l'incorporation dans les sulfates d'atomes d'oxygène des molécules d'eau au cours de l'oxydation de la pyrite.
- la respiration bactérienne.
- l'évaporation du milieu.

Incorporation d'atomes d'oxygène des molécules d'eau dans les sulfates formés.

Les oxygènes incorporés dans les sulfates dissous peuvent provenir des molécules d'eau et de l'oxygène atmosphérique dissous. Selon cette hypothèse et compte tenu de l'augmentation au cours du temps du $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau de Ferm1 et Ferm2, le $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}$ devrait être fortement négatif. Or, l'incorporation dans les sulfates d'atomes d'oxygène de l'eau s'accompagne d'un fractionnement isotopique cinétique positif, couramment reporté dans la littérature : $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} \approx +5 \pm 1\text{‰}$ en conditions abiotiques et qui varie de +8.9‰ à +18.1‰ en conditions biotiques (Taylor *et al.*, 1984a). Le $\delta^{18}\text{O}$ moyen de l'eau du milieu est donc

supposé diminuer au cours de l'oxydation de la pyrite. Cette hypothèse ne peut donc pas, en première approximation, être retenue.

Respiration bactérienne : directe ou du fer (III)

Les chapitres précédents ont permis d'établir un schéma de bio-oxydation de la pyrite dans lequel les bactéries adhérentes récupèrent directement les électrons de la pyrite au niveau de cathodes minérales. La bactérie transfère alors ces électrons, via les protéines membranaires de sa chaîne respiratoire, à l'oxygène dissous qui se réduit en formant une molécule d'eau selon la réaction :



Dans ce cas, le $\delta^{18}O$ des molécules d'eau formées reflète celui de l'oxygène atmosphérique dissous (+23,5‰). Ce processus, déjà évoqué par Krouse *et al.* (1991), Taylor *et al.* (1984a), et Suzuki (1965a; 1965b), se traduirait donc par une augmentation du $\delta^{18}O$ de l'eau du milieu.

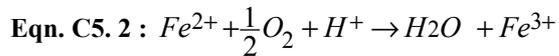
Lors de l'oxydation d'une mole pyrite, 14 électrons sont transférés du minéral vers des oxydants externes et deux moles de sulfates sont formées. En supposant que ces 14 électrons, par mole de pyrite oxydée, soient transférés aux bactéries adhérentes, le nombre maximum de molécules d'eau formées par la respiration bactérienne peut être calculé.

Tableau C5. 1 : Calcul de l'évolution du $\delta^{18}O$ de l'eau du milieu réactionnel avec l'influence de l'eau de respiration. Le nombre de molécules d'eau formées par respiration est calculée en fonction du nombre de molécules de sulfates incongruents formées.

	Nombre de mol		Nombre de molécules		$\delta^{18}O$ (‰/SMOW)	
	Ferm1	Ferm2	Ferm1	Ferm2	Ferm1	Ferm2
H ₂ O initial	69,44		4,18.10 ²⁵		-7,04	-5,32
SO ₄ formés	4,6.10 ⁻²	2,1.10 ⁻²	2,79.10 ²²	1,28.10 ²²	--	
H ₂ O respiration	--		4,89.10 ²²	2,24.10 ²²	+23,5	+23,5
H ₂ O final	--		--		-7,00	-5,30

Au cours des expériences Ferm1 et Ferm2, l'enrichissement du milieu en ¹⁸O serait de 0,57 à 0,38% et l'eau du milieu final aurait respectivement un $\delta^{18}O$ de -7,0‰ et -5,3‰ (Tableau C5. 1). Ces valeurs sont significativement inférieures à celles mesurées en fin de réaction (-6.41‰ et -3.98‰). Cette hypothèse ne peut donc suffire à expliquer l'augmentation du $\delta^{18}O_{H_2O}$ en cours de réaction.

Par ailleurs, la réaction d'oxydation des ions ferreux (Eqn. C5. 2), fortement catalysée par les bactéries, aboutit à la formation de molécules d'eau dont la composition isotopique reflète également celle de l'oxygène dissous ($\delta^{18}\text{O} = +23,5\text{‰}$).



Cette eau de « respiration du fer » a donc une signature isotopique plus élevée que celle de l'eau du milieu. Il est cependant difficile d'estimer l'implication réelle de cette réaction au cours des expériences Ferm1 et Ferm2.

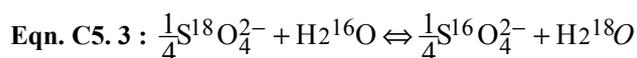
Evaporation

Une évaporation ayant été observée, et estimée au maximum à 10% du milieu, il semble probable que l'augmentation du $\delta^{18}\text{O}$ soit en grande partie contrôlée par celle-ci. Les concentrations d'éléments en solution sont donc, à partir de ce point, corrigées de cet effet d'évaporation.

3.2 Composition isotopique des sulfates dissous

3.2.1 Equilibre eau/sulfates.

Les cinétiques d'échanges isotopiques entre les molécules d'eau et les molécules de sulfates en solution sont supposées être très lentes même à pH acide (Chiba and Sakai, 1985; Chiba *et al.*, 1981; Lloyd, 1968). Le temps nécessaire pour échanger un atome d'oxygène de SO_4^{2-} avec un atome d'oxygène de H_2O s'estime de la manière suivante (Lloyd, 1968) :



$$\text{Eqn. C5. 4 : } \log t_{1/2} = \frac{2,15 \cdot 10^3}{T} + 0,44\text{pH} - 3,09$$

avec $t_{1/2}$ temps de demi-réaction exprimé en heures, et T la température en Kelvin.

A une température de 30°C (température expérimentale) et pour des pH de 1 à 2, le temps de demi-réaction d'échange d'un atome d'oxygène entre une molécule d'eau et un sulfate dissous est compris entre $2,79 \cdot 10^4$ et $7,67 \cdot 10^4$ heures (Figure C5. 8). Ces valeurs sont proches de celles extrapolées des données de Chiba & Sakai (1985). On peut ainsi exclure ce type d'échange au cours des expériences réalisées et considérer que les sulfates analysés ont conservé leur composition isotopique initiale en oxygène.

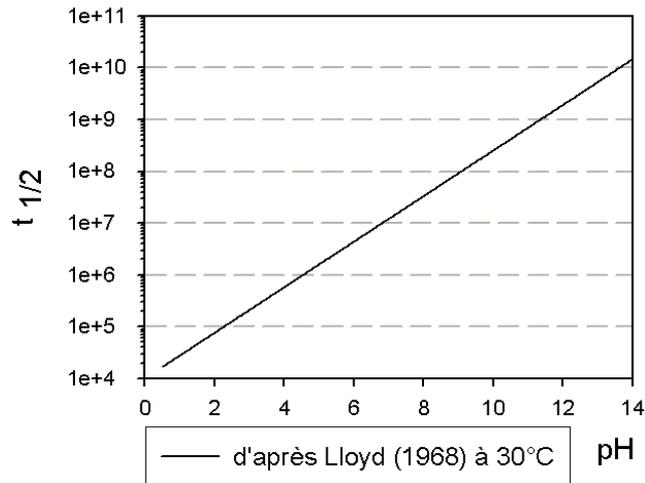


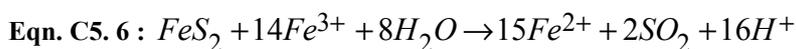
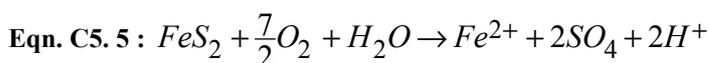
Figure C5. 8 : Evolution du $t_{1/2}$ d'échange (en heures) d'un atome d'oxygène entre un sulfate dissous et une molécule d'eau en fonction du pH, pour une température de 30°C, d'après les données de Lloyd (1968).

Si des échanges isotopiques ne sont pas envisageables entre les sulfates finaux et les molécules d'eau du milieu, on ne peut pas exclure que de tels échanges puissent intervenir au cours d'étapes réactionnelles intermédiaires. Ce phénomène est supposé minoritaire et influence *a priori* peu la valeur moyenne des $\delta^{18}\text{O}$ des sulfates de solution. En revanche, de tels intermédiaires peuvent être formés et stabilisés en surface des pyrites oxydées, générant ainsi une variabilité de $\delta^{18}\text{O}$ importante lors des analyses ponctuelles de surface par sonde ionique.

3.2.2 Composition isotopique en oxygène et soufre des sulfates dissous

Les compositions isotopiques en oxygène ($\delta^{18}\text{O}$) et en soufre ($\delta^{34}\text{S}$) des sulfates dissous ont été régulièrement déterminées pour les expériences Ferm1 (Figure C5. 9) et Ferm2 (Figure C5. 10).

Comme défini au chapitre 1, les équations globales de formation de sulfates au cours de l'oxydation de la pyrite sont généralement écrites sous la forme suivante :



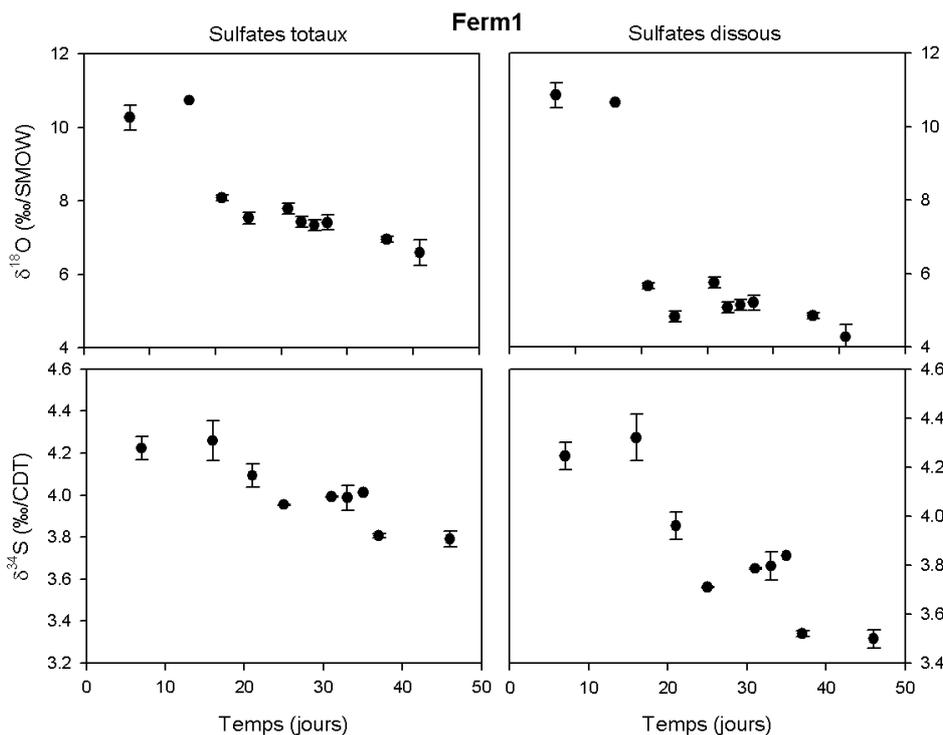


Figure C5.9 : Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ et du $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates totaux et dissous mesurés au cours du temps pour Ferm1 (moyenne \pm sd).

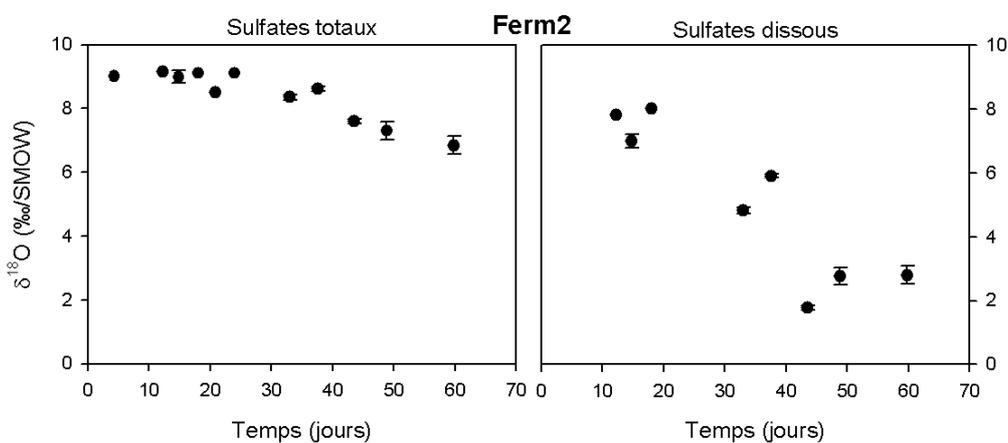


Figure C5.10 : Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ des sulfates totaux et dissous mesurés au cours du temps pour Ferm2 (moyenne \pm sd).

L'ensemble de ces données, dont les interprétations sont détaillées dans le manuscrit présenté Partie III, permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

- les $\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates dissous sont corrélés à la proportion de sulfates incongruents en solution.
- les signatures isotopiques ($\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$) des sulfates congruents et incongruents sont différentes et reflètent des mécanismes de formation distincts.

- les fractionnements cinétiques associés à l'incorporation d'oxygène dans les sulfates provenant des molécules d'eau et de l'oxygène atmosphérique dissous sont respectivement estimés à $\approx +16\text{‰}$ et $\approx -25\text{‰}$.
- les sulfates incongruents se forment par oxydation d'un atome de soufre des doublets S-S²⁻ de la pyrite et rupture de la liaison S-S. Cette rupture s'accompagne d'un léger fractionnement positif des isotopes du soufre ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}} = +0,4\text{‰}$) et de l'incorporation majoritaire dans les sulfates d'oxygène provenant de l'eau. Ce mécanisme peut s'apparenter à l'oxydation de la pyrite par les ions ferriques (Eqn. C5. 5) et traduit l'action des bactéries en solution (mécanisme distal) qui oxydent les ions ferreux libérés par la pyrite.
- les sulfates congruents se forment suite à l'oxydation des deux soufres du doublet S-S²⁻ de la pyrite et la rupture d'une liaison S-FeS₂. Le fractionnement des isotopes du soufre est cette fois légèrement négatif ($-1,3\text{‰}$) et les sulfates incorporent majoritairement des atomes d'oxygène provenant de l'oxygène atmosphérique dissous (Eqn. C5. 6) ou de l'eau issue de la respiration bactérienne. Cette signature isotopique traduirait l'effet des bactéries adhérentes en surface de la pyrite (mécanisme proximal).

Partie II : Composition isotopique des produits d'oxydation en surface de pyrites oxydées

1 Fractionnement de masse instrumental

Des standards de sulfates ont été choisis pour déterminer la valeur du fractionnement de masse instrumental à chaque session d'analyse menées à la sonde ionique. Toutes les mesures effectuées ont ainsi été corrigées de cette valeur. Cependant, bien que les sulfates soient les produits d'oxydation majoritaires en solution, les résultats obtenus par spectroscopie Raman indiquent que la « couche d'oxydation » en surface de pyrite est plus complexe. Elle est, en effet, principalement constituée d'un assemblage d'oxydes et de sulfates. Cependant, les analyses à la sonde ionique étant « aveugles », les proportions relatives de ces deux composés, pour chaque profil isotopique, ne sont pas déterminables. Une erreur est donc commise lors de la correction du fractionnement de masse instrumental sur les données brutes de $\delta^{18}\text{O}$. Des standards de sulfates et d'oxydes ont donc été analysés au cours d'une même session de mesures à la sonde ionique afin de déterminer le $\Delta^{18}\text{O}_{\text{IMF sulfates-oxydes}}$ et d'estimer l'erreur commise sur le calcul du $\delta^{18}\text{O}$ des produits d'oxydation de surface (Figure C5. 11).

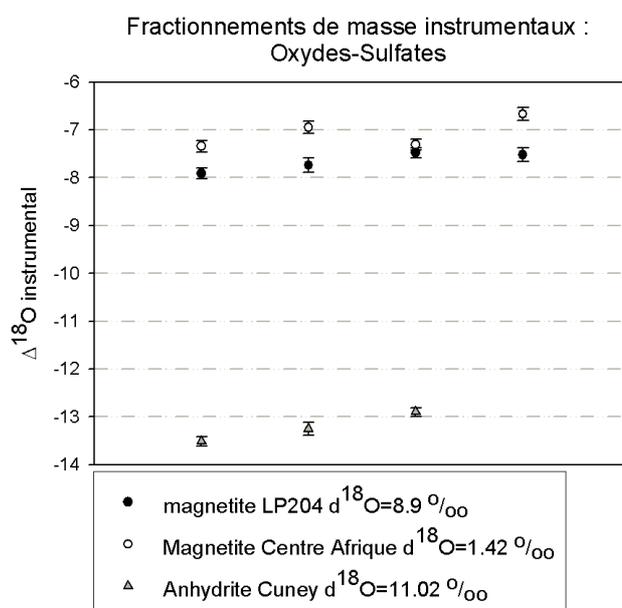


Figure C5. 11 : Fractionnement de masse instrumentaux sur des oxydes et sulfates en conditions d'analyse Faraday - Faraday

Lors d'analyses en conditions Faraday-Faraday, pour un faisceau primaire de 5nA, le $\Delta^{18}\text{O}_{\text{IMF oxydes-sulfates}}$ est de +4,86‰. Ainsi, pour un mélange homogène en surface d'oxydes et de sulfates, l'erreur sur la correction de fractionnement isotopique instrumental sera de ≈ 2 à 3‰. Compte tenu de la très grande variabilité des $\delta^{18}\text{O}$ déterminés en surface de pyrites provenant d'un même réacteur ($\approx 40\%$), cette erreur de correction peut être considérée comme négligeable et n'influe pas sur l'identification des principaux signaux isotopiques de surface.

2 Contamination bactérienne ?

Avant d'être analysées par sonde ionique, les pyrites issues de réacteurs de bio-oxydation sont vortexées cinq fois dans du milieu neuf stérile, puis séchés, afin d'éliminer toute trace bactérienne en surface. Des images MEB attestent cependant de la présence résiduelle de quelques cellules biologiques en surface des échantillons. La composition isotopique en oxygène des bactéries n'étant pas connue, leur présence en surface des échantillons pourrait contribuer au signal global analysé et biaiser les résultats.

La matière organique bactérienne étant en moyenne composée de 50% de carbone et de 30% d'oxygène (rapports C/O de 1,5 à 1,88) (Edeline, 1993; Pelet, 1981), un agrégat bactérien résiduel en surface de pyrite engendrerait un signal carboné intense. Des images de l'isotope léger du carbone (^{12}C) ont donc été réalisées en parallèle de celles des isotopes de l'oxygène (^{16}O et ^{18}O) et du soufre (^{32}S), afin de s'assurer de l'absence de bactéries en surface des pyrites.

La Figure C5. 12 présente un exemple d'images des isotopes de l'oxygène et du carbone réalisées sur un grain de pyrite bio-oxydée. L'image du ^{16}O indique la présence de deux zones particulières riches en oxygène, sur la surface du grain de pyrite. En revanche, ces deux zones ne contiennent pas de carbone. D'autre part, l'absence de signal de carbone et d'oxygène au niveau des figures de corrosion implique que ces dernières ne contiennent pas de bactéries ni de produits d'oxydation.

Des observations similaires ont été obtenues sur différents grains de pyrites bio-oxydés et impliquent que les $\delta^{18}\text{O}$ mesurés ne sont pas imputables à des agrégats bactériens résiduels mais bien à des phases minérales.

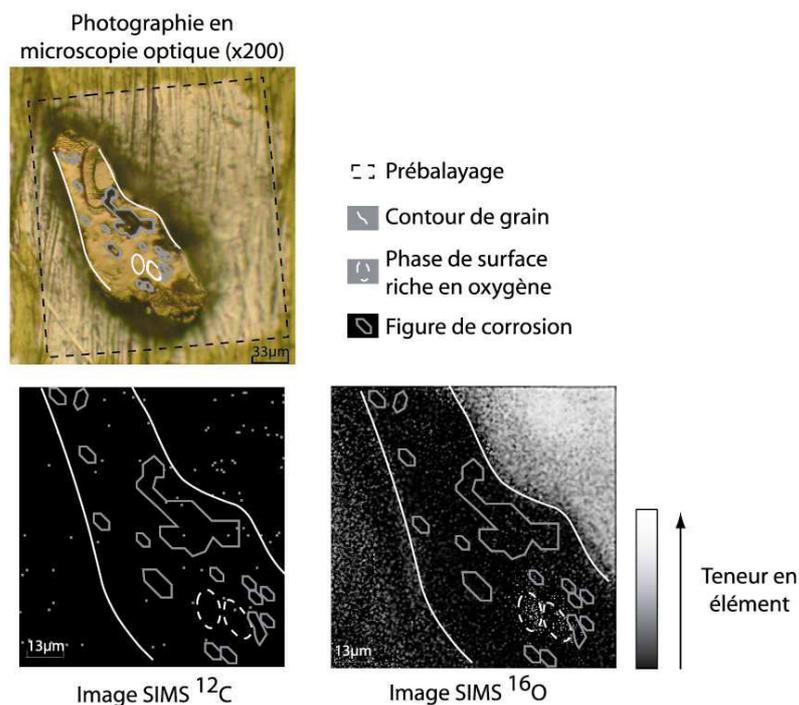


Figure C5. 12 : Images en ims 1270 du ^{12}C et ^{16}O de surface d'un grain de pyrite biooxydée. Mise en évidence de « bosses » de surface riches en oxygène mais sans contribution carbonée associée. Ces phases observées sont minérales et ne peuvent être attribuées à des agrégats ou biofilms bactériens. Les ratios $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de ces phases d'oxydation de surface sont calculés.

3 Images isotopiques : hétérogénéité de surface intra-grains

Les images isotopiques réalisées sur des pyrites bio- ou chimio-oxydées confirment les données Raman (Chapitre 3) et AFM (Toniazzi, 1998). Elles illustrent en effet l'organisation des produits d'oxydation de surface en bosses micrométriques. Elles mettent par ailleurs en évidence une très grande variabilité de $\delta^{18}\text{O}$ de ces composés, illustrée Figure C5. 13.

Les calculs de $\delta^{18}\text{O}$ réalisés à partir de ces images présentent en général une forte erreur interne due à un trop faible temps de comptage relativement à la quantité d'oxygène analysée (Tableau C5. 2 et Figure C5. 13). Par ailleurs, les diamètres moyens (plusieurs microns) des zones révélées par imagerie isotopique ne reflètent pas directement les dimensions connues des composés de surface (quelques centaines de nanomètres à $1\mu\text{m}$). Ces patches correspondent à plusieurs zones réactionnelles de surface, de composition chimique et isotopique probablement différentes. L'erreur propagée sur la mesure de $\delta^{18}\text{O}$ est ainsi plus importante. Il serait donc nécessaire de diminuer la taille du faisceau primaire et d'augmenter le temps de comptage sur des surfaces plus faibles ($5\times 5\mu\text{m}$ par exemple) afin de déterminer de manière plus fiable les $\delta^{18}\text{O}$ de ces composés de surface.

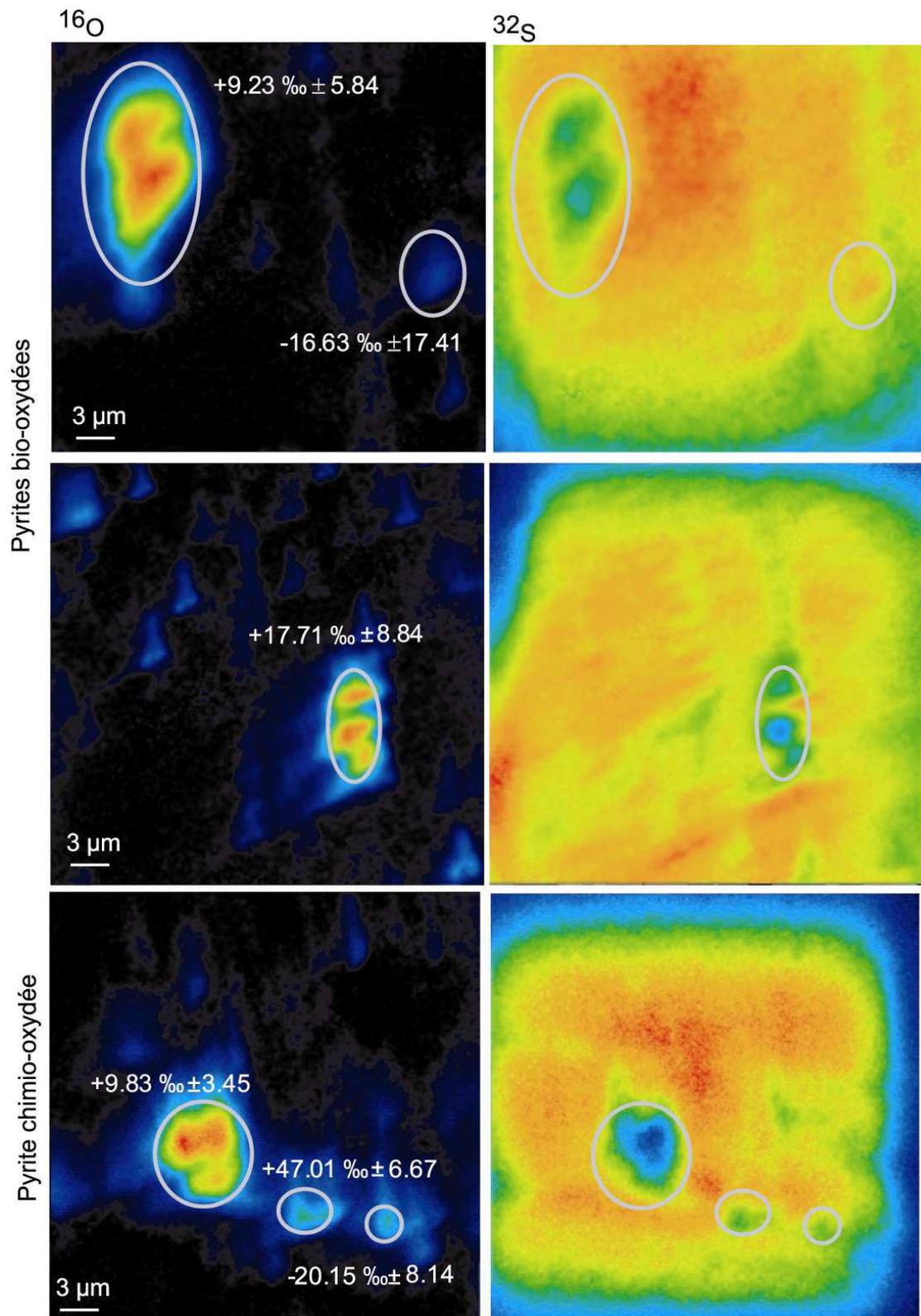


Figure C5. 13 : Images isotopiques (^{16}O et ^{32}S) réalisées sur des surface de pyrites bio-oxydées et oxydées par des ions ferriques en milieu stérile.

Les images des isotopes ^{32}S et ^{16}O permettent de calculer, pour chaque zone de surface riche en oxygène, un rapport S/O (Tableau C5. 2). Celui-ci est en principe directement corrélé à la nature chimique du composé de surface analysé. Par exemple, des oxy-hydroxydes de fer ont un rapport S/O nul alors que celui des sulfates s'élève à 0,25. Cependant, le signal de soufre est biaisé par celui de la pyrite sous-jacente et les rapports S/O calculés sont de ce fait supérieurs à ceux attendus. Ces rapports S/O calculés ne permettent donc pas de conclure sur la nature des produits analysés.

Tableau C5. 2 : $\delta^{18}\text{O}$ de produits d'oxydation de surface déterminés à partir d'images isotopiques par sonde ionique 1270.

Traitement	Echantillon	$^{16}\text{O}/\text{pixel}$	$\delta^{18}\text{O}$ (‰/SMOW)	std	S/O
A.f.	pt44	148	0.3	11.1	
A.f.	pt64	289	17.7	8.8	4.06
A.f.	pt94	115	-16.1	24.7	29.38
		121	-8.8	17.1	25.58
		148	-14.4	10.5	11.12
A.f.	pt101	239	4.5	20.2	5.94
A.f.	pt105	415	-38.0	4.1	0.29
		427	-44.0	3.6	0.00
		184	5.5	10.6	6.67
		201	-43.5	11.3	7.84
		156	-20.3	19.9	7.85
Fe^{3+}	pt125	698	9.8	3.5	1.99
		400	47.0	6.7	3.91
		358	-20.2	8.1	4.08
Fe^{3+}	pt131	216	-27.9	12.9	8.42
Fe^{3+}	pt133	133	-18.8	16.9	18.35
O_2	pt81	264	7.1	15.4	4.26
		361	-10.4	7.5	3.38
		218	2.3	11.8	10.68
		188	-34.8	12.0	2.09
O_2	pt85	238	-6.1	11.0	7.63
O_2	pt88	191	-15.6	8.8	3.99
		164	10.2	20.7	18.26

Les images réalisées permettent néanmoins de visualiser la forte hétérogénéité de surface inter-grain et intra-grain, à la fois spatiale et isotopique. Elles traduisent l'existence, en surface des échantillons de pyrite, de processus d'oxydation particuliers capables d'engendrer des fractionnement isotopiques très importants. L'utilisation de profils isotopiques en profondeurs s'avère plus discriminante pour déterminer les $\delta^{18}\text{O}$ des produits d'oxydation en surface de grains de pyrite.

4 Profils en profondeur : mise en évidence d'une hétérogénéité de surface intra-grains et inter-grains

Les analyses isotopiques en surface de grains bio- ou chimio-oxydés sont très variables (de $-33.5 \pm 1.6\%$ à $+38.5 \pm 1.2\%$), au même titre que les résultats obtenus par spectroscopie Raman ou imagerie isotopique. Dans un souci de représentativité statistique, de nombreuses mesures ont ainsi été réalisées afin de mettre en évidence :

- l'influence des faces cristallographiques de la pyrite sur la composition isotopique des produits d'oxydation.
- la morphologie des premières centaines de nanomètres des surfaces de pyrites oxydées.
- une éventuelle biosignature isotopique de surface, en s'appuyant sur la connaissance de la couche d'oxydation (Chapitre 3) et le modèle de bio-corrosion de la pyrite proposé à partir des observations *in vivo* du processus (Chapitre 4).

4.1 Influence des orientations cristallochimiques sur les $\delta^{18}\text{O}$ de surface.

Les réactivités de surface des faces cristallines de la pyrite sont, *a priori*, non homogènes et semblent favoriser le développement de produits d'oxydation variés (Chapitre 3). Des variations de $\delta^{18}\text{O}$ de ces composés de surface sont donc être attendues en fonction de la face ou orientation cristalline. Des déterminations Raman des rapports Ag/Eg et Ag/Eg_{45°}, semblables à celles décrites dans le Chapitre 3, ont donc été effectuées sur 91 grains analysés par sonde ionique afin de tenter de corréliser la nature des faces de la pyrite et les valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ mesurés sur ces mêmes échantillons (Figure C5. 14).

Quel que soit le traitement considéré, les moyennes de $\delta^{18}\text{O}$, par face, oscillent entre -10% et $+2\%$. Les quelques différences observées entre faces sont plus sûrement imputables au nombre trop faible de répétitions qu'à de réelles différences induites par le réseau cristallin. D'autre part, il avait été noté que les groupes cristallochimiques déterminés (notamment C et D) correspondaient à des associations de différentes faces cristallines (Chapitre 3). Ils ne seraient donc pas suffisamment fins pour permettre l'identification de différences significatives de $\delta^{18}\text{O}$. Par ailleurs, les signatures chimiques caractéristiques de certains groupes cristallochimiques, déterminées au chapitre 3, concernaient seulement la nature des bosses micrométriques monophasiques de surface. Or, les profils isotopiques sont réalisées sur des surfaces de $50 \times 50 \mu\text{m}$ qui englobent plusieurs zones réactionnelles et donc un nombre

conséquent, mais non déterminable de bosses mono- et polyphasiques. Ils ne permettent donc pas d'atteindre la résolution micrométrique nécessaire à l'identification d'éventuelles signatures isotopiques propres à chaque face cristalline.

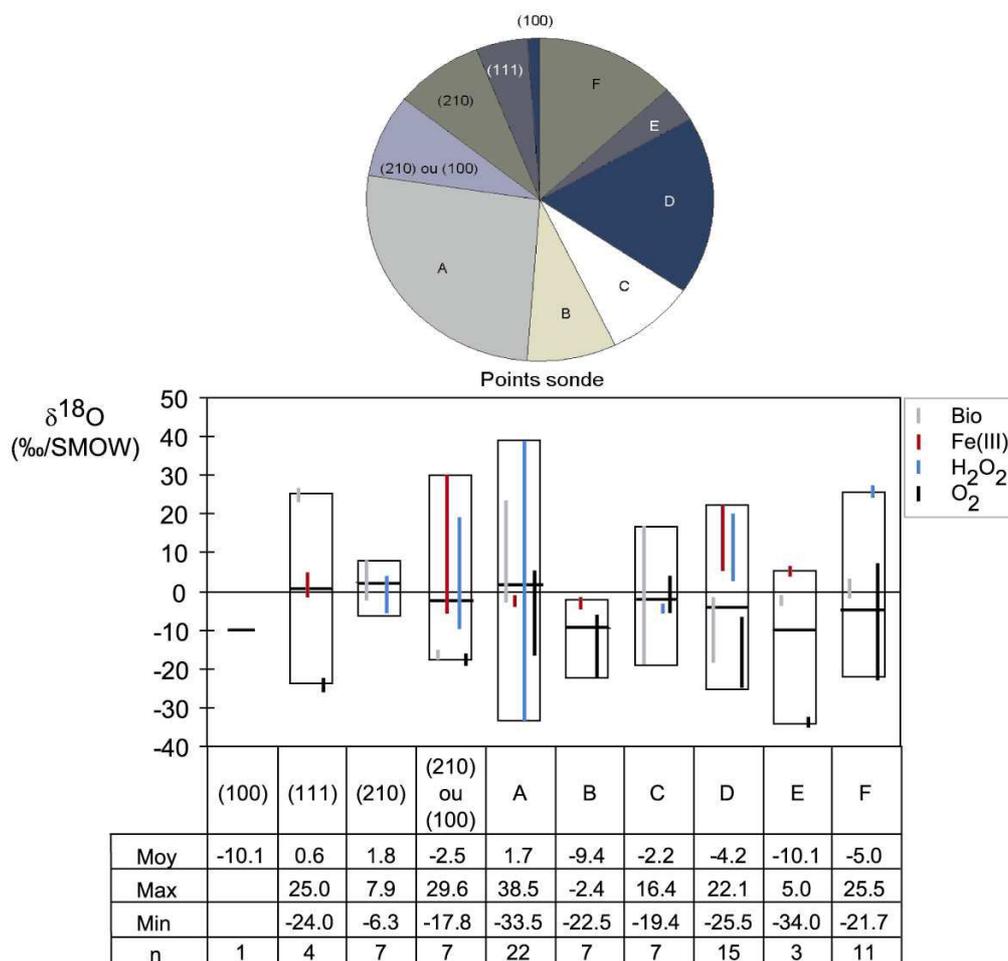


Figure C5. 14 : $\delta^{18}\text{O}$ moyen des phases de surface de pyrite oxydées selon différents traitements pour plusieurs faces ou groupements de faces. Le nombre de groupes cristallochimique rencontrés est donné par n. Chaque boîte exprime les moyennes (barres horizontales), minima et maxima des valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ sur chaque groupement cristallin. Les barres verticales donnent la dispersion des données traitement par traitement.

En conclusion, bien que les faces cristallines de la pyrite n'aient, *a priori*, pas la même réactivité, il n'est pas possible de déterminer leur influence sur la composition isotopique des produits d'oxydation de surface. On peut donc considérer que la forte variabilité des $\delta^{18}\text{O}$ déterminés sur des grains de pyrite oxydés n'est pas induite par la nature de la face cristalline analysée.

4.2 Morphologie de la surface analysée : mise en évidence de tunnels de corrosion

Les grains utilisés pour les profils en profondeur ont été prélevés à 60 jours, en fin de réacteur, pour tous les traitements. Ils ont été triés sous loupe binoculaire afin de sélectionner les surfaces à la fois planes et oxydées (présence de piqûres, zones irisées...). Les grains ne présentent, au bout de 60 jours, pas encore de figures de corrosion bien développées semblables à celles mises en évidence par CLSM et MEB après 24 mois d'oxydation. Cependant, les circulations électroniques au sein du minéral sont déjà actives et le réseau cristallin des pyrites est donc affecté. Le décapage par le faisceau de sonde ionique de la surface des échantillons met au jour les premières dizaines voire centaines de nanomètres de la pyrite oxydée. Cette profondeur de décapage, bien que globalement faible, permet néanmoins de révéler certaines structures particulières au sein des minéraux. La Figure C5. 15 met ainsi en évidence l'existence de tunnels bien développés à la verticale d'une zone de surface qui ne présentait initialement que quelques piqûres. Une coupe XZ à partir d'une image AFM réalisée sur cette zone particulière permet d'estimer la profondeur minimale de ces tunnels à 1 μm . Ils pourraient correspondre à :

- des produits d'oxydation de surface, plus tendres, dont l'extension verticale serait importante et qui présenteraient des « racines » en profondeur dans la pyrite.
- des chemins empruntés par les électrons au sein de la pyrite.
- des figures de corrosion en formation.

Cette mise en évidence, par décapage à la sonde ionique de morphologies « perforantes » prononcées a été observée sur plusieurs grains. La présence de ces tunnels profonds confirme la forte influence de la circulation électronique au sein du minéral et l'identification possible de couples anodes/cathodes.

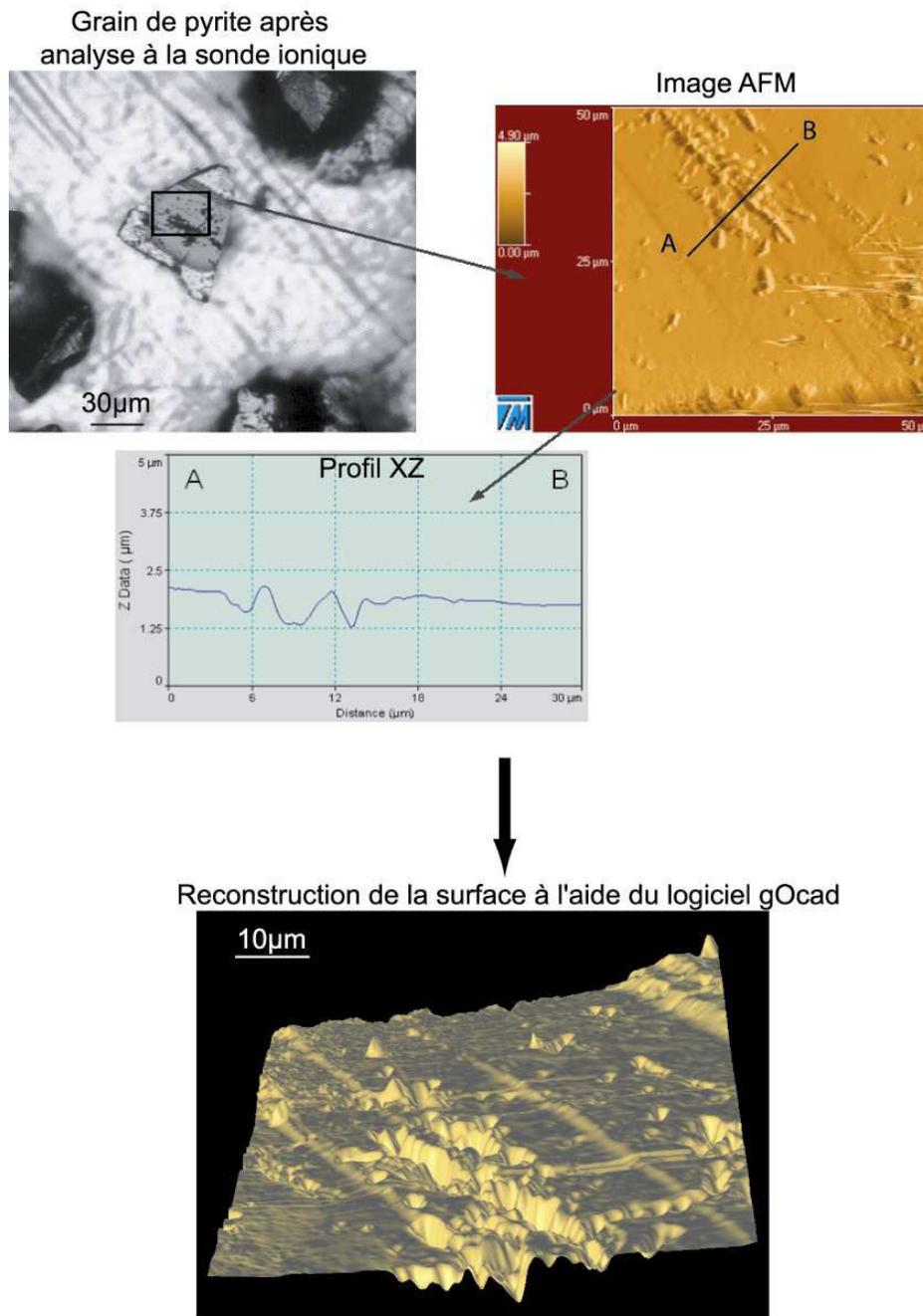


Figure C5. 15 : Image par Microscopie à Force Atomique (AFM) réalisée sur une surface de pyrite après analyse à la sonde ionique. La zone de décapage du faisceau primaire de la sonde révèle des zones plus fragiles profondes de 1µm non visibles avant analyses. Une coupe XZ est réalisée et indique la morphologie de ces « pseudo-racines » ainsi qu’une reconstitution de la surface par le geomodeleur gOcad.

4.3 Signature isotopique « biologique » des produits d'oxydation de surface ?

L'ensemble des analyses réalisées par sonde ionique en surface de grains de pyrites bio- ou chimio-oxydées est reporté dans la Figure C5. 16. Quel que soit l'oxydant au contact de la pyrite (Fe^{3+} , H_2O , $\text{O}_{2\text{atm}}$ ou *A.f.*), la gamme de $\delta^{18}\text{O}$ mesurés est très importante ($\approx 40\%$ au minimum). Ces variations traduisent des différences inter-grains mais également intra-grains. En effet, les $\delta^{18}\text{O}$ moyens de deux zones distinctes, sur un même grain, peuvent présenter jusqu'à 20‰ de différence.

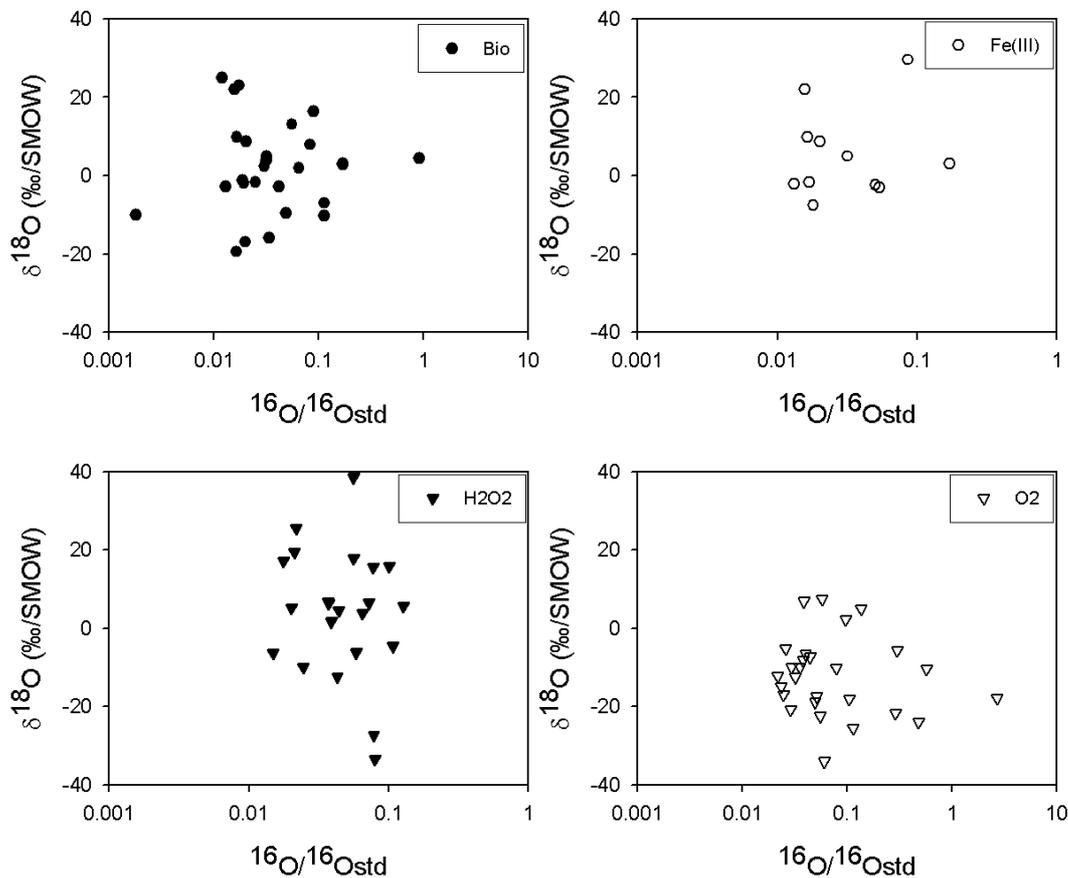


Figure C5. 16 : Répartition des compositions isotopiques en oxygène des produits d'altération en surface de grains de pyrite en fonction de l'agent oxydant : biologique, ions ferriques, peroxyde d'hydrogène, témoins d'oxydation à l'air libre.

L'ensemble de ces résultats est détaillé dans le manuscrit (Partie III) à soumettre à *Geochimica et Cosmochimica Acta* et permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

- Les signatures isotopiques des composés de surface de pyrites oxydées par *A.f.* et Fe^{3+} sont sensiblement comparables ($\delta^{18}\text{O}$ de $-19,4 \pm 2,3\%$ à $+29,6 \pm 1,4\%$) avec un pic à $0 \pm 5\%$ qui se rapproche des $\delta^{18}\text{O}$ des sulfates dissous. Cette similarité traduit, au moins en partie, l'influence du processus électrochimique dans l'oxydation de la pyrite (Eqn. C5. 6) entretenu par les bactéries en solution. L'influence réelle des bactéries en solution et adhérentes sur les processus d'oxydation n'est cependant pas déterminable à partir des valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ de surface en raison de leur très forte variabilité. Une biosignature isotopique de surface n'est donc pas envisageable.
- La signature isotopique de l'oxydation abiotique aqueuse par du peroxyde d'hydrogène est légèrement différente avec un pic moyen de $\delta^{18}\text{O}$ à $+10 \pm 5\%$ et une très grande dispersion des données (de $\approx -40\%$ à $\approx +40\%$). Ces valeurs extrêmes pourraient être attribuée (i) à des intermédiaires réactionnels stabilisés en surface de la pyrite et dont le $\delta^{18}\text{O}$ n'est pas connu et (ii) à des produits incorporant des radicaux OH ($\delta^{18}\text{O} \approx -40\%$) issus de la dissociation des molécules de H_2O_2 en surface de la pyrite.
- Les grains de pyrites oxydés à l'air libre, en milieu non aqueux, présentent une gamme de $\delta^{18}\text{O}$ plus restreinte (30%) mais les valeurs moyennes sont nettement plus négatives (de $-34 \pm 1,7\%$ à $+7,4 \pm 1,2\%$). Dans ce cas, l'oxydation intervient par l'intermédiaire d'une couche d'eau vapeur adsorbée en surface des minéraux (Eqn. C5. 6), qui servirait à former aussi bien des oxydes que des sulfates. Le $\delta^{18}\text{O}$ de cette eau vapeur est estimé à -18% , pour une eau sous forme liquide à -8% (Majzoub, 1971) et expliquerait ainsi la valeur moyenne négative des $\delta^{18}\text{O}$ de surface.
- Malgré la forte variabilité du signal de surface, deux pics principaux de $\delta^{18}\text{O}$ sont notés pour toutes les expériences en milieux aqueux :
 - $\delta^{18}\text{O} = +5 \pm 5\%$. Ces valeurs correspondraient à la prédominance en surface de sulfates formés de manière similaire à ceux analysés en solution et dont les

$\delta^{18}\text{O}$ (de -2‰ à +12‰) reflètent les sources d'oxygène ($\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ de -7‰ à -4‰ et $\delta^{18}\text{O}_{\text{O}_2} = +23,5\text{‰}$) et les fractionnements isotopiques cinétiques associés.

- $\delta^{18}\text{O} = -10 \pm 5\text{‰}$. Dans ce cas, les zones analysées renfermeraient principalement des oxy-hydroxydes de fer formés à partir de l'eau du milieu ($\Delta_{\text{oxydes-H}_2\text{O}}$ de -1‰ à +1‰, Bao & Koch, 1999).

- Les valeurs extrêmes de $\delta^{18}\text{O}$ pourraient s'expliquer par :
 - la formation de sulfates à partir de l'eau de « respiration ». Si la formation et la stabilisation de ces sulfates en surface de la pyrite est suffisamment rapide, cette eau n'a pas le temps de se rééquilibrer isotopiquement avec la solution et conserve sa valeur de +23,5‰. Le $\delta^{18}\text{O}$ des sulfates formés peut alors couvrir la gamme de +2‰ à +39‰.
 - l'existence en surface de conditions locales (moins acides) différentes du milieu global favorisant la présence de OH^- ($\delta^{18}\text{O} \approx -40\text{‰}$) incorporés dans les produits d'oxydation, expliquant certaines valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ très négatives.
 - la présence en surface d'intermédiaires réactionnels dont les compositions isotopiques ne sont pas connues.

En conclusion, les $\delta^{18}\text{O}$ des produits d'oxydation en surface de la pyrite sont très variables et traduisent l'existence d'environnements et de mécanismes particuliers. Il n'est ainsi pas possible de dégager une biosignature isotopique de surface, du moins compte tenu de la résolution d'analyse utilisée. Il serait intéressant de pouvoir augmenter cette résolution d'analyse afin de disposer de la nature chimique et de la composition isotopique des produits d'oxydation, à l'échelle sub-micrométrique et sur une même zone d'analyse. Pour cela, des cartographies haute résolution Raman et nanoSIMS, par exemple, pourraient apporter de plus amples informations sur les processus de formation de produits d'oxydation en surface de grains de pyrite.

Partie III

Manuscrit soumis à

Geochimica et Cosmochimica Acta

O and S isotopic composition of dissolved and attached oxidation products of pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Comparison with abiotic oxidations.

Celine Pisapia^{1,2*}, M. Chaussidon¹, C. Mustin², B. Humbert³

¹ Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques, Nancy, France.

² Laboratoire des Interactions Microorganismes Minéraux Matière Organique dans les Sols, Université Henri Poincaré Nancy I, Nancy, France.

³ Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Université Henri Poincaré Nancy I, Nancy, France.

* e-mail : pisapia@crpg.cnrs-nancy.fr, celine.pisapia@limos.uhp-nancy.fr

Abstract

Oxygen and sulphur isotopic compositions were analyzed on dissolved sulphates and water from experimental aerobic acidic (pH<2) pyrite oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. The oxidation products attached to the pyrite surfaces were studied for their morphology, their chemistry (Raman spectroscopy) and for their $\delta^{18}\text{O}$ (ion microprobe). They were compared to abiotically (Fe^{3+} , H_2O_2 , O_2) oxidized pyrite surface compounds in order to elucidate the oxidation pathways and to look for the existence of potential biosignatures for this system.

The pyrite dissolution appeared to be either nonstoichiometric (during the first days) or stoichiometric (with increasing time). The associated $\Delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}$ are slightly positive (+0.4‰) or negative (-1.3‰) and most probably related to a S-S or a Fe-S bond breaking, respectively. The correlation observed between the chemical (nonstoichiometric fraction) and the isotopic ($\delta^{18}\text{O}$) evolutions of dissolved sulphates can be isotopically modelled according to several and contradictory hypotheses. The model that seems the most consistent with the development of the bio-corrosion of pyrite implies higher isotopic fractionations ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} \approx +16\text{‰}$ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2} \approx -25\text{‰}$) than previously proposed. It reflects the succession of an indirect (non adherent bacteria and Fe^{3+} -oxidation of pyrite) and a direct (adherent bacteria) biological control on the oxidation process.

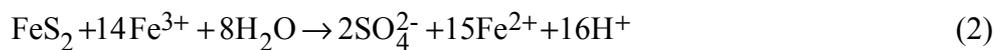
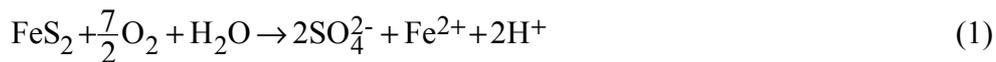
The “oxidation layer” at pyrite surfaces is quite complex and made of iron oxides, sulphates, polysulphides, elemental sulphur and polythionates. Bio- and Fe^{3+} -oxidations favor the development of monophased micrometric bumps made of hematite or sulphates while other abiotic oxidations are more variable. The large $\delta^{18}\text{O}$ heterogeneity measured at the surfaces of oxidized pyrites (from $\approx -40\text{‰}$ to $\approx +30\text{‰}$), whatever the oxidant, may be related (i) to the existence of local surface environments isolated from the solution in which the oxidation processes are different and (ii) to the stabilization at the pyrite surface of reactional intermediates that are not in isotopic equilibrium with the solution.

Though the oxygen isotopic composition of surface oxidation products cannot be taken as a direct biosignature, the combined utilization of morphological, chemical and isotopic characterization of the surfaces of oxidized pyrites may furnish clues about a biotic activity on a mineral surface.

1 INTRODUCTION

Pyrite FeS₂ is one of the most common minerals on Earth and is involved in many geochemical and biological processes. *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A.f.*), an acidophilic iron and sulphur oxidizing bacterium, is often associated to sulfide minerals and plays an important role in the acceleration of pyrite dissolution (Battaglia-Brunet et al., 1998; Boon et al., 1999; Fowler et al., 2001; Nordstrom and Southam, 1997). This comes from the fact that *A.f.* recovers most of its energy for its metabolism through the oxidation of pyrite. This system has been widely investigated because of its importance (i) in the recovery of e.g. Cu, U, Au from sulfides ores (Battaglia-Brunet et al., 1998; Ehrlich and Brierley, 1990; Thorma, 1986) and the commonly associated metal pollutions (Stumm and Morgan, 1996) and (ii) in the Acid Mine Drainage (AMD) phenomenon (Colmer and Hinkle, 1947; Edwards et al., 2000; Taylor et al., 1984b; Weber et al., 2004).

Pyrite (bio)oxidation in acidic medium is commonly described in bulk by the following equations (Ehrlich, 1981; Singer and Stumm, 1970):



In details, the mechanisms by which pyrite is oxidized to sulphates are much more complicated and involve many species such as polythionates (S_xO_y²⁻), polysulfides (S_nS²⁻) and elemental sulphur (Blight et al., 2000; Mc Guire et al., 2001; Mustin et al., 1993a; Toniazzo et al., 1999b). The rate of reaction (2), which is supposed to be the dominant one (Reedy et al., 1991), depends on the availability of Fe³⁺ which is controlled by :



Bacteria are considered to increase the pyrite dissolution rates by at least 6 orders of magnitude in three different ways (Crundwell, 2003; Sampson et al., 2000): (i) in the "indirect" mechanism, bacteria which are not attached to mineral surfaces oxidize Fe²⁺ according to reaction (3), (ii) in the "indirect contact" mechanism, bacteria attached to mineral surfaces oxidize Fe²⁺ according to reaction (3) and (iii) in the "direct contact" mechanism, attached bacteria oxidize directly pyrite by biological means according to a reaction similar to reaction (1). Note that in the "direct contact" mechanism bacteria may act as electron pumps entertaining a transfer of electrons into pyrite from oxidation and corrosion sites where

electrons are removed to bacteria adhesion sites where they directly recover electrons for their respiration (Pisapia, 2006).

The sulphur and oxygen isotopic compositions of dissolved sulphates produced during the oxidation of pyrite have been studied for the different oxidation mechanisms (Reedy et al., 1991; Suzuki, 1965; Toran and Harris, 1989). Because oxygen isotopic exchanges between dissolved sulphates and water is slow even at low pH (Chiba and Sakai, 1985), the $\delta^{18}\text{O}$ of sulphates formed during bio- or chemo-oxidation of pyrite are a reliable proxy for the oxidation mechanisms. Contrary to oxygen, there is no clear resolvable S isotope fractionation during the oxidation of pyrite with or without *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Mc Cready and Krouse, 1982; Taylor et al., 1984b). For oxygen, the major source of isotopic variations comes from the fact that sulphates incorporate oxygen atoms from both water molecules and dissolved atmospheric oxygen (Taylor et al., 1984a; Taylor et al., 1984b; Van Everdingen and Krouse, 1985). For instance, sulphates formed according to reaction (1) contain 87.5% of oxygen coming from dissolved atmospheric oxygen ($\delta^{18}\text{O}=+23.5\text{‰}$) and 12.5% from water ($\delta^{18}\text{O}$ from $\approx -5\text{‰}$ to $\approx -15\text{‰}$ for most meteoric waters). In addition to this "source effect", kinetic isotopic fractionations have been demonstrated to occur during the incorporation in sulphates of O from either water or dissolved atmospheric oxygen. Taking into account mass balance and isotopic fractionation the $\delta^{18}\text{O}$ of sulphates formed from the oxidation of pyrite can thus be described by:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4} = x \times (\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} + \Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}) + (1-x) \times [0.875 \times (\delta^{18}\text{O}_{\text{O}_2} + \Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}) + 0.125 \times (\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} + \Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}})] \quad (4)$$

with x the fraction of sulphates formed from reaction (2), $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}$ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}$ the kinetic oxygen isotopic fractionations between sulphates and dissolved atmospheric oxygen or water, respectively. These kinetic isotopic fractionations (Lloyd, 1968; Taylor et al., 1984b; Van Everdingen and Krouse, 1985) appear to be significantly different between inorganic oxidation pathways ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}^{\text{abiotic}}$ from -4.3‰ to -8.7‰ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}^{\text{abiotic}} = +5.1 \pm 1\text{‰}$) and oxidation in solution with *Acidithiobacillus ferrooxidans* ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}^{\text{biotic}} = -11.3 \pm 0.2\text{‰}$ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}^{\text{biotic}} = +9.9 \pm 1\text{‰}$). A much higher value for $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}^{\text{biotic}}$ of $+17.8 \pm 0.3\text{‰}$ has been obtained for alternatively submersed and dried pyrites with adherent bacteria (Taylor et al., 1984b).

A further complication of isotopic mass balance comes from the fact that the $\delta^{18}\text{O}$ of sulphates produced during pyrite oxidation may not only reflect the stoichiometry of the reactions (1) and (2) because of (i) reactions involving intermediate oxidation compounds and a solvent molecule or another ion and of (ii) the presence of water produced by reaction (3)

and thus having the $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved O_2 . Toran & Harris (1989) developed a model describing the $\delta^{18}\text{O}$ of sulphates as a function of the fraction of oxygen coming from H_2O (f_W) or O_2 (f_A) through different mechanisms transferring electrons from pyrite to sulphates:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4} = f_W \times (\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} + \Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}) + (f_A) \times (\delta^{18}\text{O}_{\text{O}_2} + \Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}) \quad (5)$$

They showed that $f_W = (n_2+n_3)/n_{\text{tot}}$ and $f_A = n_1/n_{\text{tot}} = 1 - f_W$, with n_i representing the number of electrons removed from the S^{2-} donor according to the different mechanisms. For pyrite oxidation the sum of electron transferred ($n_{\text{tot}}=n_1+n_2+n_3$) to form two sulphates from one FeS_2 mole is equal to 14. The values of n_1 , n_2 and n_3 are variable and correspond respectively to the following mechanisms: (i) O_2 molecules transfer electrons and are incorporated into sulphates, (ii) O_2 molecules transfer electrons but sulphates incorporate oxygen from water and (iii) electron carriers (Fe^{3+} or enzymes) transfer electrons and sulphates incorporate oxygen from water.

The oxidation mechanisms, derived from the composition of dissolved sulphates, appear however too simplistic to describe the complexity of the reaction products observed at the surface of pyrites (Blight et al., 2000; Edwards and Rutenberg, 2001; Fowler et al., 2001; Mc Guire et al., 2001; Mustin et al., 1992; Toniazzo et al., 1999a). The oxidized pyrite surfaces do reveal the presence of various compounds: sulphates, elemental sulphur, polysulfides and a non-negligible amount of iron oxides even at very low pH (Buckley and Woods, 1987; Holmes and Crundwell, 2000; Toniazzo et al., 1999a). These observations favour the idea that pyrite oxidation can take place in the close vicinity of bacteria, in zones characterized by an increased surface pH (Blight et al., 2000; Fowler and Crundwell, 1998; Fowler et al., 1999) or an over-concentration of ferric ions under biofilms (Fowler et al., 2001).

These systems might be analogues of the first forms of life that developed on Earth so that biologically altered pyrite surfaces contain potential bio-signatures. However, there is yet no experimental study of pyrite bio-oxidation coupling the chemistry and the isotopic composition of dissolved sulphates with an *in situ* characterization of the mineralogy and the isotopic composition of oxidation compounds residing at the surface of pyrite.

The aim of this present work is to (i) characterize the solution chemistry and isotopic composition, (ii) determine the chemical and mineralogical nature and the oxygen isotopic composition of compounds formed on the mineral surface during pyrite bio-oxidation by *A.f.* and (iii) to compare it to abiotic oxidation treatments. These experimental data are used to refine at the crystal scale the mechanisms by which pyrite is bio-oxidized, to identify the

oxidative pathways and the sources of oxygen incorporated into secondary products and to predict what kind of bio-signature can be anticipated for pyrite oxidation.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Leaching experiments

2.1.1 Material

A pure natural triglych hydrothermal pyrite (mineralogical purity of 99.95% : Fe 46.23 wt% and S 53.19 wt%) from Peru was used. Minerals were dry grinded in a tungsten carbide mill and wet sieved as described by Toniazzo et al, (1999b). To avoid influence of preexistent surface oxidation compounds, grains (80-250 μm) were selected and cleaned before each experiment. The cleaning procedure consisted of (i) two autoclaving in acidic media (110°C during 30min) that remove any soluble oxidized compounds (sulphates, polysulphides) and (ii) agitation into dithionite and hexane solutions to eliminate refractory oxidation products (oxides and sulphur respectively). A last sterilization step was performed before leaching experiments.

A pure bacteria strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) was used (DSMZ 583 adapted to ferrous sulphate). Bacteria were cultivated and maintained in an active physiological state into an appropriate liquid growth medium modified from the DSMZ 70 medium with elemental substrates for cell growth (0.4 g $\times\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 ; 0.4 g $\times\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g $\times\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and energetic substrates (20 g $\times\text{L}^{-1}$ $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) into deionized water. The initial pH of the cultures is adjusted to 1.8 with a 0.5M H_2SO_4 solution and the final medium is sterilized during 20min at 120°C. Before bioleaching experiments, bacteria were recovered by centrifugation and washed into fresh DSMZ 70 modified medium to remove iron sulphate ions from the solution.

2.1.2 Biological oxidation

Bioleaching experiments have been conducted into a sterile 1.25L batch under controlled conditions (pH, Eh, O_2 supply, $T=30^\circ\text{C}$). Two sets of experiments (Ferm 1 and Ferm 2) were conducted with different grain sizes of the starting pyrite of $\approx 80\text{-}100\ \mu\text{m}$ for Ferm 1 and $\approx 200\ \mu\text{m}$ for Ferm 2. A sterile growth medium was inoculated with an active population of *A.f.* in exponential growth phase to reach an initial population of 5×10^6 bacteria

per mL. Sterilized cleaned pyrite grains were added to form a 2% pulp ($20 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$). Solution and minerals samplings (representing a total of less than 10% of the original mass) were made regularly to perform (i) elemental analysis, bacteria cell numeration, and isotopic determination of the solution (oxygen) and dissolved sulphates (oxygen and sulphur) and (ii) surface analysis of the oxidized minerals. Dissolved elements have been quantified by ICP-AES in sequential mode on a Jobin Yvon Ultratrace 238 for sulphates (error $\approx 1\%$) and in simultaneous mode for Iron and Copper on a Jobin Yvon 32S (error from ≈ 2 to 3% and $\approx 10\%$, respectively). The experiments were stopped at ≈ 50 days, when the solutions reached a stable pH (≈ 1.1), implying that most of possible pyrite dissolution occurred. The total pyrite pulp was recovered at the end of the experiment, vortexed and dried to eliminate adherent bacteria. Specific grains were chosen under a binocular magnifier and mounted into an indium foil for Raman and SIMS analysis.

Specific experiments (50mL) have also been performed at 28°C under stirring, using culture flasks closed by a special sterile membrane (Biofolie[®]) that enables gas exchanges with the atmosphere, limits evaporation and contamination and enables to keep the oxidation active several months. SEM observations were made on a HITACHI S2500 after 24 months on highly corroded surfaces.

2.1.3 Abiotic oxidations

Pure abiotic treatments were performed into 50 mL sterile batches under conditions similar to the experiments with bacteria. A 2% cleaned and sterile pyrite pulp was added to a sterile modified DSMZ 70 growth medium at 28°C . Two chemical oxidant agents were used to favour different oxidation pathways and oxygen sources to be incorporated into oxidation compounds: (i) Fe(III), as a $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ salt (Aldrich, 30771-8) to obtain an initial iron concentration of 2mM per liter. Electrochemical oxidation pathway (Eqn. 3) is favoured and oxidation sulphates incorporate oxygen from water molecules, (ii) 3% oxygen peroxyde (Fluka 95321, H_2O_2 - 30%) to enhance a radical oxidation of pyrite with a molecular source of oxygen. The $\delta^{18}\text{O}$ of water and dissolved sulphates were measured at the beginning of both experiments. Those samples were compared to initial natural air-oxidized pyrites.

Experiments have also been conducted for 20 months in small batches closed by a Biofolie[®] membrane as described for bio-oxidations protocols.

2.2 Chemistry and distribution of oxidation products on the pyrite surface by Raman spectroscopy

The nature of the compounds present at the surface of bio- or chemo-oxidized pyrites was estimated by Raman spectroscopy (Fig. 1). Analyses have been performed on a Jobin-Yvon T64000 spectrometer equipped with a Charge Coupled Device (CCD) detector and a liquid nitrogen cooling system that enables to use a low-power laser that do not damage samples. Dried samples, mounted on an indium foil, were set on a XY motorized stage (step of 80 nm) under a confocal microscope Olympus BH 10 coupled with the spectrometer. A 514nm Ar laser source was used to excite samples at a 2mW power, the analytical spot being of $\approx 1\mu\text{m}$ diameter and $\approx 1\mu\text{m}$ depth. Acquisitions were done between 50 and 1300 cm^{-1} using two acquisition modes (from 50 to 732 cm^{-1} and from 676 to 1307 cm^{-1}) of 180 min each. A semi-quantitative determination of the abundances of the various oxidation products was obtained from the relative intensities of the vibrational peaks with the following first order assumptions. It was assumed that the intensity of the main vibration peaks (ν_1) can be compared between different mineral species: (i) for pure mineral phases the intensities are the same for all minerals and (ii) for mixture of different minerals, intensities of each phase are proportional to their relative abundance in the analyzed area. A more precise quantitative estimation of the abundances of the oxidation products sitting on pyrite surfaces is not possible because of the second order variations in vibrational intensities introduced by the mineralogical and topographic variability of surface compounds.

2.3 Isotopic analysis

Oxygen and sulphur isotopic compositions of dissolved sulphates and compounds attached to pyrite have been determined at the CRPG-CNRS (Nancy, France). All results are given with the delta notation in per mil relative to the SMOW and CDT standard values:

$$\delta^{18}\text{O} = \left(\frac{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{SMOW}}} - 1 \right) * 1000$$

$$\delta^{34}\text{S} = \left(\frac{\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{CDT}}} - 1 \right) * 1000$$

2.1.4 Solution isotopic compositions

The oxygen isotopic composition of water ($\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$) has been determined after equilibration with a CO_2 gas and analyzed on a VG602 spectrometer. The $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{34}\text{S}$ of dissolved sulphates were analyzed, after precipitation in BaSO_4 salts with a BaCl_2 solution, on an Elemental Analyzer (EA3000) coupled to a mass spectrometer. Precipitates were oxidized at 1200°C into SO_2 and CO and analyzed with a reproducibility for both isotopic ratios of $\approx \pm 0.1$ to 0.2% .

2.1.5 Isotopic analysis of surface compounds

Isotopic surface analysis was carried out on a Cameca ims 1270 ion microprobe. Samples were bombarded by a primary Cs^+ ion beam. Charges accumulated at the mineral surface were compensated by a normal incidence electron gun (NEG) and the conductivity of the sample was assured by a gold coating. A mass resolution of 5000 was used for oxygen isotopic analyses. Two different types of isotopic measurements have been performed: (i) isotopic imaging in rastering mode to document possible isotopic heterogeneities at the surface of pyrite crystals and (ii) depth profiles to determine more precisely the isotopic composition of the surface products.

2.3.1.1 Isotopic images in rastering mode

Oxygen isotopic images were obtained using a scanning imaging method (Aleon et al., 2001b). A small-sized primary Cs^+ beam ($<1\mu\text{m}$ diameter) was rastered ($50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$) on the sample. The ^{16}O and ^{18}O ion intensities were counted simultaneously in multicollection mode using two electron multipliers (EM for ^{16}O and H2 for ^{18}O). The Dynamical Transfer Operating System (DTOS) was used, rastering the transfer deflectors simultaneously with those of the primary beam to refocus the secondary ions into the transfer optics. The energy slit was totally opened (Aleon et al., 2001b). Acquisitions consisted of 30 cycles of 180s each. Typical count rates were from 1 to 5×10^5 cps for ^{16}O and from 2×10^2 to 1.2×10^3 cps for ^{18}O . Quantitative images were electronically rebuilt associating a position of the primary beam on the sample surface to each ion impact on the electron multipliers. Images were made of 256×256 pixels. Data consisted of one image per isotope and per cycle. Isotopic imaging of anhydrite standards, mounted on the same indium foil than samples, made at the beginning and at end of each analytical session showed an internal reproducibility for $\delta^{18}\text{O}$ of 0.5 to 2.5%.

For data processing (under Visilog 5.0 for Unix) data for each isotope were accumulated over 3 cycles per block, one analysis consisting of 10 blocks. Those blocks were smoothed and thresholded to extract surface oxygen-rich compounds into binary images that were superimposed to the unsmoothed block-images. The data were given as the intensity of isotope per extracted area and per block, converted into counts per second. Intensities were corrected for the dead time of electron multipliers (44ns for EM and 63ns for H2) to calculate the $\delta^{18}\text{O}$ of surface compounds. Note that carbon images have also been done to check the absence of bacteria and organic matter on the analyzed zones.

2.3.1.2 *Isotopic analyses by depth profiles*

Isotopic ratio were analysed by depth profiling in order to be able to analyse surface compounds of micrometer-sized thickness. Analyses were performed in multicollection mode using an off-axis Faraday cup for the ^{16}O (L'2) and an electron multiplier for the ^{18}O (H2) with a small primary Cs^+ beam (<1nA intensity) rastered over 10 μm to 50 μm square areas, depending on the size and the flatness of the pyrite grains. Typical concentration and isotopic depth profiles are shown in Fig. 2.

All profiles show an increase of the O ion intensities during the first ≈ 10 cycles (≈ 50 seconds) due to the removal of the gold coating and then a continuous decrease which reflects the fact that the surface compounds are rapidly sputtered away (a depth of ≈ 200 nm is reached after 600 seconds for a rastering area of 50 μm x 50 μm on a sulphate mineral at a 1.5 nA primary intensity). When the gold coating has been removed, a plateau in $\delta^{18}\text{O}$ values is generally observed until the surface compound has not been exhausted under the ion beam. The measured $\delta^{18}\text{O}$ values correspond to the integrated isotopic signal of this part of the depth profile (Fig. 2).

Several grains of an internal standard sulphate were systematically mounted in the same indium foil than the samples and were analysed to monitor the stability of the instrument during a given analytical session. The reproducibility on the internal sulphate standard (which does not show a decrease in ion intensity with depth) was from $\pm 0.2\%$ to 0.5%. The internal error on the samples was higher, from $\pm 0.5\%$ to $\pm 2\%$, because of lower counting rates (from $\approx 2 \times 10^6$ to 1×10^7 cps) at depth.

The Instrumental Mass Fractionation (IMF) was determined from the analysis of different internal standard minerals (sulphates and magnetite). The matrix effects on IMF were small among sulphate and magnetite: $\Delta_{\text{inst}}^{\text{sulphate}} = -13.2 \pm 0.3\%$ and $\Delta_{\text{inst}}^{\text{magnetite}} = -$

7.4±0.4‰ for analyses in multi-collection using two Faraday cups for ¹⁶O and ¹⁸O. Because it was not possible to determine exactly the proportions of sulphates and oxides in the sputtered areas at the surface of oxidized pyrite, all O isotopic analyses were corrected using the instrumental mass fractionation determined on sulphate standards. This is obviously a first order approximation since the fraction of oxides mixed with sulphates can be significant in some cases as shown by the Raman spectra. The error introduced is however rather small in comparison with the large range (≈ 40‰) of δ¹⁸O variations observed in the oxidation products: if the fraction of oxides is for instance of 50%, the use of the sole instrumental mass fractionation of sulphates introduces an error of ≈3‰.

3 RESULTS

3.1 Chemical and isotopic variations in solutions resulting from pyrite oxidation

The two oxidation experiments (Ferm 1 and Ferm 2) conducted in presence of *Acithiobacillus ferrooxidans* show a similar increase of the concentrations of dissolved iron, copper and sulphate ([Fe], [Cu], [SO₄], respectively) with time (Table 1). The [Fe], [Cu], [SO₄] are systematically higher for Ferm 1 than Ferm 2, in agreement with the average lower grain size of starting pyrite in Ferm 1. The molar S/Fe ratios range from 79.0 at 7 days to 3.7 at 51 days and from 7.4 at 10 days to 2.9 at 49 days for Ferm 1 and Ferm 2, respectively (Fig. 3). These ratios are significantly higher than the S/Fe ratio of 2 anticipated for stoichiometric pyrite dissolution as described by reactions (1) and (2). S/Fe ratio higher than two (during the first days of oxidation) might be produced by nonstoichiometric pyrite dissolution.

The relative proportion of nonstoichiometric pyrite dissolution is defined as

$$f_{NS} = \frac{(n_{SO_4^{2-}} - n_{(SO_4^{2-})}^0) - 2 \cdot n_{Fe}}{n_{SO_4^{2-}} - n_{(SO_4^{2-})}^0} \text{ with } n_{(SO_4^{2-})}^0, n_{SO_4^{2-}} \text{ and } n_{Fe} \text{ the number of moles of the initial}$$

medium sulphates, of the total sulphates and of total iron in solution, respectively (Table 1). It ranges from 92% at 7 days to 48% at 51 days and from 73% at 10 days to 32% at 49 days for Ferm 1 and Ferm 2, respectively. The dominance of nonstoichiometric pyrite dissolution during the first steps of pyrite oxidation was previously observed for similar experiments (Dziurla, 1995; Mustin et al., 1992; Toniazzo, 1998; Yu et al., 2001). A similar behaviour is shown by the variation of the molar Cu/Fe ratio with time : for instance in Ferm 1 it ranges from 2.7×10⁻² at 4 days to 1.0×10⁻³ at 46 days, while it is of 3.02×10⁻⁴ in the starting pyrite.

The $\delta^{18}\text{O}$ of water increases during both experiments from -5.32‰ at 7 days to -3.98‰ at 51 days and from -7.04‰ at 2 days to -6.41‰ at 52 days for Ferm 1 and Ferm 2, respectively (Table 1). The initial difference in $\delta^{18}\text{O}$ between Ferm1 and Ferm2 (-5.32‰ compared to -7.04‰) might be a consequence of the preparation of the bacterial growth medium (various amounts of hydration salts and sulphuric acid).

The $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{34}\text{S}$ of dissolved sulphates from Ferm1 decrease from +10.86‰ and +4.25‰ at 12 days to +4.28‰ and +3.50‰ at 51 days, respectively. The initial medium contains sulphates with a $\delta^{18}\text{O} = +9.93\text{‰}$ ($\pm 0.23\text{‰}$) and $\delta^{34}\text{S} = +4.21\text{‰}$ ($\pm 0.28\text{‰}$). The $\delta^{34}\text{S}$ variations are small but significant as shown by the fact that they correlate positively with f_{NS} , the fraction of nonstoichiometric pyrite oxidation (see Fig. 9). The $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates from Ferm 2 also correlates with f_{NS} and decreases from +7.82‰ at 12 days to +2.80‰ at 52 days, with $\delta^{18}\text{O} = +9.55\text{‰}$ ($\pm 0.13\text{‰}$) for the sulphates of the initial medium. Such a decrease with time of the $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates has previously been observed (Taylor et al., 1984a).

3.2 Morphological characterization of the surfaces of oxidized pyrites.

Variable corrosion features are observed on the surfaces of pyrite that have been oxidized by *A.f.*, Fe^{3+} , H_2O_2 or atmospheric O_2 (Fig. 5). The corrosion pittings that develop on bio-oxidized pyrites are not numerous but deep, geometric (squares, lozenges, pseudo-hexagones), and oriented. The average size of these pittings increases with time. They were not observed after 60 days, and were well developed after 24 months (SEM images Fig. 5). Most of these figures are hexagones of which dimensions can reach $\approx 20\mu\text{m}$ length, $\approx 10\mu\text{m}$ wide and $\approx 5\mu\text{m}$ micrometers depth after 24 months of bio-corrosion. These corrosion pittings are much larger than one bacteria cell ($1.6\mu\text{m}$ length $0.5\mu\text{m}$ wide) and cannot be interpreted as bacteria fingerprints. Whatever the observed grain, most of the figures are organized along a specific direction most probably related to a mineral symmetry axis. These observations are consistent with previous published data on the bio-oxidation of pyrite by *A.f.* and other acidophilic autotrophic bacteria (Edwards and Rutenberg, 2001; Mustin et al., 1993b; Ndlovu and Monhemius, 2005; Rojas-Chapana and Tributsch, 2004).

On the contrary, corrosion morphologies that are observed on abiotically oxidized pyrites are mostly cracks and pits without any real systematic configuration nor specific orientation. However, because pyrite surfaces abiotically oxidized by Fe^{3+} present only some discrete pits, the dissolution process seems to be limited to the initial cracks of the mineral

surface. More numerous and dispersed pits are noted for hydrogen peroxyde oxidation but not as well developed as for bio-oxidation. The surfaces of natural air-oxidized pyrites do not present corrosion morphologies and are covered by millimetric oxidation products resulting in a strong passivation of the surface.

3.3 Chemical characterization of surface oxidation products

Similarly to morphological corrosion features, there is a large variability in the chemical composition of the surface oxidation products. In addition to the fundamental pyrite $S-S^{2-}$ vibration modes observed at 380 cm^{-1} (Ag) and 344 cm^{-1} (Eg), Raman spectroscopy highlights the presence of elemental sulphur (main bands at 150, 215 and 471 cm^{-1}), iron oxides (hematite: 220 and 280 cm^{-1} , goethite: 250 and 295 cm^{-1} , akaganeite: 311, 494 and 540 cm^{-1} and lepidocrocite: 250 and 670 cm^{-1}), sulphates (ν_1 between 984 and 1040 cm^{-1} , ν_3 from 1060 to 1163 cm^{-1} and ν_4 from 605 to 650 cm^{-1}) and various intermediate products like thiosulphate (bands at 677, 1017, 1130 cm^{-1}) or polysulfides (466 cm^{-1}). Note that several major Raman bands of these compounds (from $\approx 330\text{ cm}^{-1}$ to $\approx 390\text{ cm}^{-1}$) are masked by the predominance of the pyrite Ag and Eg bands.

In more details, the Raman spectra show the presence of 4 types of sulphates underlined by a displacement of the ν_1 vibration mode from 984 to 1040 cm^{-1} , and different molecular symmetries. They suggest the existence of different bondings of the sulphate oxygens to the pyrite (e.g. Pyrite-O- SO_3^{2-} or Pyrite-O₂- SO_2^{2-}) and a low amount of hydration water (generally equal or inferior to one H_2O for each sulphate molecule) implying that these sulphates were directly formed at the pyrite surfaces by specific mechanisms (Pisapia, 2006). Furthermore, the identification of akaganeite phases that have been formed in a medium free of any Cl, thus out of equilibrium with the solution, confirms the existence of specific surface mechanisms.

Most of the Raman spectra realized on the surfaces of oxidized pyrites show that polysulfides, iron oxides and sulphates are the major products of the oxidation processes. Elemental sulphur and thiosulphate are not present in large amounts. Fig. 6 summarizes into ternary diagrams the repartition of the three dominant oxidation products observed by Raman spectroscopy on pyrite surfaces with a spatial resolution of $1\mu\text{m}$.

Bio- and sterile Fe^{3+} oxidations present strong similarities in their oxidation products: they both show micrometric monophased bumps made mostly of either iron oxides (45% and 11% of total Raman spectra, respectively) (mainly hematite) or sulphates (22% and 22%, respectively). Fe^{3+} -oxidation shows a higher proportion of intermediate compounds (33%

rather than 3.7‰ for bio-oxidation) suggestive of a less complete oxidation than for bio-oxidation. Only very few micrometric bumps show the association of several compounds and especially with intermediate unstable phases (polysulfides, polythionates).

Hydrogen peroxyde (H_2O_2) oxidation products are more various and dispersed with an homogeneous repartition of the three types of main oxidation compounds (sulphates, iron oxides and polysulfides) on micrometric polyphased bumps (77.8‰ of Raman spectra). Monophases bumps represent 5.6‰, 5.6‰ and 11.1‰ of total Raman spectra for sulphates, iron oxides and polysulphides, respectively. Note that in that case, intermediate compounds are not negligible, which indicates an incomplete oxidation process.

The surfaces of natural air-oxidized pyrites exhibit nearly systematically a mixture of hematite and sulphates (86.6‰ of total Raman spectra) that have a millimetric vertical and lateral extensions (visible by optic microscopy). Most of the surface compounds are then organized in large polyphased bumps. In some cases, various amounts of polysulfides (and elemental sulphur) are also observed. The oxidation process, in that case, is strongly different from the other treatments, and occurs inside a limited adsorbed vapor water layer that favors the preservation of these well-crystallized products on the pyrite surfaces. Note that the large surface coverage of the surface results in a surface passivation (previously observed on SEM images).

3.4 SIMS isotopic imaging and depth profiling on oxidized pyrite surfaces

A strong $\delta^{18}\text{O}$ heterogeneity is observed at the micrometer scale for the oxidation compounds on pyrite surfaces whatever the oxidation process. SIMS isotopic imaging of oxidized pyrites show surface compounds a few micrometers apart with $\delta^{18}\text{O}$ ranging in one extreme case from -20‰ ($\pm 8\%$) to +47‰ ($\pm 7\%$) (Fig. 7).

A similar isotopic variability between different grains is shown by spot analysis with a $\delta^{18}\text{O}$ ranging from $\approx -30\%$ to $\approx +30\%$ even on different grains from one experiment (Fig. 8). Three main types of $\delta^{18}\text{O}$ distributions are observed: (i) biological and ferric ions oxidations (37 analyses) have $\delta^{18}\text{O}$ ranging from $-19.4 \pm 2.3\%$ to $+29.6 \pm 1.4\%$ with a peak at $0 \pm 5\%$, i.e. in the range of the $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates, (ii) H_2O_2 oxidized pyrites (22 analyses) have $\delta^{18}\text{O}$ with a larger range from $-33.5 \pm 1.6\%$ to $+38.5 \pm 1.2\%$ and a mode between +5‰ and +20‰, i.e. slightly higher than the typical $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates and (iii) natural air-oxidized pyrites (28 analyses) show the lowest $\delta^{18}\text{O}$, from $-34 \pm 1.7\%$ to $+7.4 \pm 1.2\%$ with a peak at $-10 \pm 5\%$.

4 DISCUSSION

4.1 Leaching patterns on the surfaces of corroded pyrites

The corrosion morphologies observed on the surfaces of bio-oxidized pyrites cannot be interpreted as direct bacteria fingerprints. The pyrite dissolution occurs at the anodic sites of the mineral and bacteria are supposed to locate on mineral cathodes to recover electrons for their metabolism. As the majority of the corrosion figures on each pyrite surface is oriented along a single direction (Fig. 5), the cristallography of pyrite may control the development, morphologies and repartition of those patterns. A (111) face would allow triangular corrosion pittings (linked to the symmetry A3 axes) whereas a (210) that combines two symmetry elements (one A3 axis and one mirror) would favor the development of hexagones. The elongated-shaped corrosion morphologies would then be the consequence of the preferential dissolution of the mineral along its symmetry axes.

The micrometric size of the corrosion pittings only observed for bio-corroded surfaces may be interpreted as an indirect result of the action of adherent bacteria. As they recover electrons at the cathodes of the pyrite surfaces, they enhance specific electron transfers within the mineral between anodes and cathodes inducing pronounced and scattered corrosion pittings. On the contrary, during abiotic oxidation of pyrite, such specific electron transfers are not that favoured. Consequently, deep and geometric corrosion morphologies cannot develop and the dissolution mainly occurs on the defect sites of the pyrite surface (cracks) that play the role of the mineral anodes. Thus, though bacteria enhance the formation of specific features, the morphology of corroded surfaces is mainly controlled by the mineral lattice and is not a definitive criterion to identify bio-oxidation processes.

4.2 Chemistry of the surfaces of corroded pyrites

The similarity between the chemistry and the repartition of biotic and ferric oxidation products of pyrite (Fig. 6) indicate that a non negligible part of the bio-oxidation process occurs via ferric ions that are maintained in a quite high concentration by bacteria in suspension thanks to reaction (3). The surface coverage is quite low, even for bio-oxidation, indicating that only few sites have reacted favoring the development of a few geometric but deep corrosion pittings. When oxidation occurs, it results in the formation of the end-products, sulphates and hematite. The global effect of bacteria would then reside in the combination (i) of the amplification of reaction (3) by bacteria in suspension, and (ii) of the

entertaining of the electron transfer by adherent bacteria that limit the passivation of the surface that is observed for natural air-oxidized pyrites.

On the contrary, most of surface oxidation products formed in presence of hydrogen peroxyde are unstable phases (polysulfides, elemental sulphur...) indicative of an incomplete oxidation process. During this treatment, no ferric ions were added to the medium and their availability is controlled by the abiotic kinetics of reaction (3). Because this reaction is slow in the absence of bacteria, most oxidation occurs through a process similar to reaction (1). The electron transfer within the pyrite lattice is then limited and the oxidation slows down rapidly.

Those results confirm that the bio-oxidation of pyrite is more located and specific than abiotic oxidations and results from the combined effet of adherent and suspended bacteria.

4.3 Sulphur isotopic composition of dissolved sulphates

The range of $\delta^{34}\text{S}$ for dissolved sulphates (from +4.25‰ to +3.5‰) cannot reflect the mixture in various proportions of sulphur coming from the starting pyrite ($\delta^{34}\text{S} = +4.1‰ \pm 0.06$) and from the initial medium sulphates ($\delta^{34}\text{S} = +4.21‰$). This range likely reflects isotopic fractionation taking place during pyrite oxidation. The correlation observed between the $\delta^{34}\text{S}$ of dissolved sulphates and f_{NS} (Fig. 9) can be used to assess the $\delta^{34}\text{S}$ of sulphates produced by either stoichiometric or nonstoichiometric dissolution (Fig. 10), $+2.8 \pm 0.2 \text{ ‰}$ and $+4.5 \pm 0.2 \text{ ‰}$, respectively. This implies isotopic fractionations ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}^{\text{stoichiometric}} = -1.3‰$ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}^{\text{nonstoichiometric}} = +0.4‰$) which are low and in agreement with previous published data (Bailey et al., 2004; Kaplan and Rittenberg, 1964; Krouse et al., 1991; Taylor et al., 1984a).

Though the present data set is too limited to elucidate the details of the processes responsible for sulphur isotopic fractionation during pyrite oxidation, a few lines of evidence suggest that the variations of $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}$ result from differences in the oxidation pathways. A parallel can be drawn with equilibrium isotopic fractionation between sulfides and dissolved H_2S . Pyrite and molybdenite which are supposed to dissolve through a thiosulfate intermediate pathway (Hansford and Vargas, 1999; Sand et al., 1999) exhibit a positive $\Delta_{\text{sulfides-H}_2\text{S}}$ (Ohmoto and Rye, 1979) while chalcopyrite and galena which are supposed to dissolve through a polysulfide intermediate pathway exhibit a negative $\Delta_{\text{sulfides-H}_2\text{S}}$. The fact that Raman spectra indicate the presence of different reactional intermediates, thiosulphates and polysulfides, during pyrite oxidation allows to anticipate variations in $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}$. Our

results suggest that a slightly positive $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}$ is associated to nonstoichiometric dissolution proceeding through the breaking of covalent S-S bonds and that a negative $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}$ is present for stoichiometric dissolution occurring via the breaking of ionic S-FeS₂ bonds.

4.4 Oxygen isotopic composition of dissolved sulphates

In a similar way than for S isotopes, the correlation observed between the $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates and f_{NS} (Fig. 11) can be used to determine the $\delta^{18}\text{O}$ of sulphates formed by nonstoichiometric and stoichiometric processes: $+11.0\pm 2.7\text{‰}$ and $-2.0\pm 2.7\text{‰}$, respectively for Ferm1 and $+8.9\pm 0.8\text{‰}$ and $-0.76\pm 0.8\text{‰}$, respectively for Ferm2.

The modelling of the $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates is more complicated than that of $\delta^{34}\text{S}$ because both dissolved atmospheric oxygen and water oxygen may be used to oxidize pyrite. As described earlier, the $\delta^{18}\text{O}$ of sulphates may be predicted according to various models taking into account either bulk equations (Taylor et al., 1984b; Van Everdingen and Krouse, 1985) or the number of transferred electrons (Toran and Harris, 1989). Both modelling are tested below for Ferm1 and Ferm2.

We first consider oxygen isotopic mass balance according to Eqn. (4). Because there is no theoretical reason to infer that oxidation through reactions (1) and (2) may preferentially proceed stoichiometrically or nonstoichiometrically, we calculated the values for $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}$ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}$ consistent with our data (Fig. 11) ascribing either reaction (1) or reaction (2) to the stoichiometric one.

If reaction (2) is the stoichiometric one ($f_{\text{NS}}=1-x$), then the correlation in Fig. 11 implies that $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} = +2.0\pm 2.7\text{‰}$ and $+5.6\pm 0.8\text{‰}$ for Ferm1 ($\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}=-3.98\pm 0.1\text{‰}$) and Ferm2 ($\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}=-6.41\pm 0.1\text{‰}$), respectively. In this hypothesis, $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}$ can be calculated from Eqn. (4) to be $-8.9\pm 2.7\text{‰}$ and $-13.2\pm 0.8\text{‰}$ for Ferm1 and Ferm 2 ($\delta^{18}\text{O}_{\text{O}_2}=+23.5\text{‰}$ for both), respectively. In order to fit (Fig.12) the $\delta^{18}\text{O}$ measured for sulphates at various f_{NS} (i.e. various fractions of reaction 1), values of $+1.2\text{‰}$ and $+5.8\text{‰}$ must be taken for $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}$ and of -9‰ and -13.2‰ for $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}$ in Ferm1 and Ferm2, respectively. Note that these values, are consistent within errors with those determined from the linear regressions (Fig. 11). In addition, these values for $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}$ are very close to the previous isotopic fractionation (-11.4‰) experimentally determined for pyrite oxidation by *A.f.* (Lloyd, 1968; Taylor et al., 1984b). At variance, the values determined for $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}$ are lower than the values from $+8.9\text{‰}$ to $+18.1\text{‰}$ determined for bio-oxidation of pyrite but are close to the values measured for abiotic ferric-oxidation of pyrite of $+5.1\pm 1\text{‰}$ (Taylor et al., 1984b). Ascribing the reaction (2)

to the stoichiometric one, would thus imply that bacteria oxidize pyrite mainly through reaction (2). In this hypothesis, the bacteria in solution promote pyrite oxidation by oxidizing ferrous ions into ferric ions, and thus increase the rate of reaction (2).

If reaction (1) is the stoichiometric one ($f_{NS}=x$), following the same reasoning than previously, values of +16.3‰ and -28.5‰ for Ferm1 and +16.01‰ and -27‰ for Ferm2, respectively, can be predicted for $\Delta_{SO_4-H_2O}$ and $\Delta_{SO_4-O_2}$ to fit the present experimental data (Fig. 12). Though in that case, the value of $\Delta_{SO_4-H_2O}$ corresponds to the isotopic fractionation measured by Taylor et al., (1984a) for pyrite biooxidation in wet/dry experiments (from +17.6‰ to +18.1‰), the values of -27‰ and -28.5‰ for $\Delta_{SO_4-O_2}$ are much higher than that previously published (-11.4‰ Taylor et al., 1984a). Ascribing the reaction (1) to the stoichiometric one would thus imply that the biological effect occurs with adherent bacteria that would oxidize pyrite mainly through reaction (1) as previously proposed by Taylor et al., (1984a). Indeed, adherent bacteria may act as electrons pumps that transfer directly electrons from pyrite to dissolved oxygen without reaction with ferric ions (reaction 3), thus limiting the effect of reaction (2). Though the values calculated for $\Delta_{SO_4-H_2O}$ and $\Delta_{SO_4-O_2}$ from the present experiments match better literature data assuming that bacteria act mostly in the oxidation of pyrite through enhancing reaction (2), there is no definitive isotopic argument to reject the other possibility (i.e. adherent bacteria directly oxidize pyrite).

Alternatively, considering the model by Toran and Harris (1989), the correlation between the $\delta^{18}O$ of dissolved sulphates and f_{NS} implies that the nonstoichiometric reaction corresponds either to the incorporation in sulphates of oxygen from water (f_W) or from dissolved oxygen (f_A). Assuming $f_{NS} = f_A$, the modelling of $\delta^{18}O$ of the dissolved sulphates (Fig. 12) using Eqn. (5) allows to calculate for Ferm1 and Ferm2, respectively, $\Delta_{SO_4-H_2O} = +2.0 \pm 2.7‰$ or $\Delta_{SO_4-H_2O} = +5.6 \pm 0.8‰$ ($f_{NS} = 0$) and $\Delta_{SO_4-O_2} = -12.5 \pm 2.7‰$ or $\Delta_{SO_4-O_2} = -14.6 \pm 0.8‰$ ($f_{NS} = 1$). Assuming $f_{NS} = f_W$, the isotopic fractionation calculated are for Ferm1 and Ferm2, respectively, $\Delta_{SO_4-H_2O} = +16.3 \pm 2.7‰$ or $\Delta_{SO_4-H_2O} = +16.01 \pm 0.8‰$ ($f_{NS} = 1$) and $\Delta_{SO_4-O_2} = -25.0 \pm 2.74‰$ or $\Delta_{SO_4-O_2} = -24.3 \pm 0.8‰$ ($f_{NS} = 0$).

The isotopic fractionations calculated assuming $f_{NS}=f_A$ are very similar to those calculated assuming that stoichiometric sulphates are formed by reaction (2). Conversely the assumption $f_{NS}=f_W$ gives isotopic fractionations similar to the ones determined assuming that nonstoichiometric sulphates are formed according to reaction (2). Thus, two drastically different hypotheses can be made from the isotopic composition of dissolved sulphates to describe the bio-oxidation of pyrite. In the first hypothesis, adherent bacteria may initiate the

bio-corrosion of pyrite by transferring electrons from the mineral to dissolved oxygen that is incorporated in sulphates (non stoichiometric pyrite oxidation by reaction (1) dominant at the beginning). The corrosion process is maintained by bacteria in solution that oxidize ferrous ions into ferric ions and liberate stoichiometric sulphates that incorporate oxygen atoms from water. This first case correspond to the $f_{NS} = f_A$ hypothesis. In the second hypothesis, as a high ferric ions concentration is reached rapidly, reaction (2) may be dominant during the first days of the bio-oxidation process and favor the formation of nonstoichiometric sulphates with oxygen coming from water. Then the bio-oxidation process is maintained by adherent bacteria. This second hypothesis corresponds to $f_{NS}=f_W$. The isotopic fractionations ($\Delta_{SO_4-H_2O}$ and $\Delta_{SO_4-O_2}$) determined for both cases are rather different but do not enable to argue in favor of one of these two hypotheses. Though the previous isotopic fractionations determined by Taylor et al., (1984a, 1984b) are more consistent with the first hypothesis, they were calculated by comparing the isotopic compositions of water and sulphates at only a few steps of the oxidation experiments. They may not thus be regarded as representative of the end-member reactions of the oxidation process: for instance, the difference in $\delta^{18}O$ of +10.9‰ found by Taylor et al., (1984) between sulphates and water at 13 days for one experiment is similar to the present data (e.g. +10.3‰ for Ferm1 at 31 days) though the modelled $\Delta_{SO_4-H_2O}$ are very different (+2.0‰ and +16.3‰ for Ferm1 in the two hypotheses).

Even if there is no definitive isotopic evidence to favor hypothesis one or two, the presence of deep corrosion pittings on the surfaces of bio-oxidized pyrites would favor the second one. In fact, a direct action of adherent bacteria is required to explain the formation of such deep corrosion figures (Fig. 4) in which, by the fact, bacteria are observed by CLSM to be preferentially attached (Pisapia, 2006). The development of these corrosion holes implies that this process is the one that dominates at the end of the experiment. The first days of the oxidation process would then mainly reflect the effect of bacteria in suspension and the ferric-oxidation of pyrite (nonstoichiometric sulphates are formed according to the n_2 and n_3 mechanisms). Adherent bacteria could enhance a stoichiometric dissolution of pyrite by directly recovering electrons at the mineral cathodes for their metabolism (n_1 mechanism). This mechanism, assumed to be similar to reaction (1), would compete with the ferric-oxidation of pyrite that is controlled by the kinetics of reactions (2) and (3) and would favor the development of a few deep corrosion pittings. In that case, the present experiment indicate that the isotopic fractionations associated to pyrite oxidation are much higher than previously

anticipated with values of $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} \approx +16\text{‰}$ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2} \approx -25\text{‰}$. Such a high value for $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}$ may correspond to a biogenic effect linked to bacterial respiration.

4.5 The oxygen isotopic composition of surface compounds

As detailed above, oxygen isotopic fractionations predict that the $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates, either stoichiometric or not, would range between $\approx -3\text{‰}$ and $\approx +12\text{‰}$. This range is much more restricted than that observed for surface oxidation products (from $-34 \pm 1.7\text{‰}$ to $+38.5 \pm 1.2\text{‰}$), implying the existence of specific surface oxidation processes which cannot be described by simple isotopic equilibrium with the solution. As shown by the Raman spectroscopy data, sulphates and oxides (and in some cases unknown intermediate compounds) are the sole surface molecules that can significantly contribute to the oxygen isotopes signal.

While most of surface data for oxidation by *A.f.* and Fe^{3+} range between -2 and $+12\text{‰}$ and can be attributed to sulphates formed at the pyrite surfaces according to the same reactions than shown for dissolved sulphates, these two experiments present oxidation products with extreme $\delta^{18}\text{O}$ values either highly positive (peaking at $\approx +20\text{‰}$ to $\approx +25\text{‰}$) or negative (peaking at $\approx -20\text{‰}$). The isotopic images (Fig. 7) also confirm the presence of extreme values and strongly different $\delta^{18}\text{O}$ even at the surface of one single grain.

The high $\delta^{18}\text{O}$ values might tentatively be attributed to a formation mechanism of sulphates at the surface of pyrite using oxygen from water produced during the oxidation of ferrous ions enhanced by bacteria (reaction 3). This “respiration water” is theoretically produced by reaction (3) with a $\delta^{18}\text{O}$ of $+23\text{‰}$. If sulphates are formed fast enough so that the isotopic reequilibration of respiration water with ambient water is not completed, then their $\delta^{18}\text{O}$ can be positive (from $+3\text{‰}$ to $+39\text{‰}$ depending on the relative proportions of reactions 1 and 2 with biotic $\Delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4\text{-O}_2} = -25\text{‰}$ and $\Delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} = +16\text{‰}$). This process would be similar to, for instance, the precipitation of aragonite in the coral calcification fluids which is fast enough to prevent a complete oxygen isotopic reequilibrium of HCO_3^- with H_2O (Rollion-Bard et al., 2003). This would imply that pyrite oxidation occurs in an environment isolated by bacteria from the solution, i.e. out of isotopic equilibrium with the solution. This might be consistent with the indication from Raman spectra that most of the oxidation products are strongly attached to the surface via a Fe^{2+} or Cu^{2+} cation and nearly anhydrous (Pisapia, 2006).

The only possible source, at pyrite surface, of oxygen strongly enriched in ^{16}O is OH^- resulting from water dissociation ($\Delta^{18}\text{O}_{\text{OH-H}_2\text{O}} = -41.1\text{‰}$ at 25°C , Usdowski and Hoefs, 1993). Significant amounts of OH^- might be present in the close vicinity of bacteria which could maintain local environments with a higher pH than that of the solution as previously shown in the case of biofilms (Blight et al., 2000). While it is difficult to envision the incorporation of OH^- in sulphates, this can be readily achieved in oxy-hydroxides, such as the ones observed by Raman spectroscopy at the pyrite surface (Fig. 1 and Fig. 6). The $\delta^{18}\text{O}$ range of the bio-oxidation products of pyrite are thus likely to reflect the mixture in various proportions of oxides and sulphates formed out of equilibrium with the solution in local environments favoured by bacteria. Such a process is also in agreement with the extreme isotopic heterogeneity observed at a micrometer scale for oxidation products (Fig. 7).

Such microenvironments are not required to explain, at first order, the range of $\delta^{18}\text{O}$ observed for abiotic oxidation of pyrite with a mode at $-15\pm 5\text{‰}$ for natural air-oxidized pyrites and $+15\pm 5\text{‰}$ for H_2O_2 oxidation. In the case of natural air-oxidized pyrites, the oxidation does not occur in an aqueous medium but through a vapor water layer adsorbed at the pyrite surfaces: the $\delta^{18}\text{O}$ of this vapor is of $\approx -18\text{‰}$ (or lower in case of additional kinetic isotopic fractionation) at 15°C for local water with $\delta^{18}\text{O} \approx -8\text{‰}$ (Majzoub, 1971). Assuming that abiotic $\Delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}$ is low ($+5.1\pm 1\text{‰}$, Taylor et al., 1984a), the $\delta^{18}\text{O}$ of sulphates formed by oxidation of pyrite with water range from $\approx -24\text{‰}$ to $\approx -13\text{‰}$. Oxidation of pyrite with H_2O_2 is dominated by reaction (1) so that the $\delta^{18}\text{O}$ of sulphates ($\approx +16\text{‰}$ for an abiotic $\Delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4\text{-O}_2} = -4.6\text{‰}$ and $\Delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} = +5.1\pm 1\text{‰}$, Taylor et al., 1984a) reflects the high $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved O_2 . Obviously, these first order considerations on the $\delta^{18}\text{O}$ of surface oxidation products do not explain some of the extreme values observed (Fig. 8), values which might be due to the presence of intermediate reaction products (e.g. polythionates).

5 CONCLUSION

The oxygen and sulphur isotopic composition of dissolved sulphates from the present experiments showed the existence of at least two pyrite bio-oxidation pathways. They reflect the non-homogeneous reactivity of the surfaces of pyrites and can be related to the breaking of a S-S or a S- FeS_2 bonds. The evolution with time of the proportion of nonstoichiometric and stoichiometric sulphates reflects the influence of bacteria on the oxidation process. The first days of bio-corrosion are dominated by a ferric oxidation of pyrite that is entertained by non adherent bacteria. They oxidize ferrous ions and consequently favour reaction (2). This

electrochemical process initiates an electronic circulation within the mineral lattice. Adherent bacteria can thus recover directly electrons from the pyrite and favour the incorporation (i) of dissolved oxygen atoms in sulphates in a process similar to reaction (1) or (ii) of respiration water in a process similar to reaction (2).

If the sulphur isotopic fractionations determined for bio-oxidation ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}$ from -0.4‰ to +1.3‰) are limited and comparable with previous published data, this is not the case for the oxygen isotopic fractionations. Despite the $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates are in the same range than observed in previous experiments, their evolution with time, associated with the development of specific corrosion morphologies, argue in favour of $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} \approx +16\text{‰}$ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2} \approx -25\text{‰}$. These high values for $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}$ and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}$ might be related to biological effects, though this cannot be further constrained from the present set of experiments. In addition, a strong chemical and isotopic heterogeneity is observed for oxidation products stabilized at pyrite surfaces, indicating that oxidation processes at the pyrite surface are quite complex and occur in local environments isolated from the solution. This seems to be the major effect of bacteria, and it could result from the development of conditions akin bio-films, though bio-films were never observed in the present experiments.

Because of its large variability shown by ion microprobe at the micrometer scale, the $\delta^{18}\text{O}$ of the oxidation products attached to pyrite surfaces cannot be, in itself, a reliable biosignature. It has to be associated to other evidences (morphology of the surface, chemistry and repartition of the oxidation products). Thus, the identification of signs of a biotic activity at the surfaces of pyrite is not straightforward and requires the association of different criteria.

References

- Aleon J., Chaussidon M., Champenois M., and Mangin D. (2001a) Ion microprobe quantitative imaging of stable isotopes. *Geostandards Newsletter : The Journal of Geostandards and Geoanalysis*.
- Aleon J., Engrand C., Robert F., and Chaussidon M. (2001b) Clues to the origin of interplanetary dust particles from the isotopic study of their hydrogen-bearing phases. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65**(23), 4399-4412.
- Bailey S. W., Mayer B., and Mitchell M. J. (2004) Evidence for influence of mineral weathering on stream water sulphate in Vermont and New Hampshire. *Hydrological Processes*. **18**, 1639-1653.
- 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), 195-205.
- Blight K., Ralph D. E., and Thurgate S. (2000) Pyrite surfaces after bio-leaching: a mechanism for bio-oxidation. *Hydrometallurgy* **58**(3), 227-237.
- Boon M., Brassier H. J., Hansford G. S., and Heijnen J. J. (1999) Comparison of the oxidation kinetics of different pyrites in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **53**(1), 57-72.
- Buckley A. N. and Woods R. (1987) The surface oxidation of pyrite. *Applied Surface Science* **27**(4), 437-452.
- Chiba H. and Sakai H. (1985) Oxygen isotope exchange rate between dissolved sulfate and water at hydrothermal temperatures. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **49**(4), 993-1000.
- Colmer A. R. and Hinkle M. E. (1947) The role of microorganisms in acid mine drainage : A preliminary report. *Science* **106**, 253-256.
- Crundwell F. K. (2003) How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy* **71**(1-2), 75-81.
- Dziurla M.-A. (1995) Contribution à l'étude de réactions à l'interface Bactérie-Minéral au cours de la lixiviation de minéraux sulfurés (pyrites) par *Thiobacillus ferrooxidans*. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, Spécialité Géomicrobiologie.
- Edwards K. J., Bond P. L., Druschel G. K., McGuire M. M., Hamers R. J., and Banfield J. F. (2000) Geochemical and biological aspects of sulfide mineral dissolution: lessons from Iron Mountain, California. *Chemical Geology* **169**(3-4), 383-397.
- Edwards K. J. and Rutenberg A. D. (2001) Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chemical Geology* **180**(1-4), 19-32.
- Ehrlich H. L. (1981) Geomicrobiology. *New York, Marcel Dekker, Inc*, 393p.
- Ehrlich H. L. and Brierley C. L. (1990) *Microbial mineral recovery*.
- Fowler T. A. and Crundwell F. (1998) Leaching of Zinc Sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: Experiments with a Controlled Redox Potential Indicate No Direct Bacterial Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10), 3570-3575.
- Fowler T. A., Holmes P. R., and Crundwell F. (1999) Mechanism of Pyrite Dissolution in the Presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(7), 2987-2993.
- Fowler T. A., Holmes P. R., and Crundwell F. K. (2001) On the kinetics and mechanism of the dissolution of pyrite in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **59**(2-3), 257-270.

- Hansford G. S. and Vargas T. (1999) Chemical and electrochemical basis of bioleaching processes. *Biohydrometallurgy and the Environment toward the mining of the 21st century. International Biohydrometallurgy Symposium.*, 13-26.
- Holmes P. R. and Crundwell F. K. (2000) The kinetics of the oxidation of pyrite by ferric ions and dissolved oxygen: an electrochemical study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**(2), 263-274.
- Kaplan I. R. and Rittenberg S. C. (1964) Microbial fractionation of sulfur isotopes. *Journal of Gen Microbiology* **34**, 195-212.
- Krouse H. R., Gould W. D., McCready R. G. L., and Rajan S. (1991) ¹⁸O incorporation into sulphate during the bacterial oxidation of sulphide minerals and the potential for oxygen isotope exchange between O₂, H₂O and oxidized sulphur intermediates. *Earth and Planetary Science Letters* **107**, 90-94.
- Lloyd R. M. (1968) Oxygen isotope behavior in the sulfate-water system. *J. Geophys. Res.* **73**, 6099-6209.
- Majzoub M. (1971) Fractionnement en Oxygène-18 et en Deuterium entre l'eau et sa vapeur. *Journal of Chemical Physics.* **197**, 1423-1436.
- Mc Cready R. G. L. and Krouse H. R. (1982) Sulfur isotope fractionation during the oxidation of elemental sulfur by Thiobacilli in a solonchic soil. *Can. J. Soil. Sci.* **62**, 105-110.
- Mc Guire M. M., Edwards K. J., Banfield J. F., and Hamers R. J. (2001) Kinetics, surface chemistry, and structural evolution of microbially mediated sulfide mineral dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65**(8), 1243-1258.
- Mustin C., Berthelin J., Marion P., and de Donato P. (1992) Corrosion and Electrochemical Oxidation of a Pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(4), 1175-1182.
- Mustin C., de Donato P., and Berthelin J. (1993a) An approach to spatial distribution of iron and sulfur species present on pyrite surface. In *Biohydrometallurgical technologies, I, Biological processes.* (ed. A. E. Torma, Wey, J.E., Lakshmanan, V.I., ed.), pp. 163-175.
- Mustin C., de Donato P., Berthelin J., and Marion P. (1993b) Surface sulphur as promoting agent of pyrite leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* **11**(1-3), 71-77.
- Ndlovu S. and Monhemius A. J. (2005) The influence of crystal orientation on the bacterial dissolution of pyrite. *Hydrometallurgy* **78**(3-4), 187-197.
- Nordstrom D. K. and Southam G. (1997) Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation. In *Geomicrobiology.*, Vol. 35 (ed. J. F. Banfield, Nealson, K.H.), pp. 361-390. Mineral. Soc. Am.
- Ohmoto H. and Rye R. O. (1979) Isotopes of sulfur and carbon. In *Geochemistry of hydrothermal ore deposits.* (ed. H. L. Barnes), pp. 509-567. Wiley.
- Pisapia C. (2006) Identification de biosignatures structurales, chimiques et isotopiques à l'interface bactérie/minéral dans le système *Acidithiobacillus ferrooxidans*/pyrite. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine - Spécialité Géosciences, INPL.
- Reedy B. J., Beattie J. K., and Lowson R. T. (1991) A vibrational spectroscopic ¹⁸O tracer study of pyrite oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **55**(6), 1609-1614.
- Rojas-Chapana J. A. and Tributsch H. (2004) Interfacial activity and leaching patterns of *Leptospirillum ferrooxidans* on pyrite. *FEMS Microbiology Ecology* **47**(1), 19-29.
- Rollion-Bard C., Chaussidon M., and France-Lanord C. (2003) pH control on oxygen isotopic composition of symbiotic corals. *Earth and Planetary Science Letters* **215**(1-2), 275-288.

- Sampson M. I., Phillips C. V., and Ball A. S. (2000) Investigation of the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to mineral sulfides using scanning electron microscopy analysis. *Minerals Engineering* **13**(6), 643-656.
- Sand W., Gehrke T., Jozsa P.-G., and Schippers A. (1999) Direct vs. Indirect Bioleaching. *Biohydrometallurgy and the Environment toward the mining of the 21st century. International Biohydrometallurgy Symposium.*, 27-49.
- Singer P. C. and Stumm W. (1970) Acidic mine drainage: The rate-determining step. *Science* **164**, 1121-1123.
- Stumm W. and Morgan J. J. (1996) *Aquatic Chemistry. 3rd Ed. Wiley, New York, 1022 pp.*
- Suzuki I. (1965) Incorporation of atmospheric oxygen-18 into thiosulfate by the sulfur-oxidizing enzyme of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **110**, 97-101.
- Taylor B. E., Wheeler M. C., and Nordstrom D. K. (1984a) Isotope composition of sulphate in acid mine drainage as measure of bacterial oxidation. *Nature* **308**(5), 538-541.
- Taylor B. E., Wheeler M. C., and Nordstrom D. K. (1984b) Stable isotope geochemistry of acid mine drainage: Experimental oxidation of pyrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**(12), 2669-2678.
- Thorma A. E. (1986) Biohydrometallurgy of gold. *Proceedings of the Third Annual General Meeting of BIOMINET*, 3-24.
- Toniazzo V. (1998) Approche des mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* grâce à la modélisation morpho-chimique de la surface minérale : rôle fondamental des phases superficielles oxydées. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, Spécialité Géosciences.
- Toniazzo V., Lazaro I., Humbert B., and Mustin C. (1999a) Bioleaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*: fixed grains electrode to study superficial oxidized compounds. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* **328**(8), 535-540.
- Toniazzo V., Mustin C., Portal J. M., Humbert B., Benoit R., and Erre R. (1999b) Elemental sulfur at the pyrite surfaces: speciation and quantification. *Applied Surface Science* **143**(1-4), 229-237.
- Toran L. and Harris R. F. (1989) Interpretation of sulfur and oxygen isotopes in biological and abiological sulfide oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **53**(9), 2341-2348.
- Uzdowski E. and Hoefs J. (1993) Oxygen isotope exchange between carbonic acid, bicarbonate, carbonate, and water: A re-examination of the data of (1950) and an expression for the overall partitioning of oxygen isotopes between the carbonate species and water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**(15), 3815-3818.
- Van Everdingen R. O. and Krouse H. R. (1985) Isotope composition of sulphates generated by bacterial and abiological oxidation. *Nature* **315**(30), 395-396.
- Weber P. A., Stewart W. A., Skinner W. M., Weisener C. G., Thomas J. E., and Smart R. S. C. (2004) Geochemical effects of oxidation products and framboidal pyrite oxidation in acid mine drainage prediction techniques. *Applied Geochemistry* **19**(12), 1953-1974.
- Yu J.-Y., McGenity T. J., and Coleman M. L. (2001) Solution chemistry during the lag phase and exponential phase of pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Chemical Geology* **175**(3-4), 307-317.

Tables

Table 1. Bacteria and dissolved elements concentrations and isotopic compositions of water and dissolved sulphates for the 51 and 52 days bio-oxidation experiments (Ferm1 and Ferm 2 respectively).

Time (days)	Bacteria concentration (bacteria.mL ⁻¹)	pH	Content of dissolved species (mol)					δ ¹⁸ O H ₂ O ^a (‰ _{SMOW})	δ ¹⁸ O SO ₄ ²⁻ (‰ _{SMOW})	δ ³⁴ S dissolved SO ₄ (‰ _{CDT})	Nonstoichiometric fraction f _{ns}
			SO ₄ ²⁻	Fe ²⁺	Cu ²⁺	Fe ²⁺	Cu ²⁺				
<i>Ferm 1</i>											
0	9.67 10 ⁶	1.61	nd ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	2.00 10 ⁷	1.43	nd	1.40 10 ⁻⁴	3.81 10 ⁻⁶	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	nd	1.40	1.83 10 ⁻²	2.31 10 ⁻⁴	4.51 10 ⁻⁶	nd	-5.32	nd	nd	nd	0.97
12	2.80 10 ⁷	1.38	1.85 10 ⁻²	7.31 10 ⁻⁴	5.31 10 ⁻⁶	nd	-5.16	10.86 ± 0.34	4.25 ± 0.06	nd	0.92
16	nd	1.36	2.39 10 ⁻²	1.41 10 ⁻³	6.00 10 ⁻⁶	nd	-4.99	10.66 ± 0.19	nd	nd	0.88
22	5.20 10 ⁷	1.33	2.46 10 ⁻²	3.07 10 ⁻³	6.49 10 ⁻⁶	nd	-4.74	5.66 ± 0.08	4.32 ± 0.09	nd	0.75
25	nd	1.30	2.86 10 ⁻²	4.64 10 ⁻³	7.47 10 ⁻⁶	nd	-4.63	4.83 ± 0.15	3.96 ± 0.05	nd	0.68
31	nd	1.29	3.38 10 ⁻²	7.04 10 ⁻³	8.51 10 ⁻⁶	nd	-4.56	5.76 ± 0.14	3.71 ± 0.02	nd	0.58
33	7.20 10 ⁷	1.29	3.45 10 ⁻²	8.13 10 ⁻³	1.00 10 ⁻⁵	nd	-4.50	5.08 ± 0.15	3.78 ± 0.01	nd	0.53
35	nd	1.28	3.79 10 ⁻²	8.81 10 ⁻³	9.96 10 ⁻⁶	nd	-4.45	5.15 ± 0.15	3.80 ± 0.06	nd	0.54
37	nd	1.26	3.67 10 ⁻²	8.89 10 ⁻³	nd	nd	-4.43	5.21 ± 0.20	3.84 ± 0.01	nd	0.52
46	1.80 10 ⁸	1.21	4.52 10 ⁻²	1.15 10 ⁻²	1.17 10 ⁻⁵	nd	-4.35	4.85 ± 0.08	3.52 ± 0.01	nd	0.49
51	nd	1.16	4.64 10 ⁻²	1.27 10 ⁻²	nd	nd	-3.98	4.28 ± 0.34	3.50 ± 0.04	nd	0.45
<i>Ferm 2</i>											
0	8.50 10 ⁶	1.37	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	nd	1.23	nd	2.28 10 ⁻⁴	nd	nd	-7.04	nd	nd	nd	nd
4	nd	1.21	nd	2.59 10 ⁻⁴	nd	nd	-7.09	nd	nd	nd	nd
10	1.20 10 ⁷	1.19	2.67 10 ⁻³	3.61 10 ⁻⁴	1.82 10 ⁻⁶	nd	-6.98	nd	nd	nd	0.73
12	nd	1.19	9.21 10 ⁻³	5.02 10 ⁻⁴	nd	nd	-6.95	7.82 ± 0.15	nd	nd	0.89
15	1.80 10 ⁷	1.19	8.93 10 ⁻³	6.39 10 ⁻⁴	1.98 10 ⁻⁶	nd	-6.83	7.00 ± 0.20	nd	nd	0.86
18	nd	1.17	1.31 10 ⁻²	9.05 10 ⁻⁴	2.12 10 ⁻⁶	nd	-6.87	8.03 ± 0.09	nd	nd	0.86
21	nd	1.17	nd	1.20 10 ⁻³	2.33 10 ⁻⁶	nd	-6.77	nd	nd	nd	nd
24	2.40 10 ⁷	1.16	nd	1.49 10 ⁻³	2.38 10 ⁻⁶	nd	-6.70	nd	nd	nd	nd
26	nd	1.12	1.08 10 ⁻²	2.00 10 ⁻³	2.42 10 ⁻⁶	nd	-6.62	4.82 ± 0.09	nd	nd	0.63
37	3.20 10 ⁷	1.12	1.08 10 ⁻²	2.49 10 ⁻³	2.47 10 ⁻⁶	nd	-6.58	5.91 ± 0.06	nd	nd	0.54
43	3.80 10 ⁷	1.12	1.06 10 ⁻²	3.23 10 ⁻³	2.51 10 ⁻⁶	nd	-6.52	1.77 ± 0.06	nd	nd	0.39
49	4.40 10 ⁷	1.11	1.57 10 ⁻²	5.35 10 ⁻³	nd	nd	-6.49	2.76 ± 0.27	nd	nd	0.32
52	nd	1.10	2.13 10 ⁻²	nd	2.66 10 ⁻⁶	nd	-6.41	2.80 ± 0.28	nd	nd	nd

(a) 1s ± 0.1‰
 (b) not determined

Figure Captions

Fig. 1. Typical Raman spectra realized at the surfaces of biotically and abiotically oxidized pyrites. Various oxidation products are identified: iron oxides, sulphates, thiosulphate, polysulphides, and elemental sulphur. Pyrite main Raman bands are identified as Ag (380cm^{-1}), Eg (344cm^{-1}) and Tg3 (430cm^{-1}). Intensities are given in counts per second (cps).

Fig. 2. Typical ^{16}O intensity (in count per second, cps) and $\delta^{18}\text{O}$ evolutions with time (1 cycle = 5s) during SIMS depth profiling at the surface a bio-oxidized pyrite. The ^{16}O peak corresponds to surface oxygen-rich products formed during the oxidation process and is associated to a plateau of $\delta^{18}\text{O}$ (= -2.7‰ , for this sample) that is used to determine the isotopic composition of surface compounds. Note that summing all the ion intensities after the peak of oxygen concentration would give a $\delta^{18}\text{O}$ of $+1.1\text{‰}$. This was not chosen because of the large instrumental correction due to the background on the Faraday Cup at low intensities.

Fig. 3. Evolution with time of the molar S/Fe (dots) and Cu/Fe (triangles) ratios for Ferm1 (closed symbols) and Ferm2 (open symbols).

Fig. 4. Evolution of the isotopic composition of water (dotts $\delta^{18}\text{O}$ ‰/SMOW) and dissolved sulphates (squares: $\delta^{18}\text{O}$ ‰/SMOW and triangles: $\delta^{34}\text{S}$ ‰/CDT) with time for Ferm1 (closed symbols) and Ferm2 (open symbols).

Fig. 5. SEM images of biotically and abiotically oxidized pyrite grains after 20 months: (a) in presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, the black arrow shows deep and geometric corrosion pittings, (b) sterile Fe^{3+} -oxidation, (c) sterile hydrogen peroxide oxidation and (d) natural air-oxidized pyrites.

Fig. 6. Ternary diagrams for the three main oxidation products observed on oxidized pyrite surfaces: polysulfides (S_nS^{2-}), iron oxides (Fe-oxides) and sulphates (SO_4^{2-}) for (a) bio-oxidation and Fe^{3+} oxidation, (b) hydrogen peroxide aqueous oxidation and (c) natural air-oxidation.

Fig. 7. SIMS isotopic imaging of two oxidized pyrite surfaces. Surface oxygen-rich compounds are identified that present extreme $\delta^{18}\text{O}$ variations at the micrometric scale.

Fig. 8. Repartition of $\delta^{18}\text{O}$ measured on oxidation products at pyrite surfaces by depth profiling (SIMS). Data correspond to a mixture of surface oxidation products (mainly sulphates and iron oxides). Three behaviours have been identified and correspond to (i) bio- and ferric-oxidation, (ii) hydrogen peroxyde oxidation and (iii) natural air-oxidation. The $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved atmospheric oxygen (+23.5‰), growth medium water (from -7‰ to -4‰) and vapor water (-17‰) are precised. The grey zone indicates the range of $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates.

Fig. 9. Distribution of the $\delta^{34}\text{S}$ of dissolved sulphates as a function of the nonstoichiometric proportion of dissolved sulphates (f_{NS}) ($r^2=0.790$). For reference, the position of pyrite is given by the grey zone. Nonstoichiometric dissolved sulphates $\delta^{34}\text{S}$ (+4.52‰) is determined for $f = 1$ and stoichiometric dissolved sulphates $\delta^{34}\text{S}$ (+2.84‰) for $f = 0$.

Fig. 10. Correlation between measured and modelled $\delta^{34}\text{S}$ (in ‰/CDT) of dissolved sulphates ($r^2=0.790$) considering $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}} = +0.4\text{‰}$ for nonstoichiometric oxidation of pyrite (Δ^{NS}) and $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}} = -1.3\text{‰}$ for stoichiometric oxidation of pyrite (Δ^{S}).

Fig. 11. Evolution of the $\delta^{18}\text{O}$ (in ‰/SMOW) of dissolved sulphates as a function of the nonstoichiometric proportion of dissolved sulphates (f_{NS}). Nonstoichiometric ($f_{\text{NS}}=1$) and stoichiometric ($f_{\text{NS}}=0$) dissolved sulphates $\delta^{18}\text{O}$ are given for Ferm1 (closed symbols, $r^2=0.790$) and Ferm2 (open symbols, $r^2=0.874$).

Fig. 12. Calculated $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulphates as a function of f_{NS} accordingly to various hypotheses. The nonstoichiometric fraction of sulphates is alternatively supposed to correspond to the relative proportion of reaction (2) ($f_{\text{NS}}=x$), to the relative proportion of reaction (1) ($f_{\text{NS}}=1-x$), to f_{W} and to f_{A} for both Ferm1 (closed symbols) and Ferm2 (open symbols).

Figure 1

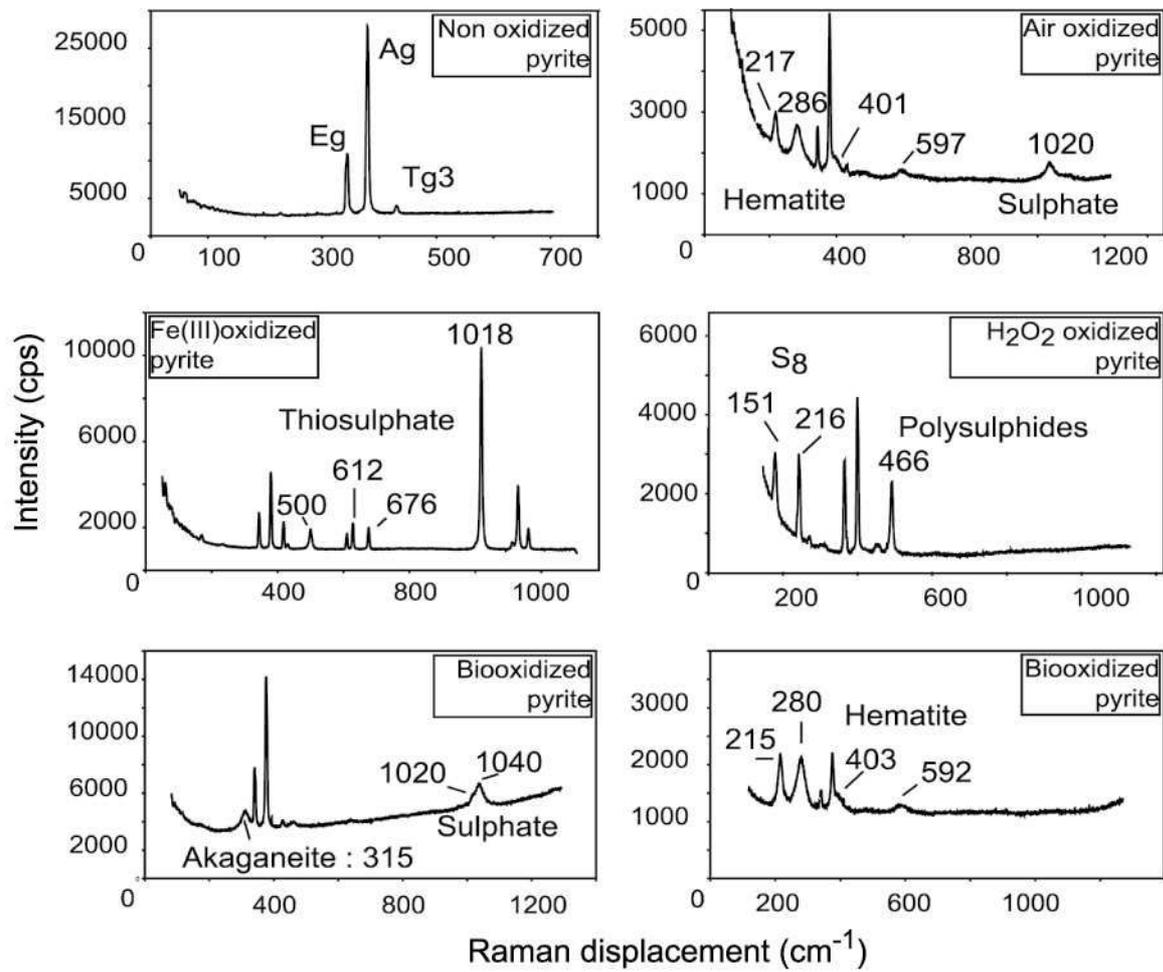


Figure 2

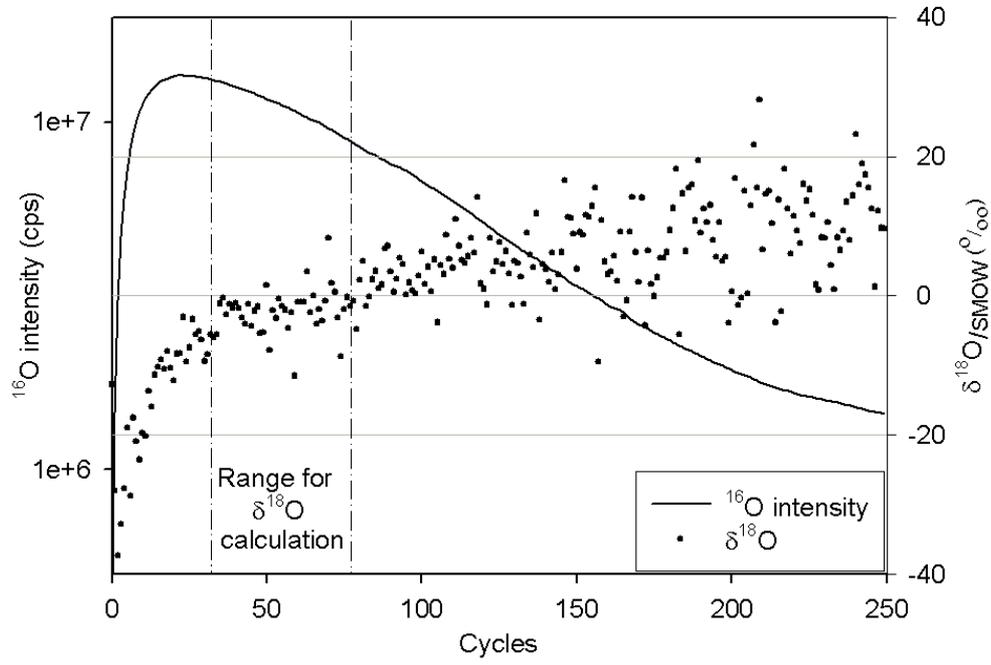


Figure 3

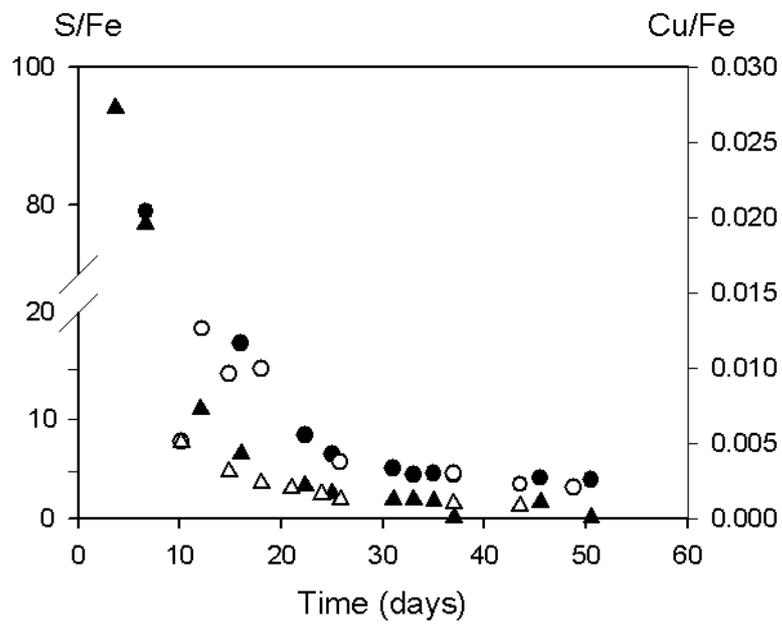


Figure 4

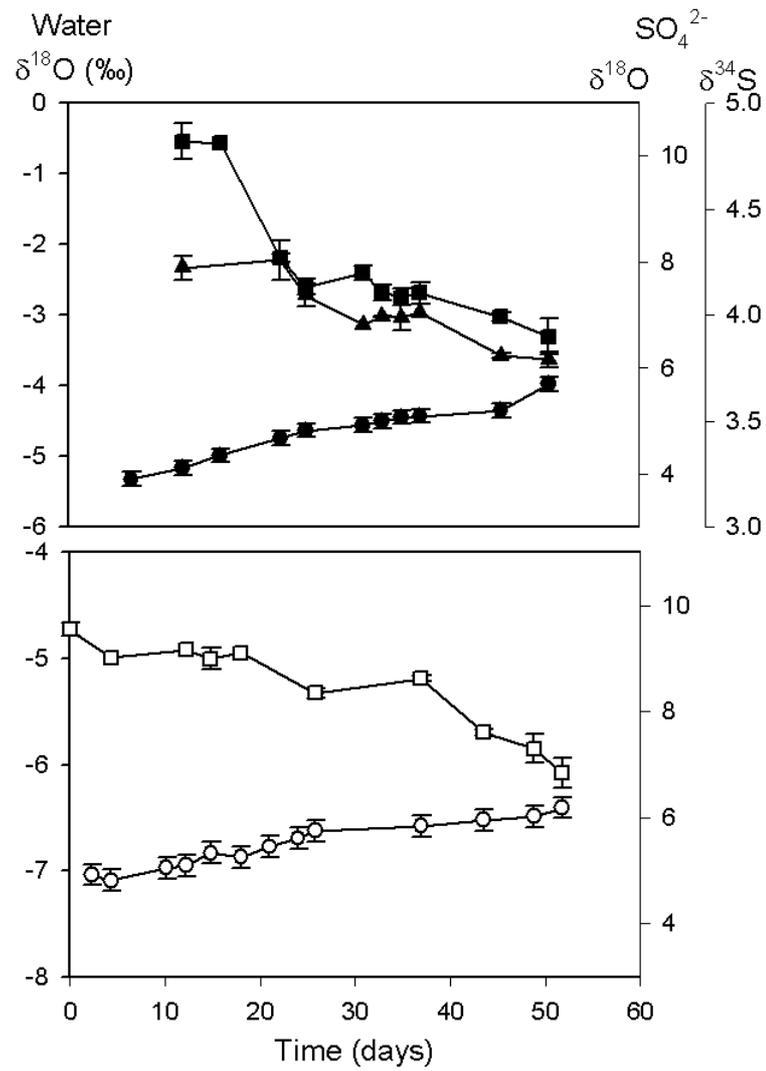


Figure 5

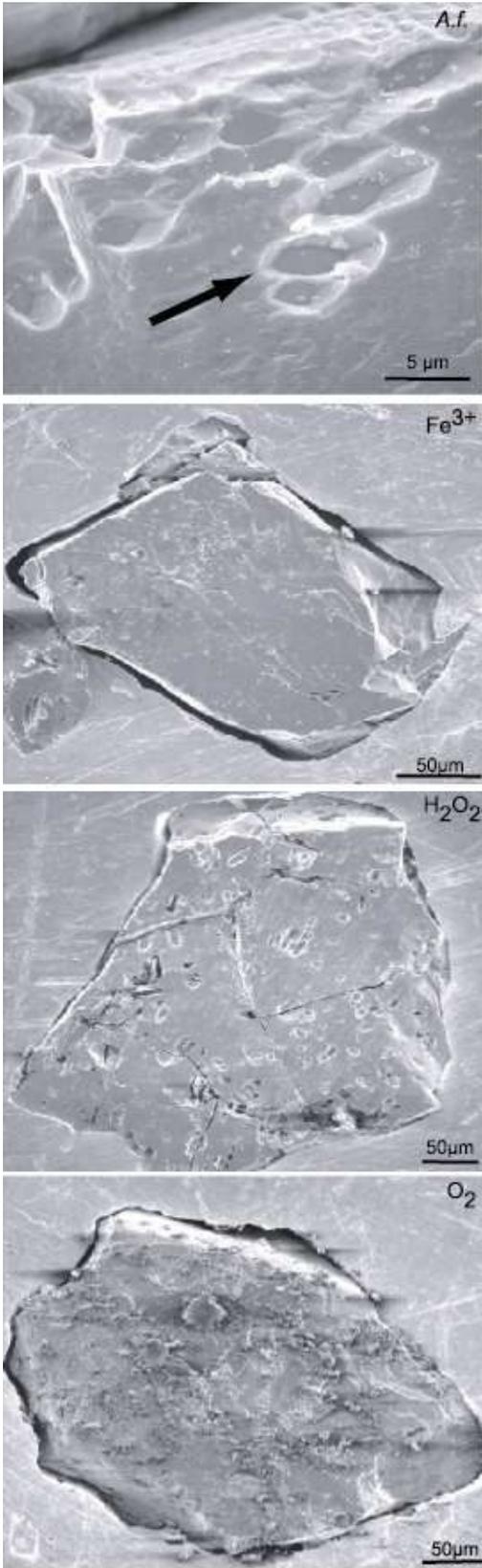


Figure 6

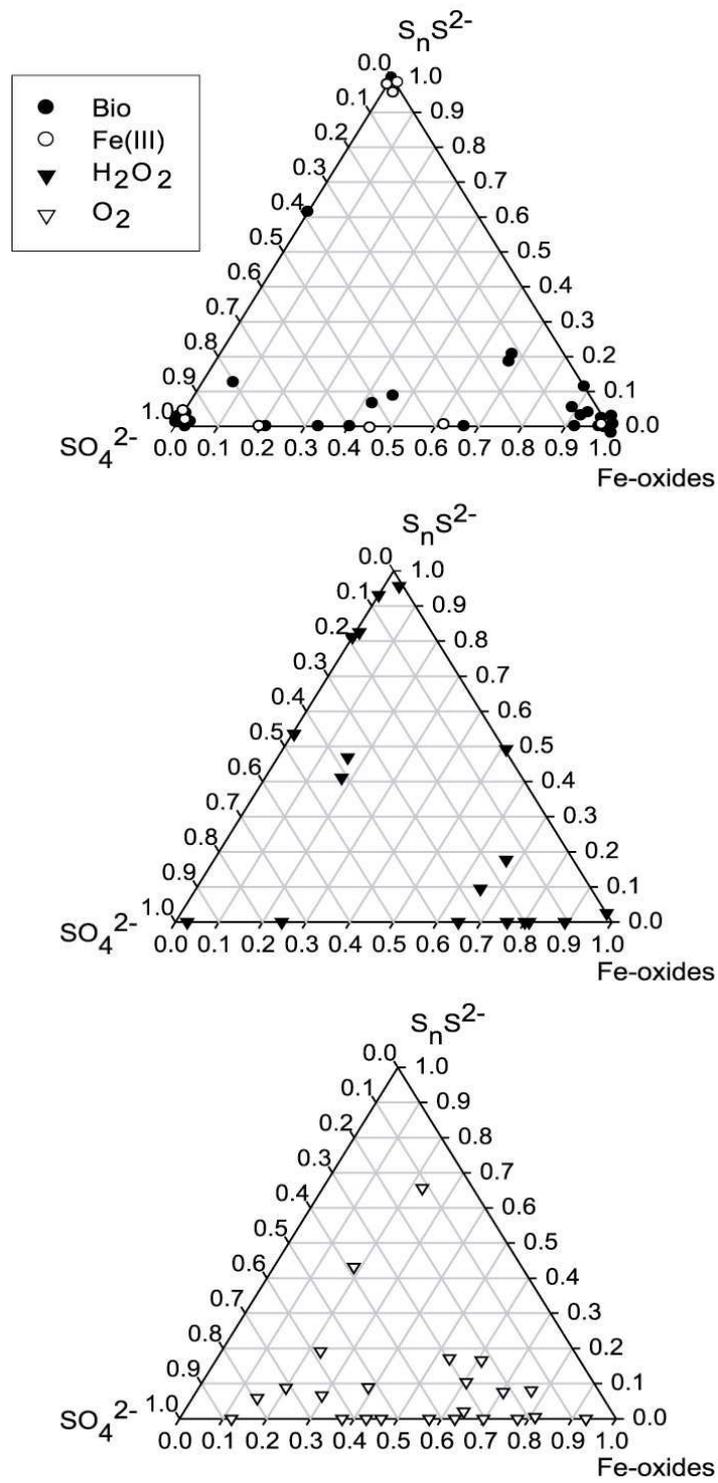


Figure 7

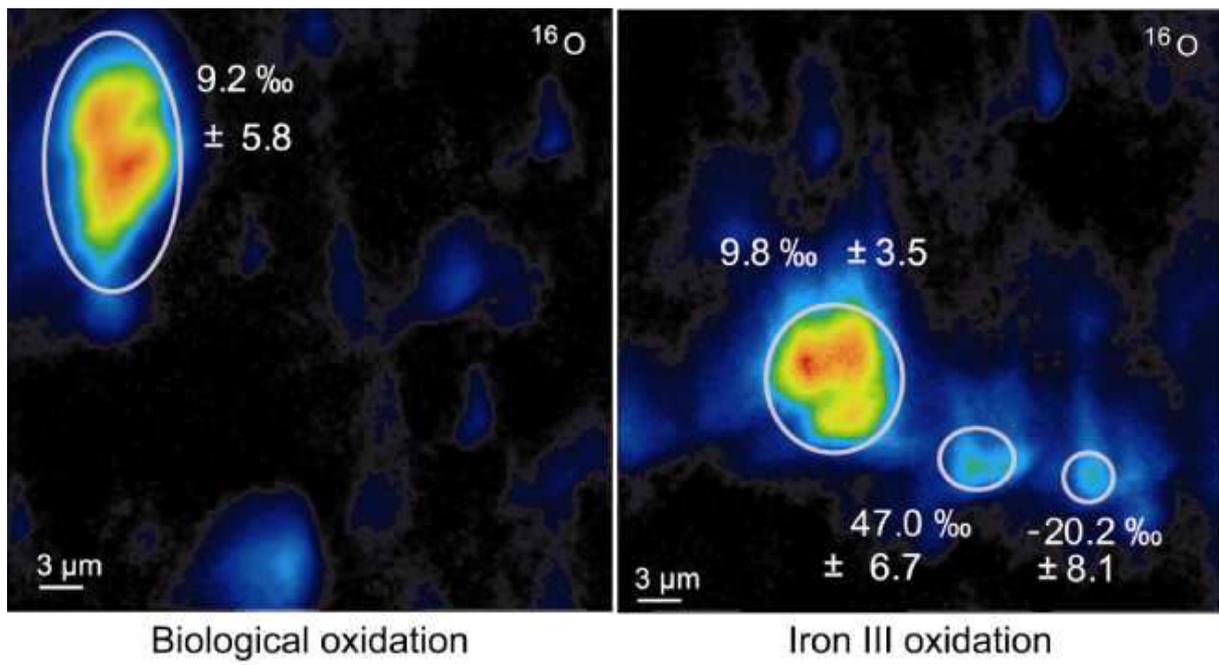


Figure 8

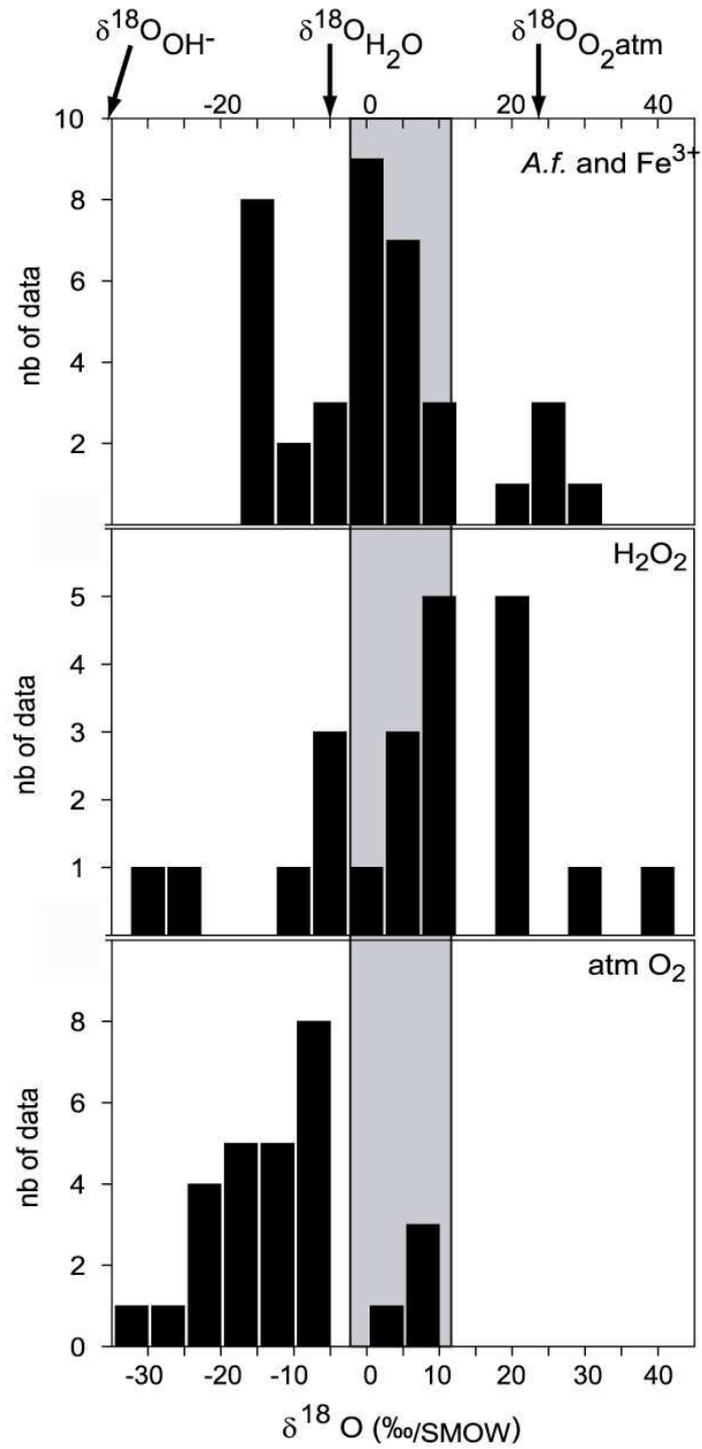


Figure 9

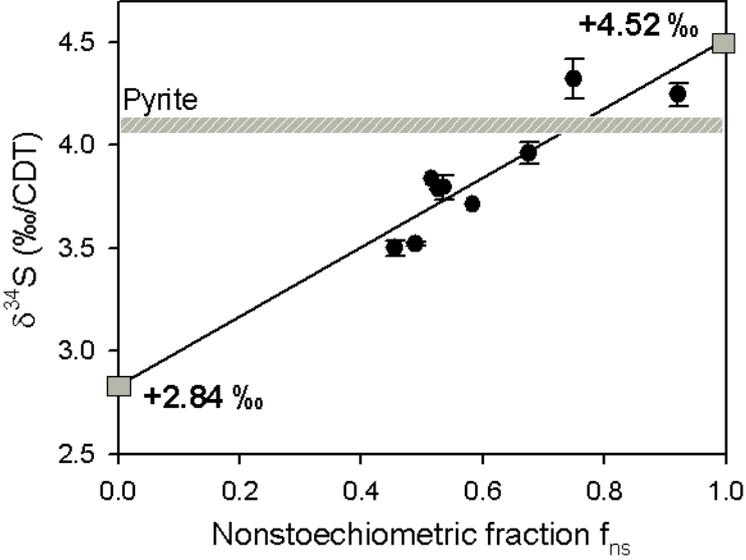


Figure 10

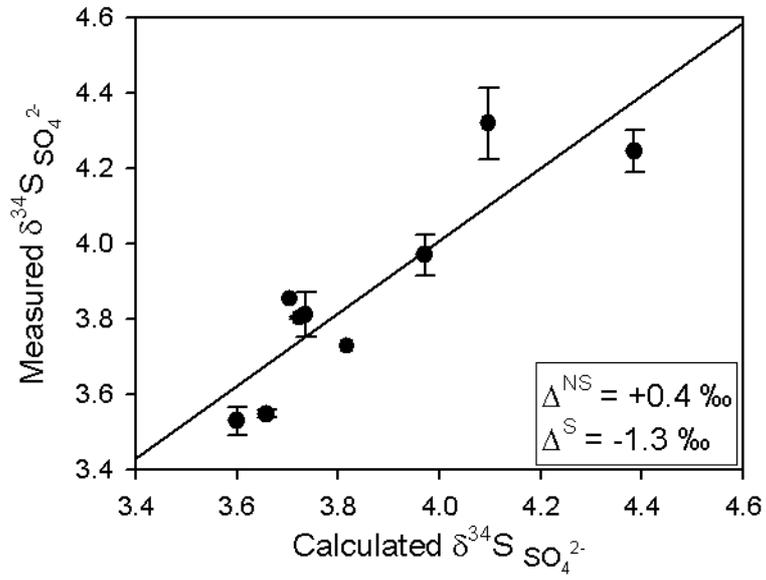


Figure 11

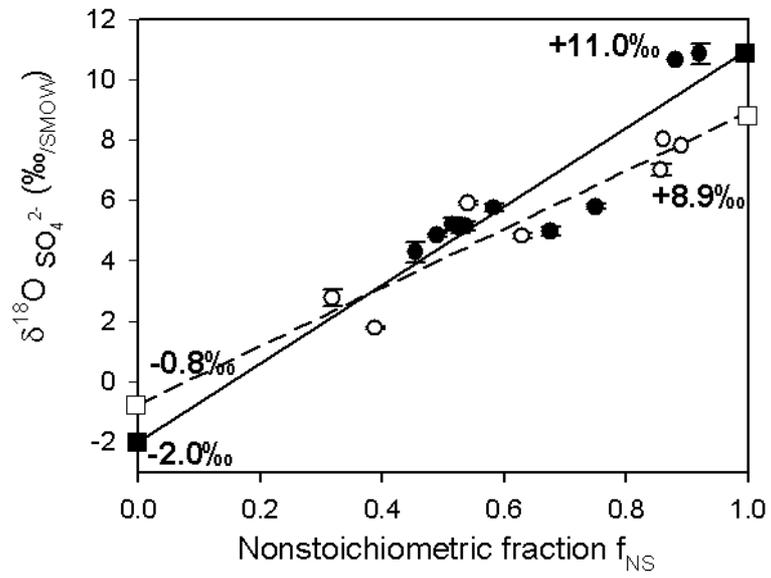
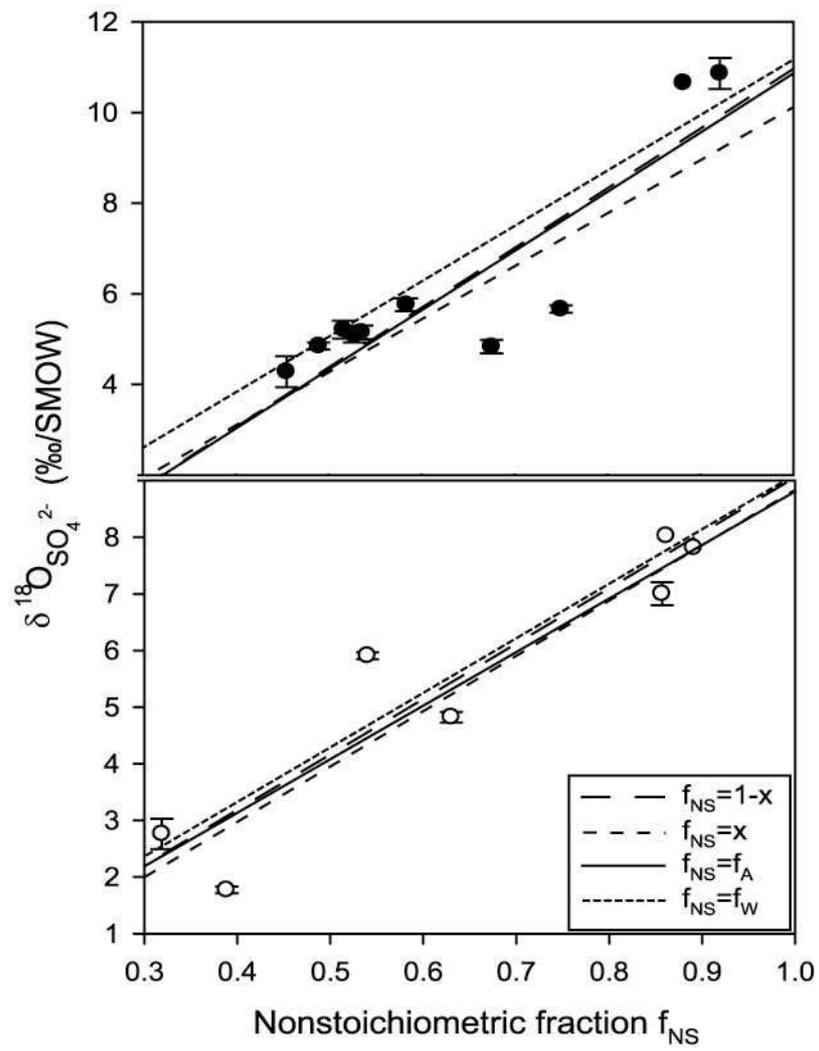


Figure 12



APPENDIX: SUMMARY OF ION MICROPROBE DATA

Table A1: Ion microprobe data on surfaces of oxidized pyrite grains for all experiments.

A.f. ^a	$\delta^{18}\text{O}$ (‰/SMOW \pm std)						
	Fe^{3+}		O_2		H_2O_2		
-10.11	± 1.8	22.07	± 1.1	-12.5	± 1.4	17.2	± 1.5
-7.04	± 0.5	9.73	± 1.6	-9.91	± 1.1	6.3	± 1.1
-16.02	± 0.9	8.62	± 1.1	-9.96	± 1.0	5.21	± 1.2
-1.33	± 2.1	2.98	± 0.8	6.92	± 0.9	6.85	± 1.3
-1.68	± 1.4	4.96	± 0.9	7.44	± 0.8	19.48	± 1.5
3.94	± 0.3	-2.12	± 0.8	-5.72	± 1.5	3.86	± 1.2
-19.42	± 2.2	-3.06	± 2.1	-10.19	± 1.4	4.63	± 1.1
-19.42	± 2.2	-7.59	± 1.4	-17.5	± 0.4	-33.48	± 1.4
-1.93	± 0.5	-1.64	± 0.7	-7.33	± 1.4	15.88	± 1.3
2.3	± 1.7	-2.44	± 1.8	5.04	± 1.5	-27.38	± 0.9
24.98	± 3.3	29.56	± 1.7	2.23	± 0.8	6.5	± 2.1
23	± 1.2			-10.3	± 1.2	-9.88	± 0.5
1.98	± 0.9			-18.82	± 0.6	-12.33	± 0.6
2.82	± 0.7			-16.89	± 0.4	17.9	± 1.2
-2.83	± 2.3			-9.83	± 1.2	-6.26	± 0.9
-9.57	± 0.7			-21.67	± 0.9	5.6	± 0.8
4.41	± 0.2			-6.58	± 0.5	15.64	± 0.5
-10.31	± 1.7			-14.94	± 2.1	-6.19	± 1.4
7.9	± 0.6			-22.46	± 0.9	1.73	± 1.6
-2.8	± 1.4			-5.21	± 0.5	-4.58	± 0.4
16.44	± 0.9			-8.03	± 1.3	38.54	± 2.0
-17	± 1.3			-12.14	± 1.9	25.5	± 1.4
				-20.71	± 0.6		
				-18.02	± 0.4		
				-25.5	± 0.9		
				-17.83	± 0.6		
				-23.97	± 1.2		
				-34	± 0.5		

(a) Oxidizer

Partie IV : Synthèse sur les mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Les résultats obtenus dans ce chapitre apportent des informations complémentaires sur les mécanismes de formation des sulfates dissous et permettent d'affiner le modèle d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

1 Mécanismes proximaux et distaux

Les observations *in vivo* du système *A.f.*/pyrite ont mis en évidence l'existence de deux circulations électroniques au sein du réseau cristallin de la pyrite liées à l'influence de bactéries adhérentes (mécanisme proximal) ou en solution via les ions ferriques (mécanisme distal). Les $\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates dissous ont permis :

- d'identifier les sources des atomes d'oxygène incorporés dans ces sulfates : H_2O ou O_2
- de déterminer les fractionnements cinétiques associés : $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} \approx +16\text{‰}$ et $\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2} \approx -25$.
- de relier l'effet des bactéries adhérentes (mécanisme proximal) à la formation de sulfates congruents incorporant majoritairement des atomes d'oxygène provenant de l'oxygène atmosphérique dissous ou de l'eau de respiration (Figure C5. 17).

Ce mécanisme est lié à la rupture d'une liaison S-FeS₂ au cours de laquelle les deux atomes de soufre du doublet S-S²⁻ de la pyrite sont oxydés en sulfates. Il est favorisé par le maintien d'un fort courant électronique de courte portée entre les anodes et les cathodes appelées précédemment « proximales ». Il s'accompagne d'un fractionnement isotopique négatif du soufre entre les sulfates et la pyrite : $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}}$ de -1,3‰.

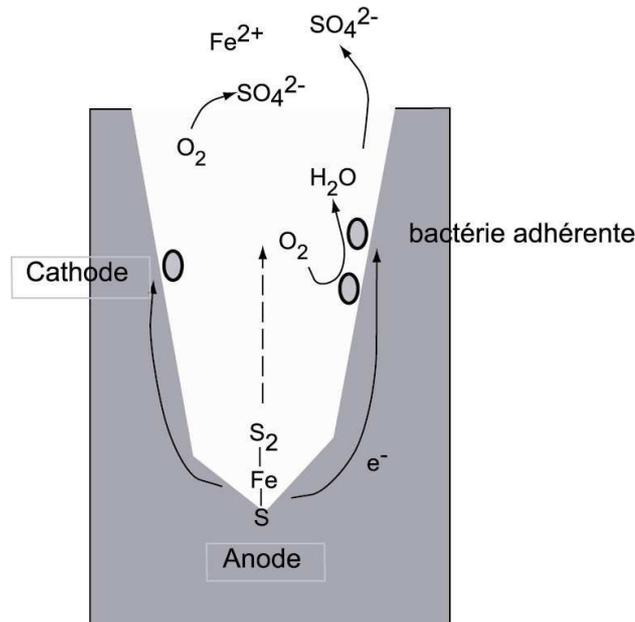


Figure C5. 17 : Schéma de formation de sulfates congruents traduisant l'influence des bactéries adhérentes au niveau des parois des figures de corrosion.

- de relier l'effet des bactéries non adhérentes (mécanisme distal) à la formation de sulfates incongruents incorporant majoritairement des atomes d'oxygène provenant de l'eau du milieu (Figure C5. 18).

Ce mécanisme est lié à la rupture d'une liaison S-S du doublet S-S²⁻ de la pyrite pour lequel un seul soufre est oxydé. Il est associé à un courant électronique de plus longue portée et/ou moins intense entre les anodes de surface et les cathodes « distales ». Cette circulation d'électrons est entretenue par les oxydants en solution : O₂ ou Fe³⁺ via les bactéries non adhérentes. Ce mécanisme peut néanmoins être entretenu par des bactéries adhérentes au niveau de sites de faible énergie, donc à faible courant électronique. Il s'accompagne d'un fractionnement isotopique positif du soufre entre les sulfates et la pyrite : $\Delta_{\text{SO}_4\text{-pyrite}} = +0,4\text{‰}$.

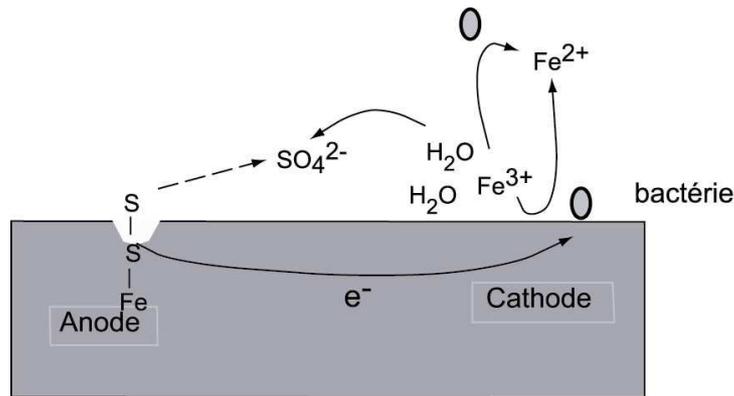


Figure C5. 18 : Schéma de formation de sulfates incongruents traduisant l'influence des bactéries non adhérentes.

2 Processus d'oxydation de surface

Les produits d'oxydation formés et stabilisés en surface de pyrites oxydées semblent provenir de mécanismes spécifiques et sont difficilement corrélables au mécanisme proximal précédemment décrit. En effet, dans ce cas précis, les transferts électroniques sont très intenses et favorisent la mise en solution rapide de la pyrite. Il semble plus probable que les composés observés en surface de pyrite soient issus de processus d'oxydation mettant en jeu des couples anodes/cathodes très rapprochés et à faible densité de courant électronique (Figure C5. 19). Ce mécanisme peut également permettre d'expliquer la stabilisation en surface de polysulfures, ou de soufre élémentaire qui sont les intermédiaires réactionnels couramment décrit pour l'oxydation d'un atome de soufre du doublet $S-S^{2-}$ de la pyrite. Dans ce cas, le transfert d'électrons serait trop faible pour mener à terme l'oxydation du soufre et permettre la rupture de la liaison S-S.

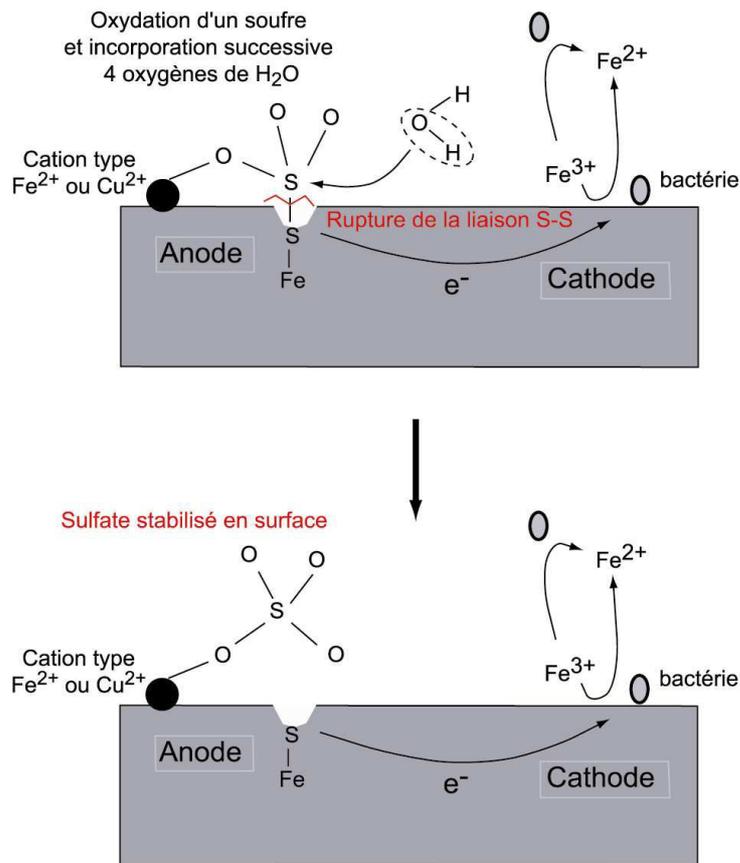


Figure C5. 19 : Modèle de formation et de stabilisation d'un sulfate en surface de la pyrite par mécanisme distal.

Par ailleurs, la grande variabilité des résultats obtenus par sonde ionique, et notamment les valeurs extrêmes (positives et négatives), semble traduire l'existence d'environnements locaux confinés, isolés du milieu réactionnel :

- Ainsi, les valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ relativement élevées pourraient s'expliquer par l'incorporation, dans les produits d'oxydation, d'atomes d'oxygène de molécules d'eau issues de la respiration bactérienne (Figure C5. 20).

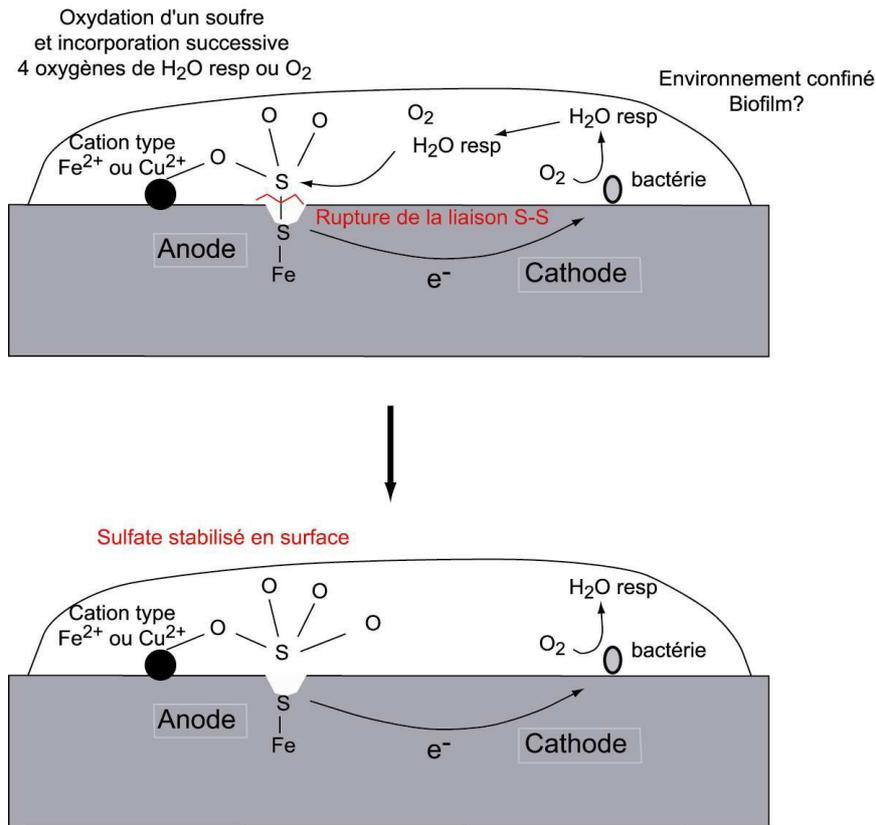


Figure C5. 20 : Modèle de formation et de stabilisation d'un sulfate en surface de la pyrite en environnement confiné.

- De même, les valeurs très négatives observées en surface de pyrite pourraient traduire la présence de composés tels que des oxy-hydroxydes de fer incorporant des groupements hydroxyles dont le $\delta^{18}\text{O}$ est proche de -40‰ (Figure C5. 21).

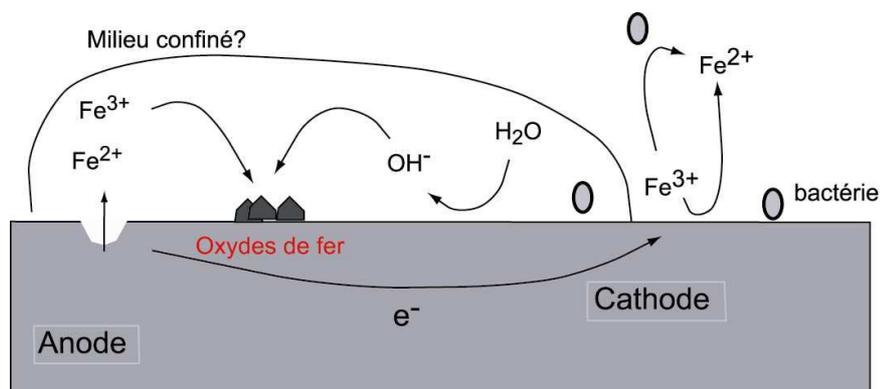


Figure C5. 21 : Modèle de formation et de stabilisation d'oxy-hydroxydes de fer en surface de la pyrite en environnement confiné.

En conclusion, si les $\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates en solution permettent de compléter le modèle d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*, les données obtenues par sonde ionique confirment la complexité et la diversité des processus de surface. Il a néanmoins été possible de proposer quelques exemples de mécanismes à l'origine de la formation de composés à très fort ou très faible $\delta^{18}\text{O}$. Cependant, la détermination d'une biosignature isotopique univoque en surface de pyrite reste difficilement envisageable.

Partie V : Biosignature isotopique ?

Bien que les sulfates dissous semblent être caractéristiques des mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ces informations ne peuvent pas être prise en compte lors de la recherche d'indices de vie en surface des minéraux. Ils mettent toutefois en évidence l'existence de fractionnements isotopiques forts entre les sulfates et l'oxygène dissous ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2} \approx -25\%$) ou l'eau ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}} \approx +16\%$) qui participent au signal de $\delta^{18}\text{O}$ de surface.

En revanche, les résultats obtenus par profils en profondeur ou imagerie isotopique, sur des surfaces minérales, sont trop variables pour permettre l'identification d'une signature isotopique fiable et unique de la bio-oxydation de la pyrite, du moins à l'échelle d'analyse utilisée (50x50 μm). Leur interprétation est limitée en raison :

- de l'analyse simultanée de divers produits d'oxydation de surface dont la nature chimique et les proportions relatives ne sont pas connues.
- de la probable multitude de processus de surface.
- du manque de connaissance de ces mécanismes de surface.

Il est toutefois possible de noter que les expériences de bio-oxydation présentent les gammes de valeurs les moins dispersées. En effet, les $\delta^{18}\text{O}$ extrêmes ($<-30\%$ ou $>+30\%$) n'ont été observées qu'en surface de pyrites oxydées abiotiquement et pourraient, dans ce cas, constituer un indice de probable absence de vie. Cependant, l'incorporation dans les sulfates d'eau issue de la respiration bactérienne peut, en théorie, engendrer la formation de sulfates à $\delta^{18}\text{O}$ très élevé (jusqu'à $+39\%$).

Une probable signature isotopique biologique résiderait alors dans la mise en évidence :

- d'environnements de surface particuliers imputables à la présence bactérienne (traces de biofilms par exemple) favorisant le développement de nombreux processus d'oxydation de surface distincts.
- des fractionnements isotopiques ($\Delta_{\text{SO}_4\text{-O}_2}$ et $\Delta_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}}$) forts.

Dans tous les cas, il est tout de même nécessaire de coupler ces déterminations isotopiques à d'autres analyses (chimiques, morphologiques ou organiques) de surface pour pouvoir être capable d'identifier des indices de vie.

Discussion générale et synthèse

C H A P I T R E 6

DISCUSSION GENERALE

1	MECANISMES D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	316
1.1	CONTROLE BIOLOGIQUE DE L'OXYDATION	316
1.2	CONTROLE MINERALOGIQUE	317
1.3	MODELE D'OXYDATION DE LA PYRITE PAR <i>A.F.</i>	319
1.4	TRANSPOSITION A D'AUTRES SYSTEMES.	323
2	BIOSIGNATURE DE L'OXYDATION DE LA PYRITE PAR A.F. OU INDICES DE VIE ?	326
3	COUPLAGE D'ECHELLE ET METHODOLOGIE	328
4	LIMITES DE L'ETUDE	329

L'identification de fossiles de macro-organismes est en général aisée en raison de l'existence de critères morphologiques non ambigus. En revanche, les processus de fossilisation des micro-organismes restent mal contraints et sujets à controverse. La seule observation d'une forme ovoïde ou sphérique ne suffisant pas à caractériser un fossile bactérien, il est nécessaire de disposer de critères indirects de reconnaissance de traces biologiques. Il est alors indispensable de comprendre les interactions fortes existant entre la bactérie et son environnement proche. Le système *A.f./pyrite* a été couramment décrit à travers différentes approches : études des lixiviats, états de surface des minéraux, nature de la liaison bactérie/minéral. Cependant, peu d'études présentent une vision globale du système prenant en considération simultanément l'incidence des propriétés minérales et de l'activité biologique. L'objectif du travail présenté ici était donc d'essayer de combler une partie de cette lacune, en couplant diverses techniques d'analyse plus ou moins résolutes.

Les résultats obtenus dans ce travail confirment la très forte hétérogénéité de surface (morphologique et chimique) de grains non polis de pyrite bio- ou chimio-oxydés, à laquelle vient s'ajouter une très forte variabilité isotopique des produits d'oxydation. Cette réponse non homogène du minéral à un oxydant souligne l'existence de mécanismes d'oxydation de surface spécifiques. Ce travail permet ainsi d'apporter un éclairage nouveau sur le processus d'oxydation de la pyrite par *A.f.* et sur ses implications pour la recherche d'indices de vie. Trois résultats majeurs sont à souligner et seront développés dans la suite de cette synthèse :

- Un nouveau modèle d'oxydation de la pyrite par *A.f.* a été pu être proposé. Il est basé sur les circulations d'électrons au sein du réseau cristallin de la pyrite. Ces électrons servent de source d'énergie aux bactéries et sont transférés directement (mécanisme proximal) ou indirectement (mécanisme distal via des ions ferriques) du minéral aux cellules bactériennes. Ces deux mécanismes sont supposés concomitants et attribuables respectivement à l'action de bactéries adhérentes et en solution.
- Une succession d'indices structuraux, chimiques et isotopiques de l'activité de *A.f.* sur des surfaces naturelles de pyrites à été établie. Ces indices ne définissent pas une biosignature unique et incontestable, mais ils permettent néanmoins de réduire l'incertitude quant à l'identification de traces d'activité de bactéries sur des surfaces de pyrite.
- La nécessité d'employer des couplages méthodologiques pour rechercher des biosignatures est ainsi mise en évidence, un seul outil ne suffisant pas.

1 Mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans*

De nombreux indices mettent en évidence le phénomène d'oxydation de la pyrite par corrosion perforante en présence de *A.f.* (figures de corrosion géométriques et orientées, adhésion préférentielle des bactéries dans ces figures de corrosion...). Le système *A.f.*/pyrite est en effet marqué par une très forte dépendance trophique et énergétique de la bactérie vis-à-vis du minéral auquel elle se trouve fréquemment associée dans les milieux naturels. Cette dépendance induit un mécanisme spécifique d'oxydation de la pyrite par *A.f.* guidé simultanément par les propriétés des bactéries et celles du minéral.

1.1 Contrôle biologique de l'oxydation

Les observations morphologiques, ainsi que les caractérisations chimiques et isotopiques de surface réalisées dans cette étude, mettent en évidence les similitudes existant entre la bio-oxydation et l'oxydation abiotique par les ions ferriques. Ces résultats confirment que la bio-oxydation de la pyrite est, au moins pour une partie, basée sur un phénomène électrochimique, accéléré par la régénération rapide des ions ferriques par les bactéries en solution. Ce mécanisme bio-induit est d'ailleurs le plus souvent retenu pour expliquer l'augmentation des taux de dissolution de la pyrite en présence de bactéries.

Cependant, l'action du vivant dans l'oxydation de la pyrite ne peut pas se résumer à cette description globale ni se limiter à ce mécanisme indirect peu spécifique, que l'on peut considérer comme distal. L'effet discriminant du biotique vis-à-vis de l'abiotique semble, en effet, provenir des bactéries adhérentes en surface du minéral. Ces dernières récupèrent directement les électrons au niveau de cathodes minérales en jouant un rôle de pompe à électrons. Ce mécanisme, qui ne fait pas intervenir de couple redox intermédiaire, est plus direct et plus spécifique. Il est basé sur des circulations d'électrons à courte portée et peut être considéré comme proximal. Les compositions isotopiques ($\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{34}\text{S}$) des sulfates dissous confirment d'ailleurs l'existence de ces deux mécanismes distaux et proximaux, qui semblent posséder des signatures isotopiques propres et distinctes.

Cette forte dépendance de la bactérie vis-à-vis du minéral se déduit de la constitution de la chaîne respiratoire de *A.f.* Comme il a été précisé Chapitre I, *A.f.* possède un des plus grand nombre de transporteur d'électrons parmi les micro-organismes autotrophes. L'organisation de ces transporteurs périplasmiques n'est pas figée, et est susceptible de varier en fonction de la source énergétique disponible pour la bactérie. Cette modularité de la chaîne

respiratoire de la bactérie indique que *A.f.* peut s'adapter facilement aux variations locales des propriétés de surface du minéral et, de ce fait, favorise une oxydation très efficace de la pyrite. Les cellules se comportent, en effet, comme des pompes à électrons en surface de la pyrite, même si la réactivité des faces et des sites actifs de surface n'est pas homogène (potentiels électrochimiques variables).

1.2 Contrôle minéralogique

Il existe, par ailleurs, un fort contrôle minéralogique du système, aussi bien sur la propagation des figures de corrosion que sur le déroulement du processus d'oxydation lui-même.

Corrosion et propagation de pores

En présence de bactéries et suite à une oxydation poussée (plusieurs mois), la surface des pyrites oxydées présente des figures de corrosion possédant des morphologies et orientations spécifiques.

Contrairement aux idées admises, le processus d'oxydation n'a pas (ou peu) lieu au niveau des fissures ou des fractures initiales du minéral. Ces dernières résultent de contraintes mécaniques antérieures exercées sur les grains (fissures de Griffith) : broyage, choc, et sont peu affectées par l'oxydation. Elles peuvent favoriser la dissolution de la pyrite, dans les stades initiaux de l'oxydation, mais sont très vite supplantées par l'apparition de figures de corrosion géométriques et orientées.

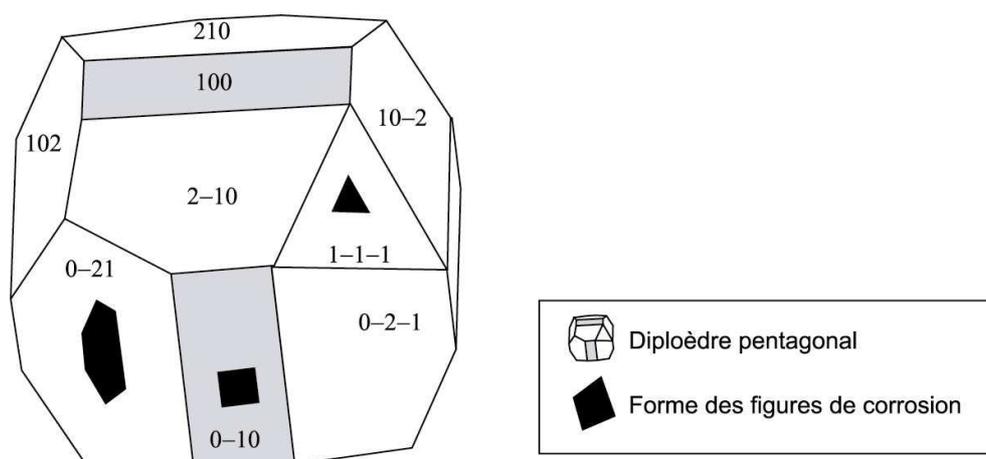


Figure C6. 1 : Géométrie des figures de corrosion en fonction des faces cristallographiques de la pyrite.

Ces figures de corrosion, dont les morphologies et les dimensions sont caractéristiques, ne peuvent pas être assimilées à des empreintes (« fingerprints ») de bactéries en surface de la pyrite. Toutes les figures d'une même face cristallographique sont par ailleurs orientées dans une direction commune, traduisant un contrôle minéralogique fort. Leur géométrie est caractéristique des éléments de symétrie de la pyrite (Figure C6. 1) : des faces (111), (100) et (210) à élément de symétrie 3 (un axe A3), 2 (axes A2) et 6 (combinaison d'un A3 et d'un miroir) développeront respectivement des figures de corrosion triangulaires, losangiques et hexagonales.

Granulométrie

La taille des grains de pyrite a une influence non négligeable sur l'oxydation. Elle conditionne, en effet, la surface spécifique du minéral et donc le nombre et la répartition des sites actifs de surface. Ainsi, des pyrites de faible granulométrie ($< 50\mu\text{m}$), à surface spécifique importante, auront une forte réactivité, très homogène et peu discriminante. D'après les résultats obtenus, la granulométrie 50-150 μm peut à ce titre être considérée comme quasi-idéale dans le cadre de cette étude, car elle présente :

- une surface spécifique suffisamment importante pour développer un nombre non négligeable de sites actifs disponibles pour les bactéries.
- une surface spécifique suffisamment faible pour que l'oxydation soit contrôlée par les bactéries. En effet, pour des granulométries fines, la réactivité des grains est telle que, même en présence de bactéries, les processus d'oxydation chimique abiotique sont majoritaires et conduisent à une passivation de surface importante.

Circulation électronique

En raison du caractère semi-conducteur de la pyrite, les surfaces des grains ne peuvent pas être considérées comme inertes et ne possèdent pas une réactivité homogène. La circulation anisotrope d'électrons, au sein du réseau cristallin, favorise l'expression en surface de sites à potentiel électrochimique variable, influençant à la fois l'adhésion bactérienne et le processus d'oxydation. Ainsi, l'adhésion de *A.f.* sur la pyrite ne dépend pas uniquement de liaisons hydrophobes, mais possède également un caractère « électrique » marqué, imposé par les propriétés du minéral.

Par ailleurs, la présence d'impuretés (même en faibles proportions), ainsi que la cristallinité des grains, contrôlent la corrosion de la pyrite en définissant les chemins

préférentiels empruntés par les électrons. Elles sont en partie à l'origine de l'orientation et du degré de corrosion de chaque grain.

Mécanismes de surface

Des mécanismes spécifiques, différenciables de ceux de solution, semblent être à l'origine de la formation de produits d'oxydation en surface de pyrites, comme l'attestent quelques-uns des résultats obtenus dans cette étude :

- Quatre types de sulfates possédant des conformations moléculaires et des degrés d'hydratation différents ont été identifiés en surface des pyrites oxydées. Si l'origine des sulfates de type I ou IV est connue (précipitation de sulfates de solution et adsorption sur des oxydes respectivement), les mécanismes de formation des types II et III restent encore à affiner. Ils seraient stabilisés par l'intermédiaire d'une liaison Oxygène-Cation-Pyrite qui interviendrait avant rupture de la liaison S-S du doublet de la pyrite. Ces sulfates seraient ainsi formés directement, et rapidement, en surface des pyrites, sans jamais passer en solution.
- L'absence, ou le faible degré d'hydratation ($n_{H_2O} \leq 1$) de ces sulfates traduit également un mode de formation particulier en surface des grains de pyrite. Ces sulfates « anhydres » auraient ainsi une conformation moléculaire semblable à celle des szolmonokites ($FeSO_4, 1H_2O$).
- La présence d'akaganéite semble également indéniable. Or, cet oxyde n'est pas considéré comme stable dans les conditions expérimentales en raison notamment (1) des conditions de pH très acides et (2) de l'absence totale de chlore dans le milieu. Toutefois, en conditions biotiques, certains polymères bactériens résiduels en surface du minéral pourraient contribuer à la stabilisation de l'akaganéite. En revanche, en milieu abiotique, un autre ion stabilisateur que le chlore doit être envisagé. Le milieu étant relativement pauvre, seuls des SO_4^{2-} ou des OH^- pourraient jouer ce rôle. Dans les deux cas, la présence d'akaganéite en surface de la pyrite indique l'existence de processus spécifiques ou d'un environnement de surface localement moins acide.

1.3 Modèle d'oxydation de la pyrite par A.f.

L'ensemble des résultats de cette étude conduit à l'élaboration d'un nouveau modèle d'oxydation de la pyrite par A.f. (Figure C6. 2) tenant compte :

- des observations *in vivo* et *in situ* (CLSM) qui ont permis de localiser précisément les bactéries actives et adhérentes sur les surfaces de pyrite au cours de l'oxydation.

- des analyses spectroscopiques de surface (Raman, IR et XPS) qui ont permis de caractériser la « couche d'oxydation » biologique comme étant constituée principalement de bosses micrométriques monophasiques oxydes (hématite) et sulfates (de type II).
- des analyses de la composition isotopique des produits d'oxydation qui ont permis (1) d'identifier les sources probables d'oxygène des sulfates dissous en relation avec leur mécanisme de formation et (2) de mettre en évidence la présence de processus de surface particuliers dans des environnements confinés.

Initiation de la corrosion

L'initiation de la corrosion de la pyrite est dépendante de la mise en place d'une circulation d'électrons au sein du réseau cristallin et donc de la présence d'un oxydant dans le milieu. Le facteur déclencheur de cette circulation pourrait être attribué aux bactéries adhérentes en surface, ou à des oxydants chimiques de solution (O_2 ou premiers Fe^{3+} formés). Il suffit, en général, d'une légère teneur en fer dans le milieu pour initier le mécanisme. L'ajout dans le milieu réactionnel d'une résine sulfonique complexant le fer (II) et (III) inhibe d'ailleurs fortement le processus de corrosion, même en présence de bactéries (Toniazzo, 1998). Toutefois, dans un environnement naturel, la question de cette initiation de l'oxydation de la pyrite ne se pose pas. En effet, la pyrite étant un des sulfures les plus nobles, son oxydation intervient relativement tard (après altération d'autres minéraux sulfurés moins stables) et la solution environnante est alors déjà très riche en fer.

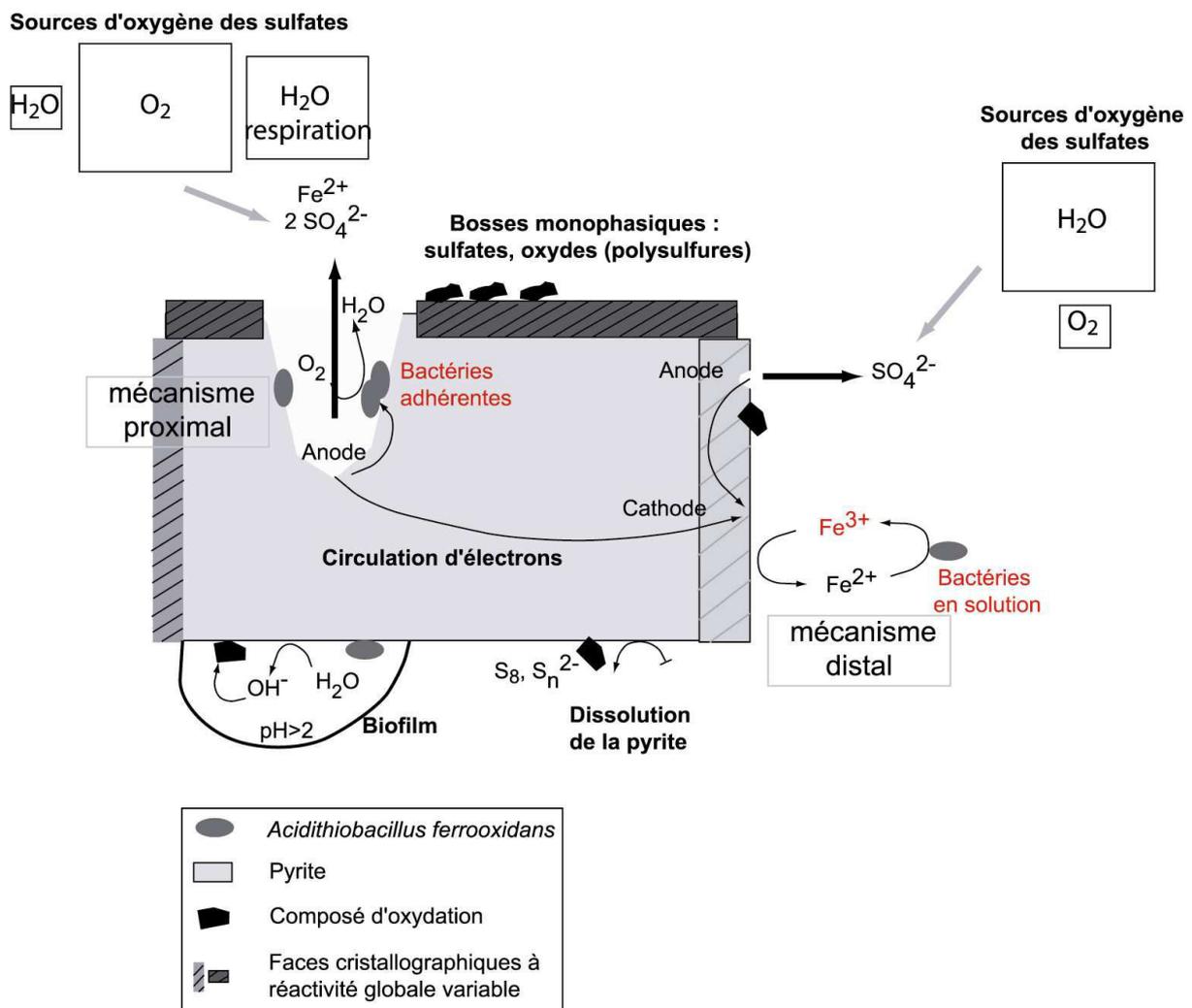
Déroulement de la corrosion

Une fois la circulation électronique initiée, la corrosion de la pyrite est guidée par le fonctionnement de couples anodes/cathodes (A/C) situés en surface du minéral. Deux types de couples A/C peuvent être distingués :

- Type A/C I qui donne lieu à l'oxydation d'un atome de soufre du doublet $S-S^{2-}$ et donc à la libération d'une mole de sulfate par mole de FeS_2 . Dans ce cas, le processus d'oxydation se rapproche du processus électrochimique (oxydation par Fe^{3+} , Eqn C1.18). L'oxydant majoritaire peut être (1) Fe^{3+} maintenu à forte concentration dans le milieu par les bactéries en suspension (**mécanisme distal**), (2) l'oxygène dissous ou (3) des bactéries adhérentes sur les surfaces non corrodées du minéral. Les sulfates

formés incorporent majoritairement des atomes d'oxygène provenant des molécules d'eau.

- Type A/C II qui donne lieu à l'oxydation des deux atomes de soufre du doublet S-S²⁻ et à la libération de deux moles de sulfates et d'un ion ferreux par mole de pyrite. Dans ce cas, le processus est plus efficace, et est entretenu par des circulations électroniques à courte portée. Il engendre une oxydation très localisée favorisant la formation de figures de corrosion profondes dont la géométrie et l'orientation sont gouvernées par le minéral. Dans ce cas, l'« oxydant » majoritaire est toute bactérie adhérente au niveau des cathodes situées sur les parois des figures de corrosion (**mécanisme proximal**). Les sulfates formés incorporent majoritairement des atomes d'oxygène provenant du O₂ atmosphérique dissous ou de molécules d'eau issues de la respiration bactérienne comme l'avait supposé Taylor et al. (1984).



Sur le schéma précédent, les deux couples A/C sont considérés comme indépendants, mais il est fort probable que cette distinction ne soit pas réelle et qu'elle traduise plus simplement des différences de cinétique des processus de corrosion au niveau de zones à réactivité variable.

Il est, d'autre part, important de noter que les notions de mécanisme proximal et distal ne se limitent pas seulement à décrire une « proximité » entre les bactéries et la surface du minéral, mais indiquent également la portée des circulations d'électrons :

- le mécanisme proximal est spécifique des figures de corrosion avec une circulation d'électrons sur de très faibles distances. Il ne peut pas être assimilé au mécanisme « contact », couramment décrit dans la littérature.
- le mécanisme distal traduit des chemins électroniques plus longs, moins efficaces, entretenus principalement par les bactéries en solution via les ions ferriques. Cependant, une partie des bactéries adhérentes au niveau de la surface non corrodée du minéral pourraient également être impliquée dans ce mécanisme distal.

Ce modèle phénoménologique traduit le caractère très local et intense de la bio-corrosion. Elle conduit à la formation de phases stables (hématite ou sulfates), organisées en bosses monophasiques. Les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} , majoritaires dans le milieu, sont supposés être les contre-ions principalement associés à ces sulfates, mais les techniques employées ici ne permettent pas de l'affirmer. En effet, les analyses Raman effectuées (Chapitre III) ont montré que les déplacements des ν_1 des sulfates ne sont pas dépendants de la nature du cation mais du degré d'hydratation. D'autres techniques (Mössbauer de surface ou μXANES par exemple) seraient nécessaires pour conclure finement sur ce point.

Passivation de surface et arrêt de la corrosion

Le maintien d'une corrosion efficace sur des périodes relativement longues dépendant :

- de la disponibilité de l'oxydant. En milieu abiotique, la cinétique (relativement lente) d'oxydation des ions ferreux par l'oxygène dissous contrôle l'avancement de l'oxydation.
- du minéral et du degré de corrosion « acceptable » pour un grain de pyrite donné, au-delà duquel la circulation électronique est ralentie et entravée.

- de la passivation de surface due au dépôt de produits d'oxydation qui limitent l'accès des oxydants (biotique et abiotique) aux zones électro-actives du minéral et la dissolution des zones anodiques. Elle dépend à la fois, du courant électronique et de la densité de corrosion. Ainsi, une pyrite n'est pas passivée tant que le degré de corrosion du minéral reste relativement faible, c'est à dire, tant que la conduction des électrons peut avoir lieu. La passivation est, *a priori*, la première cause d'arrêt de la corrosion de la pyrite. C'est à ce niveau que se situe une des différences majeures entre bio- et chimio-oxydation. Alors que les oxydants abiotiques ne peuvent pas contrôler cette passivation, les bactéries adhérentes maintiennent l'intensité du courant de corrosion sur de plus longues périodes, en favorisant la propagation des pores. La surface minérale, qui augmente au cours du temps, est de ce fait moins facilement passivée.

1.4 Transposition à d'autres systèmes.

Les résultats obtenus dans cette étude, comme pour la plupart des expériences de laboratoire, ne sont *a priori* applicables qu'au système choisi et difficilement extrapolables. La transposition de ces résultats ne peut se faire que sur des systèmes similaires associant un sulfure (ex : chalcopyrite, molybdénite, pyrite volcano-sédimentaire) et une bactérie autotrophe (ex : *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*).

Afin de valider le modèle proposé ci-dessus, des expériences complémentaires en mini-réacteurs de 4mL ont été réalisées sur deux pyrites naturelles (K hydrothermale et Es volcano-sédimentaire) et en présence de deux bactéries différentes *Acidithiobacillus ferrooxidans* (sulfo- et ferro-oxydante) et *Acidithiobacillus thiooxidans* (sulfo-oxydante). Les oxydations ont été maintenues 19 mois dans des conditions similaires à celles décrites pour les expériences en batch (procédure de nettoyage des pyrites, milieu de culture 70b ou 35, 28°C, agitation, fermeture par un bouchon Biofolie®). L'oxydation de la pyrite Es, contenant des impuretés de cuivre et d'arsenic, a été comparée à celle de la pyrite K, plus noble, utilisée dans toutes les expériences précédemment décrites. Elle a permis de tester l'influence de la pureté du minéral sur la bio-oxydation. L'utilisation d'inocula de *A.f.* et *A.t.* a, quant à elle, permis de tester l'influence de la bactérie.

Les morphologies des figures de corrosion observées sur la surface de la pyrite Es en présence de *A.f.* sont semblables à celles obtenues sur la pyrite K mais nettement plus marquées (Figure C6. 3). La corrosion est maximale, les contours des grains ne sont presque plus identifiables. La pyrite Es, probablement en raison de la présence d'arsenic dans le

réseau cristallin, est nettement plus réactive. Les critères morphologiques de reconnaissance de l'activité de *A.f.* en surface de pyrite ne peuvent pas être appliqués dans ce cas, car la corrosion est trop intense et non spécifique de l'action bactérienne. En effet, une oxydation abiotique pourrait provoquer l'apparition de figures géométriques et orientées similaires à celles décrites précédemment, en raison de la très forte réactivité de la pyrite Es.

La **pureté du minéral** est donc un paramètre majeur pour la reconnaissance de traces d'activité de bactéries en surface du minéral. Dans le cadre de la recherche de biosignatures sur des pyrites naturelles, il est évident qu'une pyrite hydrothermale, moins réactive sera à préférer à une pyrite sédimentaire ou volcano-sédimentaire pour laquelle les structures résultant d'une bio-oxydation seront moins spécifiques.

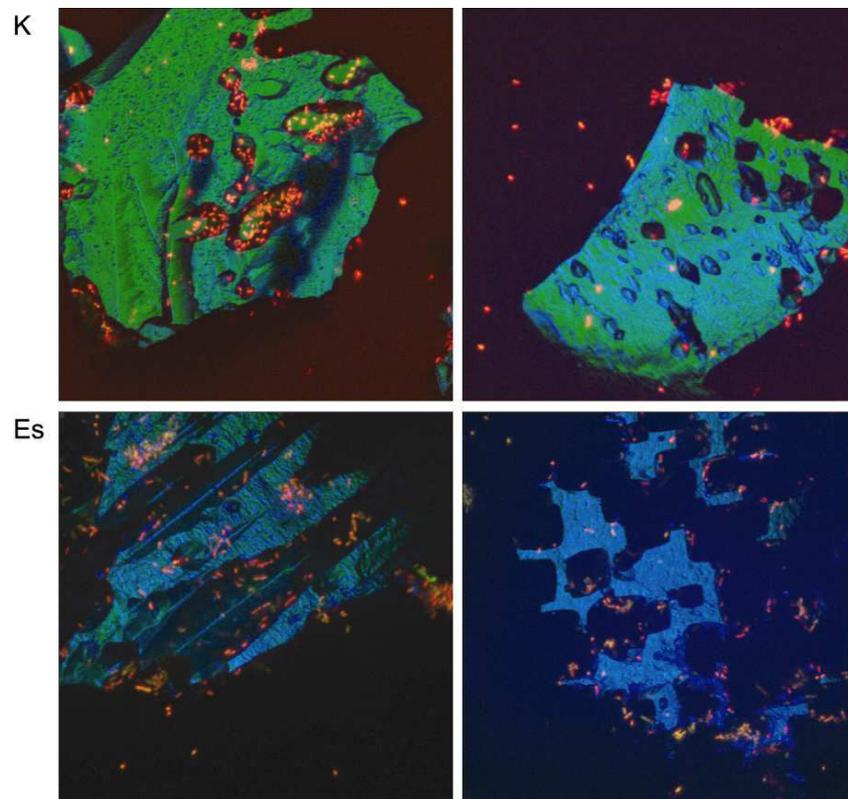


Figure C6. 3 : Figures de corrosion observées par CLSM sur des grains de pyrites K et Es après oxydation en batch de 19 mois par *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

D'autre part, l'oxydation de ces deux pyrites par *Acidithiobacillus thiooxidans*, ne donne pas lieu au développement de figures de corrosion géométriques aussi bien marquées qu'en présence de *A.f.*. Seuls quelques grains particulièrement réactifs de la pyrite Es semblent affectés et couverts de quelques figures de corrosion quasi-géométriques (flèche blanche Figure C6. 4). Dans ce cas, l'oxydation s'effectue le long de figures pré-existantes du minéral et, même si les bactéries sont majoritairement positionnées au niveau de ces fractures,

les processus d'oxydation semblent similaires à ceux d'un traitement abiotique. Une passivation de surface (fluorescence marquée de la SulfoRhodamine B) est même observée sur certains grains (Figure C6. 5).

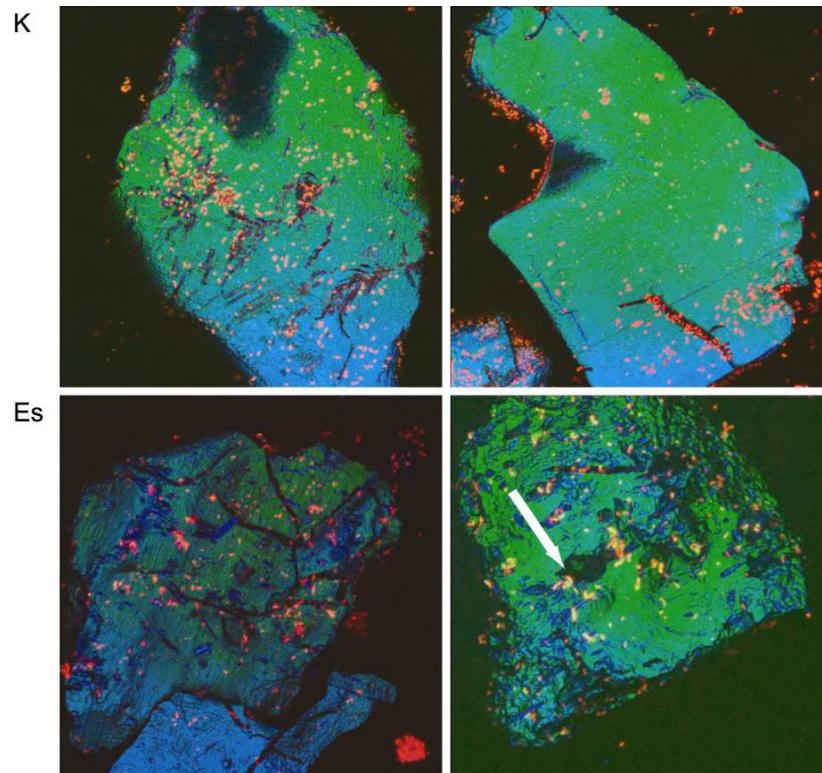


Figure C6. 4 : Figures de corrosion observées par CLSM sur des grains de pyrites K et Es après oxydation en batch de 19 mois par *Acidithiobacillus thiooxidans*. La flèche blanche indique le développement d'une figure de corrosion quasi-géométrique.

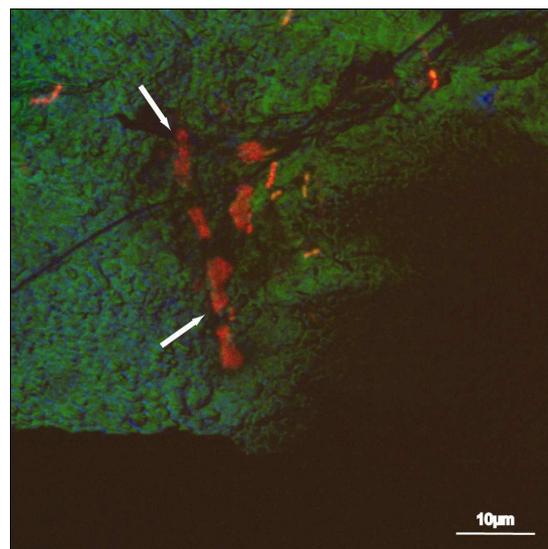


Figure C6. 5 : Observation CLSM d'un grain de pyrite K après oxydation en batch de 19 mois par *Acidithiobacillus thiooxidans*. Mise en évidence d'une passivation de surface par le marquage à la SRB (flèches blanches).

Le modèle de bio-corrosion de la pyrite déterminé par cette étude est donc bien spécifique du système étudié, à savoir de l'association d'une pyrite noble hydrothermale et d'une bactérie acidophile sulfo- et ferro-oxydante (*A.f.*). Si la spécificité de ce système implique qu'une transposition n'est envisageable que sur des systèmes comparables (sulfures et bactéries autotrophes similaires), il est cependant important de noter que le couplage méthodologique employé ici est, quant à lui, plus aisément généralisable à tous les systèmes d'interactions bio-minérales (Cf paragraphe 3).

2 Biosignature de l'oxydation de la pyrite par *A.f.* ou indices de vie ?

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que l'identification de traces d'activité de *A.f.* en surface de pyrites passe par l'accumulation d'indices variés (morphologiques, chimiques et isotopiques). Il est ainsi nécessaire de coupler les échelles d'observations et donc les techniques d'analyse pour dégager un ensemble concordant d'indices de vie.

Dans le cas du système particulier *A.f.*/pyrite hydrothermale pure, ces indices indirects complémentaires seraient :

- une morphologie globale de surface traduisant une corrosion à la fois très intense et très localisée : figures de corrosion profondes, géométriques, orientées et peu nombreuses.
- un taux de recouvrement des surfaces de pyrite par les produits d'oxydation peu important, traduisant une surface non passivée.
- une organisation en bosses monophasiques des produits d'oxydation.
- une prédominance de phases oxydées stables hématite ou sulfate anhydres à symétrie C_{2v} (type II).
- des fractionnements isotopiques entre les sulfates et l'eau ou l'oxygène dissous relativement importants.
- des $\delta^{18}O$ de surface traduisant la présence d'environnements locaux particuliers potentiellement isolés du milieu réactionnel, et favorisant par exemple l'incorporation d'eau de respiration dans les produits de l'oxydation de la pyrite.

Cependant, la présence simultanée des indices précédemment cités permet simplement de limiter les incertitudes quant à la nature biotique de l'oxydant majeur des grains de pyrites

étudiés. Une clef de détermination de la présence éventuelle de traces d'activités de A.f. sur une pyrite est proposée Figure C6. 6 d'après l'ensemble des résultats obtenus.

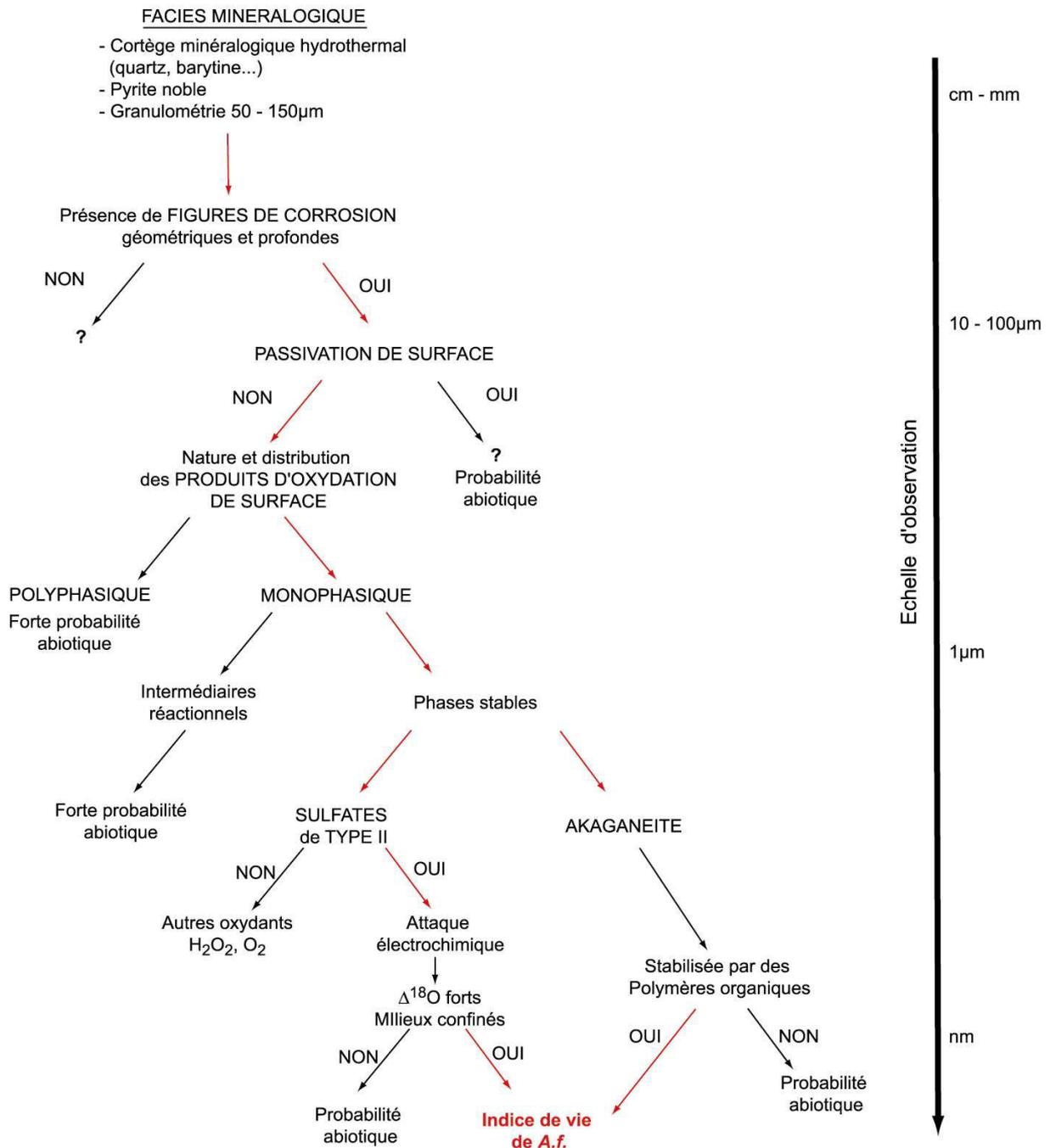


Figure C6. 6 : Clef de détermination de la présence de traces d'activités de A.f. sur une surface de pyrite. Le « chemin » rouge indique les associations d'indices à forte probabilité biotique.

3 Couplage d'échelle et méthodologique

Les résultats présentés dans ce travail mettent en évidence la complexité de l'étude d'un tel système, pourtant considéré comme simple car associant une bactérie autotrophe à un minéral noble. L'hétérogénéité de surface des pyrites oxydées est en effet très importante. Elle s'exprime à échelle micrométrique à sub-micrométrique, que ce soit dans l'organisation 3D des composés d'oxydation en surface des grains, que dans la variabilité de la nature chimique et isotopique de ces produits. Les techniques d'analyse requises pour ce type d'étude sont donc fortement dépendantes des contraintes issues du degré de complexité de la surface minérale oxydée. Elle doivent permettre à la fois de caractériser cette hétérogénéité et de définir la résolution minimale d'étude indispensable pour s'en affranchir.

Ainsi, une première approche générale doit être effectuée afin d'identifier tous les paramètres du système. Dans cette étude, les microscopies optiques ou à fluorescence, de même que les spectroscopies Infra-Rouge et de Photoélectrons X permettent d'accomplir cette tâche. En revanche, elles sont inadaptées à la caractérisation fine des mécanismes d'oxydation. Des techniques de résolution supérieures doivent donc être utilisées, jusqu'à atteindre une description pertinente des paramètres du système. Dans notre cas, la spectroscopie Raman de même que la spectrométrie de masse d'ions secondaires (ims 1270), apportent des éléments de réponse et indiquent la nécessité de décrire le système à échelle submicrométrique. Une telle résolution peut être obtenue en utilisant des outils de résolution encore supérieure (nanoSIMS, μ XANES, Synchrotron...) qui doivent constituer le dernier maillon de la chaîne analytique. En revanche, l'interprétation des résultats obtenus par ces dernières techniques (indispensables pour atteindre l'échelle du site actif), est totalement dépendante de la caractérisation globale préalable du système.

Le couplage méthodologique semble donc ici indispensable et la recherche de biosignatures en surface d'échantillons minéraux similaires à des pyrites oxydées et doit inclure une démarche statistique, à la fois globale (analyse à l'échelle de l'échantillon) et locale (analyse à l'échelle du site actif).

La figure suivante propose un couplage méthodologique (non exhaustif) nécessaire à la description d'un système tel que *A.f./pyrite* et *a priori* indispensable pour la recherche de traces d'activités biologiques en surface d'un grain minéral.

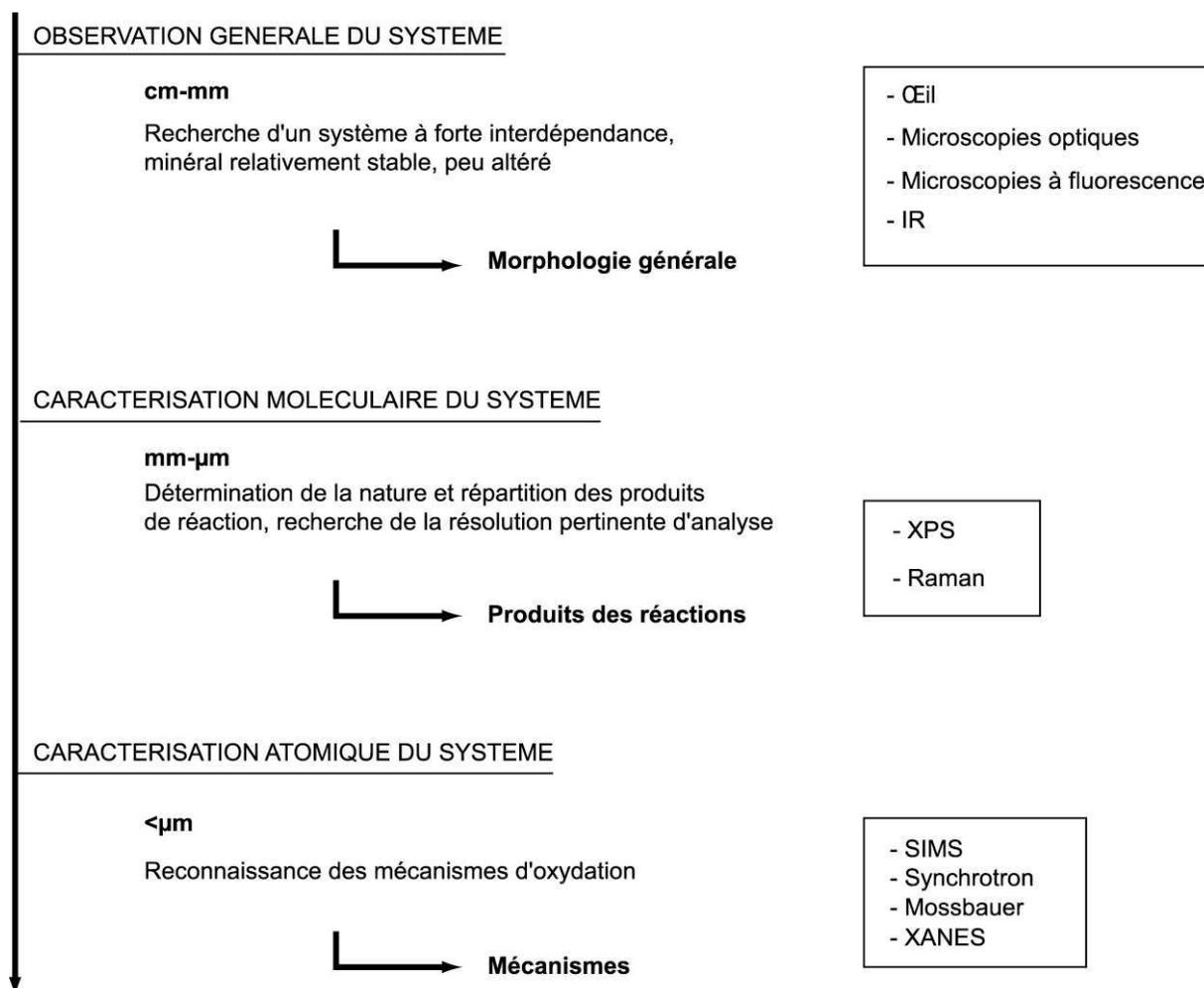


Figure C6.7 : Schéma d'étude d'un système bio-minéral.

4 Limites de l'étude

Les résultats obtenus tout au long de ce travail ont permis de proposer un nouveau modèle de l'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* et de déterminer une succession d'indices de traces d'activité de cette bactérie en surface de pyrite. Cependant, quelques points majeurs restent encore à préciser.

Connaissance des mécanismes de surface

La caractérisation du système bio-minéral réalisée ici se heurte à la très forte hétérogénéité de surface des grains minéraux qu'elle soit morphologique, chimique ou isotopique. Il semble évident que la compréhension du processus d'oxydation de la pyrite par *A.f.* passe par l'identification précise des mécanismes de surface. Les conditions physico-chimiques et thermodynamiques qui règnent à l'interface bactérie/minéral sont encore mal connues et les équations globales décrivant l'oxydation de la pyrite ne semblent pas

appropriées pour modéliser les phénomènes de surface. Les résultats obtenus dans ce travail ont ainsi mis en évidence certaines lacunes qui doivent être approfondies :

- la détermination des sites actifs de surface (anodes et cathodes) est sûrement un des point majeur à affiner afin de compléter le modèle proposé ici. Bien que certains sites aient été mis en évidence à travers l'observation *in vivo* du processus, la nature exacte de ces sites (terminaison Fe ou S) de même que leur potentiel électrochimique restent inconnus. Or, il est fort probable que ces paramètres conditionnent les circulations des électrons au sein du minéral et donc leur réponse à l'action d'un oxydant biotique ou abiotique.
- d'autre part, la formation de produits d'oxydation en surface de la pyrite, ainsi que l'adhésion de cellules bactériennes doivent engendrer des modifications des propriétés électrochimiques de surface du minéral. Il serait donc intéressant de connaître l'évolution des potentiels de surface de la pyrite en cours d'oxydation afin de comprendre le déroulement, la propagation voire l'arrêt du processus.
- enfin, il est évident que l'hétérogénéité de surface s'exprimant à une échelle sub-micrométrique, il semble nécessaire d'améliorer la résolution d'analyse afin d'être capable de décrire les processus de surface à l'échelle atomique.

Résolution et méthodologie

S'il est nécessaire d'étudier un système tel que *A.f./pyrite* à différentes échelles d'observation afin de s'affranchir de l'hétérogénéité globale naturelle de ce système, l'emploi de différentes techniques d'analyse de résolution variable pose nécessairement des problèmes d'ajustement et de comparaison des résultats. Ainsi, les caractérisations chimiques par spectroscopie Raman sont nécessaires à l'interprétation des données de sonde ionique. Cependant, bien que les profondeurs d'investigation soient relativement similaires, les résolutions latérales de ces deux techniques sont difficilement comparables. De la même manière, les analyses XPS et les profils isotopiques ont des résolutions latérales similaires, cependant les profondeurs d'investigation sont cette fois différentes.

Il serait pertinent de réaliser, en surface d'un même grain oxydé, des cartographies haute résolution chimiques (Raman) et isotopiques (nanoSIMS par exemple). Le couplage de l'identification précise de la nature chimique et isotopique des produits d'oxydation à une telle résolution permettrait de décrire les processus de surface, a priori à l'échelle du site actif.

Représentativité en milieu naturel

Le choix du couple *A.f.*/pyrite a été effectué à la fois en raison de son caractère « simple » et de la forte interdépendance des deux parties, mais également car il est couramment évoqué comme un analogue potentiel des premières interactions vie/minéraux sur Terre. Peut-on pour autant réellement parler d'analogue et extrapoler ou généraliser les observations faites sur ce système ? Par définition un analogue est une entité possédant de fortes similarités avec une autre. En biologie, un analogue désigne des organes ou structures à fonction semblables qui ne partagent pas, pour autant, une histoire évolutive commune. Le système *A.f.*/sulfures de fer, étudié en laboratoire, présente de fortes similarités avec les associations organo-minérales primitives. Cependant, l'extrapolation des résultats à des systèmes primitifs voire extraterrestres doit être entreprise avec une certaine prudence.

De même, il est évident que l'étude d'un système en laboratoire se heurte à la représentativité des résultats en milieu naturel. En effet, les microorganismes rencontrés dans les milieux sulfurés naturels ne sont que très rarement monospécifique et les phénomènes à grande échelle (drainage minier acide et pollutions métalliques associées) sont souvent dus à l'action de consortia bactériens. Si le modèle développé ici permet d'affiner notre compréhension de l'oxydation de la pyrite par *A.f.* à petite échelle, il serait intéressant de mener des études comparatives sur d'autres systèmes simples voire sur des associations minérales ou bactériennes.

En conclusion, les résultats obtenus tout au long de ce travail, bien qu'ils ne puissent que difficilement être extrapolés directement aux milieux naturels, permettent d'avoir une vision plus globale du processus d'oxydation de sulfures de fer par des bactéries sulfo- et ferro-oxydantes telles que *A.f.* Cette oxydation est contrôlée par les circulations électroniques au sein de la pyrite et leur transfert du minéral à la bactérie. Ils mettent également en évidence l'intérêt de considérer les systèmes bio-minéraux dans leur ensemble, en associant différentes échelles d'observation, afin de s'affranchir de la très forte hétérogénéité des systèmes naturels et d'être capable d'identifier des indices de vie en surface d'un minéral.

Conclusion générale

CONCLUSION

Les microorganismes, bactéries et champignons, ont progressivement colonisés tous les milieux naturels terrestres et ont développés des liens étroits avec leur environnement. Il en est de même pour *Acidithiobacillus ferrooxidans* qui présente une très forte dépendance trophique et énergétique vis-à-vis de la pyrite. Cette association est à l'origine de fortes modifications de l'environnement : acidification, altération de gisements sulfurés, précipitation de phases minérales secondaires, etc, qui sont autant d'indices de l'activité de *A.f.* en présence de pyrite.

Bien que ce système bio-minéral soit considéré comme l'un des plus simples existant sur Terre, le mécanisme d'oxydation réel de la pyrite par *A.f.* est relativement complexe. Il résulte de l'effet conjugué des propriétés minéralogiques et biologiques ce qui rend l'interprétation des processus physico-chimiques à l'interface bactérie/minéral non aisée. Il est vrai que chacun de ces points relève d'une discipline différente, et est en général étudié par des communautés scientifiques distinctes à l'aide de techniques d'analyse difficilement comparables. Néanmoins, la compréhension des mécanismes d'oxydation de sulfures de fer par des bactéries autotrophes ne peut pas être atteinte sans considérer le système dans son ensemble, et sans tenir compte des interactions bactéries/minéral. Cette description plus complète du système, bien que non-exhaustive, a pu être obtenue, dans ce travail, à l'aide de l'utilisation conjointe de :

- techniques d'observations *in vivo* (microscopies optiques, CLSM) permettant de suivre le déroulement du processus d'oxydation tout en localisant précisément les bactéries actives « *in situ* » sur les surfaces minérales.
- techniques microscopiques (AFM) et spectroscopiques de surface (XPS, Raman) permettant de caractériser la nature chimique et l'organisation spatiale des produits d'oxydation.
- techniques isotopiques de surface (SIMS) permettant de « pister » les voies oxydantes de la pyrite et d'identifier des mécanismes réactionnels de surface.

Cette description à la fois globale et précise du système a permis d'aboutir à un nouveau modèle d'oxydation de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* dans lequel les paramètres « électriques » sont prépondérants :

- la forte dépendance énergétique de *A.f.* vis-à-vis de la pyrite la place au niveau de cathodes minérales où elle joue le rôle d'une pompe à électrons. La liaison bactérie/minérale posséderait ainsi un caractère « électrique ».
- la corrosion est gouvernée par le nombre et l'interdistance des couples Anodes/Cathodes du minéral. La circulation d'électrons au sein du minéral définit les sites de surface « électro-actifs » intervenant dans l'adhésion bactérienne et la corrosion.
- les zones électrochimiquement « neutres » où se déposent les produits de corrosion favorisent une passivation de la surface et l'arrêt de la corrosion.

Ce modèle met en avant l'existence d'une « jonction électrique » entre le minéral et les bactéries qui conditionne la corrosion perforante du minéral et assure l'approvisionnement énergétique des bactéries.

Enfin, l'étude de ce système simple, souvent considéré comme analogue potentiel des premières formes de vie terrestre ou extraterrestre, apporte un éclairage nouveau sur la manière d'appréhender la recherche d'une biosignature. Ce type de système est très fortement contraint par l'hétérogénéité naturelle, existant tant au niveau minéralogique (topographie de surface, impuretés et réseau cristallin non « idéal »...) que biologique (être vivant en évolution constante, capacité d'adaptation des bactéries aux modifications de leur environnement...). La détermination de biosignatures univoques, sur des systèmes similaires à celui étudié ici, paraît donc utopique. En revanche, le couplage de techniques et d'échelles d'analyse variées, au travers d'une approche statistique, peut permettre d'accumuler des indices de vie, et de réduire l'incertitude sur la présence de traces réelles d'une activité biologique en surface d'un minéral.

De nombreux points restent toutefois à éclaircir, que ce soit dans une optique mécanistique (processus d'oxydation de la pyrite par *A.f.*) ou prospective (recherche d'indices de vie). Il semble, en effet, indispensable de mieux caractériser l'interface bactérie/minéral et les processus d'oxydation de surface qui s'y développent. Cela passe autant par une meilleure connaissance du comportement électrique du minéral à l'échelle du site actif, que par la détermination de l'influence locale des bactéries sur ce comportement. L'utilisation conjointe

de techniques analytiques permettant d'atteindre une résolution d'analyse sub-micrométrique à nanométrique devient alors inévitable.

La recherche de biosignatures dans des systèmes bactéries/minéraux est donc un réel travail pluridisciplinaire et interdisciplinaire, dans lequel différents domaines de recherche et des techniques analytiques à résolution variable doivent être associés. Cette approche multiple et cette nécessité de regarder un même objet avec des « yeux » différents deviennent indispensables lorsque l'objet en question est un système aussi « complexe » qu'une association bio-minérale naturelle.

Références Bibliographiques

**B
i
b
l
i
o
g
r
a
p
h
i
e**

A

- Abergel, C., Nitschke, W., Malarte, G., Bruschi, M., Claverie, J.-M. , and Giudici-Orticoni, M.-T. (2003) The Structure of Acidithiobacillus ferrooxidans c4-Cytochrome: A Model for Complex-Induced Electron Transfer Tuning. *Structure* 11(5), 547-555.
- Abratis, P. K., Patrick, R. A. D. , and Vaughan, D. J. (2004) Variations in the compositional, textural and electrical properties of natural pyrite: a review. *International Journal of Mineral Processing* 74(1-4), 41-59.
- Al-Hanbali, H. S., Sowerby, S. J. , and Holm, N. G. (2001) Biogenicity of silicified microbes from a hydrothermal system: relevance to the search for evidence of life on earth and other planets. *Earth and Planetary Science Letters* 191(3-4), 213-218.
- Aleon, J. (2001) Développement de l'analyse isotopique de microparticules par sonde ionique : études des poussières désertiques et interplanétaires. Thèse de l'INPL.
- Andersen and Hinthorne. (1973) Thermodynamic approach to the quantitative interpretation of sputtered ion mass spectra. *Anal. Chem.* 45, 1421-1438.
- Aubriet, H. (2005) Contribution à une meilleure connaissance du devenir du combustible nucléaire usé. Mise en place et utilisation de nouvelles techniques électrochimiques par la caractérisation de UO₂ et des produits issus de l'irradiation de l'interface UO₂/H₂O, association in situ avec la microspectrométrie Raman. Etude des interactions de la pyrite et de la galène avec le cation uranyle., Université Henri Poincaré, Nancy I.
- Awramik, S. M., Schopf, J. W. , and Walter, M. R. (1983) Filamentous fossil bacteria from the Archean of Western Australia. *Precambrian Research* 20(2-4), 357-374.

B

- Bada, J. L., Wang, X. S., Poinar, H. N., Paabo, S. , and Poinar, G. O. (1994) Amino acid racemization in amber-entombed insects: Implications for DNA preservation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58(14), 3131-3135.
- Bailey, S. W., Mayer, B. , and Mitchell, M. J. (2004) Evidence for influence of mineral weathering on stream water sulphate in Vermont and New Hampshire. *Hydrological Processes*. 18, 1639-1653.
- Bao, H. and Koch, P. L. (1999) Oxygen isotope fractionation in ferric oxide-water systems: low temperature synthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63(5), 599-613.
- Bengrine, A., Guiliani, N., Appia-Ayme, C., Jedlicki, E., Holmes, D. S., Chippaux, M. , and Bonnefoy, V. (1998) Sequence and expression of the rusticyanin structural gene from Thiobacillus ferrooxidans ATCC33020 strain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1443(1-2), 99-112.
- Beveridge, T. J. and Fyfe, W. S. (1985) Metal fixation by bacterial cell walls. *Canadian Journal of Earth Sciences* 22, 1893-1898.

- Bevilaqua, D., Leite, A. L. L. C., Garcia, J., O. , and Tuovinen, O. H. (2002) Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry* **38**(4), 587-592.
- Blake, R. C. and Shute, E. A. (1987) Respiratory enzymes of *Thiobacillus ferrooxidans*. A kinetic study of electron transfer between iron and rusticyanin in sulfate media. *J. Biol. Chem.* **262**, 14983-14989.
- Blake, I., R. C., Lyles, M. M. , and Simmons, R. C. (1995) Morphological and physical aspects of attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite and sulfur. *Biohydrometallurgical processing*, 13-22.
- Blgham, J. M., Schwertmann, U., Carlson, L. , and Murad, E. (1990) A poorly crystallized oxyhydroxysulfate of iron formed by bacterial oxidation of Fe(II) in acid mine waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **54**(10), 2743-2758.
- Blight, K., Ralph, D. E. , and Thurgate, S. (2000) Pyrite surfaces after bio-leaching: a mechanism for bio-oxidation. *Hydrometallurgy* **58**(3), 227-237.
- Botz, R., Pokojski, H.-D., Schmitt, M. , and Thomm, M. (1996) Carbon isotope fractionation during bacterial methanogenesis by CO₂ reduction. *Organic Geochemistry* **25**(3-4), 255-262.
- Bradley, J. P., Harvey, R. P. , and McSween Jr, H. Y. (1997) No 'nanofossils' in martian meteorite. *Nature* **390**, 454-455.
- Brasier, M., Green, O., Jephcoat, O. R., Klepepe, A. P., van Kranendonk, M. J., Lindsay, J., Steele, A. , and Grassineau, N. V. (2002) Questioning the Evidence for Earth's Oldest Fossils. *Nature* **416**, 76-81.
- Brasseur, G., Bruscella, P., Bonnefoy, V. , and Lemesle-Meunier, D. (2002) The bc1 complex of the iron-grown acidophilic chemolithotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* functions in the reverse but not in the forward direction: Is there a second bc1 complex? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1555**(1-3), 37-43.
- Brasseur, G., Levican, G., Bonnefoy, V., Holmes, D., Jedlicki, E. , and Lemesle-Meunier, D. (2004) Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc1 complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1656**(2-3), 114-126.
- Breed, A. W. and Hansford, G. S. (1999) Studies on the mechanism and kinetics of bioleaching. *Minerals Engineering* **12**(4), 383-392.
- Buckley, A. N. and Woods, R. (1987) The surface oxidation of pyrite. *Applied Surface Science* **27**(4), 437-452.

C

- Campbell, N. A. (1995) *Biology*.
- Carbonne, A., Carpentier, C., Comba, S., Dabonneville, L., Levillain, J. , and Loiseau, J. B. (2005) Modélisation géométrique à l'échelle microscopique des associations organo-minérales (bactéries-polymères-minéraux). pp. 40. ENSG-INPL.

- Carter, M. C., Kilduff, J. E. , and Weber, W. J. (1995) Site Energy Distribution Analysis of Preloaded Adsorbents. *Environmental Science and Technology* **29**(7), 1773-1780.
- Casiot, C., Morin, G., Juillot, F., Bruneel, O., Personne, J.-C., Leblanc, M., Duquesne, K., Bonnefoy, V. , and Elbaz-Poulichet, F. (2003) Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoules creek, France). *Water Research* **37**(12), 2929-2936.
- Chiba, H., Kusakabe, M., Hirano, S.-I., Matsuo, S. , and Somiya, S. (1981) Oxygen isotope fractionation factors between anhydrite and water from 100 to 550°C. *Earth and Planetary Science Letters* **53**(1), 55-62.
- Chiba, H. and Sakai, H. (1985) Oxygen isotope exchange rate between dissolved sulfate and water at hydrothermal temperatures. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **49**(4), 993-1000.
- Chio, C. H., Sharma, S. K. , and Muenow, D. W. (2005) Micro-Raman studies of hydrous ferrous sulfates and jarosites. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. & Biomol. Spectroscopy* **61**(10), 2428-2433.
- Clark, I. D. and Fritz, P. (1997) Stable Isotope Geochemistry. In *Environmental Isotopes in Hydrogeology*. (ed. C. Press), pp. 328.
- Cobley, J. G. and Haddock, B. A. (1975) The respiratory chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: The reduction of cytochromes by Fe²⁺ and the preliminary characterization of rusticyanin a novel 'blue' copper protein. *FEBS Letters* **60**(1), 29-33.
- Coleman, M., Ader, M., Chaudhuri, S. , and Coates, J. (2003) Microbial isotopic fractionation of perchlorate chlorine. *Applied-and-Environmental-Microbiology*. **69**(8), 4997-5000.
- Colmer, A. R. and Hinkle, M. E. (1947) The role of microorganisms in acid mine drainage : A preliminary report. *Science* **106**, 253-256.
- Cornell, R. M. and Schwertmann, U. (1996) *The Iron Oxides*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim and VCH Publishers, New York.
- Cox, J. C. and Boxer, D. H. (1978) The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in the iron(II) oxydation from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochem. J.* **174**, 497-502.
- Crundwell, F. K. (2003) How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy* **71**(1-2), 75-81.
- Curutchet, G., Donati, E., Oliver, C., Pogliani, C. , and Viera, M. R. (2001) Development of *Thiobacillus* biofilms for metal recovery. *Methods in Enzymology.*, pp. 171-186. Academic Press.

D

- Demoisson, F. (2006) Réactivité à l'échelle micronique et sub-micronique de particules colloïdales : oxydation d'un sulfure de fer (pyrite) par du chrome (VI) et sorption sur un hydroxyde d'aluminium (gibbsite) d'espèces organiques., Université henri Poincaré, Nancy I.
- Deniau, I. (2002) Caractérisation géochimique du kérogène associé à l'argile Oligocène de Boom (Mol, Belgique) et évolution sous divers stress thermiques. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, 207p.

- Descostes, M., Vitorge, P., and Beaucaire, C. (2004) Pyrite dissolution in acidic media. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**(22), 4559-4569.
- Druschel, G. K., Baker, B. J., Gihring, T. M., and Banfield, J. F. (2004) Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochemical Transactions* **5**(2), 13-32.
- Duhig, N. C., Davidson, G. J., and Stolz, J. F. (1992) Microbial involvement in the formation of Cambrian sea-floor silica-iron oxides deposits, Australia. *Geology* **20**, 511-514.
- Dziurla, M.-A. (1995) Contribution à l'étude de réactions à l'interface Bactérie-Minéral au cours de la lixiviation de minéraux sulfurés (pyrites) par *Thiobacillus ferrooxidans*. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, Spécialité Géomicrobiologie.
- Dziurla, M.-A., Achouak, W., Lam, B.-T., Heulin, T., and Berthelin, J. (1998) Enzyme-Linked Immunofiltration Assay To Estimate Attachment of Thiobacilli to Pyrite. *Applied-and-Environmental-Microbiology*. **64**(2937-2942).

E

- Edeline, F. (1993) L'épuration biologique des eaux.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., Druschel, G. K., McGuire, M. M., Hamers, R. J., and Banfield, J. F. (2000) Geochemical and biological aspects of sulfide mineral dissolution: lessons from Iron Mountain, California. *Chemical Geology* **169**(3-4), 383-397.
- Edwards, K. J., Hu, B., Hamers, R. J., and Banfield, J. F. (2001) A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. *FEMS Microbiology Ecology* **34**(3), 197-206.
- Edwards, K. J. and Rutenberg, A. D. (2001) Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chemical Geology* **180**(1-4), 19-32.
- Eggleston, C. M., Ehrhardt, J.-J., and Stumm, W. (1996) Surface structural controls on pyrite oxidation kinetics; an XPS-UPS, STM, and modeling study. *American Mineralogist* **81**(9-10), 1036-1056.
- Elbehti, A. and Lemesle-Meunier, D. (1996) Identification of membrane-bound c-type cytochromes in an acidophilic ferrous ion oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters* **136**(1), 51-56.
- Ennaoui, A., Fiechter, S., Pettenkofer, C., Alonso-Vante, N., Buker, K., Bronold, M., Hopfner, C., and Tributsch, H. (1993) Iron disulfide for solar energy conversion. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **29**(4), 289-370.
- Ettler, V., Johan, Z., and Hradil, D. (2003) Natural alteration products of sulphide mattes from primary lead smelting. *Comptes Rendus Geosciences* **335**(14), 1013-1020.

F

- Ferris, F. G., Fyfe, W. S., and Beveridge, T. J. (1988) Metallic ion binding by *Bacillus subtilis* : Implications for the fossilization of microorganisms. *Geology* **16**, 149-152.

- Ferris, F. G., Hallbeck, L., Kennedy, C. B. , and Pedersen, K. (2004) Geochemistry of acidic Rio Tinto headwaters and role of bacteria in solid phase metal partitioning. *Chemical Geology* **212**(3-4), 291-300.
- Ferroni, G. D., Leduc, L. G. , and Todd, M. (1986) Isolation and temperature characterization of psychrotrophics strains of *Thiobacillus ferrooxidans* from the environment of uranium mine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**, 169-176.
- Folk, R. L. and Taylor, L. A. (2002) Nannobacterial alteration of pyroxenes in martian meteorite Allan Hills 84001. *Meteoritics and Planetary Science* **37**, 1057-1069.
- Fowler, T. A., Holmes, P. R. , and Crundwell, F. K. (2001) On the kinetics and mechanism of the dissolution of pyrite in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **59**(2-3), 257-270.
- Fujimori, A., Mamiya, K., Mizokawa, T., Miyadai, T., Sekiguchi, T., Takahashi, H., Mori, N. , and Suga, S. (1996) Resonant photoemission study of pyrite-type NiS₂, CoS₂ and FeS₂. *Phys. Rev. B.* **54**, 16329–16332.
- Furnes, H. and Staudigel, H. (1999) Biological mediation in oceanic crust alteration: How deep is the deep biosphere? *Earth and Planetary Science Letters* **166**, 97-103.
- Furnes, H., Muehlenbachs, K., Torsvik, T., Thorseth, I. H. , and Tumyr, O. (2001) Microbial fractionation of carbon isotopes in altered basaltic glass from the Atlantic Ocean, Lau Basin and Costa Rica Rift. *Chemical Geology* **173**(4), 313-330.

G

- Giannetti, B. F., Bonilla, S. H., Zinola, C. F. , and Raboczkay, T. (2001) A study of the main oxidation products of natural pyrite by voltammetric and photoelectrochemical responses. *Hydrometallurgy* **60**(1), 41-53.
- Gillet, P., Barrat, J. A., Heulin, T., Achouak, W., Lesourd, M., Guyot, F. , and Benzerara, K. (2000) Bacteria in the Tatahouine meteorite: Nanometric-scale life in rocks. *Earth and Planetary Science Letters* **175**, 161-167.
- Girard, J.-P., Freyssinet, P. , and Morillon, A.-C. (2002) Oxygen isotope study of Cayenne duricrust paleosurfaces: implications for past climate and laterization processes over French Guiana. *Chemical Geology* **191**(4), 329-343.
- Gornay, J. (2002) Mise au point d'une méthode d'analyse Raman pour déterminer la nature des faces cristallines de pyrite à l'échelle micrométrique., Université Henri Poincaré - Nancy I.
- Grant, P. G., Lemke, S. L., Dwyer, M. R. , and Phillips, T. D. (1998) Modified Langmuir model for S-shaped and multisite isotherm plots. *Langmuir* **14**, 4292-4299.
- Greenwood, J. P., Riciputi, L. R. , and McSween, J., Harry Y. (1997) Sulfide isotopic compositions in shergottites and ALH84001, and possible implications for life on Mars. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**(20), 4449-4453.
- Guevremont, J. M., Elsetinow, A. R., Strongin, D. R., Bebie, J. , and Schoonen, M. A. (1998a) Structure sensitivity of pyrite oxidation: Comparison of the (100) and (111) planes. *American Mineralogist* **83**, 1353-1356.

Guevremont, J. M., Bebie, J., Elsetinow, A. R., Strongin, D. R. , and Schoonen, M. A. (1998b) Reactivity of the (100) plane of pyrite in oxidizing gaseous and aqueous environments: Effects of surface imperfections. *Environmental Science and Technology* **32**, 3743-3748.

H

Habicht, K. S. and Canfield, D. E. (1997) Sulfur isotope fractionation during the bacterial sulfate reduction in organic-rich sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**, 5351-5361.

Hansford, G. S. and Vargas, T. (1999) Chemical and electrochemical basis of bioleaching processes. *Biohydrometallurgy and the Environment toward the mining of the 21st century. International Biohydrometallurgy Symposium.*, 13-26.

Hasselstrom, T., Henry, M. C. , and Mur, B. (1957) B synthesis of amino acids by beta radiation. *Science* **125**, 350-351.

Herbert, R. B. J. (1999) MiMi - Sulfide oxidation in mine waste deposits. A review with emphasis on dysoxic weathering., pp. 45. Mitigation of the environmental impact of Mining waste.

Hoffman, B. A. and Farmer, J. D. (1997) Microbial fossils from terrestrial subsurface hydrothermal environments: Examples and implications for Mars. *Conference on Early Mars: Geologic and hydrologic evolution. Physical and Chemical environments, and the implications for life*, 40-41.

Holm, N. G., Dowler, M. J., Wadsten, T. , and Arrhenius, G. (1983) $[\beta\text{-FeOOH} \cdot \text{Cln}$ (akaganeite) and Fe_{1-x}O (wustite) in hot brine from the Atlantis II Deep (Red Sea) and the uptake of amino acids by synthetic $\beta\text{-FeOOH} \cdot \text{Cln}$. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **47**(8), 1465-1470.

Holmes, P. R. and Crundwell, F. K. (2000) The kinetics of the oxidation of pyrite by ferric ions and dissolved oxygen: an electrochemical study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**(2), 263-274.

Horita, J. (2005) Some perspectives on isotope biosignatures for early life. *Chemical Geology* **18**, 171-186.

Hornibrook, E. R. C., Longstaffe, F. J. , and Fyfe, W. S. (2000) Evolution of stable carbon isotope compositions for methane and carbon dioxide in freshwater wetlands and other anaerobic environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**(6), 1013-1027.

Hug, S. J. (1997) In Situ Fourier Transform Infrared Measurements of Sulfate Adsorption on Hematite in Aqueous Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* **188**(2), 415-422.

Hung, A., Muscat, J., Yarovsky, I. , and Russo, S. P. (2002) Density-functional theory studies of pyrite FeS_2 (111) and (210) surfaces. *Surface Science* **520**(1-2), 111-119.

I

Ida, C., Sasaki, K., Ando, K., Blake, I., Robert C., Saiki, H. , and Ohmura, N. (2003) Kinetic rate constant for electron transfer between ferrous ions and novel Rusticyanin isoform in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**(5), 534-537.

Ingledeu, W. J. and Cobley, J. G. (1980) A potentiometric and kinetic study on the respiratory chain of ferrous-iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **590**, 141-158.

J

Jambor, J. L., Nordstrom, D. K. , and Alpers, C. N. (1999) Metal-sulfate salts from sulfide mineral oxidation. In *Reviews in Mineralogy and Geochemistry - Sulfate minerals*, Vol. 40 (ed. J. L. J. C.N. Alpers, D.K. Nordstrom.), pp. 303-350. Mineralogical society of America - Geochemical Society.

Jedlicki, E., Reyes, R., Jordana, X., Mercereau-Puijalon, O. , and Allende, J. E. (1986) Rusticyanin: Initial Studies on the Regulation of its Synthesis and Gene Isolation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **8**, 342-350.

Jones, R. A., Koval, S. F. , and Nesbitt, H. W. (2003) Surface alteration of arsenopyrite (FeAsS) by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**(5), 955-965.

K

Kannenber, E. and Poralla, K. (1999) Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* **86**, 168-176.

Kaplan, I. R. and Rittenberg, S. C. (1964) Microbial fractionation of sulfur isotopes. *Journal of Gen Microbiology* **34**, 195-212.

Kappler, A. and Newman, D. K. (2004) Formation of Fe(III)-minerals by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**(6), 1217-1226.

Karavaiko, G. I., Sakhno, T. V., Emelyanov, V. M., Plhilinova, N. I. , and Pivoravova, T. A. (1995) Electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* oxidizing Fe²⁺, S⁰, and sulfide minerals. *Biohydrometallurgical processing*, 13-22.

Kroopnick, P. and Craig, H. (1972) Atmospheric Oxygen: Isotopic Composition and Solubility Fractionation. *Science* **175**, 54-55.

Krouse, H. R., Gould, W. D., McCready, R. G. L. , and Rajan, S. (1991) ¹⁸O incorporation into sulphate during the bacterial oxidation of sulphide minerals and the potential for oxygen isotope exchange between O₂, H₂O and oxidized sulphur intermediates. *Earth and Planetary Science Letters* **107**, 90-94.

L

Lappin, A. G., Lewis, C. A. , and Ingledeu, W. J. (1985) Kinetics and mechanisms of reduction of rusticyanin, a blue copper protein from *Thiobacillus ferrooxidans*, by inorganic cations. *Inorg. Chem.* **24**, 1446-1450.

Leduc, L. G. and Ferroni, G. D. (1994) The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Review* **14**, 103–120.

- Lemelle, L., Salome, M., Fialin, M., Simionovici, A. , and Gillet, P. (2004) In situ identification and X-ray imaging of microorganisms distribution on the Tataouine meteorite. *Spectrochimica Acta Part B* **59**, 1703-1710.
- Lloyd, R. M. (1968) Oxygen isotope behavior in the sulfate-water system. *J. Geophys. Res.* **73**, 6099-6209.
- Lowson, R. T. (1982) Aqueous Oxidation of Pyrite by Molecular Oxygen. *Chemical Reviews* **82**(5), 461-495.
- Luttge, A. (2005) The effect of microbial attachment on mineral dissolution kinetics: Experimental results and computer simulations. *Geophysical Research Abstracts* **7**.

M

- Majzoub, M. (1971) Fractionnement en Oxygène-18 et en Deuterium entre l'eau et sa vapeur. *Journal of Chemical Physics.* **197**, 1423-1436.
- Marchal, R. (1999) Rôle des bactéries sulfurogènes dans la corrosion du fer. *Oil and Gas Science and Technology - Rev. IFP* **54**(5), 649-659.
- Marshall, W. L. (1994) Hydrothermal synthesis of amino acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **58**, 2099-2106.
- Mattila, S., Leiro, J. A. , and Heinonen, M. (2004) XPS study of the oxidized pyrite surface. *Surface Science* **566-568**(Part 2), 1097-1101.
- Mc Kibben, M. A. and Barnes, H. L. (1986) Oxidation of pyrite in low temperature acidic solutions: rate laws and surface textures. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **50**, 1509-1520.
- McCready, R. G. L. and Krouse, H. R. (1982) Sulfur isotope fractionation during the oxidation of elemental sulfur by Thiobacilli in a solonchastic soil. *Can. J. Soil. Sci.* **62**, 105-110.
- McGuire, M. M., Edwards, K. J., Banfield, J. F. , and Hamers, R. J. (2001) Kinetics, surface chemistry, and structural evolution of microbially mediated sulfide mineral dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65**(8), 1243-1258.
- McKay, D. R. and Halpern, J. (1958) A kinetic study of the oxidation of pyrite in aqueous suspension. *Transactions of the Metallurgical Society of the American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers.* **212**, 301-309.
- McKay, D. S., Gibson Jr, E. K., Thomas-Keprta, K. L., Vali, L. H., Romanek, C. S., Clemett, S. J., Chillier, Z. D. F. M., C. R. , and Zare, R. N. (1996) Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. *Science* **273**, 924-930.
- Meline, F. (1995) Interactions à l'interface *Thiobacillus ferrooxidans* / pyrite : inhibition et adhésion.
- Miller, S. L. (1953) Productions of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* **117**, 528-529.
- Mizutani, Y. and Rafter, T. A. (1969) Oxygen isotopic fractionation in the bisulfate ion-water system. *New Zealand Journal of Science*, 54-59.

- Monroy, M. G. (1993) Biolixiviation - cyanuration de minerais sulfurés aurifères réfractaires en dispositif de percolation : comportement des populations de *Thiobacillus ferrooxidans* et influence de la minéralogie et des conditions opératoires.
- Monroy, M. G., Dziurla, M. A., Lam, B. T., Berthelin, J. , and Marion, P. (1994) A laboratory study on the behavior of *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite bioleaching in percolation columns. In *Advances in Bioprocess Engineering* (ed. G. E. a. R. O.T.), pp. 509-517. Kluwer Academic Publ., Netherlands.
- Moses, C. O., Kirk Nordstrom, D., Herman, J. S. , and Mills, A. L. (1987) Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **51**(6), 1561-1571.
- Moses, C. O. and Herman, J. S. (1991) Pyrite oxidation at circumneutral pH. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **55**, 471-482.
- Mustin, C. (1992) Approche physico-chimique et modélisation de l'oxydation bactérienne de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* : Rôle déterminant de la phase minérale. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, Spécialité Géomicrobiologie.
- Mustin, C., Berthelin, J., Marion, P. , and de Donato, P. (1992a) Corrosion and Electrochemical Oxidation of a Pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(4), 1175-1182.
- Mustin, C., de Donato, P. , and Berthelin, J. (1992b) Quantification of the intragranular porosity formed in bioleaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* **39**(11), 1121-1127.
- Mustin, C., de Donato, P., Berthelin, J. , and Marion, P. (1993) Surface sulphur as promoting agent of pyrite leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* **11**(1-3), 71-77.
- Mycroft, J. R., Bancroft, G. M., McIntyre, N. S., Lorimer, J. W. , and Hill, I. R. (1990) Detection of sulphur and polysulphides on electrochemically oxidized pyrite surfaces by X-ray photoelectron spectroscopy and Raman spectroscopy. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **292**(1-2), 139-152.

N

- Ndlovu, S. and Monhemius, A. J. (2005) The influence of crystal orientation on the bacterial dissolution of pyrite. *Hydrometallurgy* **78**(3-4), 187-197.
- Nealson, K. H. (1997) The limits of life on Earth and searching for life on Mars. *Journal of Geophysical Research* **102**, 365-367.
- Nesbitt, H. W. and Muir, I. J. (1994) X-ray photoelectron spectroscopic study of a pristine pyrite surface reacted with water vapour and air. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **58**(21), 4667-4679.
- Nesterova, M., Moreau, J. , and Banfield, J. F. (2003) Model biomimetic studies of templated growth and assembly of nanocrystalline FeOOH. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**(6), 1185-1195.
- Nordstrom, D. K. and Southam, G. (1997) Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation. In *Geomicrobiology.*, Vol. 35 (ed. J. F. Banfield, Nealson, K.H.), pp. 361-390. Mineral. Soc.

Am.

Nunzi, F. (1993) Relations Structure/Fonction de la Rusticyanine chez *Thiobacillus ferrooxidans*: du Fermenteur au Cristal., Université de Provence.

Nyberg, A. V. and Schopf, W. J. (1981) Microfossils in stromatolitic cherts from the proterozoic allamoore formation of west texas. *Precambrian Research* **16**(1-2), 129-141.

O

Ohmoto, H., Kaiser, C. J. , and Geer, K. A. (1990) Systematics of sulphur isotopes in recent marine sediments and ancient sediment-hosted basemental deposits. *Stable Isotopes and Fluid Processes in Mineralisation*(Eds. H.K. Herbert & S.E. Ho), 70-120.

Ohmoto, H., Kakegawa, T. , and Lowe, D. R. (1993) 3.4 billion-year-old biogenic pyrites from Barberton, South Africa: sulfur isotope evidence. *Science* **262**, 555-557.

Ohmura, N., Kitamura, K. , and Saiki, H. (1993) Selective Adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to Pyrite. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(12), 4044-4050.

Ostergren, J. D., Brown, G. E., Parks, G. A. , and Persson, P. (2000) Inorganic Ligand Effects on Pb(II) Sorption to Goethite (α -FeOOH) - II. Sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science* **225**(2), 483-493.

P

Pagnanelli, F., Moscardini, E., Giuliano, V. , and Toro, L. (2004) Sequential extraction of heavy metals in river sediments of an abandoned pyrite mining area: pollution detection and affinity series. *Environmental Pollution* **132**(2), 189-201.

Pelet, R. (1981) Preservation and alteration of present-day sedimentary organic matter. *Advances in Organic Geochemistry*. **25**, 1545-1548.

Pesic, B. and Kim, I. (1993) Electrochemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* Interactions with Pyrite. *Metallurgical transactions B* **24B**, 717-727.

Potts, P. J., Bowles, J. F. W., Reed, S. J. B. , and Cave, M. R. (1995) Micropobe techniques in the Earth Sciences. Chap 6. R.W. Hinton. *Ion microprobe analysis in geology*.

Q

Qiu, G., Xiao, Q., Hu, Y., Qin, W. , and Wang, D. (2004) Theoretical study of the surface energy and electronic structure of pyrite FeS₂ (100) using a total-energy pseudopotential method, CASTEP. *Journal of Colloid and Interface Science* **270**(1), 127-132.

R

Rasmussen, B. (2000) Filamentous microfossils in a 3.235-million-year-old volcanigenic massive sulphide deposit. *Nature* **405**, 676-679.

- Remsen, C. and Lundgren, D. G. (1966) Electron Microscopy of the Cell Envelope of *Ferrobacillus ferrooxidans* Prepared by Freeze-Etching and Chemical Fixation Techniques. *J Bacteriol.* **92**(6), 1765–1771.
- Rimstidt, J. D. and Vaughan, D. J. (2003) Pyrite oxidation: a state-of-the-art assessment of the reaction mechanism. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**(5), 873-880.
- Riveros, P. A. and Dutrizac, J. E. (1997) The precipitation of hematite from ferric chloride media. *Hydrometallurgy* **46**(1-2), 85-104.
- Rodriguez, M., Campos, S. , and Gomez-Silva, B. (1986) Studies on Native Strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* **8**, 292-299.
- Rodriguez-Leiva, M. and Tributsch, H. (1988) Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite. *Arch. Microbiol.* **149**, 401-405.
- Rojas-Chapana, J. A. and Tributsch, H. (2004) Interfacial activity and leaching patterns of *Leptospirillum ferrooxidans* on pyrite. *FEMS Microbiology Ecology* **47**(1), 19-29.
- Rollion-Bard, C. (2001) Variabilité des isotopes de l'oxygène dans les coraux Porites : développement et implications des microanalyses d'isotopes stables (B, C et O) par sonde ionique. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. Spécialité Géosciences.*
- Ross, K. A. and Fisher, R. V. (1986) Biogenic grooving on glass hard. *Geology* **14**, 571-573.
- Rosso, K. M., Becker, U. , and Hochella, J., Michael F. (1999) Atomically resolved electronic structure of pyrite {100} surfaces: An experimental and theoretical investigation with implications for reactivity. *American Mineralogist* **84**, 1535–1548.
- Russel, M. J., Hall, A. J. , and Gize, A. P. (1990) Pyrite and the origin of life. *Nature* **344**, 387.
- Rye, R. O., Breit, G. N. , and Zimbelman, D. R. (2003) Preliminary mineralogic and stable isotope studies of altered summit and flank rocks and Osceola Mudflow deposits on Mount Rainier, Washington. (USGS report).

S

- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.-G. , and Schippers, A. (1999) Direct vs. Indirect Bioleaching. *Biohydrometallurgy and the Environment toward the mining of the 21st century. International Biohydrometallurgy Symposium.*, 27-49.
- Sasaki, K., Tsunekawa, M., Ohtsuka, T. , and Konno, H. (1998) The role of sulfur-oxidizing bacteria *Thiobacillus thiooxidans* in pyrite weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **133**(3), 269-278.
- Sawlowicz, Z. (1993) Pyrite framboids and their development: a new conceptual mechanism. *Geol. Rdsch.* **82**, 148-156.
- Schelble, R. T., Westall, F. , and Allen, C. C. (2004) ~1.8 Ga iron-mineralized microbiota from the Gunflint Iron Formation, Ontario, Canada: implications for Mars. *Advances in Space Research* **33**(8), 1268-1273.

- Schidlowski, M., Hayes, J. M. , and Kaplan, I. R. (1983) Isotopic interferences of ancient biochemistries: carbon, sulfur, hydrogen and nitrogen. *Earth's Earliest Biosphere: Its origin and Evolution*(Ed. William Schopf), 149-186.
- Schopf, J. W. (1993) Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. *Science* **260**, 640-646.
- Schultze-Lam, S., Fortin, D., Davis, B. S. , and Beveridge, T. J. (1996) Mineralization of bacterial surfaces. *Chemical Geology* **132**(1-4), 171-181.
- Schulze-Makuch, D., Irwin, L. N. , and Guan, H. (2002) Search parameters for the remote detection of extraterrestrial life. *Planetary and Space Science* **50**(7-8), 675-683.
- Scofield, J. H. (1976) Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **8**(2), 129-137.
- Shearer, C. K., Layne, G. D., Papike, J. J. , and Spilde, M. N. (1996) Sulfur isotopic systematics in alteration assemblages in martian meteorite Allan Hills 84001. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**(15), 2921-2926.
- Siebert, D. and Stocker, W. (1992) *Phys. Stat. Sol. (a)* **134**.
- Singer, P. C. and Stumm, W. (1968) Kinetics of the oxidation of ferrous iron. *Proc. 2nd Symp. Coal Mine Drainage Res.*, 12-34.
- Stahl, K., Nielsen, K., Jiang, J., Lebeck, B., Hanson, J. C., Norby, P. , and van Lanschot, J. (2003) On the akaganeite crystal structure, phase transformations and possible role in post-excavational corrosion of iron artifacts. *Corrosion Science* **45**(11), 2563-2575.
- Strauss, H. (1997) The isotopic composition of sedimentary sulfur through time. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **132**, 97-118.
- Summons, R. E., Franzmann, P. D. , and Nichols, P. D. (1998) Carbon isotopic fractionation associated with methylotrophic methanogenesis. *Organic Geochemistry* **28**(7-8), 465-475.
- Summons, R. E., Jahnke, L. L., Hope, J. M. , and Logan, G. A. (1999) 2-Methyl-hopanooids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* **400**, 554-557.
- Suzuki, I. (1965) Incorporation of atmospheric oxygen-18 into thiosulfate by the sulfur-oxidizing enzyme of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **110**, 97-101.
- Suzuki, I. (2001) Microbial leaching of metals from sulfide minerals. *Biotechnology Advances* **19**(2), 119-132.

T

- Taylor, B. E., Wheeler, M. C. , and Nordstrom, D. K. (1984a) Stable isotope geochemistry of acid mine drainage: Experimental oxidation of pyrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**(12), 2669-2678.
- Taylor, B. E., Wheeler, M. C. , and Nordstrom, D. K. (1984b) Isotope composition of sulphate in acid mine drainage as measure of bacterial oxidation. *Nature* **308**(5), 538-541.

- Temple, K. L. and Colmer, A. R. (1951) The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **62**, 605-611.
- Teresaki, M., Nomoto, S. , and Mita, H. (2002) A new pathway to aspartic acid from urea and maleic acid affected by ultraviolet light. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **32**, 91-98.
- Thorseth, I. H., Pedersen, R. B. , and Christie, D. M. (2003) Microbial alteration of 0-30-Ma seafloor and sub-seafloor basaltic glasses from the Australian Antarctic Discordance. *Earth and Planetary Science Letters* **215**(1-2), 237-247.
- Toniazzo, V. (1998) Approche des mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* grâce à la modélisation morpho-chimique de la surface minérale : rôle fondamental des phases superficielles oxydées. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, Spécialité Géosciences.
- Toniazzo, V., Lazaro, I., Humbert, B. , and Mustin, C. (1999a) Bioleaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*: fixed grains electrode to study superficial oxidized compounds. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* **328**(8), 535-540.
- Toniazzo, V., Mustin, C., Portal, J. M., Humbert, B., Benoit, R. , and Erre, R. (1999b) Elemental sulfur at the pyrite surfaces: speciation and quantification. *Applied Surface Science* **143**(1-4), 229-237.
- Toran, L. and Harris, R. F. (1989) Interpretation of sulfur and oxygen isotopes in biological and abiological sulfide oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **53**(9), 2341-2348.
- Toro, L., Paponetti, B. , and Cantalini, C. (1988) Precipitate formation in the oxidation of ferrous ions in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **20**(1), 1-9.
- Torsvik, T., Furnes, H., Muehlenbachs, K., Thorseth, I. H. , and Tumyr, O. (1998) Evidence for microbial activity at the glass-alteration interface in oceanic basalts. *Earth and Planetary Science Letters* **162**(1-4), 165-176.
- Tributsch, H. (2001) Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* **59**(2-3), 177-185.

V

- Van Everdingen, R. O. and Krouse, H. R. (1985) Isotope composition of sulphates generated by bacterial and abiological oxidation. *Nature* **315**(30), 395-396.
- Vaughan, D. J., Becker, U. , and Wright, K. (1997) Sulphide mineral surfaces: theory and experiment. *International Journal of Mineral Processing* **51**(1-4), 1-14.
- Vidal, P. (1998) Géochimie. In *Geosciences*, Vol. 1 (ed. Dunod), pp. 109.

W

- Weber, P. A., Stewart, W. A., Skinner, W. M., Weisener, C. G., Thomas, J. E. , and Smart, R. S. C. (2004) Geochemical effects of oxidation products and framboidal pyrite oxidation in acid mine drainage prediction techniques. *Applied Geochemistry* **19**(12), 1953-1974.
- Westall, F. (2003) Stephen Jay Gould, les procaryotes et leur evolution dans le contexte geologique.

Comptes Rendus Palevol **2**(6-7), 485-501.

Whiticar, M. J. (1999) Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology* **161**(1-3), 291-314.

Willerslev, E., Hansen, A. J. , and Poinar, H. N. (2004) Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends in Ecology & Evolution* **19**(3), 141-147.

Williamson, M. A. and Rimstidt, J. D. (1994) The kinetics and electrochemical rate-determining step of aqueous pyrite oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **58**(24), 5443-5454.

Y

Yamanaka, T. and Fukumori, Y. (1995) Molecular aspects of the electron transfer system which participates in the oxidation of ferrous ion by *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* **17**(4), 401-413.

Yarzabal, A., Brasseur, G. , and Bonnefoy, V. (2002) Cytochromes c of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters* **209**(2), 189-195.

Yarzabal, A., Duquesne, K. , and Bonnefoy, V. (2003) Rusticyanin gene expression of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 in sulfur- and in ferrous iron media. *Hydrometallurgy* **71**(1-2), 107-114.

Yee, N., Phoenix, V. R., Konhauser, K. O., Benning, L. G. , and Ferris, F. G. (2003) The effect of cyanobacteria on silica precipitation at neutral pH: implications for bacterial silicification in geothermal hot springs. *Chemical Geology* **199**(1-2), 83-90.

Yu, J.-Y., McGenity, T. J. , and Coleman, M. L. (2001) Solution chemistry during the lag phase and exponential phase of pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Chemical Geology* **175**(3-4), 307-317.

Yunmei, Y., Yongxuan, Z., Williams-Jones, A. E., Zhenmin, G. , and Dexian, L. (2004) A kinetic study of the oxidation of arsenopyrite in acidic solutions: implications for the environment. *Applied Geochemistry* **19**(3), 435-444.

Z

Zak, M. (1999) Physical invariants of biosignatures. *Physics Letters A* **255**(1-2), 110-118.

Zhang, C., Liu, S., Phelps, T. J., Cole, D. R., Horita, J., Fortier, S. M., Elless, M. , and Valley, J. W. (1997) Physiochemical, mineralogical, and isotopic characterization of magnetite-rich iron oxides formed by thermophilic iron-reducing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**(21), 4621-4632.

Annexes

A
N
N
E
X
E
S

PROFILS EN PROFONDEUR DE SONDE IONIQUE

Oxydant	$\delta^{18}\text{O}$	std	$^{16}\text{O}/^{16}\text{Ostd}$	Ag/Eg	Ag/Eg 45	Groupe cristallochimique
Af	-10.11	1.8	1.80E-03	1.28	1.23	(001)
Af	-7.04	0.5	1.13E-01	2.33	1.60	D
Af	-16.02	0.9	3.36E-02	2.33	1.60	D
Af	-1.33	2.05	1.86E-02	3.82	2.07	E
Af	-1.68	1.4	2.49E-02	4.47	3.69	F
Af	3.94	0.3	3.17E-02	4.47	3.69	F
Af	-19.42	2.2	1.64E-02	2.64	2.00	C
Af	-19.42	2.2	1.64E-02	2.57	2.46	C
Af	-1.93	0.5	1.94E-02	6.50	1.56	(210)
Af	2.3	1.7	3.02E-02	6.50	1.56	(210)
Af	24.98	3.3	1.21E-02	3.23	3.13	(111)
Af	23	1.2	1.73E-02	3.19	1.63	A
Af	1.98	0.9	6.46E-02	10.52	5.32	(210)
Af	2.82	0.7	1.69E-01	7.98	4.80	(210)
Af	-2.83	2.3	4.15E-02	3.74	1.52	A
Af	-9.57	0.7	4.89E-02	2.18	1.94	D
Af	4.41	0.2	9.14E-01	3.17	1.76	A
Af	-10.31	1.7	1.14E-01	2.76	1.71	D
Af	7.9	0.6	8.28E-02	7.10	4.64	(210)
Af	-2.8	1.4	1.30E-02	2.31	1.90	D
Af	16.44	0.9	8.97E-02	2.31	2.07	C
Af	-17	1.3	1.99E-02	4.19	1.48	(210) ou (100)

PROFILS EN PROFONDEUR DE SONDE IONIQUE

Oxydant	$\delta^{18}\text{O}$	std	$^{16}\text{O}/^{16}\text{Ostd}$	Ag/Eg	Ag/Eg 45	Groupe cristallochimique
Fe (III)	22.07	1.1	1.57E-02	1.82	1.81	D
Fe (III)	9.73	1.6	1.65E-02	1.82	1.81	D
Fe (III)	8.62	1.1	2.02E-02	2.36	1.95	D
Fe (III)	2.98	0.8	1.71E-01	4.74	4.49	(111)
Fe (III)	4.96	0.9	3.17E-02	3.85	2.82	E
Fe (III)	-2.12	0.8	1.31E-02	3.18	1.64	A
Fe (III)	-3.06	2.1	5.40E-02	4.73	2.04	B
Fe (III)	-7.59	1.4	1.81E-02	4.84	1.46	(210) ou (100)
Fe (III)	-1.64	0.7	1.69E-02	5.18	4.94	(111)
Fe (III)	-2.44	1.8	5.03E-02	4.31	2.32	B
Fe (III)	29.56	1.7	8.58E-02	5.70	2.00	(210) ou (100)

PROFILS EN PROFONDEUR DE SONDE IONIQUE

Oxydant	$\delta^{18}\text{O}$	std	$^{16}\text{O}/^{16}\text{Ostd}$	Ag/Eg	Ag/Eg 45	Groupe cristallochimique
O ₂	-12.5	1.4	3.21E-02	4.71	2.11	B
O ₂	-9.91	1.1	2.92E-02	4.71	2.11	B
O ₂	-9.96	1	2.92E-02	4.71	2.11	B
O ₂	6.92	0.9	3.84E-02	2.41	2.19	C
O ₂	7.44	0.8	5.76E-02	4.64	3.95	F
O ₂	-5.72	1.5	3.00E-01	3.25	1.47	A
O ₂	-10.19	1.4	7.83E-02	3.25	1.47	A
O ₂	-17.5	0.4	5.12E-02	3.25	1.47	A
O ₂	-7.33	1.4	4.41E-02	3.25	1.47	A
O ₂	5.04	1.5	1.36E-01	3.25	1.47	A
O ₂	2.23	0.8	9.61E-02	3.00	2.58	F
O ₂	-10.3	1.2	5.70E-01	3.00	2.58	F
O ₂	-18.82	0.6	4.93E-02	3.05	2.08	F
O ₂	-16.89	0.4	2.47E-02	3.05	2.08	F
O ₂	-9.83	1.2	3.52E-02	3.05	2.08	F
O ₂	-21.67	0.9	2.88E-01	3.05	2.08	F
O ₂	-6.58	0.5	3.99E-02	2.48	2.35	C
O ₂	-14.94	2.1	2.33E-02	3.57	2.66	F
O ₂	-22.46	0.9	5.51E-02	3.97	2.24	B
O ₂	-5.21	0.5	2.57E-02	3.97	2.24	B
O ₂	-8.03	1.3	3.78E-02	2.51	1.76	D
O ₂	-12.14	1.9	2.17E-02	2.51	1.76	D
O ₂	-20.71	0.6	2.88E-02	2.51	1.76	D
O ₂	-18.02	0.4	1.04E-01	2.38	1.53	D
O ₂	-25.5	0.9	1.13E-01	2.38	1.53	D
O ₂	-17.83	0.6	2.67E+00	5.12	2.29	(210) ou (100)
O ₂	-23.97	1.2	4.78E-01	5.55	4.28	(111)
O ₂	-34	0.5	6.04E-02	3.60	3.37	E

PROFILS EN PROFONDEUR DE SONDE IONIQUE

Oxydant	$\delta^{18}\text{O}$	std	$^{16}\text{O}/^{16}\text{Ostd}$	Ag/Eg	Ag/Eg 45	Groupe cristallochimique
H ₂ O ₂	17.2	1.5	1.76E-02	3.67	1.36	A
H ₂ O ₂	6.3	1.1	3.73E-02	3.29	1.31	A
H ₂ O ₂	5.21	1.2	2.01E-02	3.29	1.31	A
H ₂ O ₂	6.85	1.3	3.66E-02	2.67	1.94	D
H ₂ O ₂	19.48	1.5	2.11E-02	2.67	1.94	D
H ₂ O ₂	3.86	1.2	6.47E-02	3.60	1.38	A
H ₂ O ₂	4.63	1.1	4.39E-02	3.60	1.38	A
H ₂ O ₂	-33.48	1.4	7.94E-02	3.72	1.44	A
H ₂ O ₂	15.88	1.3	1.01E-01	3.72	1.44	A
H ₂ O ₂	-27.38	0.9	7.81E-02	3.72	1.44	A
H ₂ O ₂	6.5	2.1	7.20E-02	3.72	1.44	A
H ₂ O ₂	-9.88	0.5	2.44E-02	4.85	1.60	(210) ou (100)
H ₂ O ₂	-12.33	0.6	4.28E-02	4.85	1.60	(210) ou (100)
H ₂ O ₂	17.9	1.2	5.60E-02	4.49	1.56	(210) ou (100)
H ₂ O ₂	-6.26	0.9	1.49E-02	6.64	1.57	(210)
H ₂ O ₂	5.6	0.8	1.27E-01	9.36	2.14	(210)
H ₂ O ₂	15.64	0.5	7.75E-02	3.94	1.85	A
H ₂ O ₂	-6.19	1.4	5.85E-02	2.71	2.03	C
H ₂ O ₂	1.73	1.6	3.89E-02	3.59	1.49	A
H ₂ O ₂	-4.58	0.4	1.08E-01	3.22	1.52	A
H ₂ O ₂	38.54	2	5.62E-02	3.45	1.34	A
H ₂ O ₂	25.5	1.4	2.18E-02	4.29	3.18	F

COMPOSITION CHIMIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION DE SURFACE

Agent oxydant	Face	Ag/Eg	Ag/Eg _{45°}	Intensité des bandes Raman majeures				Type de sulfate	Nature des oxydes
				Soufre	Oxy-hydroxydes de fer	Polysulfures	Sulfates		
A.f.	(1 1 1)	5.49	4.27	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.49	2.08	86	538	147	109	II	akaganéite
A.f.	C	2.36	2.31	0	0	0	153	II	--
A.f.	A	3.20	1.51	0	0	0	0	--	--
A.f.	A	3.59	1.71	389	605	0	659	I + II	lépidocrocite
A.f.	A	3.09	1.61	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.27	2.16	72	0	148	93	I	--
A.f.	E	3.72	2.26	332	0	483	0	--	--
A.f.	F	4.86	3.43	0	0	0	380	I + II	--
A.f.	A	3.34	1.81	0	87	0	0	--	hématite
A.f.	E	3.61	2.70	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.66	2.14	136	108	187	1194	I + II	hématite
A.f.	E	3.10	2.40	129	1187	185	1438	II	akaganéite
A.f.	E	3.45	2.36	0	0	0	0	--	--
A.f.	A	3.88	1.62	0	591	0	0	--	hématite
A.f.	F	4.19	3.46	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.91	2.70	0	337	0	0	--	lépidocrocite
A.f.	C	2.28	2.11	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.23	3.16	0	145	0	0	--	hématite
A.f.	A	3.22	1.40	80000	2106	0	0	--	akaganéite
A.f.	A	3.31	1.78	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.83	2.27	0	892	274	158	--	hématite
A.f.	C	2.65	2.19	0	807	49	52	II	hématite
A.f.	A	3.14	1.96	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.69	2.08	0	0	0	?	--	--
A.f.	D	2.28	1.61	0	0	0	0	--	--
A.f.	D	2.58	1.75	0	0	0	517	I	--
A.f.	F	4.76	3.26	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	3.00	2.27	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.71	2.79	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.11	2.03	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.53	3.07	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.94	2.16	0	488	0	244	II	--
A.f.	C	2.22	2.21	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.78	2.63	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.46	2.63	0	1066	0	4007	II	hématite
A.f.	C	2.51	1.99	0	2017	0	172	--	goethite
A.f.	C	2.75	2.08	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.87	2.05	0	1958	371	1929	I	--
A.f.	C	2.89	2.69	0	0	0	383	I	--
A.f.	C	2.70	2.09	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.10	2.57	0	0	0	0	--	--
A.f.	B	4.14	2.37	0	12212	515	363	II	--
A.f.	D	2.65	1.75	0	0	0	0	--	--
A.f.	F	4.62	4.12	0	0	0	0	--	--
A.f.	E	3.01	2.27	0	5253	175	279	II	--
A.f.	C	2.12	2.04	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	1.89	1.82	0	0	0	352	I	--
A.f.	C	2.66	2.48	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.66	2.28	0	1067	136	0	--	--
A.f.	E	3.10	2.59	0	1302	0	0	--	--
A.f.	C	2.76	2.18	0	0	0	0	--	--
A.f.	C	2.56	2.20	0	0	0	0	--	--

COMPOSITION CHIMIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION DE SURFACE

Agent oxydant	Face	Ag/Eg	Ag/Eg 45°	Intensité des bandes Raman majeures				Type de sulfate	Nature des oxydes
				Soufre	Oxy-hydroxydes de fer	Polysulfures	Sulfates		
Fe (III)	E	3.33	2.82	0	0	0	0	--	--
Fe (III)	A	3.77	1.59	80000	0	645	0	--	--
Fe (III)	A	3.43	1.65	0	0	293	0	--	--
Fe (III)	D	2.22	1.77	0	0	0	0	--	--
Fe (III)	D	2.23	1.89	0	e	0	0	--	lépidocrocite
Fe (III)	E	3.86	2.31	0	0	0	0	--	--
Fe (III)	E	3.66	2.05	0	0	0	0	--	--
Fe (III)	E	3.11	2.12	0	0	0	0	--	--
Fe (III)	C	2.21	2.04	80000	65	24400	46	II	goethite
Fe(III)	A	3.32	1.95	0	0	0	0	--	--
Fe(III)	D	1.99	1.58	955	0	0	27310	II	--
Fe(III)	C	2.12	2.11	363	101	0	411	II	akaganéite
Fe(III)	D	2.61	1.39	0	719	0	447	II	--
Fe(III)	E	3.00	2.27	0	0	0	0	--	--
Fe(III)	D	2.75	1.83	0	0	0	0	--	--
Fe(III)	C	2.27	2.27	392	0	0	0	--	--
Fe(III)	C	2.67	2.56	0	351	0	0	--	Hématite
Fe(III)	D	2.43	1.85	0	0	0	0	--	--
Fe(III)		2.99	2.80	0	0	0	0	--	--
Fe(III)	C	2.83	2.41	0	1714	0	231	II	Hématite
Fe(III)	C	2.21	2.03	0	0	0	0	--	--
Fe(III)		2.99	2.97	0	0	0	1865	II	--
Fe(III)	D	2.35	1.81	0	0	0	0	--	--
Fe(III)	C	2.80	2.65	1052	403	0	506	II	Goethite
Fe(III)	C	2.43	2.34	0	2040	0	304	II	--

COMPOSITION CHIMIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION DE SURFACE

Agent oxydant	Face	Ag/E g	Ag/Eg 45°	Intensité des bandes Raman majeures				Type de sulfate	Nature des oxydes
				Soufre	Oxy- hydroxydes de fer	Polysulfures	Sulfates		
H ₂ O ₂	D	2.28	1.99	0	0	0	0	--	--
H ₂ O ₂	A	3.19	1.57	0	131	127	0	--	lépidocrocite
H ₂ O ₂	2 1 0) ou (0 0 1	5.41	1.87	0	205	492	500	IV	hématite
H ₂ O ₂	A	3.46	1.87	0	0	268	62	II	--
H ₂ O ₂	B	4.40	2.36	80000	0	0	0	--	--
H ₂ O ₂	D	2.71	1.54	0	0	0	0	--	--
H ₂ O ₂	D	2.53	1.80	2961	309	0	77	--	hématite
H ₂ O ₂	A ou D	2.93	1.64	0	0	0	0	--	--
H ₂ O ₂	A	3.45	1.69	0	0	0	0	--	--
H ₂ O ₂	A	3.84	1.90	0	353	92	75	II	
H ₂ O ₂	D	2.67	1.97	0	1502	0	800	II + III	
H ₂ O ₂	C	2.65	2.13	0	418	0	1297	II	
H ₂ O ₂	C	2.77	2.05	0	0	0	66	II	--
H ₂ O ₂	D	2.90	1.55	0	0	0	0	--	--
H ₂ O ₂	D	2.24	1.41	0	2044	299	814	I + III	
H ₂ O ₂	D	2.75	1.54	0	604	1809	1447	III	
H ₂ O ₂		4.81	4.65	0	0	572	496	I + II	--
H ₂ O ₂	F	4.00	3.60	0	0	0	0	--	--
H ₂ O ₂	F	4.30	3.63	0	1162	0	359	II	
H ₂ O ₂	B	4.35	2.95	0	2580	0	604	III	
H ₂ O ₂	A	3.02	1.46	0	0	1940	455	II	--
H ₂ O ₂	(210) ou (100)	4.65	1.87	0	0	0	0	--	--
H ₂ O ₂		3.78	2.98	0	0	676	50	--	--
H ₂ O ₂	E	3.24	2.65	0	0	158	0	II	--
H ₂ O ₂	E	3.75	2.47	0	1904	0	0	--	
H ₂ O ₂	E	3.50	2.47	0	2588	0	313	III	

COMPOSITION CHIMIQUE DES PRODUITS D'OXYDATION DE SURFACE

Agent oxydant	Face	Ag/Eg	Ag/Eg 45°	Intensité des bandes Raman majeures				Type de sulfate	Nature des oxydes
				Soufre	Oxy-hydroxydes de fer	Polysulfures	Sulfates		
O ₂	A	3.42	1.99	89	787	178	1722	II + IV	lépido + hématite
O ₂	D	2.00	1.55	268	272	798	146	IV	goethite + hématite
O ₂	B	4.96	2.07	0	156	69	557	II	hématite
O ₂	D	2.17	1.88	0	257	217	658	IV	hématite
O ₂	B	4.48	2.44	0	250	0	306	II	hématite
O ₂	D	2.54	1.90	0	272	0	2014	II	goethite
O ₂	A	3.52	1.76	0	1253	290	1690	II + III	hématite
O ₂	C	2.95	2.10	0	1238	339	471	I + II + IV	Hématite
O ₂	C	2.31	2.00	0	1480	156	308	II	hématite
O ₂	B	4.10	2.53	0	1782	580	1013	II	goethite
O ₂	D	2.78	1.71	0	1446	0	107	II	Hématite
O ₂	D	2.28	1.86	0	1521	260	717	II	Hématite
O ₂		3.21	3.08	0	1624	175	497	II	Hématite
O ₂	B	4.25	2.28	0	623	0	142	II	Hématite
O ₂	D	2.63	1.73	0	1084	0	826	I + II	Hématite
O ₂		3.44	3.37	0	468	184	2496	II	Hématite
O ₂	F	4.02	3.31	0	814	0	243	III	Hématite
O ₂	D	2.50	1.76	0	234	0	308	I + II	Hématite
O ₂	D	2.45	1.79	0	490	0	272	III	goethite
O ₂	F	4.08	3.47	0	221	532	479	II	Hématite
O ₂	D	2.65	1.47	0	765	0	418	I	Hématite
O ₂	A	3.16	1.96	0	545	0	238	II	Hématite
O ₂	E	3.80	2.28	0	395	0	e	II	Hématite
O ₂	D	2.78	1.51	0	0	0	0	--	--
O ₂	C	3.51	3.04	279	316	0	542	I + II + (III)	Hématite