



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>

Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Mécanique - Génie Civil

Par Baptiste Maitte

Influence de l'activité bactérienne ferro-oxydante et ferri-réductrice sur les propriétés minéralogiques et micromécaniques du minerai de fer dans le contexte des mines abandonnées de Lorraine

Soutenance publique le 14 décembre 2015

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs

Mme Alexandra BERTRON
M Régis GRIMAUD

PU, INSA Toulouse
MC HDR, IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Examineurs

Mme Marie-Françoise LIBERT
M Jack-Pierre PIGUET

DR, CEA Cadarache
PU (émérite), GeoRessources, Université de Lorraine

Invité

M Rafik HADADOU

DR, directeur de GEODERIS

Directeurs de thèse

M. Dragan GRGIC
M. Frédéric JORAND

MC HDR, GeoRessources, Université de Lorraine (directeur)
PU, LCPME, Université de Lorraine (co-directeur)

GeoRessources
UMR 7359, BP 40, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy, France
LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement)
UMR CNRS-UL 7564, 405 rue de Vandœuvre, 54600 Villers-lès-Nancy

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Jacques Pironon et Alain Walcarius pour m'avoir accueilli au sein des laboratoires GEORESSOURCES et LCPME et de m'avoir permis d'y réaliser ma thèse.

Je remercie également mes deux directeurs de thèse Dragan Grgic et Frédéric Jorand pour m'avoir fait confiance afin de mener à bien ce projet pluridisciplinaire. Cela m'a incontestablement permis d'enrichir mes connaissances dans de nombreux domaines, allant de la mécanique des roches à la microbiologie et autres compétences nécessaires au thésard. Je tiens à les remercier pour leur patience et leurs conseils lors de l'élaboration de ce manuscrit ainsi que leur disponibilité pour les répétitions de l'oral alors que 1200 km nous séparaient.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse par leurs conseils et leur aide pour les nombreuses analyses réalisées au cours de ces 3 ans et demi : Mustapha Abdelmoula (Mössbauer), Cédric Carteret (DRIFTS et RAMAN), Christelle Despas (HPIC), Martine Mallet et Aurélien Renard (XPS et BET) pour la physico-chimie, Christophe Auvray et l'équipe technique de choc, Momo, Patrick et Laurent pour les essais mécaniques. Merci aussi à Lise Salsi (MEB), Silvie Migot (MET) et Isabelle Bihannic (DRX) pour leur aide et leur avis avisé ainsi que Jean-Paul (la mirabelle ce qu'elle est belle!), Gérard et Patrick, l'autre équipe technique de choc. C'est sans oublier tout le personnel du LCPME, lieu de résidence, qui m'a soutenu, aidé, et a surtout contribué à vivre dans un environnement propice au travail et à la détente. Et bien entendu, une spéciale dédicace à Mélanie sans qui rien n'aurait été possible administrativement!!

Un bureau de thésard, cela se partage, et pour avoir partagé nous en avons partagé ! Merci à PP, plus qu'un collègue, un ami ! Ensemble nous avons inscrit à jamais notre "marque" dans la moquette du LCPME. Je n'oublie pas JS, Florence et Stéphane qui ont su supporté mon humeur (bonne ou mauvaise) ainsi que Marjorie. Et je n'oublie pas mes disciples, Arnaud, Kathleen qui m'ont autant appris que je leur ai appris (enfin j'espère !)

Enfin, parce qu'une thèse est aussi une affaire de famille (et même de la belle-famille), je remercie la mienne pour m'avoir soutenu et encouragé pendant ces années.

Et pour terminer, cette thèse ne serait certainement pas ce qu'elle est sans celles qui partagent ma vie aujourd'hui, auxquelles je dois plus que beaucoup, Amélie Caron (mariée Maitte) et Cléo.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre 1 : Analyse Bibliographique	7
1.1 Les mines de Lorraine : une histoire	9
1.2 Le minerai de fer lorrain : méthode d'exploitation et caractéristiques.....	10
1-2-1-Méthode d'extraction	10
1-2-1-1- L'extraction artisanale	10
1-2-1-2- Le dépilage intégral.....	11
1-2-1-3- Chambres et piliers, stots de protection	11
1.3 Propriétés minéralogiques et pétrophysiques du minerai de fer lorrain	13
1.4 Le cycle biogéochimique du fer	18
1-4-1-Généralités.....	18
1-4-2- Le fer, un élément majeur de l'histoire géologique de notre planète.....	20
1-4-3- Les oxydes de fer et la sidérite	22
1-4-3-1- La goethite.....	23
1-4-3-2- La lépidocrocite	23
1-4-3-3- L'hématite	24
1-4-3-4- La sidérite	24
1.5 Les bactéries ferri-réductrices	25
1-5-1- Shewanella	27
1-5-2- La réduction indirecte de Fe(III) par les bactéries sulfato-réductrices	29
1.6 Les bactéries ferro-oxydantes	30
1-6-1- Les acidophiles	31
1-6-2- Les phototrophes oxydantes	33
1-6-3- Les neutrophiles aérobies	35
1-6-3-1- Les neutrophiles ferro-oxydantes d'eau douce.	35
1-6-3-2- Les neutrophiles ferro-oxydantes d'eau de mer.....	37
1-6-4- Les neutrophiles oxydantes nitrate-dépendantes	38
1.7 Conclusions	39
Chapitre 2 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES	41
2.1 Composition de l'eau de mine.....	43
2.2 Les enrichissements bactériens.....	44
2.3 Sélection des souches bactériennes	48
2.4 Préparations des suspensions bactériennes	48
2-4-1- Shewanella putrefaciens CIP 8040	48
2-4-2- Consortium minier de BSR	49
2-4-3- Acidithiobacillus ferroxydans DSM 14882	49
2-4-4- Acidovorax sp. souche BoFeN1	50
2-4-5- Enterobacter aerogenes (équivalent à Klebsellia mobilis)	51
2-4-6- Rhodopseudomonas palustris souche TIE-1.....	51
2.5 Synthèse des oxydes de Fe(III)	52
2-5-1- Lépidocrocite.....	52
2-5-2- Goethite	52
2.6 Méthodes d'analyses des solutions.....	54
2-6-1 Dosage colorimétrique du fer par ferrozine	54
2-6-2- Dosage anionique par HPIC.....	54
2.7 Méthodes d'analyses des solides	55
2-7-1- Diffraction aux rayons X	55
2-7-2- Spectroscopie infrarouge en réflexion diffuse à transformée de Fourier (DRIFTS)	55

2-7-3- Spectroscopie Mössbauer (TMS, Transmission Mössbauer spectroscopy)	56
2-7-4- Spectroscopie RAMAN	57
2-7-5- Spectrométrie photoélectronique X (XPS).....	58
2-7-6- Microscopie électronique à balayage (MEB) et spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie (EDS)	58
2-7-8- Microscopie électronique à transmission (MET) et spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie (EDS)	58
2-7-9- Isotherme d'adsorption de gaz (BET)	59
2-7-10- Granulométrie.....	59
2.8 Études des propriétés mécaniques des roches.....	59
2-8-1- La compression simple (uniaxiale) sur micro-éprouvette.....	59
2-8-2- L'indentation	60
2-8-3- Le fluage.....	60
Chapitre 3 : Réduction directe et indirecte du minerai de fer.....	63
3.1. Réduction du minerai de fer lorrain par une souche ferri-réductrice <i>Shewanella</i> <i>putrefaciens</i>	66
3 ₁ -1- Introduction	70
3 ₁ -2. Materials and experimental methods	72
3 ₁ -2-1- Description and origin of the iron ore samples	72
3 ₁ -2-2- Preparation of laboratory materials.....	72
3 ₁ -2-3- Chemical analysis.....	75
3 ₁ -2-4-. Solid analysis	75
3 ₁ -3. Results.....	76
3 ₁ -3-1- Characterization of the iron ore.....	76
3 ₁ -3-2- Bioreduction of the iron ores.....	81
3 ₁ -3-3- Characterization of the iron ore after bioreduction	85
3 ₁ -4. Discussion.....	89
3 ₁ -4-1- Iron reduction extent.....	89
3 ₁ -4-2- Biomineralization of iron ore	91
3 ₁ -4-3-. Implications for underground iron mines.....	93
3 ₁ -5. Conclusion.....	94
3.2 Impact des sulfures biogénérés par les bactéries sulfato-réductrices sur les minerais de fer intacts et vieillis ainsi que divers autres oxydes de fer.	97
3 ₂ -2-Matériels et méthodes.....	101
3 ₂ -2-1- Enrichissement des bactéries sulfato-réductrices	101
3 ₂ -2-2- Matériaux utilisés pendant les différentes expériences	102
3 ₂ -2-3- Incubation des BSRs avec les minéraux.....	103
3 ₂ -2-4- Expériences de réduction avec les sulfures chimiques	103
3 ₂ -2-5- Analyses chimiques et physico-chimiques.....	103
3 ₂ -3- Résultats	104
3 ₂ -3-1- Réaction entre les minéraux et les sulfures d'origine chimique.....	104
3 ₂ -3-3- Altération minéralogique des oxydes de fer par les BSRs	106
3 ₂ -3-4- Analyse des expériences lépidocrocite-H ₂ S et lépidocrocite-SRB.....	108
3 ₂ -3-5- Observation au microscope électronique à transmission (MET) de la lépidocrocite après réaction biotique et abiotique.....	110
3 ₂ -4- Discussion	113
3 ₂ -4-1- Impact des sulfures sur le dosage Fe(II) / Fe _{TOT}	113
3 ₂ -4-2- Réactions des sulfures chimiques avec le Fe(III).....	113
3 ₂ -4-3-Réaction des sulfures biogénérés par les bactéries sulfato-réductrices avec le Fe(III)	114
3 ₂ -4-4 Implications pour le minerai de fer et l'impact au niveau des mines	115
4.1. Conclusion générale au chapitre 3.....	116
Chapitre 4 : Oxydation du minerai de fer intact et d'une roche de sidérite naturelle	117
4.1 Introduction.....	119

4.2	Matériels et Méthodes	122
4-2-1-	Préparation des échantillons	122
4-2-2-	Préparation des souches	122
4-2-3-	Préparation des incubations	122
4-2-4-	Oxydation par l'O ₂ atmosphérique	123
4-2-5-	Oxydation par le peroxyde d'hydrogène	124
4-2-6-	Oxydation par les nitrates et nitrites (réactions abiotiques) sur Fe(II) soluble.....	124
4-2-7-	Dosage du Fer, des nitrates et des nitrites.	124
4.3	Résultats	125
4-3-1-	La couche de passivation des minerais riches en Fe(II)	125
4-3-2 -	Oxydation chimique	127
4-3-2-1-	Par le dioxygène atmosphérique (O ₂).....	127
4-3-2-2-	par le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	130
4-3-2-3-	par les nitrates (NO ₃ ⁻) et les nitrites (NO ₂ ⁻)	131
4-3-3-	Oxydation du fer par BoFeN1 et <i>Klebsiella mobilis</i>	132
4-3-4	Oxydation par TIE-1	135
4-3-5	Oxydation par Acidithiobacillus ferrooxydans	136
4.4	Discussion	137
Chapitre 5 : Étude des propriétés mécaniques du minerai de fer lorrain après		
réduction et oxydation, chimique ou biologique.		
		143
5.1	Introduction	145
5-1-1-	Comportement mécanique des roches : définitions	146
5-1-1-1	Généralités	146
5-1-1-2-	Les propriétés élastiques des matériaux	147
5.2	Matériels et méthodes	148
5-2-1-	Indentation.....	148
5-2-2-	La compression simple	151
5-2-3-	Mise en place des expériences de fluages.....	152
5-2-4-	Mise en place des réactions chimiques et biologiques	153
5.3	Résultats	154
5-3-1-	Compression simple	154
5-3-2-	L'indentation	162
5-3-2-1-	Minerai vieilli	162
5-3-2-2-	Minerai intact	165
5-3-3-	Le fluage	168
5.4	Discussion	169
DISCUSSION - CONCLUSIONS GENERALES		173
Références Bibliographiques.....		181
ANNEXES		196
9.1.	Annexe au Chapitre 3 ₁	198
9.2.	Annexe Chapitre 5.....	204

Liste des abréviations

BRGM : Bureau de recherches géologiques et minières

DIRB : *dissimilatory iron reducing bacteria* (bactérie réductrice du fer par dissimulation)

DRIFTS : Spectroscopie infrarouge en réflexion diffuse à transformée de Fourier

DRIRE : Direction régionale de l'industrie, de la recherche et de l'environnement

DSMZ : *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (collection allemande de souches microbiennes)

GISOS : Groupement d'intérêt scientifique sur l'impact et la sécurité des ouvrages souterrains

IONRB : *iron-oxidizing nitrate reducing bacteria* (bactérie ferro-oxydante réductrice du nitrate)

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique à transmission

SMW : *synthetic mine water medium* (milieu synthétique d'eau de mine)

SRB : *sulfate reducing bacteria* (bactérie sulfato réductrice - BSR)

XPS : *X ray photoelectron spectrometry* (spectrométrie photoélectronique aux rayons X)

INTRODUCTION GENERALE

Le fer est un enjeu économique important pour tous les pays, notamment ceux qui l'exploitent et l'exportent (Australie, Brésil, Chine, ...). Pour l'Australie, en 2013-2014, l'export de minerai de fer est la première valeur exportée (75 milliards de dollars (US)). Le minerai de fer représente 22,5 % de la valeur total des exports et 4,7 % du PIB de l'Australie (DFAT, 2014). Le Brésil est le second exportateur avec 32,5 milliards de dollars et la Chine, premier pays importateur mondial (64 % des imports mondiaux de minerai de fer) est aussi le premier producteur mondial (Comtrade Labs, 2013). Si la France est aujourd'hui loin derrière, elle a été, avec les mines de Lorraine, le second producteur mondial au début du XX^{ème} siècle, derrière les États-Unis. Cette industrialisation n'a pu se faire qu'avec l'apparition du procédé Thomas, permettant une déphosphoration efficace du minerai. Mais la faible teneur en fer de la Minette (30-35%), surnom donné au minerai de fer de Lorraine, ainsi que la nécessité d'un traitement post-extraction, n'ont pu concurrencer l'importation de minerai de fer plus riche (~ 60 %) et ne nécessitant que peu de traitements. Cela a conduit à l'arrêt des exploitations minières de France. Les dernières mines ont été fermées dans les années 90. Les mines (exploitées en chambres et piliers), à l'abandon et ennoyées, ont provoqué des effondrements, causant d'importants dommages aux infrastructures (maisons, routes) et impactant profondément la population locale. La mise en place d'organismes de surveillance et de prévention a donc été décidée (GISOS: Groupement de recherche sur l'Impact et la Sécurité des Ouvrages Souterrains, GEODERIS) et l'étude scientifique des sites miniers a été financée. Le comportement rhéologique du minerai de fer a été étudiés (Grgic, 2001, Grgic *et al.*, 2003, 2005, 2006, 2009, 2013, 2014) avec la mise en place de modèles théoriques pour l'évolution mécanique et chimio-minéralogique du minerai de fer. Mais jusqu'alors l'impact de l'activité bactérienne n'avait pas été exploré en profondeur.

Il n'est plus à démontrer que les bactéries, via leur grande diversité métabolique, affectent la géochimie environnementale, le cycle du fer ne faisant pas exception (Kappler et Straub, 2005). Les conditions aérobie ou anaérobie vont fortement conditionner les réactions chimiques liées au fer. En présence d'oxygène, le Fe(II) s'oxyde spontanément en Fe(III) à pH neutre, alors qu'à faible pression partielle en O₂ ou à pH acide l'oxydation bactérienne domine. Le Fe(III) est insoluble et précipite sous forme d'oxydes ou oxyhydroxydes de fer. En revanche, en anoxie, l'activité bactérienne contribue à la réduction ou l'oxydation du fer bien plus que les réactions chimiques (Lovley *et al.*, 2004 ; Hedrich *et al.*, 2011). Par exemple, les bactéries capables de réduire le Fe(III) peuvent utiliser directement les oxydes de Fe(III) (goethite, lépidocrocite et hématite) et générer un flux notable de Fe(II) (Lovley,

2000). Le devenir du Fe(II) va alors dépendre de l'environnement : en milieu sulfureux de la pyrite (FeS_2) ou de la mackinawite (FeS) se forme; en milieu riche en phosphates, la vivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) précipite; alors qu'en milieu riche en carbonate la sidérite (FeCO_3) précipite. Les bactéries oxydant le Fe(II) sont en revanche souvent dépendantes de facteurs environnementaux majeurs tels que la lumière ou l'acidité du milieu.

Aujourd'hui, dus à leur important impact économique (Kruger, 2011), les phénomènes de biocorrosion sont de plus en plus décrits dans la littérature. En revanche, l'impact des réactions bactériennes d'oxydation et de réduction sur la minéralogie des roches ferrugineuses ou ferriques reste toujours à étudier. Si les mécanismes de réduction et d'oxydation sont connus, ainsi que les différentes phases minérales formées, la question des modifications mécaniques des roches ayant subi ces bioréactions, a peu ou pas été étudiée. C'est l'un des objectifs de cette thèse. En effet, les mines souterraines de Lorraine sont aujourd'hui sujettes à des effondrements, causant d'importantes modifications à la surface. Ces effondrements sont souvent liés à la rupture des piliers qui soutiennent les mines souterraines (jusqu'à 250 m de profondeur). Les piliers sont constitués de minerai de fer laissé sur place. Si l'impact de l'oxydation, liée à la ventilation durant l'exploitation minière (vieillesse anthropique de la roche), sur les propriétés mécaniques du minerai de fer au sein des piliers a été étudiée (Grgic, 2001), les différentes réactions chimiques et biologiques survenant dans les mines maintenant ennoyées restent à étudier. Ainsi, dans un environnement anaérobie, riche en Fe(III) et Fe(II), et au pH neutre correspondant aux mines de Lorraine ennoyées, une activité bactérienne liée au fer est sans aucun doute possible.

L'objectif de cette thèse a donc été de déterminer si les bactéries ferri-réductrices et ferro-oxydantes sont capables de réduire ou oxyder les phases minéralogiques contenues au sein du minerai de fer. Et si oui, il a été déterminé l'impact de telles réactions sur les propriétés micro-mécaniques du minerai de fer.

Ce manuscrit s'articule en cinq chapitres. Le premier chapitre est une analyse bibliographique sur les études réalisées sur les mines de fer de Lorraine, les bactéries ferri-réductrices et les bactéries ferro-oxydantes. Le deuxième chapitre traitera de la partie expérimentale notamment des techniques de cultures microbiennes, ainsi que les différentes analyses physico-chimiques utilisées. Les troisième et quatrième chapitres retraceront toutes les expériences de réduction et d'oxydation du minerai, que ces réactions soient dues à

l'action directe des bactéries ou indirecte, par la formation de produits secondaires de respiration, tels que les sulfures et les nitrites. Enfin le dernier chapitre s'intéressera aux propriétés macro-mécaniques (compression uniaxiale, fluage) ou micro-mécaniques (micro-indentation) des roches, et à l'effet potentiel que peuvent avoir la réduction bactérienne et l'oxydation chimique.

Chapitre 1 : Analyse Bibliographique

1.1 Les mines de Lorraine : une histoire

Au début du XX^{ème} siècle, alors que l'ère industrielle prend son essor, l'exploitation des mines s'intensifie. Nous sommes passés d'une exploitation dite artisanale depuis le Moyen-Age, à une industrialisation de l'extraction des minerais, qui prend alors une ampleur jusque-là inconnue. La demande croissante en matières premières (charbon, fer,...) fait que la Lorraine, premier exploitant de fer français, va devenir le second territoire mondial de fer. En 1910, la Lorraine représentait 91% de l'exploitation nationale en fer. Ceci a été possible grâce à de nouvelles techniques de forage, de nouveaux explosifs, ainsi qu'à la mécanisation. Cela va perdurer jusqu'en 1960. Après cette date une décroissance a été amorcée, elle continuera jusqu'à la fermeture de toutes les mines de Lorraine dans les années 90. Cet arrêt, brutal, de l'exploitation minière s'explique principalement par la découverte de nouveaux gisements en Chine et en Australie (respectivement les 1^{er} et 2^{ème} producteurs mondiaux actuels) où le minerai de fer est bien plus riche ($\geq 60\%$ de teneur en fer) que la *minette* lorraine ($\approx 30\%$).

Cet arrêt signe la fin de l'essor minier lorrain. Aujourd'hui, toutes les mines de fer sont fermées, mais ce n'est pas pour autant que l'on n'entend plus parler d'elles. En effet, en 1996, un premier effondrement « post-mine » a eu lieu à Auboué (54) rendant 80 habitations inhabitables. D'autres effondrements surviennent les années suivantes : à Auboué (un second en 1996), Moutier (1997), Moyeuve (1998) et Roncours (1999). Si durant l'exploitation minière, des effondrements sont effectivement survenus, c'est l'exploitant qui prenait alors en charge tous les dommages. Or, depuis l'arrêt des exploitations, une procédure de désengagement a été mise en place (i.e., renonciation) : les exploitants cèdent leurs terrains à l'Etat. Les effondrements ayant lieu pendant cette longue procédure et leurs conséquences n'ayant pas été prévues, un bras de fer s'engage entre les anciens propriétaires des mines (quand ceux-ci sont connus) et l'Etat, qui vont alors se renvoyer la responsabilité au détriment des sinistrés. Aucun responsable n'étant désigné, les assurances refusent de payer.

En 1999 un consensus est trouvé. L'Etat aide les victimes et l'exploitant est responsable des désordres du sous-sol. Des moyens techniques sont mis en places, gérés par des organismes publics/privés dont la mission est de surveiller et de prévoir les risques (GEODERIS, GISOS, BRGM, DRIRE...). De plus, de nombreux projets sont mis en place afin de comprendre l'impact de l'après-mine, notamment les conséquences de l'ennoyage, dû à l'arrêt des pompages d'eaux d'exhaures (Duchêne, 2008 ; Besnard *et al.*, 2010; Petit *et al.*, 2002; Salmo *et al.*, 2006).

1.2 Le minerai de fer lorrain : méthode d'exploitation et caractéristiques

Le bassin ferrifère lorrain s'étend sur 120 km de long, entre la frontière luxembourgeoise au nord jusqu'au sud de Nancy, et sur 50 km de large d'est en ouest. Il est divisé en deux parties principales : le bassin de Briey-Longwy au nord, couvrant 1300 km², et le bassin de Nancy, au sud, couvrant 380 km² (Fig. 1A) (Grgic, 2001). Le minerai exploité affleure souvent la surface mais peut aussi se trouver jusqu'à 250 m de profondeur (mine d'Amermont-Dommary). Les couches du gisement s'enfoncent en pente douce vers l'ouest (pente 3%) (Grgic, 2001). La formation ferrifère est constituée d'une alternance de couches ferrifères (riches et exploitées) et de couches plus pauvres dites « marnes intercalaires ». Le faciès ferrifère possède une teneur en fer de 30 à 35%, teneur relativement faible, ce qui a valu au minerai de fer lorrain le nom de "minette". Les "marnes intercalaires" sont constitués d'argilites, siltites et carbonates (Grgic, 2001; Salmo *et al.*, 2006).

1-2-1-Méthode d'extraction

1-2-1-1- L'extraction artisanale

Les exploitations artisanales ont été menées à partir de l'affleurement de la couche, en s'enfonçant progressivement, et en laissant des piliers de soutien résiduels de forme et de taille très diverses. Les galeries sont partiellement remblayées avec des blocs de stérile empilés pour soutenir le toit. Ces travaux miniers sont généralement mal connus du fait de leur caractère artisanal et de leur ancienneté (Fig. 1B). Les méthodes changent avec l'ère industrielle.

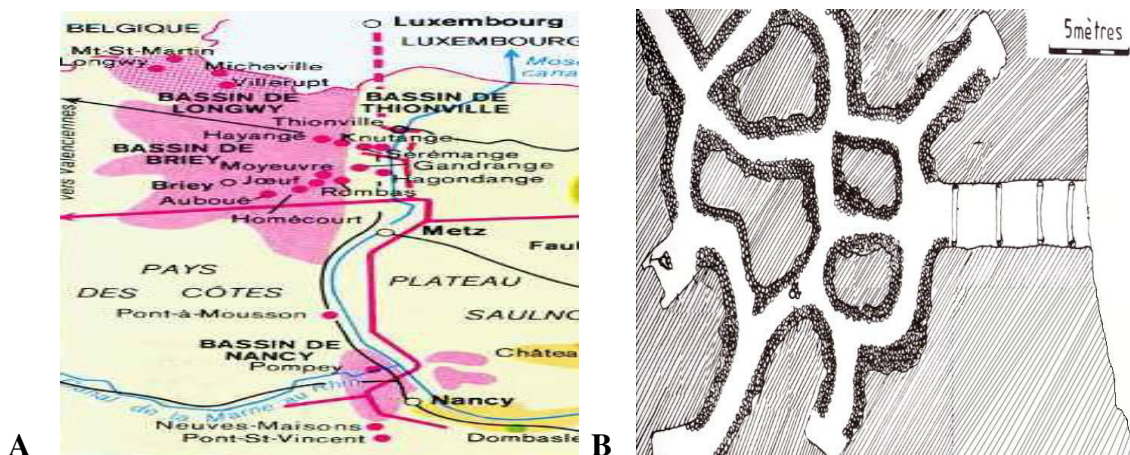


Figure 1 : (A) Etendue du bassin ferrifère de Lorraine (en rose, 1 cm = 12.5 km, modifié de soleildacier.org), (B) Schéma d'une ancienne exploitation (Salmo *et al.*, 2006).

1-2-1-2- Le dépilage intégral

Ce type d'exploitation est utilisé dans les zones inoccupées. Cette méthode consiste à découper le gisement en panneaux, puis à tracer des chambres, de l'ordre de 5 m de large, découpant des piliers longs de 15 à 20 m. Ces piliers sont repris dans l'opération de dépilage pour ne laisser subsister que des "quilles" (piliers résiduels) (Fig. 2A). Ces piliers résiduels sont finalement abattus à l'explosif (torpillage), provoquant ainsi un effondrement contrôlé du toit. Au-dessus, les terrains fléchissent et viennent s'appuyer progressivement sur le foudroyage. L'affaissement remonte jusqu'en surface où apparaît une cuvette dont, la surface est plus importante que celle du panneau dépilé au fond (Fig. 2B). Dans les cinq ans, les terrains sont naturellement compactés et il n'est plus observé de mouvements naturels discernables en surface (Grgic, 2001 ; Salmo *et al.*, 2006).

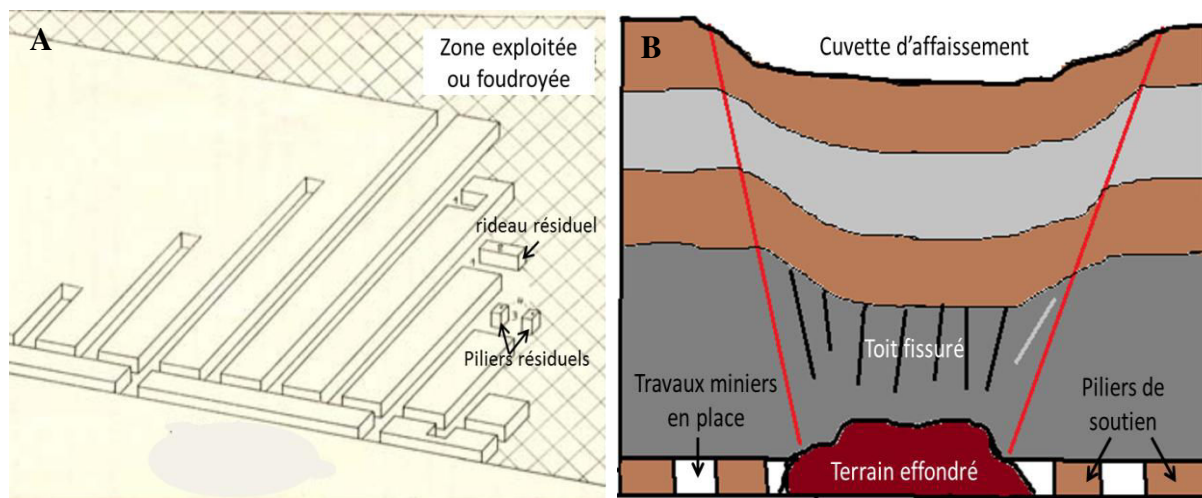


Figure 2.: (A) Schéma d'exploitation par dépilage (Salmo *et al.*, 2006). (B) Schéma d'affaissement suite au dépilage total (modifié de Grgic, 2001), les droites rouges correspondent à l'angle d'influence (par rapport à la verticale). Elles montrent qu'un effondrement faible en profondeur a des conséquences importantes à la surface.

1-2-1-3- Chambres et piliers, stots de protection

Cette méthode concerne des pendages de 0 à 15°. Les mineurs creusent dans la couche ferrifère, entre toit et mur, des séries de galeries parallèles, les chambres, entre lesquelles des bandes non exploitées servent de soutènement (piliers) (Fig. 3). Afin d'augmenter le taux de récupération du minerai, des ouvertures sont pratiquées dans les piliers, perpendiculairement aux chambres. Un taux de défruitement (% de vide entre les piliers) est défini en fonction du terrain de surface. En zone urbaine il est de 30% contre 50% avant les premiers effondrements

(Fig. 3). Les piliers sont ensuite foudroyés en zone rurale afin de récupérer un maximum de minerai. En zone urbaine (ou sous les infrastructures), les exploitants doivent laisser des piliers de soutien plus importants (10 à 25 mètres d'épaisseur) constituant les stots de protection. Ces piliers supportent l'ensemble du recouvrement et protège la surface. Les contraintes appliquées à ces piliers sont d'autant plus importantes que la profondeur des travaux est grande et que le taux de défrètement est élevé. Dans le cas d'exploitation sur plusieurs couches (ce qui est le cas en Lorraine), les contraintes sont d'autant plus fortes que les piliers sont mal superposés (Grgic, 2001).

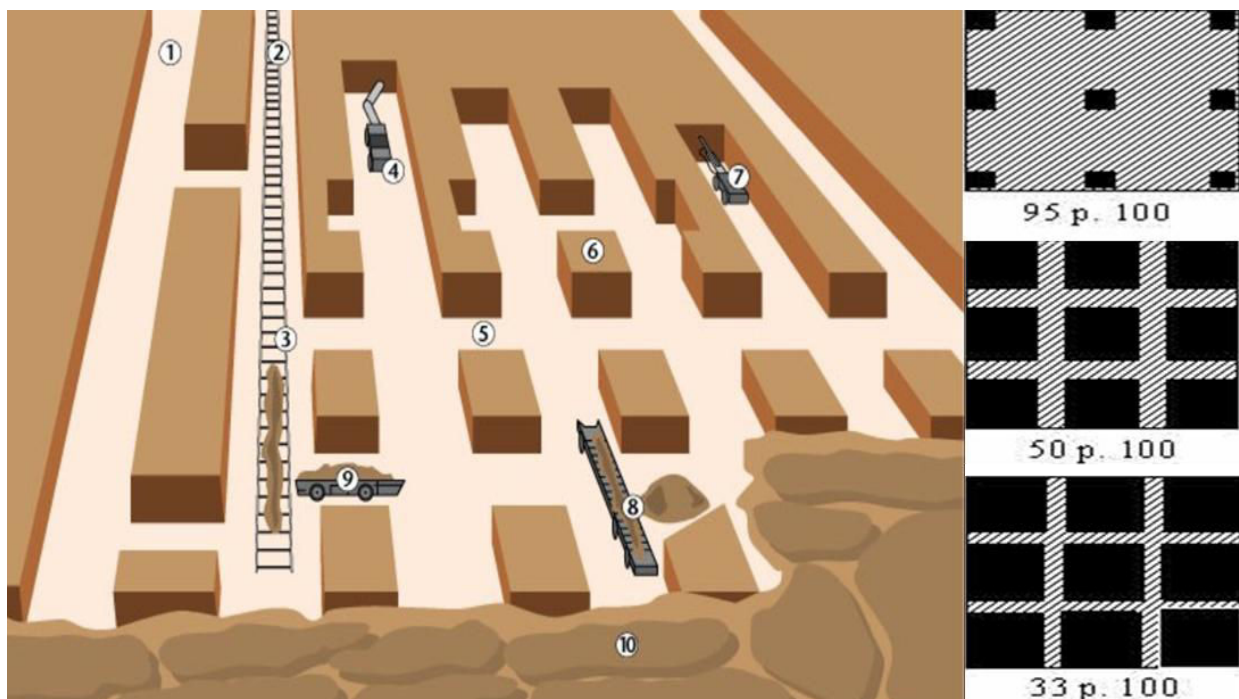


Figure 3 : Schéma de la méthode d'exploitation par chambres et piliers (modifié de www.mdpa.fr, consulté le 02/03/2015). 1. Voie de transport, 2. Voie de desserte, 3. Convoyeur à raclette, 4. Haveuse universelle, 5. Chambre, 6. Pilier, 7. Perforatrice, 8. Chargement du minerai de fer excavé, 9. Déchargement d'une navette, 10. Zone de foudroyage. En zone urbaine, les piliers sont laissés sur place alors qu'en zone rurale des foudroyages sont effectués. A droite, il est représenté des exemples de taux de défrètement (adapté de derelicta.fr, consulté le 02/03/2015).

1.3 Propriétés minéralogiques et pétrophysiques du minerai de fer lorrain

Deux types de minerais différents ont été étudiés au cours de cette thèse. Un minerai dit « intact » ou « sain » qui correspond au minerai originel, trouvé lors de sondage hors site d'exploitation, ou encore au cœur de larges piliers exploités dans les années 90 (donc peu soumis à l'oxydation pendant la ventilation). Le second minerai est dit « vieilli » ou encore « oxydé ». Il provient de sondages horizontaux prélevés au parement de piliers formé dans les années 30 au début de l'exploitation, et soumis pendant plus de 70 ans à des conditions oxydantes dues à l'aération des galeries. Deux faciès sont retrouvés au sein de ces minerais ; un faciès ferrifère, riche en fer (jusqu'à 30%) et un faciès carbonaté. Seul le faciès ferrifère est ici considéré. Les deux minerais correspondent à une ferri-arénite oolitique. Le minerai sain est composé d'un assemblage d'oolites liées par un ciment (Fig. 4). Les oolites sont constituées majoritairement de goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$) et quelques autres oxydes ($\text{Al}_2\text{O}_3 \approx 11\%$, $\text{SiO}_2 \approx 8\%$, $\text{P}_2\text{O}_5 \approx 3\%$). Leurs cortex s'organisent en couches concentriques dont la formation est due aux phénomènes de concrétion qu'a subit la roche à sa formation (Fig. 4D). Le ciment est un ensemble de calcite (CaCO_3) (plus ou moins ferrifère), de sidérite (FeCO_3) et d'argile (phyllosilicates ferrifère: berthiérine).

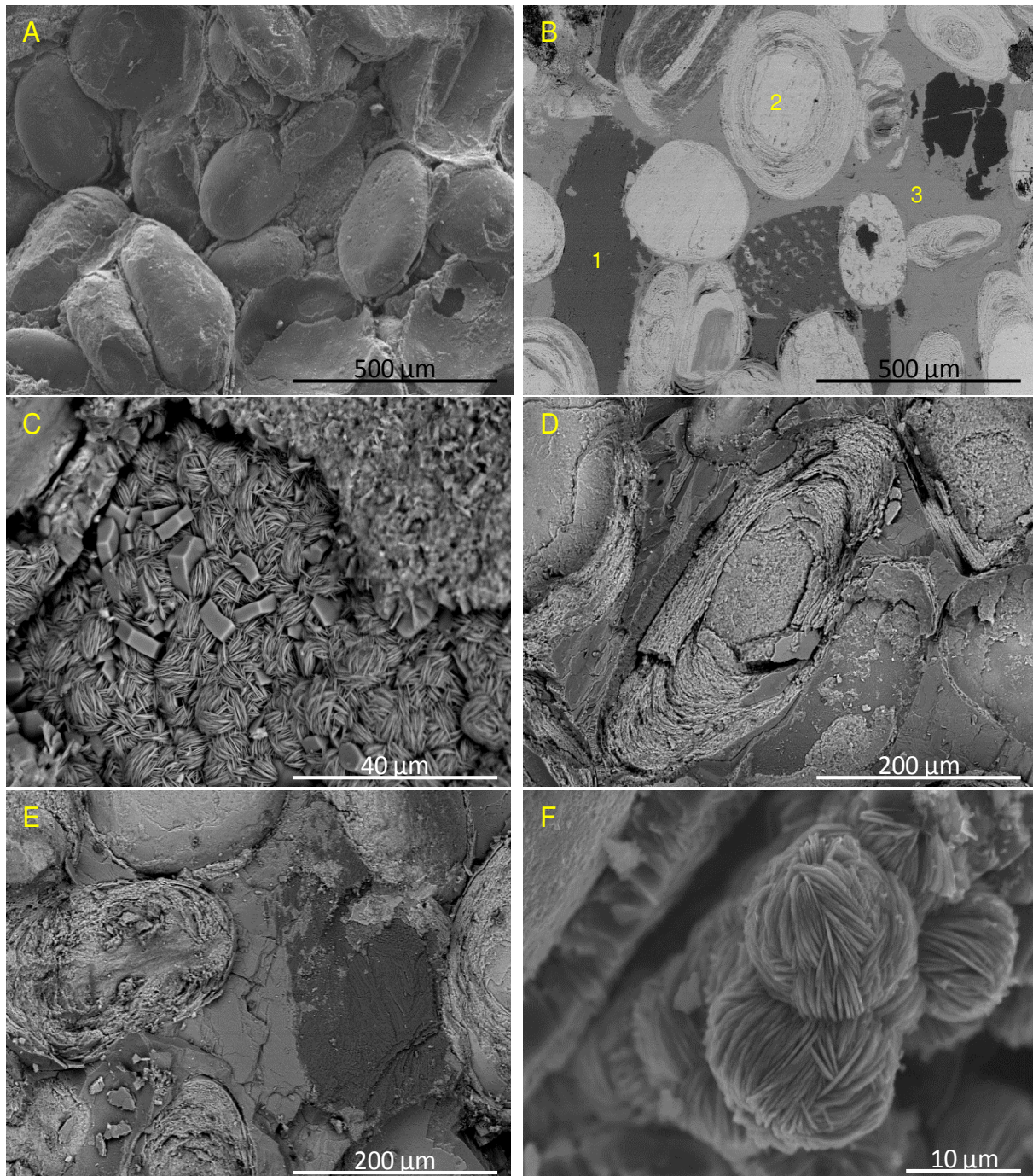


Figure 4 : Photographies de microscopie électronique à balayage (MEB) pris sur le minerai intact (auteur B. Maitte). (A): Vue d'ensemble des oolites jointes par du ciment interoolitique. (B): Vue d'ensemble sur lame mince ; 1. Calcite, 2. Oolithe, 3. Sidérite (C): Zone interoolitique riche en phyllosilicates ferrifères (roses des sables) et hydroxyapatite (cubes). (D): Image centrée sur une oolithe dont les différentes couches du cortex sont visibles. (E): Ciment interoolitique de calcite (gris sombre) et sidérite (gris clair). (F): Roses des sables ferrifères (berthiérine) retrouvés au sein du ciment interoolitique.

Les phyllosilicates ferrifères (berthiérine) sont présents sous forme diagénétique (« crêtes floues », Fig. 5D), mais aussi sous forme dite recristallisée en rose des sables (« crêtes nettes », Fig. 5F). La néo-cristallisation est possible lorsque le minéral a suffisamment d'espace, comme au sein d'une géode (Fig. 6F). Les phyllosilicates sont retrouvés dans le minerai sain et le minerai vieilli, et ce sous ces deux formes.

Soumis à l'oxydation atmosphérique pendant l'exploitation minière, le minerai de fer a vieilli. Ceci a entraîné une modification chimique du minerai de fer. D'après Dagallier et al (2002), il a été constaté la disparition du ciment de sidérite, entraînant une perte de cohésion inter-granulaire (Figs. 5A et B). Ceci occasionne un tassement du minerai où les oolites vont s'imbriquer en texture plus compacte, menant à leur fracturation voir leur écrasement (Fig. 6A). Une desquamation du cortex oolitique a été observée, certaines oolithes devenant pulvérantes. La néoformation d'une croûte d'oxyde (hématite notamment) est également observée (Figs. 5D et E). Argile et calcite sont toujours présentes mais la sidérite a quasi disparue du minerai (Fig. 5B).

Que le minerai soit vieilli ou sain, la porosité est comprise entre 25 % et 30 %, le réseau de pores est très bien connecté et la taille des mésopores est comprise entre 0,002 et 0,05 μm de rayon (Grgic *et al.*, 2013). Mais il existe également des macropores ($> 1 \mu\text{m}$) ainsi que des fissures où les bactéries (taille moyenne 1 μm) peuvent s'infiltrer (Grgic *et al.*, 2013).

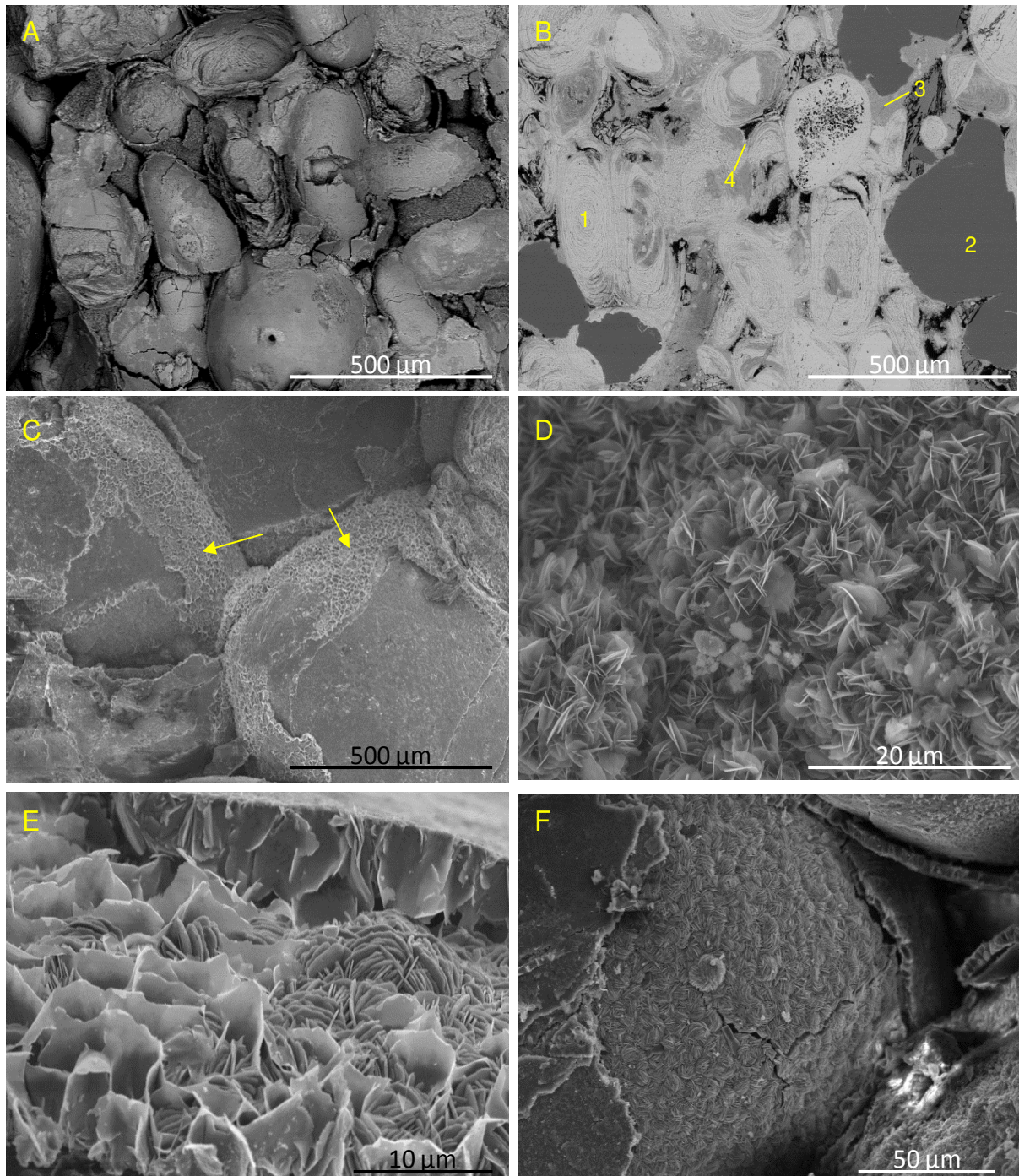


Figure 5 : Photographies de microscopie électronique à balayage du minerai vieilli (auteur B. Maitte). (A): Vue d'ensemble, le ciment interoolitique a presque disparu et les oolites sont écrasées les unes contre les autres. (B): Vue d'ensemble sur lame mince ; 1. Goethite, 2. Calcite, sidérite, 4. Croute d'hématite (C): Image centrée sur des oolites encroutées par de l'hématite (flèche). (D): Zone interoolithique riche en phyllosilicates diagénétiques et oxyhydroxyde de fer. (E): Hématite et phyllosilicates recristallisés entremêlés à la surface d'une oolite. (F): Phyllosilicates recristallisés présents dans une géode (vide entre les oolites).

Relativement stables depuis des millénaires, l'activité humaine a sans doute réactivé les cycles biogéochimiques, à l'échelle de la mine. En effet, après une phase d'oxydation durant l'exploitation, les galeries, aujourd'hui ennoyées, sont susceptibles d'être le siège de réactions chimiques et/ou biologiques. Les réactions biologiques pourraient résulter de l'activité de certaines bactéries, présentes naturellement dans les mines et/ou apportées par l'activité humaine, qui pour satisfaire leurs besoins nutritifs, principalement liés aux besoins énergétiques, peuvent entraîner des modifications physico-chimiques des minéraux, notamment ceux riches en fer (goethite, hématite et sidérite). Nous allons donc présenter par la suite, comment certaines bactéries sont capables d'utiliser le fer (Fe(II) ou Fe(III)), ou des espèces chimiques d'autres éléments comme le soufre, pour leur métabolisme, et quelles conséquences cela peut avoir sur la minéralogie.

1.4 Le cycle biogéochimique du fer

1-4-1-Généralités

Un cycle biogéochimique est le processus de transport et de transformation cyclique d'un élément ou composé chimique entre les grands réservoirs que sont la géosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère, dans lesquels se trouve la biosphère. Dans le cas du fer, cela se traduit par le passage de sa forme réduite Fe^{2+} (fer ferreux, ou Fe(II)) à sa forme oxydée Fe^{3+} (fer ferrique, ou Fe(III)), et inversement. Le fer élémentaire (Fe^0), que l'on retrouve dans les aciers, est peu impliqué dans les cycles naturels. Etant d'origine anthropique, cette espèce chimique ne sera pas discutée dans ce paragraphe. Le cycle biogéochimique du fer est souvent considéré comme le cycle le plus simple du fait de l'existence de deux espèces chimiques uniquement (Fig. 6). En revanche le fer existe au sein de nombreux minéraux (≥ 749 minéraux, d'après la base de données Rruff, Lafuente *et al.*, 2015). De par son potentiel redox ($E^0 = + 0,77 \text{ V}$), le couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ est soumis à de nombreuses réactions chimiques et biologiques, en conditions oxiques ou anoxiques, pouvant former ces minéraux (Fig. 7).

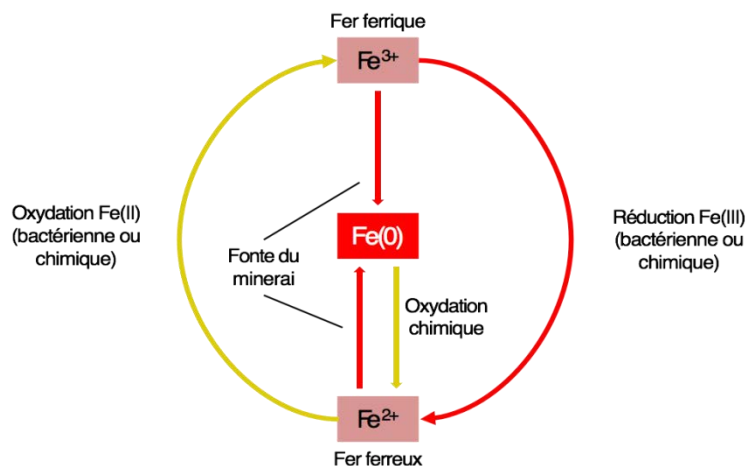


Figure 6 : Cycle biogéochimique simplifié du fer.

Si le fer est abondant sous forme minéral au sein de la croûte terrestre, c'est au cœur de notre planète, le noyau, que son abondance est sans doute la plus élevée. Le fer est aussi un élément vital pour les organismes. En effet, ses propriétés physico-chimiques lui permettent de servir notamment de centre de coordination pour les protéines au sein des groupements prosthétiques. La molécule la mieux décrite est l'hémoglobine qui permet le transport d' O_2 , mais le fer intervient également dans les protéines fer-soufre et d'autres métalloprotéines dont de nombreux cytochromes essentiels aux conversions énergétiques. Cela démontre

l'importance du fer dans le métabolisme des organismes vivants. Seules quelques rares bactéries (*Lactobacilli*, *Borrelia burdorferi*, *Treponema pallidum*) sont capables de vivre sans fer (Andrews *et al.*, 2003).

Le fer est donc clairement identifié comme vital et ubiquitaire. Dans le monde vivant, il représente le 4^{ème} élément le plus abondant (en masse) de la croûte terrestre où il participe à de nombreux processus bio-physico-chimiques (Fig. 7).

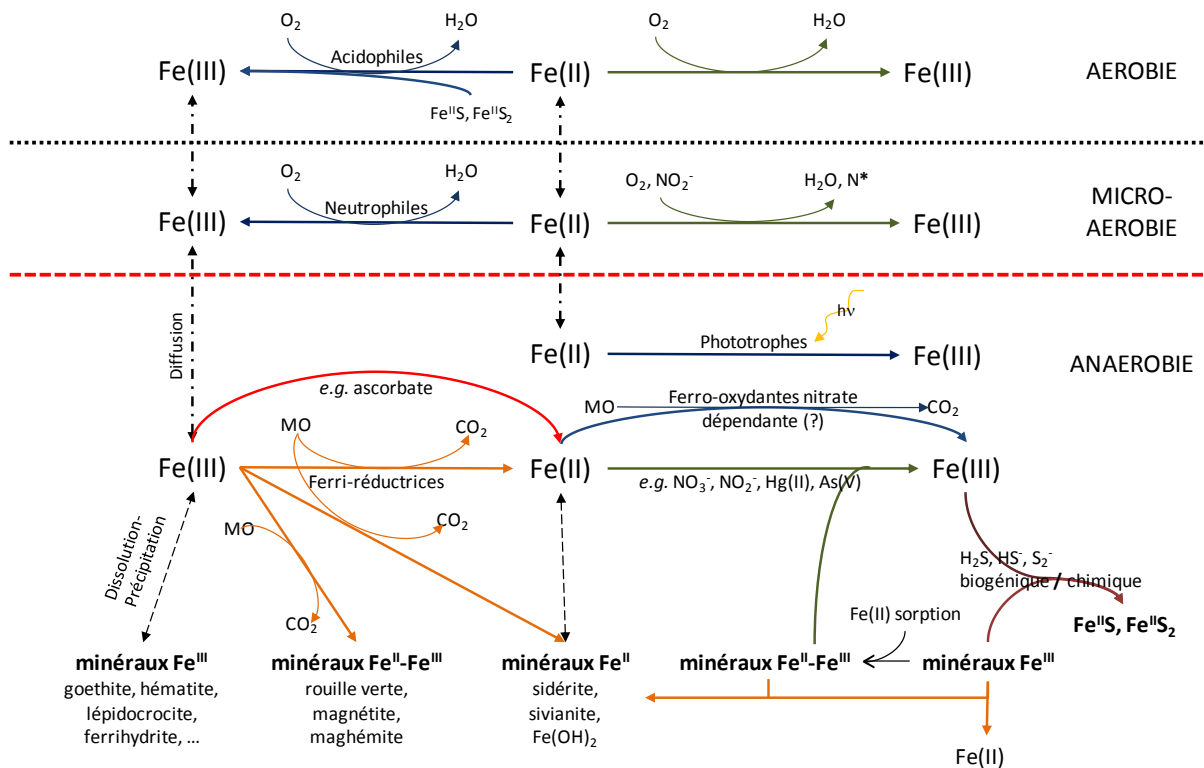


Figure 7: Cycle biogéochimique du fer. Les flèches orange et bleues représentent respectivement les bioréductions et biooxydations. Les flèches rouges et vertes représentent respectivement les réductions et oxydations chimiques. Les flèches marron représentent la réduction du Fe(III) par des espèces sulfureuses d'origine biologique ou chimiques. N* représente les espèces azotés réduites par rapport aux nitrites (NO₂⁻). MO = matière organique. L'interrogation concernant l'existence de bactéries ferro-oxydantes nitrate dépendante est symbolisée par « (?) » (voir § 4-5).

1-4-2- Le fer, un élément majeur de l'histoire géologique de notre planète

Il y a 2,4 milliards d'années, la « Grande Oxygénation » a eu lieu. Cet événement marque la fin de la période anoxique de la Terre et l'arrivée du dioxygène dans les océans et l'atmosphère. Or, avant cet avènement, les océans étaient de type ferrugineux c'est-à-dire riches en Fe(II). Aujourd'hui encore, les traces de cette ère sont visibles par les gisements de fer rubané (« *banded iron formations* », BIF). Ces derniers se caractérisent par une alternance de couches riches en fer (~ 20 - 40 %) et de couches riches en silice (~ 40 - 50 %) (Taylor et Konhauser, 2011). Si l'ensemble des couches peuvent être de quelques millimètres, elles peuvent également atteindre plusieurs mètres (Fig. 8). Mais comment est-on passé d'un océan riche en Fe(II) à ces montagnes de Fe(III) ?



Figure 8 : *Banded iron formations* de Lorraine à Abreschviller (57).

Les origines de la vie sont estimées à 3,8 milliards d'années. Cette vie serait une vie procaryote, représentée par un organisme de type archée (*Archaea*) et/ou phototrophe et tupe bactérie (*Bacteria*) (Cavalier-Smith, 2002). Cette dernière, détentrice de la protéine RuBisCo (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase), pouvait fixer le CO₂ via l'oxydation du Fe(II), très abondant dans les océans (Cavalier-Smith, 2002 ; Konhauser *et al.*, 2005). La production de dioxygène débute alors et va se poursuivre jusqu'à l'avènement de la Grande Oxygénation. L'oxydation du Fe(II) par les microorganismes, puis plus tard par l'O₂, va entraîner la formation de Fe(III) qui précipite sous la forme Fe(III) et se dépose jusqu'à 1 mm/an sous forme de sédiment et ainsi former les BIFs (Fig. 9) (Konhauser *et al.*, 2005). A noter que d'autres métabolismes bactériens sont apparus, souvent en lien avec le fer (ferri-réduction), le méthane (CH₄) et le CO₂. Les métabolismes bactériens liés au fer par sa

réduction ou son oxydation sont donc anciens. Les BIFs sont composés de différents minéraux de fer tel que l'hématite, la magnétite ou encore la sidérite (Konhauser *et al.*, 2005). Ces minéraux sont à la base de nombreuses réactions d'oxydoréduction catalysées par les bactéries. Certains d'entre eux, tels que la goethite et la sidérite, sont présents au sein du minerai de fer lorrain. Ces BIFs ont également un important impact économique car ils sont la source la plus importante en minerai de fer extrait en Australie ou en Chine.

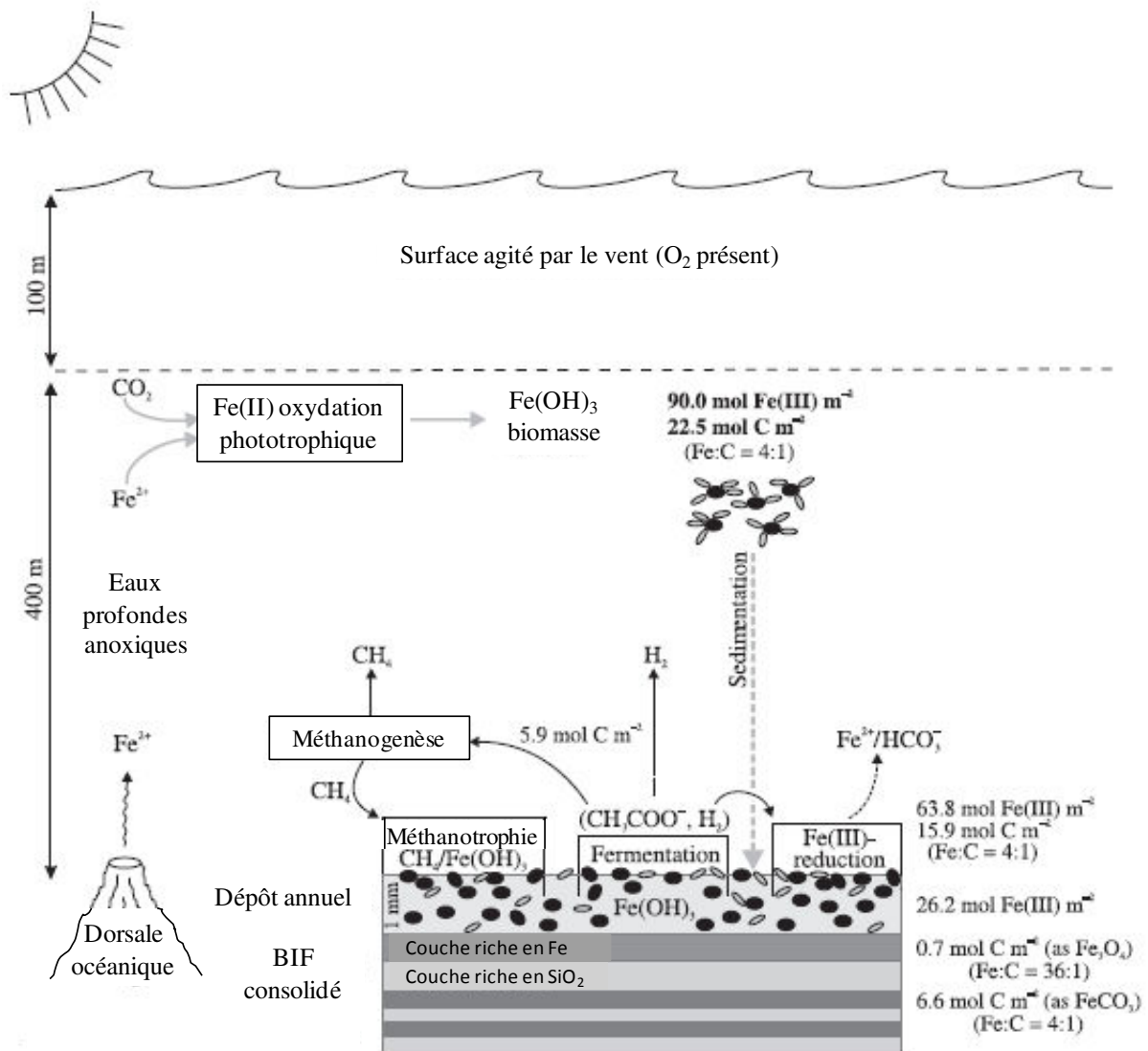


Figure 9 : Schéma représentatif du rôle des microorganismes dans le cycle du fer des océans durant l'ère Archéen et paléoproterozoïque (modifié de Konhauser *et al.*, 2005)

1-4-3- Les oxydes de fer et la sidérite

Seize oxydes de fer (oxydes, hydroxydes ou oxyhydroxydes) ont été recensés (Tableau 1) (Cornell & Schwertmann, 2003). Tous peuvent être retrouvés dans les sols. Les phases de Fe(II) sont plus difficiles à étudier car sensibles à l'O₂. Néanmoins, en milieux anoxiques (e.g. sédiments), la sidérite (FeCO₃), l'ankérite (Ca(Fe)(CO₃)₂) ou encore la vivianite (Fe₃(PO₄)₂•8H₂O) sont régulièrement retrouvées (DeGrave, 1985 ; Canfield, 1989). La pyrite (FeS₂) est également répandue (Wilkin and Barnes, 1996). Les argiles sont des phases minérales également porteuses de Fe(II) et / ou Fe(III) mais à de faibles proportions (Stucki, 1988). Seuls les minéraux qui ont été utilisés dans la partie expérimentale de ce manuscrit seront détaillés ici.

Tableau 1 : Les oxydes de fer (modifié de Cornell et Schwertmann, 2003)

Oxyde-hydroxydes et hydroxydes	Oxydes
Goethite α -FeOOH	Hématite α -Fe ₂ O ₃
Lépidocrocite γ -FeOOH	Magnetite Fe ₃ O ₄ (Fe ^{II} Fe ₂ ^{III} O ₄)
Akaganéite β -FeOOH	Maghemite γ -Fe ₂ O ₃
Schwertmannite Fe ₁₆ O ₁₆ (OH) _y (SO ₄) _z · n H ₂ O	β -Fe ₂ O ₃
δ -FeOOH	ε -Fe ₂ O ₃
Feroxyhyte δ' -FeOOH	Wüstite FeO
"High pressure FeOOH	
Ferrihydrite Fe ₅ HO ₈ · 4 H ₂ O	
Bernalite Fe(OH) ₃	
Fe(OH) ₂	
Rouille verte Fe _x ^{III} Fe _y ^{II} (OH) _{3x+2y-z} (A ⁻) _z ; A ⁻ =Cl ⁻ ; 1/2SO ₄ ²⁻	

1-4-3-1- La goethite

La goethite, α -FeOOH, qui confère la couleur jaune-brun aux sédiments, est l'oxyhydroxyde ferrique le plus stable thermodynamiquement dans l'environnement (Cornell et Schwertmann, 2003). La goethite est de symétrie orthorhombique dont le paramètre de maille est $a = 0,459$ nm, $b = 0,994$ nm et $c = 0,301$ nm. Dans les milieux naturels, le Fe(III) est très souvent substitué par des atomes d'aluminium (Al(III)), jusqu'à $0,33 \text{ mol mol}^{-1}$ (Cornell et Schwertmann, 2003). De plus, la goethite a des cristaux de tailles (de quelques nanomètres à quelques microns) et de formes variables, aiguilles (Fig. 10) ou grains (Cornell et Schwertmann, 2003).

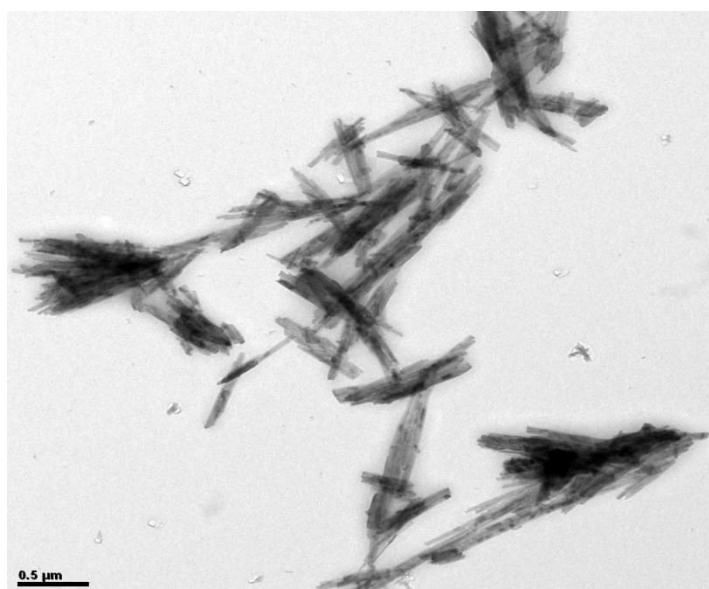


Figure 10 : Goethite synthétisée au cours de cette thèse, observation en microscopie électronique à transmission (auteur B. Maitte).

1-4-3-2- La lépidocrocite

Proche de la goethite, la lépidocrocite, γ -FeOOH, de couleur orange se retrouve souvent dans les sols hydromorphes, les composés rouillés et provient généralement de l'oxydation du Fe^{2+} (Schwertmann and Taylor, 1979 ; Cornell et Schwertmann, 2003). Dans l'environnement, la lépidocrocite est stabilisée par les composés organiques. Leur élimination conduit la lépidocrocite à se transformer en goethite. La lépidocrocite est de symétrie orthorhombique dont le paramètre de maille est $a = 1,252$ nm, $b = 0,387$ nm et $c = 0,307$ nm (Cornell et Schwertmann, 2003). Sa synthèse conduit à la formation d'aiguilles similaires à la goethite synthétique.

1-4-3-3- L'hématite

L'hématite, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, est fréquemment trouvée dans les sols et les sédiments. Elle est à l'origine de la couleur rouge sang. C'est également le minéral recherché dans l'exploitation minière car à l'origine des « pellets » qui seront transformés en acier. L'hématite est de symétrie hexagonale dont le paramètre de maille est $a = 0,503 \text{ nm}$ et $c = 1,375 \text{ nm}$. En milieu naturel, elle peut également présenter des substitutions aluminium (Cornell and Schwertmann, 2003) et est souvent caractérisée par une morphologie en nid d'abeilles (Fig. 11).

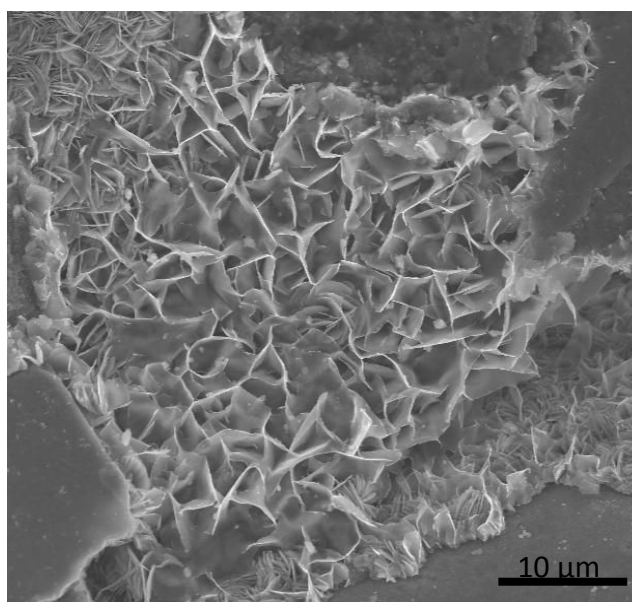


Figure 11: Observation en microscopie à balayage d'un « nid d'abeille » d'hématite fréquemment retrouvé au sein du minerai de fer vieilli de Lorraine (auteur B. Maitte).

1-4-3-4- La sidérite

La sidérite, FeCO_3 , est retrouvée dans les sédiments marins en zone anoxique, avec souvent de petite quantité de vivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$) (Postma, 1981). Cette espèce carbonatée est rarement pure et contient généralement des traces de magnésium ou manganèse. Elle a également été identifiée au sein de matériaux extraterrestres. La sidérite est de symétrie hexagonale dont le paramètre de maille est $a = 0,472 \text{ nm}$ et $c = 1,546 \text{ nm}$. La sidérite, en fonction de sa vitesse d'oxydation et la présence d'eau, est oxydée et forme de la goéthite, de la lépidocrocite ou de l'hématite (Bourman *et al.*, 1995). Elle peut être formée par voie biologique ou chimique (Roh *et al.*, 2003).

Les minéraux décrits ci-dessus peuvent être le siège de réactions d'oxydation et de réduction d'origine microbiologique. Les bactéries impliquées dans de telles réactions sont décrites dans les paragraphes suivants.

1.5 Les bactéries ferri-réductrices

Le cycle biogéochimique du fer est le siège de réactions de réduction qui peut être chimique mais aussi biologique. Du fait de la présence de nombreux oxydes de Fe(III) dans l'environnement, certaines bactéries ont développé la capacité d'utiliser ce Fe(III) comme accepteur final d'électrons en condition anaérobie (Lovley *et al.*, 2004 ; Weber *et al.*, 2006). Dans l'environnement, la croissance bactérienne, *via* la réduction du Fe(III), débute par l'oxydation de la matière organique et plus précisément des petits acides organiques (e.g. acétate) ou encore le dihydrogène (H₂) (Caccavo *et al.*, 1994, Lovley *et al.*, 2004). Ces bactéries sont nommées les bactéries réductrices du fer (IRB en anglais pour *iron-reducing bacteria*) (Fig. 12) et sont largement disséminées au sein des règnes *Bacteria* et *Archaea* (Lovley *et al.*, 2004 ; Weber *et al.*, 2006). Les IRBs sont étudiées pour deux raisons majeures. La première est leur capacité à réduire un large panel d'oxydes de fer, même les plus stables (e.g. magnétite, Kostka and Nealson, 1995). Ceci entraîne des conséquences intéressantes pour la biogéochimie du fer et notamment les minéraux néoformés qui peuvent devenir le siège de nouvelles réactions d'oxydation (Fredrickson and Gorby, 1996). La seconde raison est leur implication dans des phénomènes de bioremédiation des radionucléides (uranium, technétium et neptunium, Lloyd, 2003) ou encore la détoxification de certains métalloïdes tels que le chrome (Wielinga *et al.*, 2001) ou la séquestration de l'arsenic (Islam *et al.*, 2005).

La capacité à réduire le Fe(III) par un processus respiratoire est largement distribuée au sein des *Bacteria* (Fig. 12). Néanmoins, dans la littérature, deux genres bactériens ont été utilisés: le genre *Geobacter* et le genre *Shewanella*. Les représentants du genre *Geobacter* (famille des *Geobacteraceae*) semblent être plus abondants dans les environnements sédimentaires où ils ont la capacité d'oxyder l'acétate en CO₂ (Snoeyenbos-West *et al.*, 2000). En revanche, les *Shewanellaceae* semblent être moins répandues dans l'environnement que supposé précédemment (Lovley *et al.*, 2004), leur culture est possible en aérobie et elles sont peu exigeantes, les fortes densités bactériennes obtenues et leur capacité à réduire le Fe(III) en font un modèle d'étude privilégié (Fredrickson *et al.*, 1998 ; Zacchara *et al.*, 1998 ; Roden et

Urrutia, 2002). C'est aussi pour ces raisons qu'une souche de *Shewanella* (*Shewanella putrefaciens* CIP 8040) a été choisie dans notre étude.

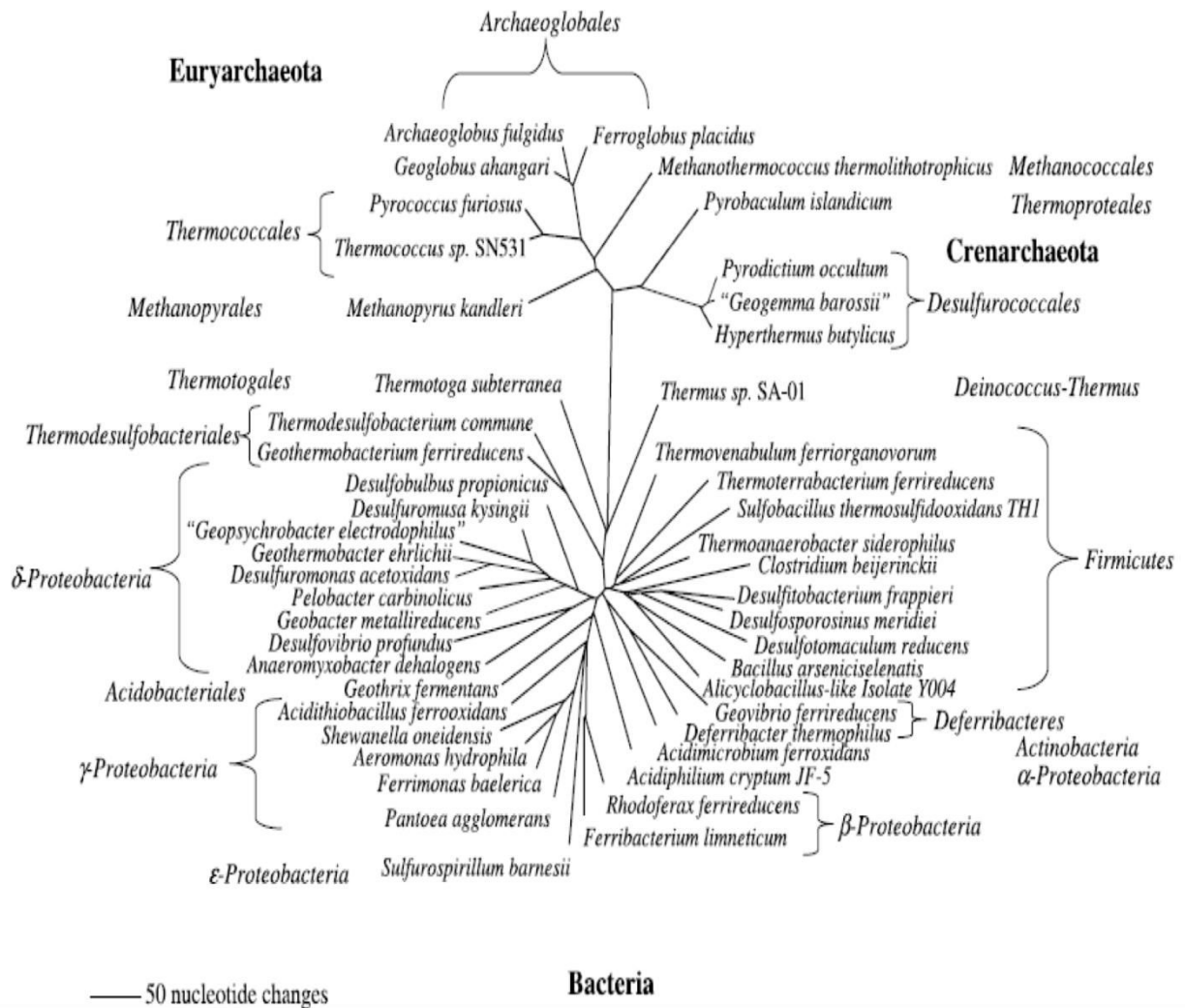


Figure 12 : Arbre phylogénétique des procaryotes capables de réduire le Fe(III) afin de supporter la croissance. Basé sur les séquences du gène codant pour l'ARN 16S (Lovley *et al.*, 2004).

1-5-1- Shewanella

Le genre *Shewanella* correspond à des bactéries à coloration de Gram négative, aéro-anaérobie facultatives, non sporulantes, mobiles et mesurant entre 2 et 3 μm de long et 0,4 et 0,7 μm de diamètre (Venkateswaran *et al.*, 1999). Ses donneurs organiques d'électrons sont nombreux : formiate, lactate, pyruvate, glycérol, glucose, etc (Lovley *et al.*, 2004). Cette souche n'est pas fermentative et est donc à respiration obligatoire. En aérobiose le dioxygène est l'accepteur final d'électrons, mais dès qu'il est épuisé, de nombreuses espèces chimiques peuvent le remplacer en tant qu'accepteur final d'électrons, tels que Mn (IV), NO_3^- , le fumarate, S^0 , U(VI) et bien sur le Fe(III) (Myers and Myers, 1997 ; Nevin and Lovley, 2002 ; Lloyd, 2003).

Du fait de sa forme solide, le Fe(III) ne peut diffuser dans la bactérie pour y être réduit (Fig. 13). Plusieurs mécanismes permettant le transfert d'électrons vers l'oxyde de Fe(III) ont été suggérés (Bird *et al.*, 2011) : (i) directement par les cytochromes de type *c* de la membrane externe (Lower *et al.*, 2001), (ii) indirectement *via* des navettes à électrons (e.g. acides humiques, Lies *et al.*, 2005) ou sidérophores (Hernandez et Newman, 2001) ou à distance, par le biais de pili conducteurs d'électrons appelés nanowires (Fig. 14) (Reguera *et al.*, 2005, Gorby *et al.*, 2006), et (iii) indirectement *via* la solubilisation du Fe(III) par des chélateurs organiques (e.g. l'EDTA, acide éthylène diamine tétraacétique, ou le NTA, acide nitrilotriacétique) (Urrutia *et al.*, 1999).

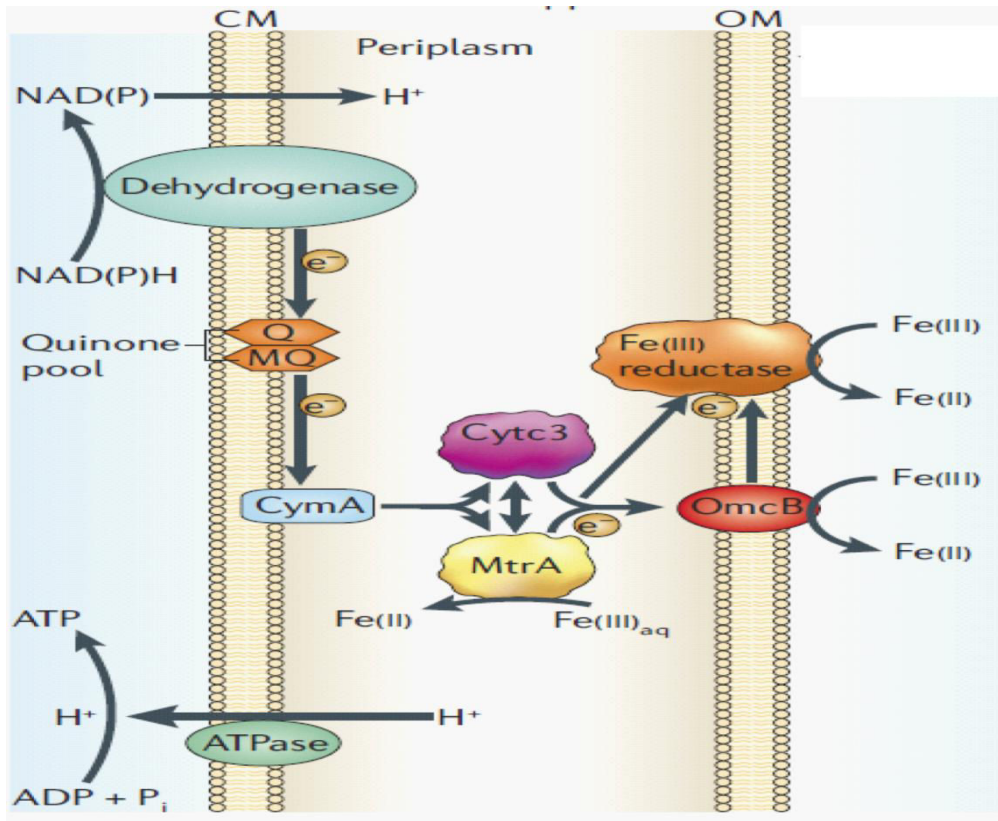


Figure 13 : Chaîne respiratoire de *Shewanella* pour la respiration du Fe(III) (d'après Weber *et al.*, 2006). CM : membrane cytoplasmique ; OM : membrane externe ; CymA : cytochrome *c* tétrahémique de la membrane cytoplasmique ; Cyt*c*3 : cytochrome *c* périplasmique ; MtrA : cytochrome *c* périplasmique décahémique ; OmcB : cytochromes B de la membrane externe ; Q/MQ : quinone et e⁻ : électron.

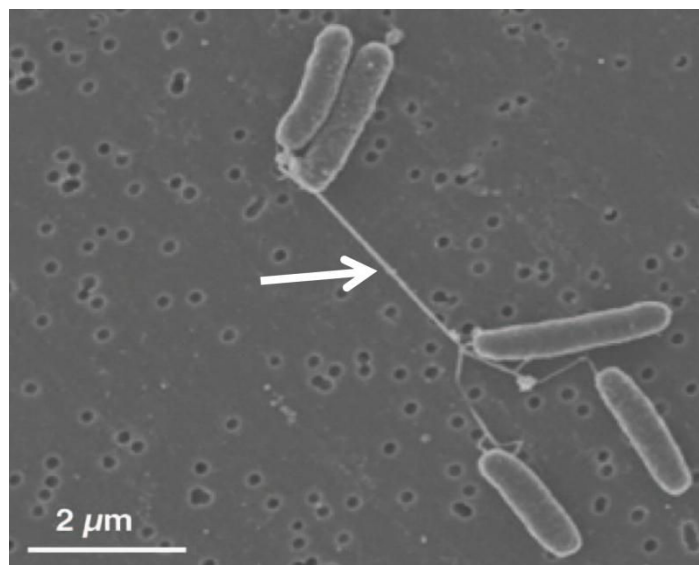


Figure 14 : Nanowires de *Shewanella odeinensis* MR1 (flèche) (Gorby *et al.*, 2006).

1-5-2- La réduction indirecte de Fe(III) par les bactéries sulfato-réductrices

Le Fe(III) peut être réduit chimiquement via un large panel de molécules telles les acides humiques ou d'autres réducteurs comme l'hydroxylamine hydrochlorite), ou encore des anions tels que les sulfures (H_2S , HS^- et S^{2-}). Les sulfures sont présents à l'état soluble dans les environnements réducteurs tels que les profondeurs marines (proche des dorsales, Enning *et al.*, 2012) et certains lacs (Holmer and Storkholm, 2001). Les sulfures sont également le produit de la réduction bactérienne du sulfate. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont retrouvées au sein des sédiments et des sols anoxiques. Les BSR couplent la réduction de SO_4^{2-} à l'oxydation de la matière organique et en général des acides organiques (lactate, acétate) ou de l' H_2 (Flynn *et al.*, 2014), elles convertissent en énergie cellulaire l'énergie dégagée de ces réactions d'oxydo-réduction. Souvent associées aux méthanogènes, ces bactéries sont les deux derniers groupes métaboliques de l'oxydation complète de la matière organique (Lovley and Phillips, 1987). Dans les environnements sédimentaires, le Fe(III) peut donc être la cible d'une réduction chimique indirecte par les sulfures d'origine bactérienne mais aussi le siège d'une réduction directe par les bactéries ferri-réductrices (Man Jae Kwon *et al.*, 2014). Malgré le fait que ces deux groupes métaboliques n'évoluent pas dans le même gradient géochimique (Jacobsen and Postma, 1999), leur interaction à l'interface peut entraîner des variations intéressantes de la minéralogie environnante. La matière organique et les sulfates, présents en quantité significative dans l'eau de mine, sont susceptibles d'autoriser le développement des BSR. Une production du sulfure biogénique est donc à considérer.

Des études ont porté sur la réduction de la lépidocrocite ou de la ferryhydrite par des sulfures d'origine chimique (Peiffer *et al.*, 1992 ; Poulton 2002; Poulton *et al.*, 2003) ou biologique (Man Jae Kwon *et al.*, 2014). Il a été démontré que les taux de réduction sont plus importants avec les sulfures d'origine biologique que chimiques mais que la constitution minérale finale semble être dans les deux cas similaire : formation de mackinawite (FeS) qui tend à former de la pyrite (thermodynamiquement plus stable) (FeS_2) et un peu de magnétite (Hellige *et al.*, 2012). Il a été également montré qu'en présence de carbonate et phosphate, de la sidérite et de la vivianite pouvaient être formées (Man Jae Kwon *et al.*, 2014). De plus, la réduction du Fe(III) dans les argiles (e.g. nontronite) serait plus dû aux sulfures biogénérés qu'à l'action directe des bactéries ferri-réductrices (Li *et al.*, 2004)

1.6 Les bactéries ferro-oxydantes

En condition aérobie, Le Fe(II) peut être retrouvé sous sa forme ionique en milieu aqueux uniquement pour un pH < 4 car son oxydation est très lente (Stumm & Morgan, 1981). Alors qu'à pH > 4, l'oxygène oxyde instantanément le Fe(II), et en anoxie seuls les oxydants tels que les nitrites vont oxyder le Fe(II). Or, le Fe(II) est aussi susceptible d'être oxydé biologiquement. En effet, le Fe(II) est un donneur d'électrons pour certaines bactéries lithotrophes. Mais l'énergie gagnée par cette oxydation est faible (Johnson et Hallberg, 2008) et la précipitation du Fe(III) à la surface des cellules (ou pire à l'intérieur) peut conduire à la formation d'une croûte limitant les échanges nutritifs (Fig. 15) (Kappler *et al.*, 2005; Emerson *et al.*, 2010). Pourtant, ces bactéries sont présentes dans de nombreux phyla, mais surtout chez les *Proteobacteriaceae*. En effet, sur les 6 sous-divisions qui constituent ce phylum, 5 possèdent des souches bactériennes capables d'oxyder le Fe(II) (Fig. 16) (Weber *et al.*, 2006; Hedrich *et al.*, 2011). Or, les stratégies d'oxydation sont différentes. En effet, jusqu'à aujourd'hui, 4 groupes physiologiques existaient : i) les acidophiles, oxydants aérobie, ii) les neutrophiles, oxydants aérobie, iii) les photo-oxydants anaérobie et iv) les neutrophiles anaérobies nitrate-dépendant (Weber *et al.*, 2006; Hedrich *et al.*, 2011).

Seules trois catégories ont été étudiées dans ce manuscrit : les acidophiles, les neutrophiles nitrate-dépendantes et les phototrophes ferro-oxydantes. Néanmoins les quatre catégories seront examinées ci-après.

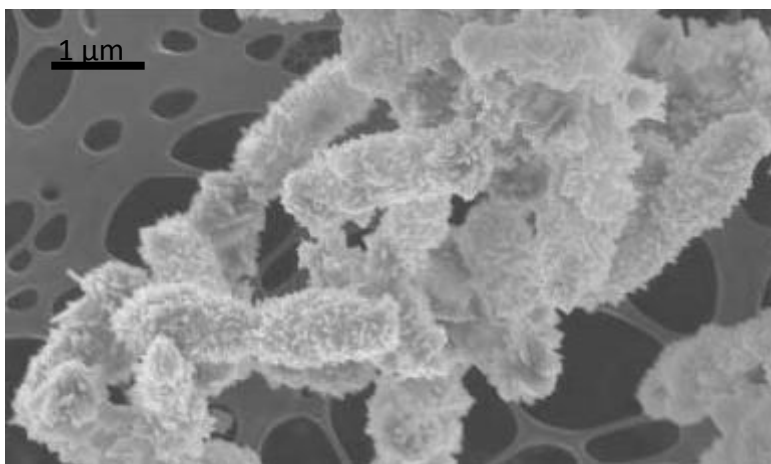


Figure 15 : Image MEB d'une cellule de BoFeN1 complètement encrustée par des oxydes de Fe(III), d'après Kappler *et al.* (2005).

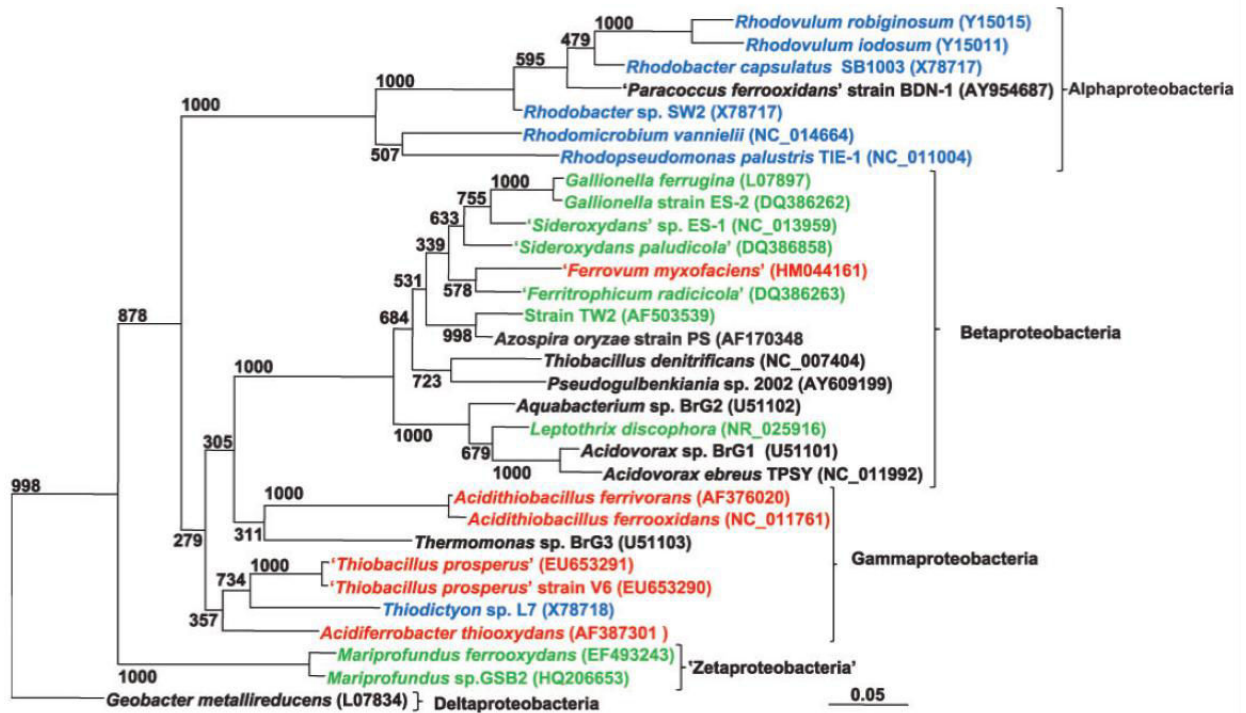


Figure 16: Arbre phylogénétique des souches oxydant le Fe(II). Les acidophiles sont en rouge, les neutrophiles aérobies en vert, les neutrophiles réducteurs des nitrates en noir et les phototrophes oxydantes en bleu. L'arbre est ancré par la souche *Desulfovibrio desulfuricans* (M34113) (d'après Hedrich *et al.*, 2011)

1-6-1- Les acidophiles

Est dite acidophile, toute bactérie capable de croître à des pH bien inférieurs à 7. Deux sous classes sont distinguées : les acidophiles « extrêmes » capables de vivre sous pH 3 et les acidophiles « modérées » vivant entre pH 3 et pH 5 (Johnson & Hallberg, 2008). Les acidophiles (souche modèle *Acidithiobacillus (At.) ferrooxidans*) possèdent deux caractéristiques physiologiques leur permettant de survivre dans ces environnements acides. La première est leur capacité à empêcher l'influx de proton (H_3O^+) à l'intérieur du cytoplasme. Alors que leur pH cytosolique est proche de la neutralité, l'environnement extérieur peut être 10^4 à 10^6 fois plus concentré en protons (Baker-Austin et Dopson, 2007 ; Johnson & Hallberg, 2008). La seconde caractéristique est de pouvoir inverser la charge de leur membrane. En effet, *via* un influx de K^+ , leur membrane se charge positivement, ce qui va repousser les cations (notamment les protons) présents dans l'environnement alentour (Baker-Austin et Dopson, 2007). Parce que à pH acide l'oxygène n'oxyde que très lentement le Fe(II) (Stumm & Morgan, 1981), les acidophiles sont capables d'utiliser le Fe(II) comme

donneur d'électron et l'oxygène O₂ en tant qu'accepteur. Du fait que les couples redox Fe²⁺/Fe³⁺ (E₀' = 770 mV) et O₂/H₂O (E₀' = 820 mV) sont proches, la quantité d'énergie produite est faible, d'où des taux de croissances faibles (Fig. 17). La quasi-totalité des acidophiles connues sont des autotrophes (obligatoire ou facultatif) qui fixent le CO₂ via le cycle de Calvin-Benson-Bassham ou la voie de l'acétylCoA (notamment chez les archées thermo-acidophile). A cause de la faible solubilité du CO₂ en milieu acide (et encore plus à température élevée), certaines bactéries ont développé leurs capacités à oxyder les acides organiques (du glucose aux petits acides aliphatiques, Johnson & Hallberg, 2008). Il est intéressant de noter que les acidophiles sont capables, en condition anoxique, de réduire le Fe(III) (Johnson & Hallberg, 2008). Cette réduction est couplée à une oxydation de S⁰ (Hedrich *et al.*, 2011). C'est pour cela que les acidophiles (et thermo-acidophiles) sont fréquemment retrouvées dans les environnements acides naturels tels que les sources d'eau chaudes où la concentration en fer ferreux et sulfure est importante, mais également dans les environnements acides anthropiques tels que les drainages miniers acides (AMD). Il est intéressant de noter toutefois, que les souches acidophiles peuvent être inhibées par des concentrations en Fe³⁺ (Rawling *et al.*, 1999). Outre *At. ferrooxidans*, le genre *Leptospirillum* est aussi l'un des genres majoritaires des milieux acides. Du fait de leur sensibilité différente à l'inhibition par Fe(III), et de leur affinité avec le Fe(II), *Acidithiobacillus* sera le genre pionnier du milieu, puis *Leptospirillum* deviendra le genre dominant lorsque les conditions changeront suffisamment (expérience en batch, Rawling *et al.*, 1999).

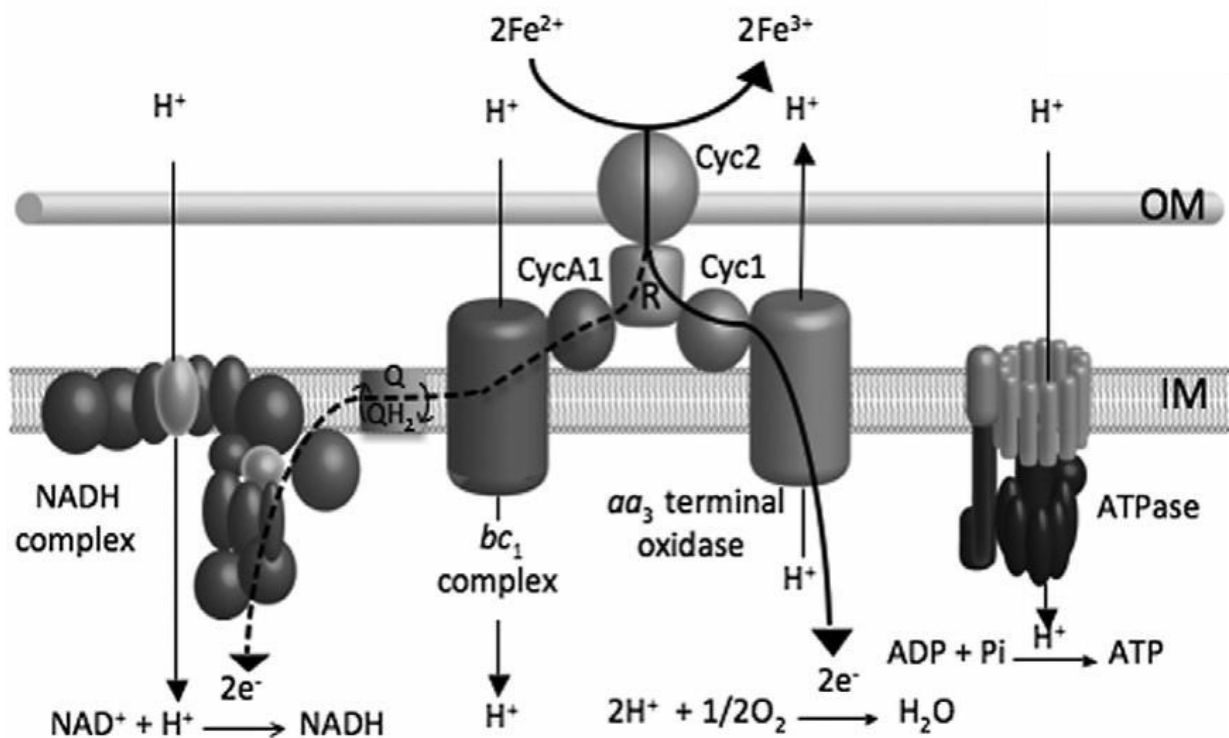
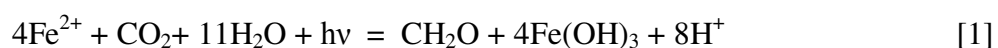


Figure 17 : Protéines impliquées dans l'oxydation du Fe(II) chez *Acidithiobacillus ferrooxidans* (d'après Bonnefoy et Holmes, 2011). Les électrons issus de l'oxydation du Fe(II) servent non seulement à réduire l'O₂ et faire fonctionner les pompes à protons et la protéine F₀F₁ ATPase (Hedrich *et al.*, 2011) mais également à régénérer le pouvoir réducteur (NADH) impliqué dans la fixation du CO₂ et l'azote (Ilbert et Bonnefoy, 2013). IM : membrane cytoplasmique ; OM : membrane externe.

1-6-2- Les phototrophes oxydantes

Les bactéries phototrophes oxydantes du Fe(II) appartiennent majoritairement à la famille des alpha-protéobactéries. Trois sous classes de phototrophes y sont représentées ; les phototrophes pourpres sulfureuses, les phototrophes pourpres non sulfureuses et les phototrophes vertes sulfureuses. Ce sont des anaérobies obligatoires dans le cadre de l'oxydation du Fe(II) mais contrairement aux acidophiles, elles n'utilisent pas l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons. En effet l'équation d'oxydation du Fe(II) *via* le photosystème est (Ehrenreich and Widdel, 1994) :



C'est grâce à cette caractéristique que les phototrophes oxydantes sont soupçonnées d'avoir joué un rôle important durant l'ère du Précambrien et notamment dans la formation des BIF

(Kappler et Newman, 2004 - Fig. 9). Il est intéressant de noter, qu'à l'instar des cyanobactéries, les phototrophes oxydantes vont suivre, au cours de la journée, l'intensité lumineuse nécessaire à leur métabolisme tout en restant sous l'oxycline (Melton *et al.*, 2012, 2014). De plus, Kappler et Newman (2004) ont montré que les phototrophes sont uniquement capables d'oxyder le Fe(II) sous sa forme soluble. En effet, la sidérite et le sulfure ferreux (FeS) ont été oxydés mais uniquement après la solubilisation du Fe(II). Il n'a pas été encore déterminé si les phototrophes possédaient un système dédié à la solubilisation ou si cela été dû à l'excrétion locale de proton acidifiant l'environnement immédiat, conduisant ainsi à la solubilisation du Fe(II) (Kappler et Newman, 2004).

L'oxydation du Fe(II) entraîne la formation d'oxydes de Fe(III) « faiblement » cristallisés (ferrihydrite) qui vont alors subir une réaction de dissolution-reprécipitation en phase plus ordonnée telle de la lépidocrocite, goethite ou hématite, en fonction du pH environnant (Kappler et Newman, 2004). Malgré la précipitation du Fe(III) à la surface de la membrane externe des phototrophes (e.g. *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1), aucun phénomène d'encroutement n'a été observé. Ceci est dû à la nucléation des oxydes de fer sur des fibres de polysaccharides qui empêche l'extension des oxydes (Miot *et al.*, 2009a).

Au niveau moléculaire, l'opéron *pioABC* a été mis en évidence comme acteur de l'oxydation du Fe(II) chez *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 (Fig. 18) (Jiao and Newman, 2007) et l'opéron *foxEYZ* chez *Rhodobacter* SW2 (Fig. 19) (Croal *et al.*, 2007). Il a également été montré que pour les phototrophes, une concentration supérieure à 15 mM de Fe(II) dissous est toxique pour la cellule (Hegler *et al.*, 2008).

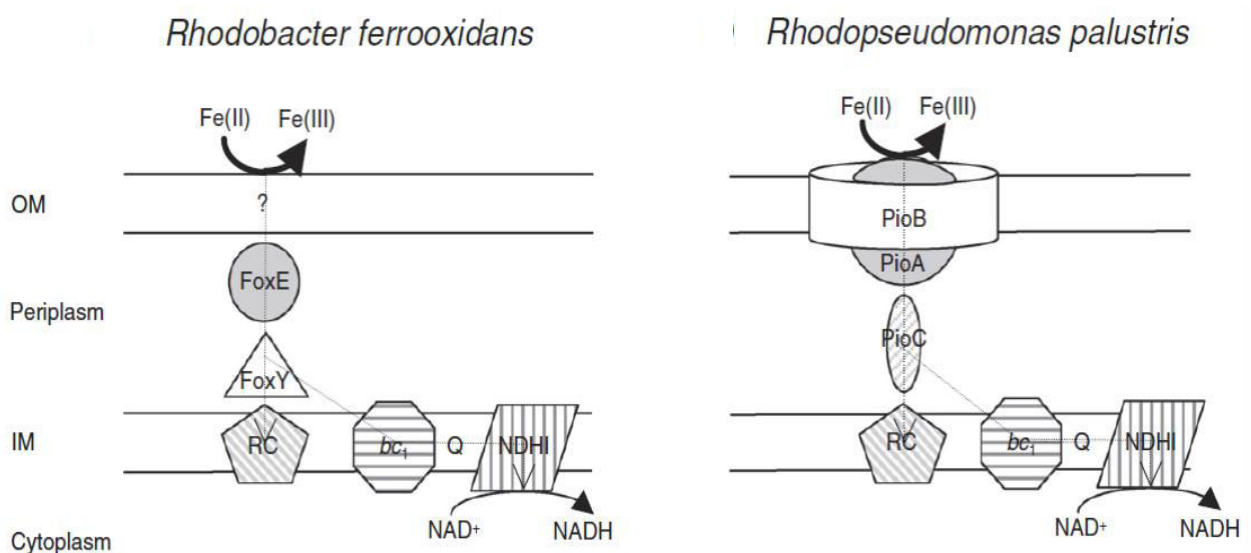


Figure 18 : Protéines impliquées dans l'oxydation du Fe(II) chez les phototrophes *Rhodobacter* SW2 et *Rhodospseudomonas palustris* souche TIE-1 (Ilbert et Bonnefoy 2013). IM : membrane cytoplasmique ; OM : membrane externe.

1-6-3- Les neutrophiles aérobies

Lithotrophes obligatoires (excepté 3 souches du genre *Leptothrix*), ces microbes oxydent le Fe(II) et utilisent l'oxygène en tant qu'accepteur final des électrons. Or le Fe(II) est rapidement oxydé par l'O₂. Par conséquent, ces procaryotes colonisent les niches microaérophiles à pH neutre où la compétition sera moins féroce : ils sont aussi nommés « microorganismes des gradients » (Hedrich *et al.*, 2011). De plus, ces souches ont donc développé des systèmes biochimiques capables de rivaliser avec l'oxydation chimique du Fe(II) par l'O₂. Malheureusement, peu de choses sont connues à propos des mécanismes impliqués.

Trois genres bactériens ont été isolés à partir d'eau douce et un genre à partir d'eau de mer.

1-6-3-1- Les neutrophiles ferro-oxydantes d'eau douce.

En 1838, Ehrenberg est le premier à avoir décrit la plus connue des souches ferro-oxydantes neutrophiles : *Gallionella ferruginea*. Cette souche doit utiliser le Fe(II) comme donneur d'électron. La particularité de cette souche est son mécanisme de défense contre la précipitation du Fe(III). En effet, pour en éviter l'accumulation à la surface de la membrane, *G. ferruginea* synthétise des filaments torsadés (Vatter et Wolfe, 1956), donnant l'aspect d'une queue accrochée à la cellule (Fig. 19). Ces filaments sont composés d'une fine matrice de fibrilles de forme hélicoïdale, sur lesquelles vont se déposer préférentiellement les oxyhydroxydes de Fe(III). Il n'a pas encore été déterminé comment sont synthétisées ces « queues » mais plusieurs observations ont néanmoins été faites. La première étant que les oxyhydroxydes de fer formés pourraient être de l'hématite (mais toujours référé en tant que ferrihydrite dû à l'incertitude) et se formeraient préférentiellement à l'intérieur du filament torsadé (Hallberg et Ferris, 2004; Chan *et al.*, 2011). Ensuite, au fur et à mesure de la croissance bactérienne, la face intérieure se retrouve à l'extérieur où la forme cristalline préférentielle serait un mélange goethite/ferrihydrite (Hallberg & Ferris, 2004) ou lépidocrocite/ferrihydrite (Chan *et al.*, 2011). La seconde observation est la présence de nanotubes de carbone au sein des fibres. Leur rôle pourrait être de maintenir la rigidité de la « queue » au cours de sa croissance et, de par leurs propriétés conductrices, de favoriser la

précipitation du Fe(III) sur ces mêmes « queues » (Hallberg et Tai, 2014). Les gènes et protéines impliqués dans l'oxydation du Fe(II) ont été récemment mis en évidence par Emerson *et al.* (2013) (Fig. 19).

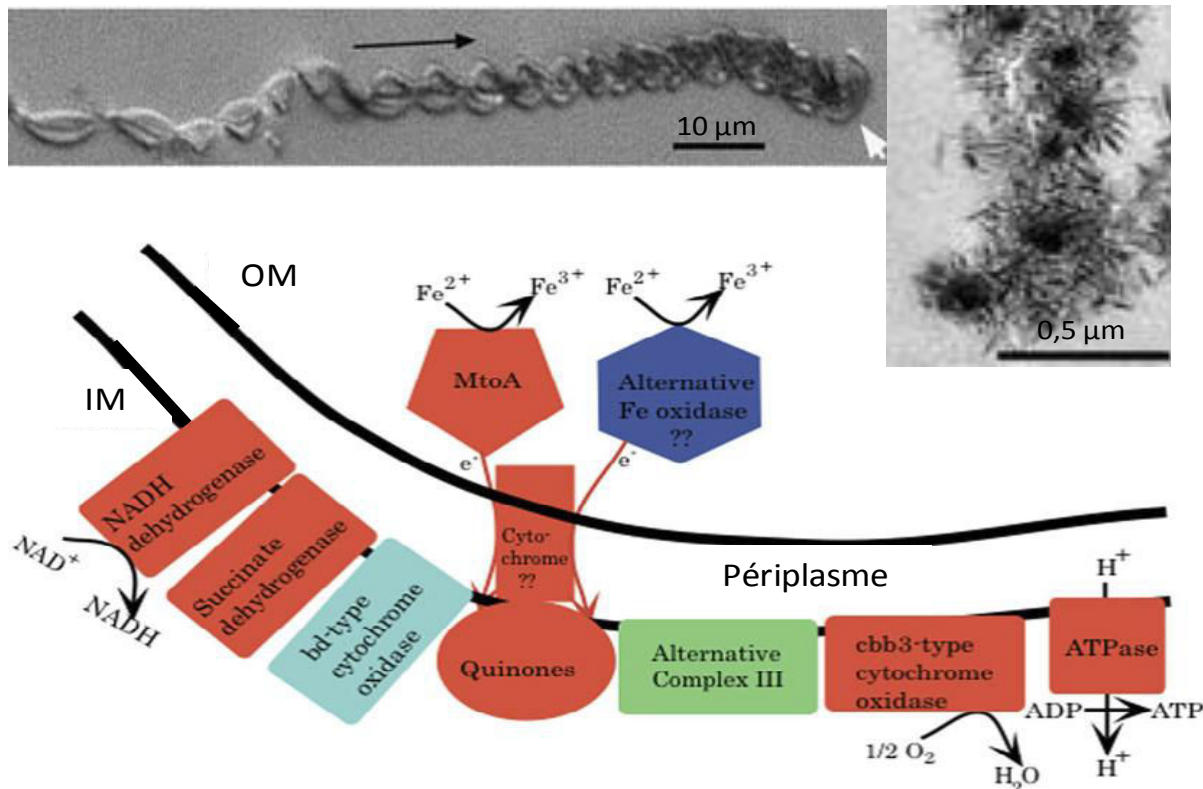


Figure 19 : (Haut) Observation au microscope de *M. ferrooxydans* et de ses filaments torsadés, la flèche blanche désigne la bactérie et la flèche noire indique le sens du développement des filaments torsadés (à gauche) (Chan *et al.*, 2011). Observation MET d'un filament sur lequel a précipité de la lépidocrocite (à droite) (Chan *et al.*, 2011). (Bas) Représentation schématique des protéines membranaires impliquées dans l'oxydation du Fe(II) chez *Gallionella* ES-2, modifié d'après Emerson *et al.*, 2013.

Le deuxième genre bactérien ferro-oxydant connu, à pH neutre, est le genre *Leptothrix* où 4 espèces sont pour le moment reconnues. Comme *Gallionella*, elles produisent des polymères extracellulaires, non sous forme de « queue » mais de « gaine » (Fig. 20) (Emerson *et al.*, 2010). Mais leur appartenance au groupe métabolique des ferro-oxydantes est aujourd'hui encore sujet à discussion. En plus d'être hétérotrophes, aucune évidence directe n'a démontré l'oxydation du Fe(II) par ces souches (Hedrich *et al.*, 2011), excepté pour la souche *L. ochracea* et *L. cholodnii* Appels. Cette dernière nécessiterait un étroit couplage avec de la réduction microbienne pour avoir une oxydation du Fe(II) mesurable (Vollrath *et al.*, 2012).

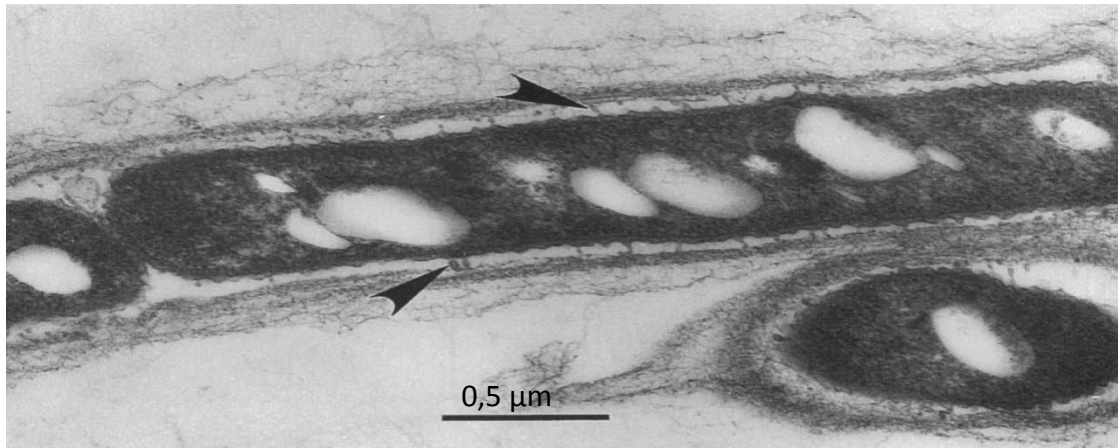


Figure 20 : Photographie en microscope électronique de *Lepthotrix discophora* SP-6 et sa gaine de Fe(III) sur lame mince. Les flèches indiquent un appendice qui semble relier la gaine et la membrane interne (Emerson *et al.*, 1993).

Enfin, un dernier genre isolé récemment est le genre *Sideroxydans* avec seulement 2 espèces connues. Ce sont des microaérophiles obligatoires, autotrophes, et qui utilisent le Fe(II) comme seule source d'électrons (Emerson *et al.*, 2010). Elles ne produisent aucune « queue » ou « gaine ». Comme *Gallionella*, les gènes et protéines impliqués dans l'oxydation du Fe(II) ont été récemment mis en évidence par Emerson *et al.* (2013) (Fig. 21).

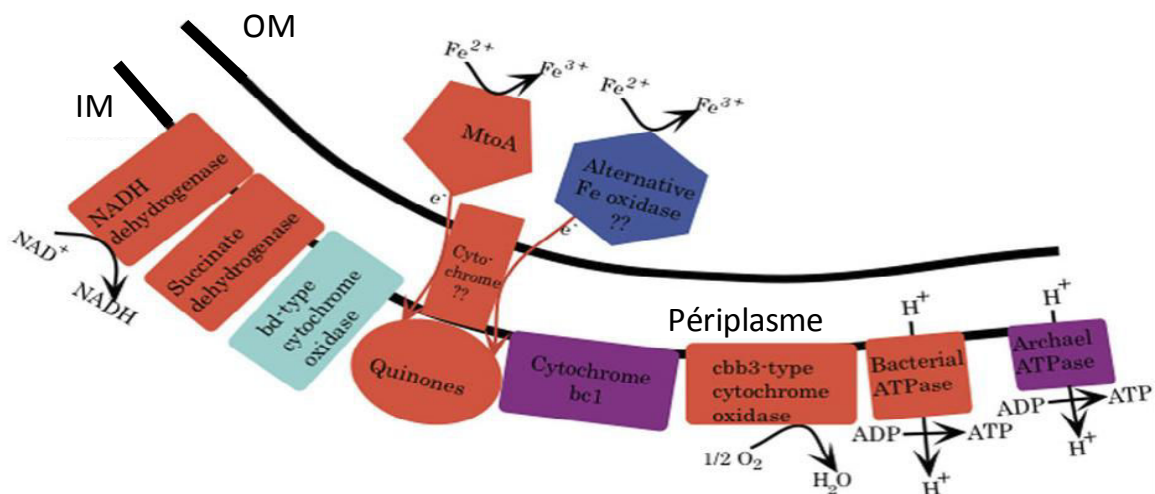


Figure 21 : Représentation schématique des protéines membranaires impliquées dans l'oxydation du Fe(II) chez *Sideroxydans* ES-1, modifié de Emerson *et al.*, 2013.

1-6-3-2- Les neutrophiles ferro-oxydantes d'eau de mer.

Ces bactéries marines sont mésophiles ou psychrophiles et sont retrouvées près des cheminées hydrothermales (Emerson *et al.*, 2002, 2010). Ces cheminées étant des environnements riches en Fe(II) et en CO₂ et pauvres en sulfure, leur métabolisme est donc

lithotrophe et microaérophile où l'oxygène est l'élément limitant (Emerson *et al.*, 2010). Le représentant est *Mariprofundus ferroxydans* isolé depuis la chaîne sous-marine de Loihi près d'Hawaï (Fig. 22) (Emerson *et al.*, 2002). Leur cycle de Calvin-Benson-Bassham leur permet de fixer le CO₂. Physiologiquement proche de *G. ferruginea*, leur morphologie est en forme de haricot et elles produisent des « queues » dont la composition reste encore inconnue.

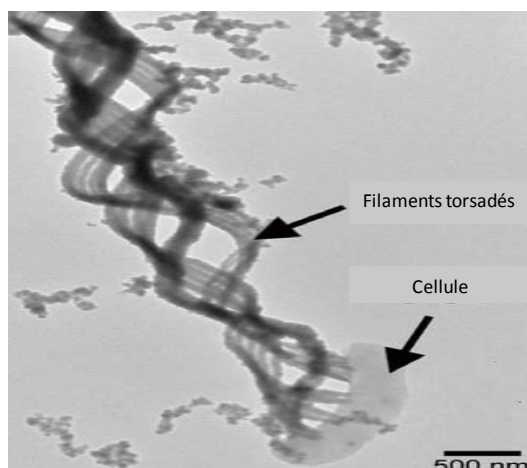


Figure 22 : Photographie en microscopie électronique à transmission de *M. ferroxydans* PV-1 (Singer *et al.*, 2011).

1-6-4- Les neutrophiles oxydantes nitrate-dépendantes

Mises en évidence dans les années 90, les bactéries neutrophiles oxydantes du fer-nitrate dépendantes ont été fortement étudiées depuis. Straub *et al.* (1996) mettent en évidence trois souches aquatiques litotrophes (eaux de fossé et lagon) capables d'oxyder le fer ferreux et le sulfure de fer (FeS), et réduire les nitrates, plus rapidement que d'autres souches nitrate-réductrices telle que *Pseudomonas stutzeri*. Ces bactéries ont été découvertes par la suite dans les sédiments d'eau douce où le potentiel redox du couple Fe³⁺/Fe²⁺ est inférieur à celui du couple NO₃⁻/NO₂⁻ (+200 mV contre + 430 mV respectivement à pH neutre (ou alcalin), Hedrich *et al.*, 2011). Il a ensuite été démontré que ces souches sont des mixotrophes capables d'oxyder le Fe(II) en présence de petites quantités d'acides organiques tel que l'acétate (Kappler *et al.*, 2005). Les nitrates sont réduits en N₂ et en petites quantités de nitrites (Straub *et al.*, 1996).

Miot *et al.* (2009b) ont montré que *Acidovorax* BoFeN1 est capable d'oxyder la vivianite, cependant, il est probable que cette réaction soit le résultat d'une oxydation indirecte et abiotique par les nitrites biogénérés comme cela a été montré chez des bactéries

dénitrifiantes ou réductrices des nitrates (Kluenglein *et al.*, 2013; Etique *et al.*, 2014). Ainsi l'existence de bactéries nitrate-dépendantes oxydantes du Fe(II) pour des besoins énergétiques (littotrophes) reste à vérifier soigneusement dans l'avenir. Néanmoins, les bactéries réductrices des nitrates peuvent avoir un impact sur les minéraux Fe(II) via l'action oxydante des nitrites biogénérés, à la manière des BSR et des sulfures bio-générés sur la réduction du Fe(III).

1.7 Conclusions

De nombreuses bactéries sont capables d'utiliser le fer soit comme accepteur soit comme donneur d'électron, ou encore d'interagir indirectement avec lui via la production de métabolites. Les formes solides du fer peuvent également être les cibles des différents métabolismes oxydants ou réducteurs. C'est pourquoi certaines souches ont été sélectionnées afin d'être incubées en présence du minerai de fer et observer les modifications minéralogiques potentielles. Ceci afin de répondre au premier objectif de l'étude. Deux métabolismes réducteurs ont été choisis ; un direct avec *S. putrefaciens* et un indirect avec des BSR. Quatre souches oxydantes ont également été sélectionnées ; deux directes (*At. ferrooxydans* et *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1) et deux indirectes, (nitrates réductrices *Klebsiella mobilis* et *Acidovorax* BoFeN1).

Chapitre 2 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES

2.1 Composition de l'eau de mine

Outre la richesse en fer des piliers, les galeries sont immergées dans une eau dont la composition peut favoriser le développement de certains groupes métaboliques. Une analyse complète de l'eau provenant des galeries des mines situées au sein de la commune de Knutange (57) est donnée sur le site ades.eaudefrance.fr (fournie par le BRGM). L'analyse des composants majeurs de l'eau est représentée dans le tableau 1. C'est à partir des valeurs moyennes qu'un milieu a été reconstitué et utilisé pour réaliser les différentes incubations en présence de minerai de fer. Ceci afin de reconstituer au plus proche les conditions de la mine.

Tableau 1: Espèce ionique majeur présent dans l'eau de mine (site ades) et les paramètres spécifiques associés.

Espèce	mg/L	Paramètre particulier de l'eau		
Ammonium	0,18	Conductivité (25°C)	2759	μS/cm
Azote organique	0,59	D.B.O.5	1,3	mg(O ₂)/L
Calcium	312	DCO	4,5	mg(O ₂)/L
Carbonate	0,15	Matière en suspension	4	mg/L
Carbone organique	1,33	pH	7,2	
Chlorure	25	Potentiel redox	96,6	mV
Fer	0,59	Température de l'eau	13	°C
Hydrogène carbonate	483			
Magnésium	195			
Nitrate	1,4			
Nitrite	0,014			
Orthophosphate	0,079			
Phosphore	0,034			
Potassium	6,91			
Sodium	160			
Sulfate	1441			

2.2 Les enrichissements bactériens

Des enrichissements spécifiques de certains groupes métaboliques bactériens ont été réalisés : les IRB, les ferro-oxydantes et les BSR. Chacun de ces groupes est susceptibles d'être présent dans l'environnement minier du fait de la richesse en Fe(II) et Fe(III) et de la concentration en sulfate dans l'eau de mine ($\sim 1.5 \text{ g L}^{-1}$). Deux eaux de mine ont été utilisées comme inocula : une provient du premier niveau de la mine d'Algrange (57) où les eaux karstiques n'ont pas ennoyé les premières chambres mais affleurent tout de même ; la seconde eau provient d'un puits de forage qui descend jusqu'à -250 m, proche de Bassompierre (57).

Quatre milieux de culture différents ont été réalisés : i) un pour les ferri-réductrices (adapté de Straub *et al.*, 2005) ; ii) un pour les ferro-oxydantes, où les nitrates sont les accepteurs d'électrons (adapté de Kappler *et al.*, 2005) ; iii) un pour les BSR (le milieu DSM 63 pour le genre *Desulfovibrio* qui est proposé par la collection allemande DSMZ, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) et, iv) un quatrième milieu dont la composition est équivalente à celle de l'eau de mine pour les éléments majeurs (ADES, 2015). Ce dernier a été utilisé pour l'enrichissement des 3 groupes métaboliques cités ci-dessus dans le but de déterminer leur capacité à croître dans l'eau de mine. Seuls les donneurs et accepteurs d'électrons ont été adaptés à chacun des cas. La composition des milieux est donnée dans le Tableau 2. Tous les enrichissements ont été réalisés en triplicat et à des volumes variables d'inoculum : 2, 5 et 10 % de milieu (v/v).

Tableau 2: Composition des différents milieux d'enrichissement. Le pH de tous les milieux a été ajusté à $7,0 \pm 0,1$. Le milieu M_{SWM} (milieu synthétique d'eau de mine) a été supplémenté, à part, par les donneurs et accepteurs d'électrons nécessaires à la croissance des ferri-réductrices, ferro-oxydantes et sulfato-réductrices, dans les mêmes concentrations que leurs milieux spécifiques respectifs.

Enrichissement	Espèce chimique	Masse (g)	Concentration (mol L ⁻¹)	MM (g mol ⁻¹)	Remarques
Ferri-réductrices	NH ₄ Cl	0,3	$5,6 \times 10^{-3}$	53,49	
	CaCl ₂ •2H ₂ O	0,1	$9,0 \times 10^{-3}$	110,98	
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,03	$0,1 \times 10^{-3}$	246,47	
	KH ₂ PO ₄	0,3	$2,2 \times 10^{-3}$	136,08	
	MgCl ₂ •6H ₂ O	0,4	$4,2 \times 10^{-3}$	95,20	
	Lepidocrocite	3,55	40×10^{-3}	88,75	
	Acétate	0,19	$2,5 \times 10^{-3}$	77,01	
	Fumarate	1,6	10×10^{-3}	160,04	
	MOPS	2,09	10×10^{-3}	209,27	
	Solution E.T.	1 mL	-	-	Voir Tableau 2
	Mix vitamines	0,1 mL	-	-	Voir Tableau 2
Ferro-oxydantes nitrate dépendantes	NH ₄ Cl	0,3	$5,6 \times 10^{-3}$	53,49	
	CaCl ₂ •2H ₂ O	0,1	$9,0 \times 10^{-4}$	110,98	
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,03	$0,1 \times 10^{-3}$	246,47	
	KH ₂ PO ₄	0,3	$2,2 \times 10^{-3}$	136,08	
	MgCl ₂ •6H ₂ O	0,4	$4,2 \times 10^{-3}$	95,20	
	NaNO ₃	0,34	$4,0 \times 10^{-3}$	84,99	
	FeCl ₂ •H ₂ O	1,99	10×10^{-3}	198,81	
	Acétate	0,039	$0,5 \times 10^{-3}$	77,01	
	MOPS ^b	2,09	10×10^{-3}	209,27	
	Solution E.T.	1 mL	-	-	Voir Tableau 2
	Mix vitamines	0,1 mL	-	-	Voir Tableau 2

Tableau 2 (suite et fin)

Enrichissement	Espèce chimique	Masse (g)	Concentration (mol L ⁻¹)	MM (g mol ⁻¹)	Remarques
Sulfato-réductrices ^a	NH ₄ Cl	1	18,7 × 10 ⁻³	53,49	
	CaCl ₂ •2H ₂ O	0,1	0,9 × 10 ⁻⁴	110,98	
	MgSO ₄ •7H ₂ O	2	8,1 × 10 ⁻³	246,47	
	KH ₂ PO ₄	0,5	3,7 × 10 ⁻³	136,08	
	Na ₂ SO ₄	1	7,0 × 10 ⁻³	142,04	Solution A
	DL-Na-lactate	2	17,9 × 10 ⁻³	112,06	
	Extrait de levures	1	-	-	
	Résazurine	0,001	4,4 × 10 ⁻⁶	229,19	
	H ₂ O UP ^c	980 mL	-	-	
	FeSO ₄ •7H ₂ O	0,5	1,80 × 10 ⁻³	278,05	Solution B
	H ₂ O UP	10 mL	-	-	
	Na-thioglycolate	0,1	1,1 × 10 ⁻³	92,12	
	Ac. ascorbique	0,1	0,6 × 10 ⁻³	176,12	Solution C
	H ₂ O UP	10 mL	-	-	
Eau de mine (M _{SWM})	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,005	3,8 × 10 ⁻⁵	132,14	
	CaSO ₄ •2H ₂ O	0,3	1,7 × 10 ⁻³	172,17	
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2	8,1 × 10 ⁻⁴	246,47	
	KH ₂ PO ₄	0,001	7,4 × 10 ⁻⁶	136,08	
	NaCl	0,015	2,6 × 10 ⁻⁴	58,44	
	Na ₂ SO ₄	0,5	3,5 × 10 ⁻³	142,04	
	K ₂ SO ₄	0,5	2,9 × 10 ⁻³	174,26	
	Solution E.T.	1 mL	-	-	Voir Tableau 2
	Mix vitamines	0,1 mL	-	-	Voir Tableau 2

^a ce milieu est le DSMZ 63. La solution A doit être chauffée puis dégazée à l'azote avant l'ajout des solutions B et C et avant stérilisation

^b MOPS= acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique

^c H₂O UP correspond à de l'eau ultra pure (18Ω)

E.T = solution d'éléments traces

Tableau 3: Composition de la solution d'éléments traces et de vitamines, d'après Widdel et Bak (1992)

Solution	Espèce chimique	masse (g)	Concentration (mol L ⁻¹)	MM (g mol ⁻¹)
Eléments traces (E.T.)	CoSO ₄ •7H ₂ O	10,7	3,8 × 10 ⁻²	281,10
	ZnCl ₂	11,7	8,6 × 10 ⁻²	136,30
	H ₃ BO ₃	0,092	8,6 × 10 ⁻³	61,83
	NiCl ₂ •6H ₂ O	2,16	9,1 × 10 ⁻³	237,6
	NaWO ₄ •2H ₂ O	2,24	6,8 × 10 ⁻³	329,85
	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	2,25	9,3 × 10 ⁻³	241,95
	CuSO ₄ •5H ₂ O	0,90	3,6 × 10 ⁻³	249,69
	AlK(SO ₄) ₂ •12H ₂ O	0,91	1,9 × 10 ⁻³	474,39
	MnSO ₄ •H ₂ O	0,0005	8,6 × 10 ⁻⁶	169,02
Mix vitamines	Acide folique	0,002	4,53 × 10 ⁻⁶	441,4
	Pyridoxine	0,01	5,91 × 10 ⁻⁵	169,18
	Riboflavine	0,005	1,33 × 10 ⁻⁵	376,36
	Thiamine	0,005	1,66 × 10 ⁻⁵	300,8
	Acide nicotinique	0,005	4,06 × 10 ⁻⁵	123,11
	Acide pantothénique	0,005	2,28 × 10 ⁻⁵	219,23
	Vitamine B12	0,0001	7,38 × 10 ⁻⁸	1355,37
	Acide aminobenzoïque	0,005	3,65 × 10 ⁻⁵	137,14
	Acide thioctique	0,005	2,42 × 10 ⁻⁵	206,33

2.3 Sélection des souches bactériennes

Les différents métabolismes testés (IRB, BSR, ferroxydante nitrate réductrices) ont bien été enrichis à partir des différents inocula. Néanmoins, seuls les BSR ont été utilisés depuis les enrichissements pour les études de réductions. En effet, chaque milieu a permis d'observer macroscopiquement, par un changement de couleur caractéristique, la présence des diverses souches ainsi qu'un "temps estimé de développement". Par exemple, la croissance des BSR dans leur milieu spécifique permet d'observer l'apparition d'un précipité noir (FeS) caractéristique. Ce "noircissement" a pu être estimé complet après 15 à 20 jours d'incubation à 30°C. Cela correspond donc au "temps estimé de développement". En revanche, pour les IRB ou les ferro-oxydantes, "temps estimé de développement" pour obtenir un changement macroscopique significatif était de plusieurs mois (> 3 mois). Par conséquent le développement naturel de ces souches a été considéré comme trop long et les souches pures ont donc été préférées.

2.4 Préparations des suspensions bactériennes

Cette partie définit la préparation des suspensions des souches avant leur incubation avec les minerais dans leurs expériences respectives. Il est important de noter que les incubations avec minerai ont été réalisées dans le milieu optimal de chaque souche et non le milieu d'eau de mine synthétique, hormis pour les expériences de bioréduction avec *S. putrefaciens*.

2-4-1- *Shewanella putrefaciens* CIP 8040

La souche *S. putrefaciens* CIP 8040 est issu d'un stock conservé à -80°C (kit Microbank™ ProLab). Deux à trois billes sont étalées sur une gélose nutritive de trypticase-soja (TSA, Sigma) pendant 48h à 30 °C et à l'obscurité, afin de revivifier la souche. Un second repiquage est effectué pour conserver la souche et sur lequel un contrôle d'identification par galerie API 20 NE (BioMérieux) est réalisé à chaque nouvelle expérience.

Afin d'obtenir une masse cellulaire importante pour les réactions de réduction, 20 mL d'une préculture (ensemencé par plusieurs colonies isolées d'une gélose TSA) sont utilisés pour ensemercer un réacteur de 2 L de bouillon nutritif de trypticase-soja (TSB, Sigma). Pendant 16h et à 30°C, le réacteur est agité à 300 rpm et est barboté en continu par de l'air filtré (0,22 µm) (Fig. 2). Après 16h, les cellules sont récupérées par centrifugations successives et lavées trois fois dans du NaCl 0,9 ‰ stérile (Zegeye *et al.*, 2005). Les cellules récupérées sont

suspendues dans 50 mL de NaCl 0,9 % et dégazées à l'azote N₂ (99,99%) pour les inoculations en anaérobie. La concentration finale dans les incubations avec minerai est d'environ 1 × 10⁸ bactéries mL⁻¹.

2-4-2- Consortium minier de BSR

Ce consortium minier a été isolé à partir d'un inoculum d'eau de mine provenant d'un puits de contrôle (-250m, Bassompierre, 57). Le milieu DSMZ 63 a servi à l'obtention des inocula et au maintien des souches. Ce consortium se développe à 20°C et 30°C. Le milieu Mswm (pH 7,0 ± 0,1) a été utilisé pour les incubations avec les minerais, il a été complété de 30 mM de pyruvate et de fumarate. Environ 3 × 10⁶ bactéries mL⁻¹ sontensemencées pour les expériences avec du minerai de fer.

2-4-3- Acidithiobacillus ferroxydans DSM 14882

Cette souche (anciennement *Thiobacillus ferrooxidans*), isolée d'un drainage minier acide par Temple and Colmer (1951) se caractérise par sa capacité à croître autotrophiquement avec du thiosulfate et du Fe(II). Reclassé en 2000 par Kelly et Wood en *Acidithiobacillus ferroxydans*, cette souche est un court bacille (1-2 µm) Gram négatif, mobile et appartenant au γ-protéobactérie. Cultivée dans le milieu DSMZ 882 (Tableau 4), sa croissance nécessite 4 à 6 jours à 30°C et pH 1,8 (peut croître jusqu'à pH 5). Un repiquage tous les mois permet de relancer rapidement la souche, mais elle croit toujours après 3 mois de conservation à 4°C dans le milieu DSMZ 882. Pour les incubations avec les minerais, seuls le milieu minimum a été conservé (pH 3, solution A). L'inoculum est obtenu en utilisant 3 L de milieu DSMZ 882 à 30 °C et à l'obscurité. La suspension de cellules ainsi récupérées présente une densité finale de 1 × 10⁹ cellules mL⁻¹ environ lors des incubations avec le minerai. La concentration bactérienne est estimée par la méthode de Lacombe Barron et Lueking (1990) où 0,2 unité de densité optique (λ = 500 nm) correspond à 10⁹ cellules mL⁻¹. Avant son utilisation en routine, les valeurs indiquées ont été vérifiées et confirmées par comptage des cellules après marquage au SYBR Green (10 photos et 10 champs par photo).

Tableau 4: Milieu de culture DSMZ 882 pour la croissance d'*Acidithiobacillus ferroxydans* DSM 14882. La solution est ajustée à pH 1,8 avec H₂SO₄ (10 N). Les deux solutions sont stérilisées séparément par autoclave à 112°C pendant 30 min puis mélangées. Le pH final est de 1,8. H₂O UP correspond à de l'eau ultra pure (18,2 Ω, Purelab Option-Q, Elga LabWater, Antony, France).

Remarques	Espèce chimique	masse (g)	Concentration (mol L ⁻¹)	MM (g mol ⁻¹)
Solution A	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,13	9,99 × 10 ⁻⁴	132,14
	MgCl ₂ • 6H ₂ O	0,053	5,57 × 10 ⁻⁴	95,20
	KH ₂ PO ₄	0,027	1,98 × 10 ⁻⁴	136,09
	CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,15	1,32 × 10 ⁻³	110,98
	H ₂ O UP	950 mL		
Solution B	FeSO ₄ • 7H ₂ O	20	7,19 × 10 ⁻²	278,01
	H ₂ O UP	50 mL		

2-4-4- Acidovorax sp. souche BoFeN1

Ce sont des bacilles (3-5 µm) Gram négatif, appartenant aux β-protéobactéries,. Cette souche a été utilisée afin d'étudier l'impact des nitrites biogénérés sur l'oxydation du Fe(II) en phase solide. Le milieu de culture utilisé est décrit dans le Tableau 5 (pH 7,0 ± 0,1). Il permet l'obtention d'un inoculum à 1 × 10⁷ cellules mL⁻¹ lors des incubations avec les minerais.

Tableau 5 : Milieu de culture pour BoFeN1. Une solution de NaHCO₃ (30 mM), d'acétate (5 mM) et de nitrate (10 mM) sont ajoutées séparément afin d'éviter tout précipité lors de la stérilisation.

Espèce chimique	masse (g)	Concentration (mol L ⁻¹)	MM (g mol ⁻¹)
NH ₄ Cl	0,3	5,61 × 10 ⁻³	53,49
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,1	0,68 × 10 ⁻³	110,98
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,5	2,03 × 10 ⁻³	246,47
KH ₂ PO ₄	0,14	1,03 × 10 ⁻³	136,08
NaCl	0,2	3,42 × 10 ⁻³	58,50
Solution E.T.	1 mL		
Mix Vitamines	0,1 mL		

2-4-5- *Enterobacter aerogenes* (équivalent à *Klebsellia mobilis*)

Enterobacter aerogenes est une entérobactérie. Ce genre bactérien est capable de réduire les nitrates en nitrites sans aller jusqu'à la dénitrification (Payne, 1973). Conservée à -80°C, la souche est repiquée sur gélose nutritive (TSA), puis en bouillon de culture (TSB) pendant environ 15 h. Les cellules sont récupérées par centrifugation, lavées 3 fois puis suspendues dans du NaCl 0,9 %. Le même milieu de culture que BoFeN1 est utilisé lors des incubations avec les minerais (pH 7). L'inoculum est alors de 1×10^8 cellules mL⁻¹ environ.

2-4-6- *Rhodopseudomonas palustris* souche TIE-1

Isolée d'un tapis microbien par Jiao *et al.* (2005), c'est un bacille phototrophe de 1 à 4 µm, appartenant à la classe des α-protéobactéries. Cette souche oxyde le Fe(II) et réduit le CO₂ en condition anaérobie et en présence de lumière. Le milieu de culture est décrit dans le Tableau 6 (pH 7,0 ± 0,1) et l'excitation lumineuse est fournie par une ampoule à incandescence. La suspension bactérienne est dégazée à l'aide d'un mélange N₂ - CO₂ (80/20) et incubé à 20°C. Afin d'obtenir l'inoculum, une solution d'acétate de sodium (10 mM) et un barbotage à l'hydrogène sont utilisés. La croissance est de 5 à 7 jours pour obtenir 1×10^7 cellules mL⁻¹ environ en concentration finale pour les incubations avec les minerais.

Tableau 6 : milieu de culture pour TIE-1. L'acétate (10 mM) est ajouté séparément ainsi que les éléments traces et les vitamines. Une solution de NaHCO₃ (30 mM, accepteur d'électron sous forme de CO₂) est ajoutée séparément afin d'éviter tout précipité lors de la stérilisation.

Espèce chimique	masse (g)	Concentration (mol L ⁻¹)	MM (g mol ⁻¹)
NH ₄ Cl	0,3	$5,61 \times 10^{-3}$	53,49
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,1	$0,68 \times 10^{-3}$	110,98
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,5	$2,03 \times 10^{-3}$	246,47
KH ₂ PO ₄	0,5	$1,03 \times 10^{-3}$	136,08

2.5 Synthèse des oxydes de Fe(III)

2-5-1- Lépidocrocite

La lépidocrocite est facilement réduite par les bactéries ferri-réductrices (Ona-Nguema *et al.*, 2002), son utilisation sert de contrôle positif de la bioréduction du fer. Pour la synthétiser, le protocole décrit par Ona-Nguema *et al.* (2002) est suivi. Quarante gramme de FeCl_2 sont mélangés à 500 mL d'eau ultra pure. Puis 250 mL de NaOH (0,8 M) sont ajoutés. La solution de Fe(OH)_2 formée est mise sous forte agitation à l'air. La suspension se transforme progressivement en rouille verte chloruré (couleur vert – bleu) puis en oxy-hydroxyde de fer de couleur orangé ($\gamma\text{-FeOOH}$), à chaque ajout de soude. Le pH est contrôlé tout au long de la réaction de manière à être inférieur à 6. L'ajout régulier de NaOH (0,4 M) est nécessaire jusqu'à stabilisation du pH (~ 4.8). Une fois stable, le pH est ajusté à 6,9. La réaction dure environ 5 h. La lépidocrocite est récupérée par centrifugations successives (5000 g pendant 8 min). Trois lavages à l'eau ultra pure ont été réalisés. Le solide a été récupéré et séché à 80°C pendant une nuit. Une poudre orangée est obtenue par broyage et caractérisée par diffraction aux rayons X (DRX, Figure 3).

2-5-2- Goethite

La méthode de synthèse utilisée est celle décrite par Cornell et Schwertmann (2000). Dans un bécher, 500 mL de $\text{Fe(NO}_3)_3$ (0,5 M) sont mélangés à 400 mL de NaOH (2,5 M) et agités pendant 20 min. Le mélange est placé à l'étuve 24h à 60°C. Le solide est récupéré par centrifugation puis lavé à l'acide nitrique pour éliminer les traces de carbonates. L'acide est rincé par lavage à l'eau ultra pure. La goethite a été caractérisée par infrarouge (Fig. 4).

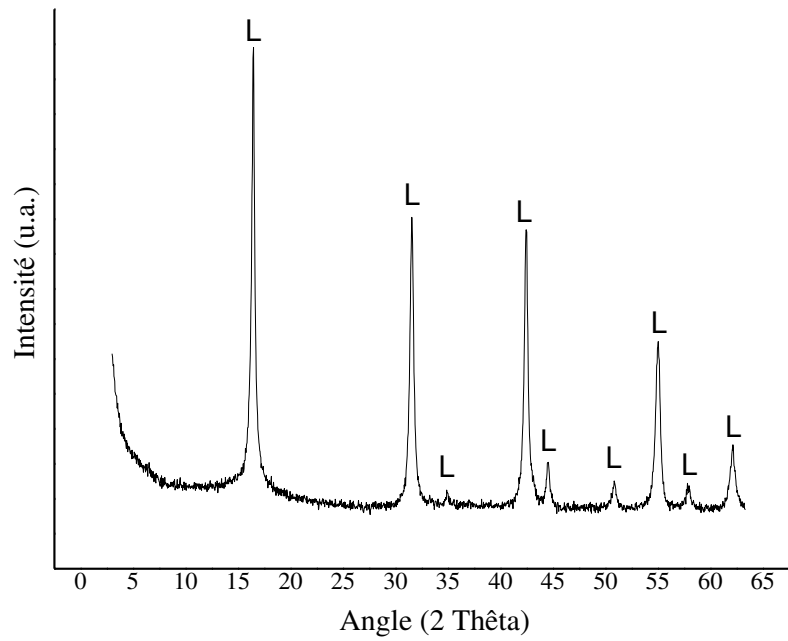


Figure 3: Diffractogramme de la lépidocrocite synthétisée. « L » indique les pics identifiés appartenant à la lépidocrocite.

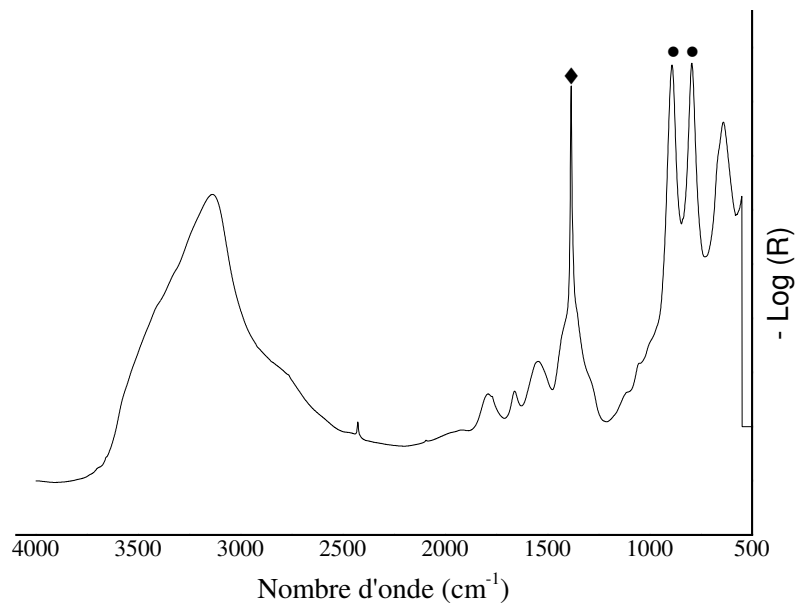


Figure 4: Spectre infrarouge en réflexion diffuse par transformée de Fourier de la goéthite synthétisée. ● correspond aux bandes caractéristiques de la goéthite (795 cm^{-1} et 892 cm^{-1} , Cornell and Schwertmann, 2003). ◆ correspond au nitrate provenant du lavage. Les nitrates sont sorbés à la surface de la goéthite.

2.6 Méthodes d'analyses des solutions

2-6-1 Dosage colorimétrique du fer par ferrozine

Afin de suivre l'évolution du fer au sein des minerais suite aux diverses incubations, une méthode simple, robuste et peu coûteuse (au vu du nombre d'échantillonnage à réaliser) devait être sélectionnée. Les méthodes pour doser le fer sont nombreuses : des méthodes colorimétriques (ferrozine ou phénanthroline), chromatographiques (chemiluminescente ou ionique) ou encore spectrométrique (Mössbauer). Afin de doser simultanément le Fe(II) et le fer total ($Fe_{TOT} = Fe(II) + Fe(III)$), la méthode utilisant la ferrozine a été appliquée. Le dosage du Fe_{TOT} est possible par l'ajout d'un agent réducteur. Développée initialement par Stokey (1970), cette méthode a été reprise par Hegler *et al.* (2008) pour l'adapter à la lecture en microplaque. Elle permet de doser de faible volume d'échantillon (20 μ L) et jusqu'à 4 μ M de fer. Trois solutions sont nécessaires : HCl 1N, une solution d'hydroxylamine hydrochloride (10% m/v dans HCl 1N, HAHCl) et une solution de ferrozine - acétate d'ammonium (0,1% m/v et 50 % m/v dans l'eau ultra pure).

Pour doser le Fe(II), il suffit d'ajouter 20 μ L d'échantillon, 80 μ L de HCL 1N et 100 μ L de solution de ferrozine. Laisser réagir 5 min à l'obscurité et lire à 562 nm (Tecan Infinite 200).

Pour doser le Fe_{TOT} , il suffit d'ajouter 20 μ L d'échantillon, 80 μ L de HAHCl et laisser agir 30 min à l'obscurité. Ajouter ensuite 100 μ L de solution de ferrozine et laisser réagir 5 min à l'obscurité. Lire à 562 nm.

Nota: Il est important de noter que l'hétérogénéité des minerais de fer a rendu délicate l'interprétation des résultats du dosage colorimétrique. En effet, pour un même échantillonnage des variations pouvant aller jusqu'à 15% du ratio $Fe(II)/Fe_{TOT}$ ont été observées. C'est pourquoi le ratio $Fe(II)/Fe_{TOT}$ a été choisi pour l'expression des résultats et non la concentration molaire. De plus, afin d'obtenir le ratio le plus exact possible à chaque échantillonnage, des triplicats ont été réalisés à chaque point de prélèvement et chaque prélèvement a été mesuré en triplicat.

2-6-2- Dosage anionique par HPIC

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPIC, Metrohm 882 Compact IC plus) a été utilisée afin de doser les ions nitrate, nitrite, sulfate, sulfite et thiosulfate, après filtration des échantillons (0,2 μ m). L'appareil est équipé d'une pompe haute pression, d'un module de suppression séquentielle (suppresseur Metrohm CO₂) et d'un supprimeur chimique

(MSM II) ainsi que d'un détecteur de conductivité. Une pré-colonne a été utilisée (Metrosep A supp 4/5) afin d'éliminer les composés organiques. La colonne de séparation (Metrosep Asupp5-250) est constituée de particules en polyvynil fonctionnalisées par un groupement ammonium. La phase mobile est une solution de Na_2CO_3 (3,2 mM), NaHCO_3 (1 mM) et acétone 4%.

2.7 Méthodes d'analyses des solides

2-7-1- Diffraction aux rayons X

La diffraction aux rayons X (DRX) est une technique physico-chimique d'analyse des solides cristallisés. Le faisceau de rayons X va être dispersé au contact du matériau. Les rayons réfractés sont collectés. La mesure des angles et l'intensité des rayons ainsi que l'utilisation de la loi de Bragg permettent l'élaboration d'un diffractogramme. Chaque matériau pur possède sa propre signature, cette technique permet donc de distinguer deux solides ayant la même formule brute. Par exemple, la goethite et la lépidocrocite (formule brute FeOOH) sont aisément discriminées au sein d'un même mélange. Pour cette thèse, les analyses ont été réalisées au LIEC (UMR 7360 CNRS-Université de Lorraine) et la source des rayons X est au cobalt (D8 Bruker). L'analyse est faite sur l'échantillon broyé en poudre et "sec" (déshydraté en dessiccateur). L'enregistrement des diffractogrammes se fait à température ambiante dans un intervalle de 3 à 64° pour 2θ en utilisant une anode au cobalt ($\lambda = 0,178897$ nm) par un diffractomètre D8 DISCOVER (Bruker) réglé sur un pas de 0,0359° et un temps de collection de 3 s par point.

2-7-2- Spectroscopie infrarouge en réflexion diffuse à transformée de Fourier (DRIFTS)

La spectrométrie infrarouge permet d'exploiter les modes vibratoires des molécules pour lesquelles les atomes vibrent. Ici, ce sont les vibrations réagissant au moyen infrarouge (allant de 4000 à 400 cm^{-1}) qui vont permettre d'identifier les structures fondamentales des solides. Chaque vibration (étirement, cisaillement, bascule, agitation ou torsion), en fonction des atomes concernés, possède une longueur d'onde propre. L'utilisation de la transformée de Fourier permet de mesurer les vibrations de toutes les longueurs d'onde simultanément. La réflexion diffuse consiste à collecter, à l'aide de miroir, tous les rayonnements réfléchis par l'échantillon lorsque le faisceau rencontre la surface. Les échantillons sont broyés en poudre et mélangés à du bromure de potassium (5 % m/m). La poudre homogénéisée est placée dans la

cellule de mesure (sous flux constant d'azote pour les échantillons sensibles à l'oxygène). La mesure est prise avec un Nicolet 8700 (Fischer Thermo Scientific, Waltham, MA USA).

2-7-3- Spectroscopie Mössbauer (TMS, Transmission Mössbauer spectroscopy)

Découverte en 1958 par Rudolph Mössbauer, la spectroscopie Mössbauer est une méthode répandue dans de nombreux domaines tels que la chimie, la physique, la métallurgie et même la biologie. Elle consiste en l'absorption d'un rayonnement gamma par l'échantillon et la mesure de l'intensité transmise qui dépend de l'environnement physico-chimique de l'échantillon. De tous les éléments actifs en spectroscopie Mössbauer, c'est l'isotope ^{57}Fe qui est le plus utilisé dans l'étude des minéraux : il représente 2,1 % des isotopes du Fe et son parent radioactif est le ^{57}Co qui se décompose directement en ^{57}Fe . Cette méthode permet de déterminer au sein de l'échantillon, l'environnement chimique, magnétique du Fe ainsi que son état d'oxydation. Les paramètres mesurés, dit hyperfins, sont le déplacement isomérique, l'effet quadrupolaire et l'interaction magnétique. Le déplacement isomérique, δ (*isomeric shift*), correspond à la différence d'environnement électronique entre les atomes émetteurs et les atomes absorbeurs. Cette différence s'exprime par un décalage du spectre de la valeur correspondante (Fig. 5A). L'effet quadrupolaire, Δ (*quadrupole splitting*), correspond à l'asymétrie des charges environnantes c'est-à-dire la scission de l'état excité en plusieurs niveaux d'énergie dû au champ électrique (Fig. 5B). Enfin l'interaction magnétique, H (*magnetic splitting*), résulte de l'interaction du moment magnétique du noyau avec son environnement magnétique, voire d'un champ magnétique extérieur. Les états fondamentaux et excités sont tous les deux scindés en différents niveaux d'énergie (Fig. 5C). Ces trois paramètres sont spécifiques à chaque phase cristalline mais ils évoluent en fonction de la température. En effet, si certaines phases sont ordonnées magnétiquement à température ambiante telle la goethite (sextet à 293 K), pour d'autres, un doublet paramagnétique les caractérise jusqu'à ce que la phase de transition soit dépassée (*e.g.* la lépidocrocite n'est sous forme de sextet qu'à 12 K). Ainsi la spectroscopie Mössbauer permet de caractériser avec précision les différentes phases minérales du fer d'un solide mais également de les quantifier. Toutes les analyses ont été réalisées au LCPME (Nancy) par le Dr. Mustapha Abdelmoula.

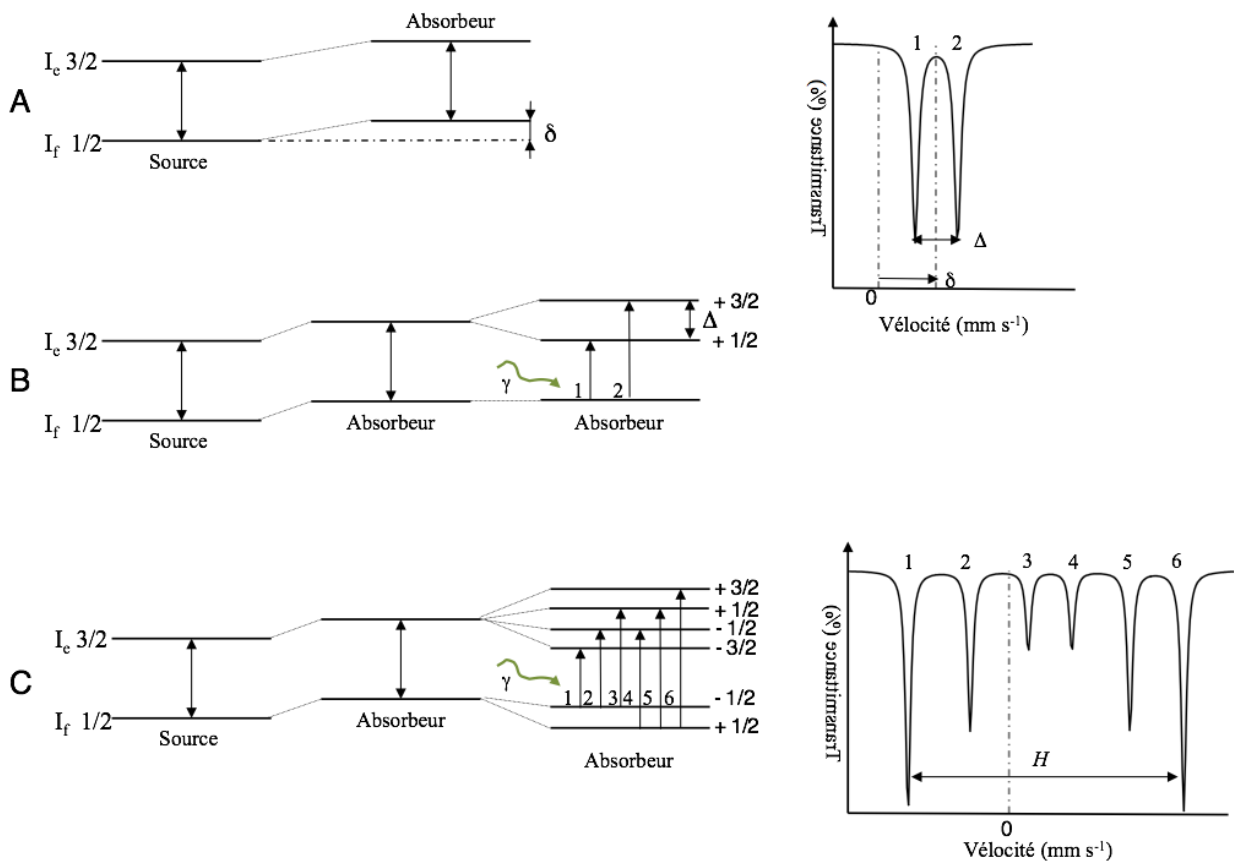


Figure 5 : Explication schématique des paramètres hyperfins Mössbauer. (A) Le déplacement isomérique (δ), (B) L'effet quadropolaire (Δ), (C) L'interaction magnétique (H). γ représente le rayonnement gamma émit par la source et qui excite le niveau fondamental (I_f) au niveau excité (I_c) de l'absorbeur (échantillon).

2-7-4- Spectroscopie RAMAN

La spectroscopie Raman (ou spectrométrie Raman) est une méthode non destructive d'observation et de caractérisation de la composition moléculaire et de la structure externe d'un matériau, qui exploite le phénomène physique selon lequel un milieu modifie légèrement la fréquence de la lumière y circulant. Ce décalage en fréquence dit l'effet Raman correspond à un échange d'énergie entre le rayon lumineux et le milieu, et donne des informations sur le substrat lui-même. La spectroscopie Raman consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser la lumière diffusée. Cette méthode est complémentaire de la spectrométrie infrarouge. Elle s'appuie sur les modes de vibration des liaisons atomiques.

Le spectroscope utilisé est une microsonde Raman confocale Jobin Yvon T64000 (488 nm, 457 nm, 514 nm, 632 nm, 532 nm, 561 nm, 672 nm) utilisé à 532 nm.

2-7-5- Spectrométrie photoélectronique X (XPS)

Le principe est basé sur la mesure de l'énergie cinétique des électrons émis par un solide sous l'impact d'un faisceau de photons X (XPS). Tout électron ayant une énergie de liaison inférieure à celle délivrée par le photon X peut être éjecté. Les électrons sont alors collectés et l'énergie mesurée de chaque électron permet de déterminer le spectre. Le spectre des électrons de cœur (ceux qui ne participent pas aux liaisons chimiques) est propre à un atome dans un composé donné. L'analyse est faite sur un échantillon solide et à une profondeur comprise entre 2 et 10 nm. Les données obtenues sont donc la nature de l'atome à la surface du matériau, son état d'oxydation et éventuellement une analyse semi-quantitative. Les analyses sont réalisées au LCPME (Axis ultra, Kratos, Manchester, Angleterre - Analyseur hémisphérique à 180 degrés, 165 mm de rayon moyen, source monochromatisée de rayons X : Al-Kalpha, 1486.6 eV -).

2-7-6- Microscopie électronique à balayage (MEB) et spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie (EDS)

Les analyses ont été réalisées par un microscope FEG S-4800 Hitachi équipé de deux sources d'électron secondaire ainsi qu'un détecteur YAG BSE. L'appareil est également équipé d'un spectromètre à dispersion d'énergie de photons X (sonde EDS), permettant l'analyse qualitative des éléments sur une zone définie. Les analyses ont été réalisées au service commun des analyses de microscopie électronique de l'université de Lorraine (SCMEM, Nancy). Les caractéristiques sont émission froide (brillance du canon très importante), résolution garantie sur site de 1 nm à 15 kV, échantillons jusqu'à 40 mm de diamètre, gamme de tensions d'accélération vaste : de 0.1 kV à 30 kV.

2-7-8- Microscopie électronique à transmission (MET) et spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie (EDS)

Les analyses ont été réalisées par un microscope CM20/STEM Philips utilisant un voltage à 200 kV, couplé à un spectromètre à dispersion d'énergie de photons X (sonde EDS). Une goutte d'échantillon (poudre en suspension) est déposée sur une grille en cuivre puis chargée dans la cellule d'analyse sous un vide à 10^{-8} Torr. Les analyses ont été réalisées à l'institut Jean Lamour (Nancy).

2-7-9- Isotherme d'adsorption de gaz (BET)

Par l'adsorption et la désorption de volume d'azote (l'adsorbant) sur l'échantillon en poudre, la méthode de Brunauer, Emmet et Teller (BET) permet de déterminer l'aire spécifique du solide analysé. Les essais ont été réalisés au LCPME sur Belsorp-max (Bel, Japan).

2-7-10- Granulométrie

La méthode utilisée est basée sur la diffraction d'un laser (633 nm) sur les particules par un angle inversement proportionnel au diamètre des particules. La lumière diffractée est collectée, via un jeu de lentilles, et des photodiodes enregistrent l'intensité et la distribution de la lumière diffractée. Les particules sont supposées sphériques. Le modèle mathématique appliqué est la théorie de Fraunhofer. L'appareil est un granulomètre SympaTEC Helos BF équipé de lentilles focales de 50 et 500 mm pour obtenir les tailles comprises entre 0,25–87,5 μm et 2,5–875 μm . Un bain à ultrasons permet d'améliorer la dispersion de l'échantillon avant la mesure. L'analyse a été réalisée au LIEC (Nancy).

2.8 Études des propriétés mécaniques des roches

Tous les essais mécaniques ont été réalisés en condition saturée, c'est à dire, que les éprouvettes (compression simple et fluage) et barrettes (micro-indentation) sont restées gorgée d'eau durant toute la mesure, soit par la mise en place d'une jaquette (compression simple), soit par capillarité (fluage), ou par adjonction continue d'eau sur l'échantillon (micro-indentation).

2-8-1- La compression simple (uniaxiale) sur micro-éprouvette

L'éprouvette (échantillon) est placée sous une presse qui applique une force axiale croissante, à vitesse contrôlée constante. Cet essai permet d'obtenir la résistance à la compression uniaxiale de l'échantillon à une force de compression uniaxiale mais également, par l'adjonction de capteurs LVDT et à l'éprouvette, les déformations au cours du temps. Ceci permet en outre d'obtenir différentes caractéristiques mécaniques telles que la limite élastique et les coefficients de l'élasticité isotrope: module d'Young et coefficient de Poisson (*via* des cycles de déchargement-rechargement). Les éprouvettes ont un élancement de 2 (2 cm de hauteur pour 1 cm de diamètre) et sont équipées de jauges de déformation (2 axiales et 2 latérales) de 350 Ω (Micro-Measurements).

2-8-2- L'indentation

Cette technique permet de déterminer la dureté du matériau. Dans le cadre de cette thèse, ces essais ont été conduits à l'échelle du micron, on parle de micro-indentation. Une pointe en acier, plate, de diamètre [1 mm] a été utilisée, correspondant la taille de quelques oolithes cimentées (Grgic *et al.*, 2013). La pénétration de la pointe (en mm) est mesurée par deux capteurs de déplacement LVDT et la force appliquée est déterminée par un capteur de force, placé dans l'axe de la pointe d'indentation. Le chargement se fait à vitesse constante, avec des cycles de chargement-déchargement afin de déterminer le module de Young à l'échelle du micron. Le module de Young a été déterminé à l'aide du logiciel MicroCalc (LaEGO, 2007).

2-8-3- Le fluage

La déformation progressive d'un matériau à contrainte constante est appelée fluage (Dieter, 1961). Le fluage entraîne la déformation irréversible du matériau au cours du temps, à température donnée. Avant rupture de l'échantillon, il existe 3 stades de fluages (Figure 6) (Dieter, 1961) :

- Le fluage primaire correspond à la déformation rapide du matériau avec une forte déformation (ϵ_0) du matériau jusqu'à atteindre une vitesse de déformation stable.
- Le fluage secondaire consiste en une déformation lente du matériau.
- Le fluage tertiaire est la phase terminale de l'essai où une accélération subite du matériau apparait jusqu'à la rupture de ce dernier.

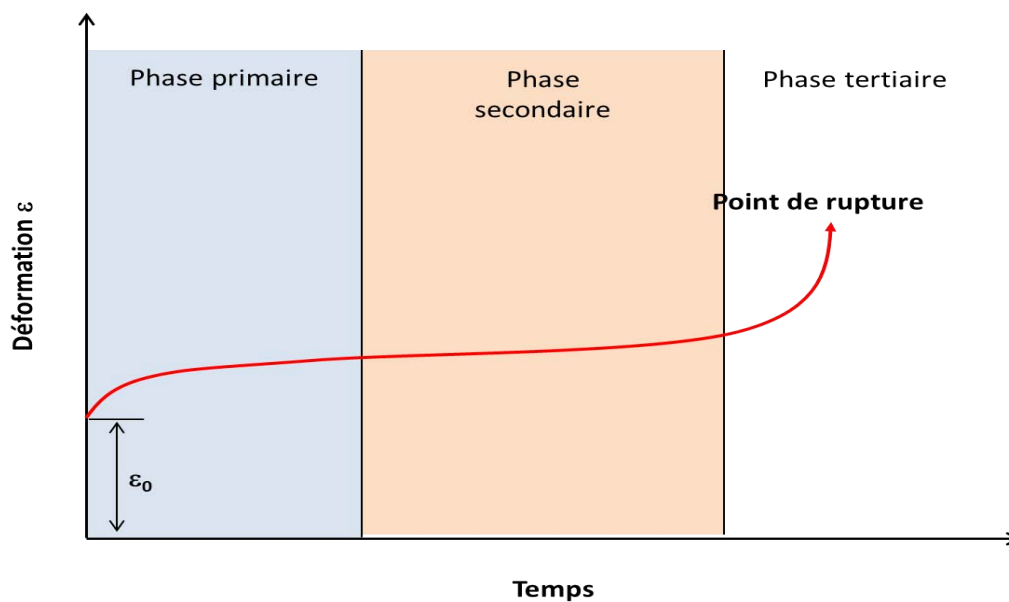


Figure 6 : Courbe schématique d'un essai de fluage montrant les trois stades de fluage, d'après Dieter, 1961. ϵ_0 représente la déformation rapide initiale.

Chapitre 3 : Réduction directe et indirecte du minerai de fer

Ce chapitre présente les résultats des différentes expériences de réduction réalisées au cours de cette thèse. Il est divisé en deux sous chapitres présentant chacun un métabolisme réducteur du Fe(III) : les IRB, réducteurs directs utilisant le Fe(III) comme accepteur final d'électron, et les BSR, réducteurs indirects où les sulfures formés vont réagir avec le Fe(III) sans gain pour les bactéries.

Le premier volet montre les expériences réalisées avec la souche IRB modèle *Shewanella putrefaciens*. De nombreuses études de réduction ont été réalisées à l'aide de cette souche sur des oxydes de synthèse mais plus rarement sur des oxydes naturels. Il a été notamment démontré que la réduction d'oxydes dit "stable" telle que la goethite est faible (~ 10%). Les minéraux ferreux formés sont souvent orienté par le tampon utilisé. Mais surtout les minéraux issus de la réduction sont dits "amorphes" et de fait difficile à caractériser. Ici, il a été démontré que la réduction vise la goethite du minerai de fer et que la réduction est important (> 20%). Un seul minéral semble être formé. Seule sa nature a pu être déterminée.

Le second volet montre les expériences réalisées avec les souches BSR issus des enrichissements. Dans cette partie, l'intérêt était de comprendre jusqu'à quel point les sulfures issus de la réduction des sulfates (1.5 g/L dans l'eau de mine) pouvaient influencer l'évolution du ratio $Fe(II) / Fe_{TOT}$ ainsi que la minéralogie du minerai de fer. Afin de déterminer les phases minéralogiques formées, plusieurs techniques analytiques ont été utilisées. La phase nouvellement formée est la pyrite (FeS_2) qui est la forme la plus stable du sulfure de fer. Ce minéral issu de la réduction indirecte a également été mis en avant par la littérature.

3.1. Réduction du minerai de fer lorrain par une souche ferri-réductrice *Shewanella putrefaciens*

Ce sous chapitre correspond à une étude publiée dans Chemical Geology en 2015. Cette publication scientifique est reportée ici dans son intégralité.

Brièvement, des incubations de *Shewanella putrefaciens* CIP80.40 ont été réalisées en présence des deux minerais de fer lorrain, le minerai intact et le minerai vieilli. La réduction du fer au cours du temps a été réalisée et des analyses minéralogiques ont été effectuées (DRX, MET, DRIFTS et spectroscopie Mössbauer). La réduction a atteint 20% et 26% pour les minerais intact et vieilli respectivement (% ratio Fe(II) / FeTotal). Il est montré que la réduction est conduite sur la goethite contenue au sein des minerais. Jusqu'à présent seule la goethite de synthèse a été étudiée et les taux de réduction obtenus sont d'environ 10%. Seul le Mössbauer a permis d'identifier la phase formée au cours de la réaction : un carbonate ferreux. L'hypothèse la plus probable est que ce néo-minéral soit de la sidérite (FeCO_3) déjà identifiée depuis la réduction de la goethite de synthèse. Or l'analyse Mössbauer réalisée sur les minerais de fer bioréduits comparée à celle d'une roche de sidérite naturelle n'a pas été concluante dans ce sens. En effet, la sidérite naturelle exprime à basse température ($< 38 \text{ K}$) un octet. Or les deux minerais réduits présentent deux octets dont aucun n'a les caractéristiques spectrales de l'octet de la sidérite naturelle.

Néanmoins, l'hypothèse retenue de ce travail est que les bactéries ferri-réductrices sont capables d'utiliser la goethite naturelle pour leur développement. La bioréduction entraîne la formation d'une phase de carbonate ferreux, mal cristallisée, qui pourrait se cristalliser en sidérite. Dans ce cas, notamment pour le minerai vieilli, il y a aurait formation d'un nouveau ciment interoolitique de sidérite qui pourrait améliorer la cohésion du minerai et par extension la stabilité des piliers.

Reminéralisation d'une phase de carbonate ferreux à partir de la goethite du minerai de fer suite à la bioréduction par *Shewanella putrefaciens*

Remineralization of ferrous carbonate from bioreduction of natural goethite in the Lorraine iron ore (Minette) by *Shewanella putrefaciens*

Baptiste Maitte^{1, 2}, Frédéric P.A. Jorand^{2*}, Dragan Grgic¹, Mustapha Abdelmoula³ and Cédric Carteret²

¹ Université de Lorraine/CNRS/CREGU, Georessources Laboratory, BP 40, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Université de Lorraine, LCPME, UMR 7564 CNRS-UL, 405, rue de Vandœuvre 54602 Villers-lès-Nancy, France

³ CNRS, LCPME, UMR 7564 CNRS-UL, 405, rue de Vandœuvre 54602 Villers-lès-Nancy, France

*corresponding author: frederic.jorand@univ-lorraine.fr

baptiste.maitte@univ-lorraine.fr; dragan.grgic@univ-lorraine.fr;

mustapha.abdelmoula@univ-lorraine.fr; cedric.carteret@univ-lorraine.fr

Abstract

Bacterial iron oxide reduction has been extensively studied over recent decades with the aim of improving knowledge of Fe-bearing mineral transformations. Chemically synthesized Fe(III) oxides such as ferrihydrite or goethite have mainly been used as iron oxide models but very few studies have focused on natural oxides. The scope of our work was to evaluate the ability of iron-reducing bacteria to transform iron ore and to identify the nature and outcome of the reduced phases. For this purpose, *Lothringen* (Minette), the oolitic iron ore type found in the Lorraine area (North-East of France), was incubated with *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40 as a model iron-reducing bacteria. Chemical and mineralogical analyses (ferrozine assay, X-ray diffraction, diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy, Mössbauer spectroscopy, transmission electron microscopy) were performed on both aged (i.e. iron ore oxidized by air during ~80 years of mining exploitation) and intact iron ore, before and after bioreduction in anoxic conditions. The oolites of intact iron ore were composed of goethite (α -FeOOH), with siderite (FeCO_3) and phyllosilicates as cement. Oolites of the aged iron ore contained hematite (α - Fe_2O_3), as well as goethite and significantly less siderite. We observed that 26% and 20% of goethite was bio-reduced for aged and intact iron ore respectively. No other Fe(III) phase was significantly reduced. Natural iron oxides constituting the iron ore can now be considered more available for iron-reducing bacteria than chemically synthesized oxides. The nano-crystallinity of iron ore goethite and the presence of sorption sites for Fe(II) were suggested as explanations for this discrepancy. Finally, a poorly crystalline ferrous carbonate was the main Fe(II) phase formed during the bio-reduction process of the iron ore (aged and intact). In the context of iron mines, the neo-formed ferrous carbonate could be a precursor of siderite and could recreate the diagenetic links and the inter-oolitic cohesion lost by the iron ore during its oxidizing process. The long-term stability of iron ore pillars would therefore be ensured.

Keywords: natural goethite; iron-reducing bacteria; siderite; Minette; Mössbauer spectroscopy; iron ore

Abbreviations:

AIO = aged iron ore; DRIFTS = diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy; IIO = intact iron ore; IRB = iron reducing bacteria; TMS = Transmission Mössbauer spectroscopy; SMW = synthetic mine water

3₁-1- Introduction

Iron-reducing bacteria (IRB) are able to reduce a large diversity of iron oxides from amorphous to crystalline phases (Weber *et al.*, 2006; Bird *et al.*, 2011) to provide energy for cellular growth. Thus, ferrihydrite and hydrous ferric oxides ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (Fredrickson *et al.*, 1998), lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) (Ona-Nguema *et al.*, 2002), goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$) (Liu *et al.*, 2001), hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) and magnetite (Kotska and Neelson, 1995; Etique *et al.*, in revision) are known to represent electron acceptors for H_2 or organic matter oxidation catalysed by IRB. This bacterial activity is assumed to be involved in bio-geochemical cycles for several elements such as carbon, nitrogen and sulphur, as well as metals (Lovley *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006; Bird *et al.*, 2011). The bacterial iron oxide reduction also results in the formation of Fe(II)-bearing minerals, such as ferrous carbonate (siderite and chukanovite), vivianite, magnetite or green rusts (Lovley *et al.*, 1987; Fredrickson *et al.* 1998; Ona-Nguema *et al.*, 2002; Kukkadapu *et al.*, 2005; Jorand *et al.*, 2013). There is important literature about fundamental and applied research on bacterial interactions with iron oxides (e.g. Weber *et al.*, 2006), but most of these studies have been however performed on pure or chemically synthesized oxides. Very few studies have addressed bacterial reactivity with natural iron oxides except for iron oxide in sediments, clays or ferruginous biofilms (Kostka *et al.*, 1996; Roden and Zachara, 1996; Zachara *et al.*, 1998; Jorand *et al.*, 2011). This makes the extrapolation of lab-experiments to the natural iron oxides questionable. For instance, the bacterial reactivity with Fe(III) in iron ore, which are composed of several minerals, could be different from those in a purely artificial set-up. Indeed, the involvement of bacteria in mineralogical transformations on short geological timescales (or a human timescale such as the mining exploitation time) is not documented (Grgic *et al.*, 2013).

The scope of our work is to evaluate the ability of iron-reducing bacteria to transform iron ore and to identify the nature and outcome of the reduced phases. For this purpose, *Lothringen* (Minette), the oolitic iron ore found in the Lorraine area (north-east of France), was incubated with *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40 as a model iron-reducing bacteria. Chemical and mineralogical analyses (ferrozine assay, X-ray diffraction, diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy, Mössbauer spectroscopy, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy) were performed on both aged (i.e. iron ore oxidized by air in the underground mine during ~ 80 years of mining exploitation) and intact iron ore (named AIO and IIO, respectively), before and after bioreduction in anoxic conditions.

The outcome of this work also provides insight into mineralogical changes likely to occur as result of post-mining operation management. Briefly, during one century of mining the mechanical strength of iron ore pillars are affected by oxidation of the Fe(II) minerals (siderite and berthierine) acting as an inter-oolitic cement (Dagallier *et al.*, 2002; Grgic *et al.*, 2013) and this is believed to be one of the main causes of mine collapses in Lorraine (France). After mining, the anoxic conditions due to the water flooding of the mines could allow biogeochemical reactions, such as bioreduction of Fe(III) minerals, that could affect the iron ore mineralogy. The consequences of these changes on iron ore properties will be discussed in this manuscript.

3₁-2. Materials and experimental methods

3₁-2-1- Description and origin of the iron ore samples

Iron ore of Lorraine (France) is a highly porous (25-30%) oolitic-type ferri-arenite (average oolite size = 0.2 mm). The oolitic cortices are made of concentric layers of goethite (α -FeOOH) and the inter-oolitic cement is made up of diagenetic calcite (CaCO_3), siderite (FeCO_3), magnesite (MgCO_3), iron oxides and berthierine (hydrous magnesium iron phyllosilicate $(\text{Fe}^{\text{II}}, \text{Fe}^{\text{III}}, \text{Al}, \text{Mg})_{2-3}(\text{Si}, \text{Al})_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) in varied proportions (Grgic *et al.*, 2013). The mineralogical composition of iron ore can vary from area to area, and so iron ore can be considered as a heterogeneous rock. Iron ore samples were taken from different core drillings: i) vertical boreholes from the land surface in a non-mined area, to study iron ore which was not exposed to the atmosphere. This is referred to as “intact iron ore” (IIO) in the present study, and ii) horizontal boreholes from the front of aged pillars, where the iron ore has been exposed for 70-100 years to the mine atmosphere (i.e., weathered and oxidized iron ore). This is referred to as “aged iron ore” (AIO).

Scanning electron microscopy (SEM) images of AIO and IIO are presented in Fig. 1. In AIO, a honeycombed crust of hematite (ferric oxide Fe_2O_3) coats all mineral supports. This neo-crystallized rust corresponds to the residue of the siderite alteration/oxidation (Grgic *et al.*, 2013) and is therefore the result of iron ore corrosion. From a macroscopic point of view, intact iron ore has a green/grey colour whereas aged (i.e. corroded) iron ore has a red/brown colour due to the oxidation of Fe(II) to Fe(III) (Fig. S1 [Annexe 1]). Both IIO and AIO were crushed and sifted through a 60 μm sieve (Fig. S1 [Annexe 1]). This powder was used during the experiments.

A “siderite rock sample” (Georessources laboratory collection) was used as a geologic reference for siderite characterization. The Mössbauer hyperfine parameters of this sample are similar to those obtained previously in the literature (Table S1).

3₁-2-2- Preparation of laboratory materials

3₁-2-2-1- Washing and sterilization of materials

All glassware was washed with 1 N HCl for 10 min then rinsed three times with ultra-pure water. Butyl-stoppers were boiled with distilled water then heat-sterilized (121°C, 15 min). All the suspensions were heat-sterilized or filtered (filter pore size 0.22 μm) and degased with N_2 (99.99 %) for 30 min.

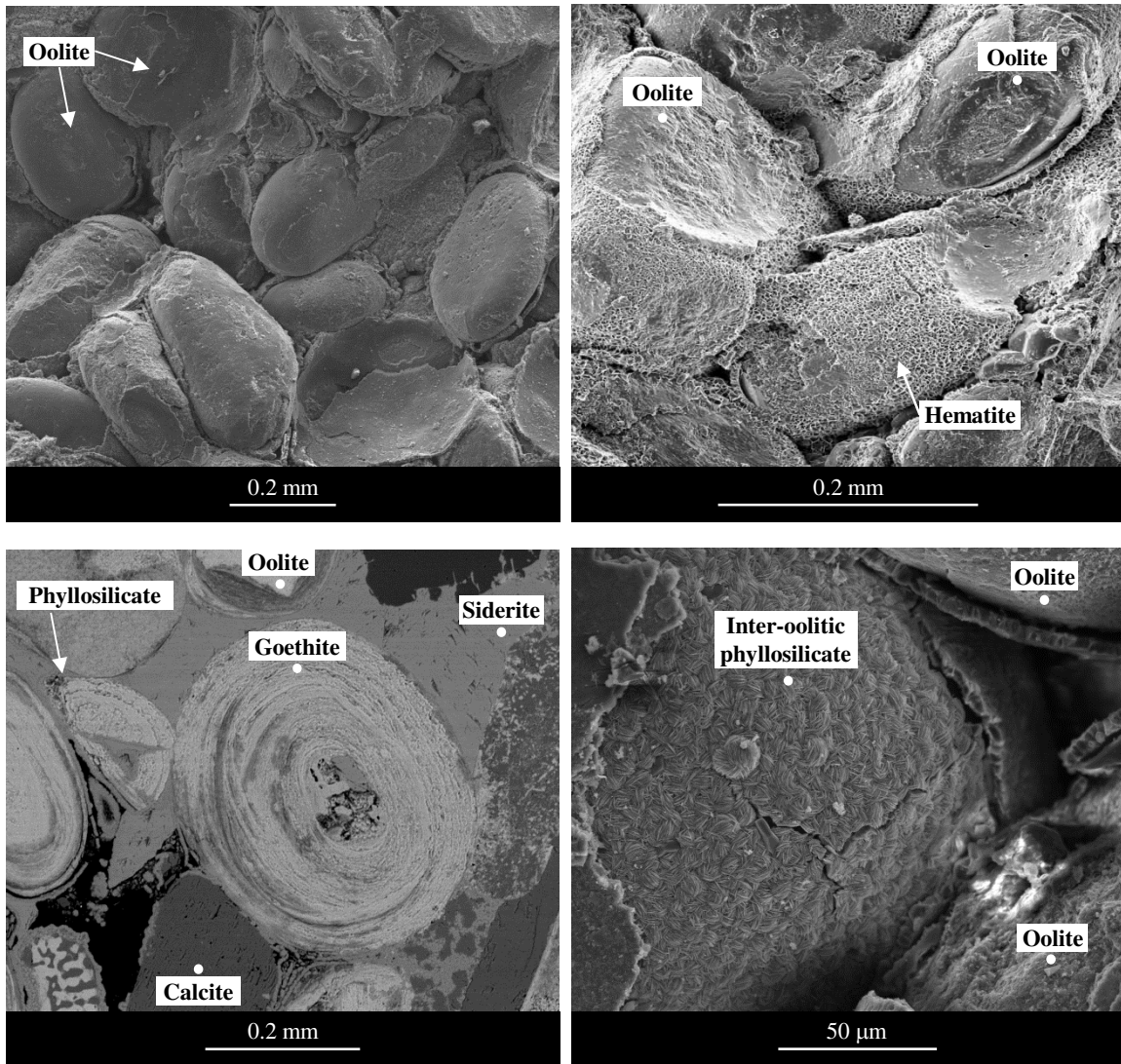


Figure 1.

Scanning electron microscopy images of iron ores. Top: crack surfaces showing textural organization of intact (left) and aged/oxidized (right) iron ore. Bottom: polished thin section (left) and crack surface (right) of intact iron ore showing oolitic cortices (concentric layers) of goethite and inter-oolitic siderite, calcite and phyllosilicates.

3₁-2-2-2- Cell suspension

The bacterial cell suspension of *Shewanella putrefaciens* CIP-80.40 was prepared as described previously (Zegeye *et al.*, 2005). In short, colonies from a culture plate on tryptic soy agar (TSA, Fluka 22091, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were used to inoculate a batch reactor containing 2 L of tryptic soy broth (TSB, Fluka 22092, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) to initiate the main culture. The reactor was continuously agitated at 300 rpm and flushed with filtered-sterilized air for 16 h. The cell suspension obtained was washed twice

with sterile NaCl 0.9% and degased for 1 h with N₂ (99.99%). This suspension was used to inoculate the batch flask with iron ore.

3₁-2-2-3- Medium

The iron bioreduction was carried out in a synthetic mine water (SMW) similar in composition to that of underground mine water as far as the main elements were concerned. This SMW contained (per liter): 0.5 g Na₂SO₄, 0.5 g K₂SO₄, 0.2 g MgSO₄•7H₂O, 0.3 g CaSO₄•2H₂O, 0.015 g NaCl, 0.005 g (NH₄)₂SO₄, 0.001 g KH₂PO₄. Trace elements and vitamins were added in accordance with Widdel and Bak (1992). The electron donor, sodium formate (Na-HCOO, 50 mM, final concentration), was added separately under anoxic chamber conditions (Coy laboratory product, Grass Lake, Michigan). Fe(III) was exclusively provided by iron ore or synthetic goethite as the sole electron acceptor. The pH was adjusted to 7.0 by the addition of NaOH (1M).

3₁-2-2-4- Incubation of iron ore in bioreduction flasks

One gram of iron ore powder was added to 100 mL serum bottles containing 85 mL of SMW medium. This suspension was submitted to an ultrasound bath (Branson 3510, 40 Hz) for 30 min to disperse iron ore particles, then heat-sterilized before the addition of the electron donor. In this suspension (one gram of iron ore powder in 85 mL), ~ 1.2 mM of Fe(II) and ~ 16.3 mM of Fe(III) were measured for AIO, whereas there was ~ 8.0 mM and ~ 28.3 mM for IIO, respectively.

The bacterial cell suspension was added to obtain a final concentration of 1×10⁹ cell mL⁻¹. Two controls were set up: one with lepidocrocite (γ-FeOOH) as a positive control of iron-reducing activity (Ona-Nguema *et al.*, 2002) and one with a heat-killed cell suspension as an abiotic control. Finally, control tests with synthetic goethite were performed in similar conditions as for iron ore - 250 mg of synthesised goethite, 85 mL of SWM medium and 1×10⁹ cells mL⁻¹. Goethite was synthesised in accordance with the procedure described by Schwertmann and Cornell (2000). Bioreduction flasks were incubated at 30°C in the dark and were kept static and lying down (but were hand-shaken just before each sampling). All assays were performed twice.

3₁-2-3- Chemical analysis

Sampling and the preparation of samples for chemical analyses were both carried out in the anoxic chamber. Sampling and analysis were systematically performed in triplicate at the selected time steps. Fe(II) (in the aqueous and in the solid phase) and “total iron” (Fe_{TOT}) (Fe(II) and Fe(III) in aqueous and in solid phase) were measured by a modified ferrozine assay (Hegler *et al.*, 2008). Beforehand, an acidic extraction was carried out with 6 N HCl for 48 h under orbital agitation (20 rpm). Sample dilution was carried out with 1 N HCl before measurement: 80 µL of 1 N HCl or hydroxylamine hydrochloride (NH₂OH•HCl, 10%, w/v, in 1 N HCl) were added to 20 µL of sample to measure Fe(II) or Fe_{TOT}, respectively. After 30 min, 100 µL of a ferrozine and ammonium acetate solution (0.1% w/v and 50%, w/v, respectively) were added. The absorbance was finally measured at 562 nm in a microplate reader (Infinite[®] 200, Tecan, Mannedorf, Switzerland) after 5 min in the dark.

3₁-2-4- Solid analysis

All solids were collected by centrifugation and dried in a desiccator, except where indicated. X-ray diffraction (XRD) data were collected with a D8 Bruker diffractometer, equipped with a monochromator and a position-sensitive detector. The X-ray source was a Co anode ($\lambda = 0.17902$ nm). The diffractograms were recorded in the 3-64° 2 θ range, with a 0.0359° step size and a collecting time of 3 s per point.

Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) analyses were run using a Nicolet 8700 spectrometer (Fischer Thermo Scientific, Waltham, MA USA) with a DRIFTS attachment cell (Praying Mantis[™]) as the collector under continuous N₂ flow. Analyses were performed in the mid-infrared range between 400 and 4000 cm⁻¹. Five grams of solid were mixed with 200 g of KBr (FT-IR grade, Sigma) in an anoxic chamber, prior to analysis.

Transmission Mössbauer spectroscopy (TMS) was performed using a ⁵⁷Co source to identify and quantify iron phases. Solid samples were prepared under an N₂ atmosphere in an anoxic chamber and quickly transferred into the cold head cryostat (manufactured by Advanced Research Systems) under an inert He atmosphere to preserve ferrous phases. The absorber consist of the finely powdered sample, spread out over the support in a uniform thickness of approximately 10 mg cm⁻², then it may need to be mixed with flour in order to achieve a uniform loading across the vertical absorber holder disk. Mössbauer spectra were collected in transmission mode with a constant acceleration spectrometer and a 512 multichannel analyser.

Data were calibrated with a 25 μm thick α -iron foil at room temperature. Measurements were performed between 8 K and 77 K. The spectra were analysed using the Recoil software (Rancourt and Ping, 1991). Two approaches were used for fitting spectra, the Lorentzian-shape lines model which is often adequate near and above 35 K, except in the case of the appearance of the magnetic order for the Fe(II) components, whereas the full static Hamiltonian site analysis is required at very low temperature for solving the mixed hyperfine interactions. The estimated absolute errors are ± 0.01 mm/s for the center shift, ± 0.02 mm/s for the quadrupole splitting and line-width, and $\pm 2\%$ for the percentage areas of the spectral components.

Transmission electron microscopy (TEM) was conducted using a CM20/STEM Philips coupled with an energy dispersive X-ray system (EDX) at a voltage of 200 kV. One drop of the suspension was laid on a copper-coated grid and loaded into the analysis holder of the microscope under 10^{-8} Torr vacuum. Scanning electron microscopy (SEM) was carried out using a FEG S-4800 Hitachi with two secondary electron detectors as well as a YAG BSE detector, coupled to an energy dispersive spectroscopy diode (EDS). The specific surface (SSA) area of iron ores was determined by multipoint N_2 -BET analysis using a Belsorp-max surface area analyser (Bel, Japan).

Particle size distribution was analysed using a laser diffraction granulometer SympaTEC Helos BF, equipped with two lenses of 50 mm and 500 mm focal, giving access respectively to size ranges of 0.25–87.5 μm and 2.5–875 μm , as well as an ultrasound tank of 450 mL operating at 25 W and 50-60 Hz. The model applied was the Fraunhofer mathematical theory which only takes into account the diffraction and not the absorption or diffusion.

3₁-3. Results

3₁-3-1- Characterization of the iron ore

The relative abundance of Fe(II) in the iron ores investigated by 6 N HCl extraction, were $4.4 \pm 0.4 \%$ and $12 \pm 1 \%$ of the Fe_{TOT} for raw AIO and IIO, respectively ($n = 3$). These ratios are close to those obtained by TMS, where the resolved spectra at 77 K for raw AIO and IIO (Fig. 2a and 2b, respectively) indicate a contribution of Fe(II) sites to the total iron (from data of hyperfine parameters centre shift and quadrupole splitting, Table S1) of 6 and 14 % for AIO and IIO, respectively (Table 1). In both AIO and IIO, the resolved TMS spectra show a sextet corresponding to goethite (Vandenberghe *et al.*, 2000) as the main Fe(III) oxide accounting for 86 and 81%, respectively (Table 1). XRD analysis (Fig. 3) and DRIFTS also identified

goethite. Doublets from DRIFTS spectra (803 cm^{-1} and 915 cm^{-1} , Fig. 4 and Fig. 5) are shifted relative to reference spectra doublets (795 cm^{-1} and 892 cm^{-1} , Cornell and Schwertmann, 2003). The shift is due to the isomorphous substitution of iron by aluminium in the goethite structure (Cornell and Schwertmann, 2003), which is probably due to weathering processes (Norrish and Taylor, 1961). This phenomenon can be correlated to the TMS measurements at room temperature (not shown) where spectra present superparamagnetic relaxation and pronounced effects of hyperfine field distribution. For its complete identification, Mössbauer spectra have been collected at even lower temperature than 80 K. The Al-substitutions correspond to $0.251\text{ mole mol}^{-1}$ (Al/(Al + Fe)) for AIO and $0.248\text{ mole mol}^{-1}$ (Al/(Al + Fe)) for IIO (values are calculated from Ruan *et al.*, 2002; Cornell and Schwertmann, 2003). The ore goethite was observed as fine grains of $\sim 20\text{ nm}$ size (Fig. 6a, e), which is common in sedimentary iron ore (Cornell and Schwertmann, 2003).

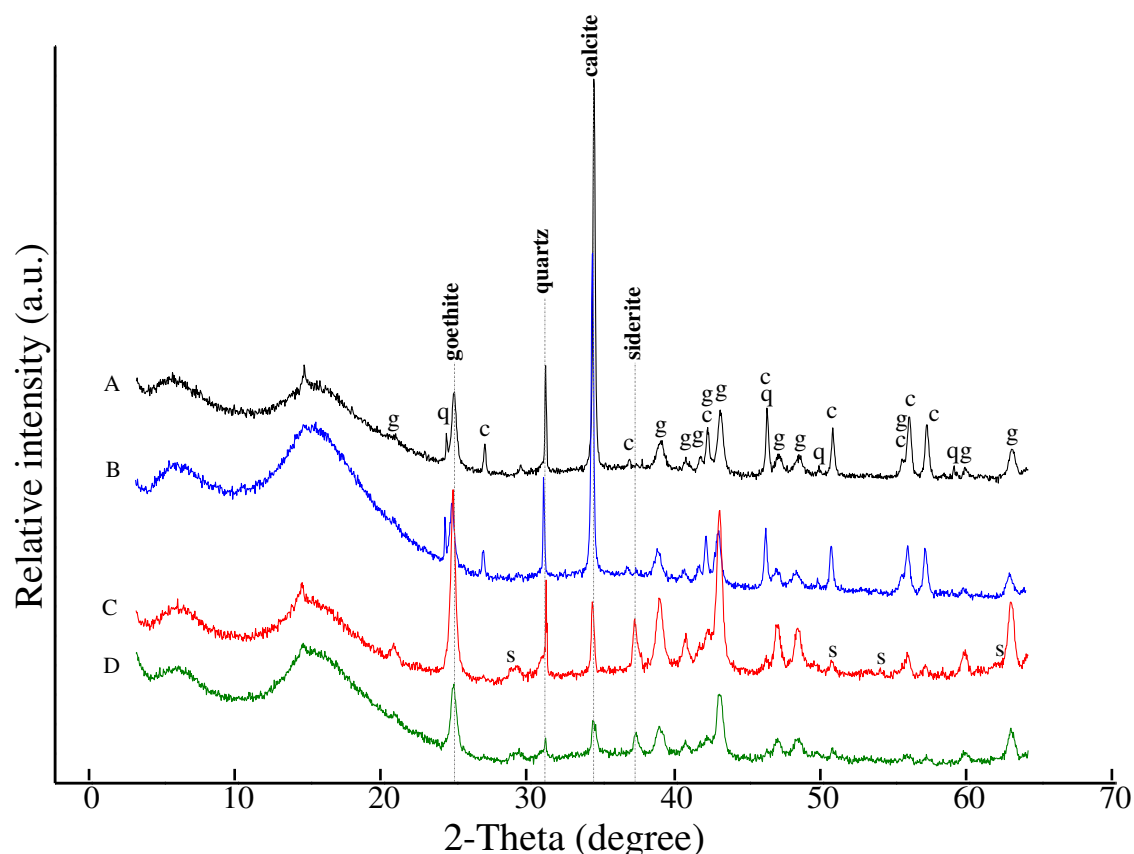


Figure 3.

XRD diffractograms on the aged iron ore (AIO) and intact iron ore (IIO) before (raw AIO or IIO) and after bioreduction (bioreduced AIO or IIO). A, raw AIO; B, bioreduced AIO; C, raw IIO; D, bioreduced IIO. The main peaks of goethite, quartz, calcite and siderite are shown by the dotted line. “g”, goethite, “q”, quartz, “c”, calcite and “s”, siderite, a.u. = arbitrary unit. No siderite was detected in the AIO.

Table 1

Iron mineral composition obtained from X-ray diffraction (XRD), diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and transmission Mössbauer spectroscopy (TMS) analyses for: aged iron ore (AIO) and intact iron ore (IIO) before (raw AIO or IIO) and after incubation under anoxic conditions with *Shewanella putrefaciens* and formate as electron donor (bioreduced AIO or IIO). For XRD and DRIFTS, The signs “+” and “0” represent the presence or absence of mineral detection in iron ore, respectively. The sign Ø means that the signal of the mineral could be hidden by another phase. TMS data represent the relative abundance (%) of iron in each mineral (see Table S1 for hyperfine parameters). Non-iron Fe-bearing phase, such as quartz and calcite also detected by XRD and DRIFTS, were not represented.

Mineral	Raw AIO			Bioreduced AIO		
	XRD	DRIFTS	Mössbauer (77 K)	XRD	DRIFTS	Mössbauer (77 K)
Berthierine Fe(II)	0	Ø	6	0	Ø	10
Fe(II) phase	0	Ø	0	0	Ø	7
Fe(III) phase ^a	0	Ø	2	0	Ø	6
Goethite	+	+	86	+	+	73
Hematite	0	+	6	0	+	4

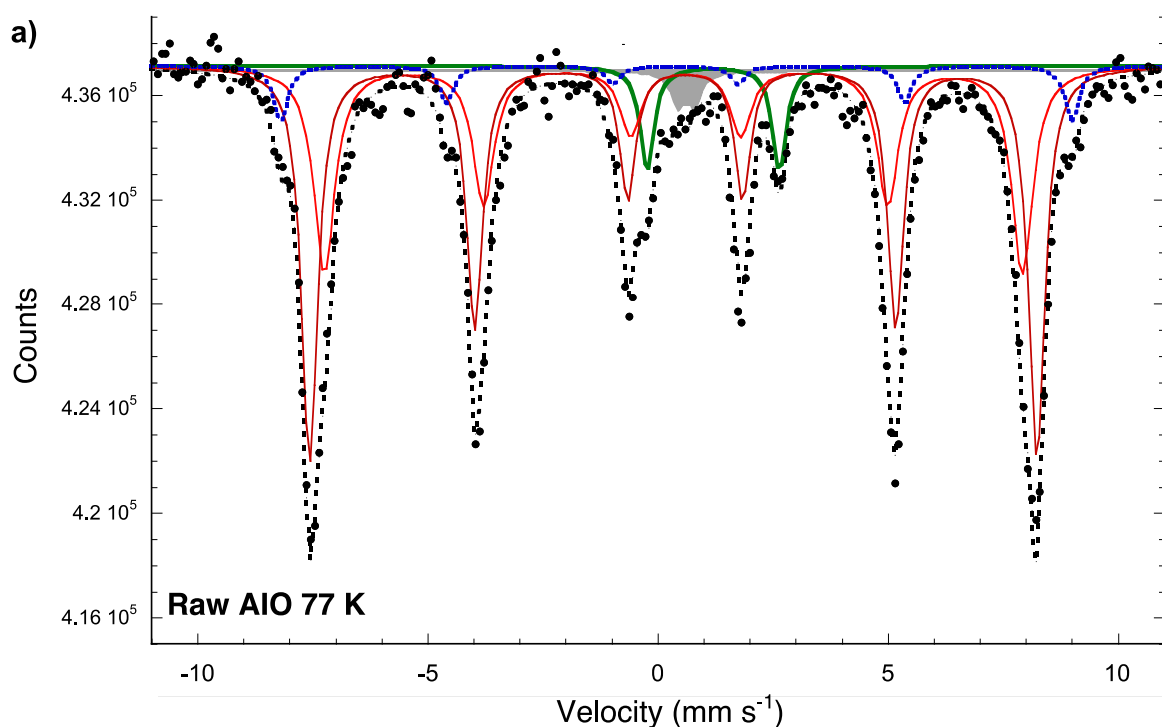
Mineral	Raw IIO			Bioreduced IIO		
	XRD	DRIFTS	Mössbauer (77 K)	XRD	DRIFTS	Mössbauer (38 K)
Berthierine Fe(II)	0	Ø	7	0	Ø	13
Fe(II) phase ^b	+	Ø	7	+	Ø	21
Fe(III) phase ^a	0	Ø	5	0	Ø	7
Goethite	+	+	81	+	+	59

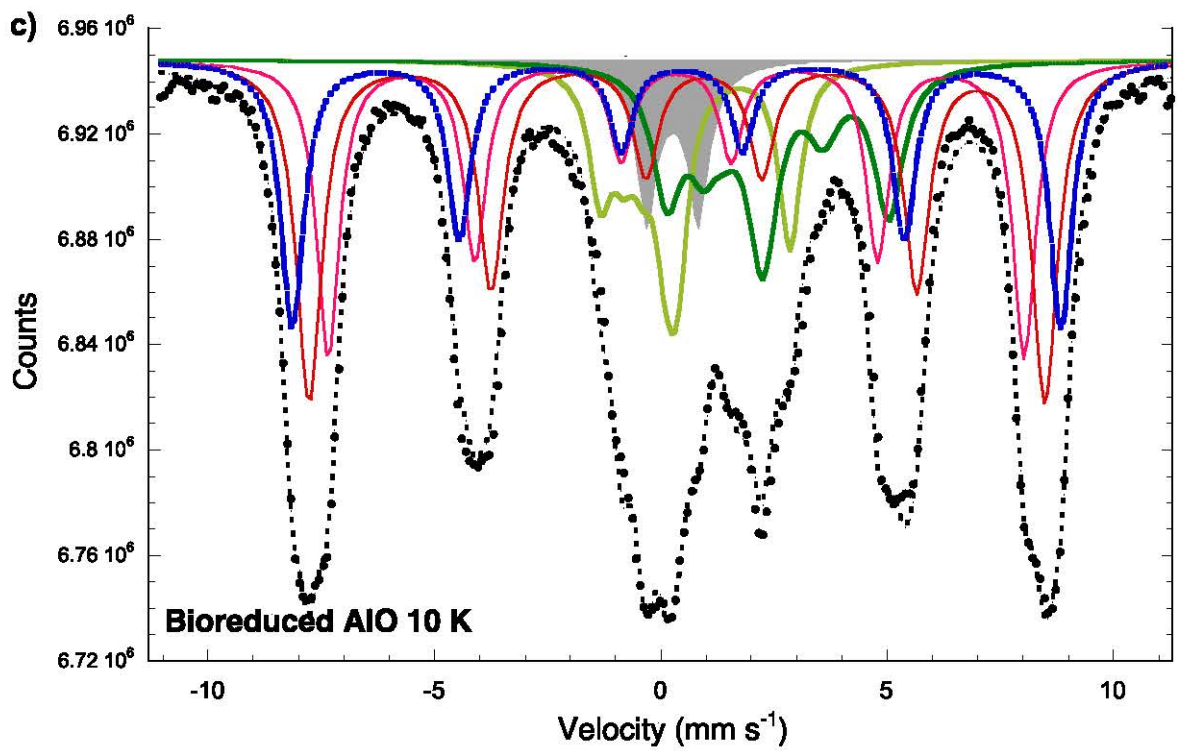
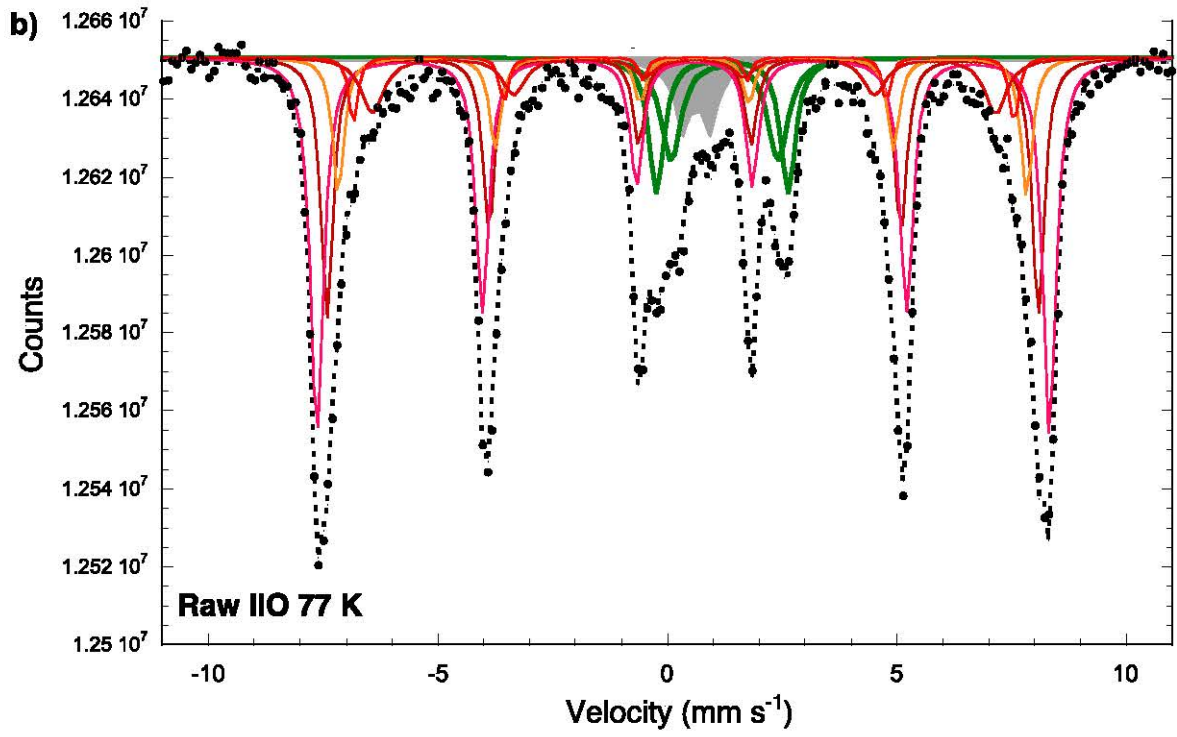
^a This phase could be either berthierine or chlorite (Mackenzie and Berezowski, 1984).

^b This phase was identified as siderite by XRD.

Transmission Mössbauer spectroscopy also identified hematite in AIO by the sextet and a large magnetic hyperfine field (~530 kOe, Fig. 2a and Table S1 [Annexe 1]) which is typical of hematite (Vanderberghe *et al.*, 2000). Hematite accounts for 6% of the total Fe in AIO but it was not detected in IIO (Table 1). In addition, DRIFTS spectrum of AIO exhibits a shoulder for hematite that was not found for IIO (Fig. 4 and Fig. 5). However, due to the relatively low amount of hematite in iron ore, it was not possible to detect it by XRD (Fig. 3).

A paramagnetic doublet of Fe(III) was observed in TMS matching with some clays (Fig. 2, Table 1) which could either be berthierine or chlorite (Mackenzie and Berezowski, 1984). Fe(II) phases were found in both iron ores, one corresponding to berthierine (Table 1), the second one was only detected in IIO. Goethite, calcite and quartz were identified by XRD (Fig. 3), however, other peaks, with low intensity and broad shape, were assigned to siderite. Thereafter, by TMS, this phase was not clearly characterized as siderite, relative to the geologic reference (Georessources laboratory collection) (see Table S1-[Annexe 1]). DRIFTS enabled the detection of carbonate (CO_3^{2-}) with bands at 713, 871, 1440, 1795 and 2508 cm^{-1} (Fig. 4 and Fig. 5) (Huang and Kerr, 1960). It should be possible to distinguish each carbonate phase with the in-plane bending vibration of CO_3^{2-} at 713 cm^{-1} . Indeed, siderite vibrates at 737 cm^{-1} whereas ankerite ($\text{Ca}(\text{Fe}^{2+}, \text{Mg}, \text{Mn})(\text{CO}_3)_2$) vibrates at 726 cm^{-1} and calcite (CaCO_3) at 712 cm^{-1} (Huang and Kerr, 1960), as illustrated in Fig. S2. However, the DRIFTS signals only characterized the calcite band (also detected from XRD, Fig. 3) and no other Fe(II)-carbonate phases, like siderite and ankerite, were detected. However, signals of siderite might be hidden by the calcite bands, preventing its detection. Quartz was detected with XRD (Fig. 3) and DRIFTS (Figs. 4 and 5), by the Si-O stretching vibration around 1000 cm^{-1} (Madejová *et al.*, 2001), in both IIO and AIO samples. Finally, the SSA were $26.2 \pm 0.1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ and $18.8 \pm 0.4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for AIO and IIO, respectively. The particle size distribution showed that for 90% of particles (in volume) (D_{90}) the size of AIO is smaller than 20 μm , compared to 24 μm for IIO.





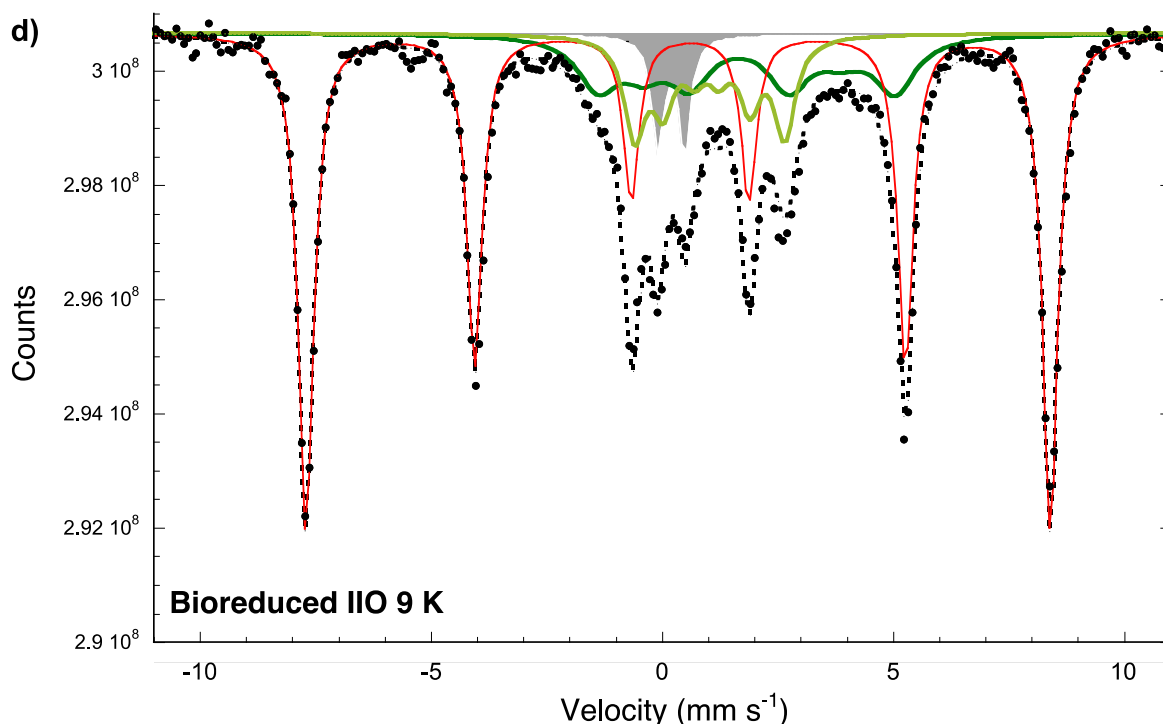


Figure 2.

Mössbauer spectra at 77 K on raw iron ores: a) aged iron ore, b) intact iron ore, and Mössbauer spectra on bioreduced iron ores: c) aged iron ore at 10 K, d) intact iron ore at 9 K. Black circle = experimental data, black dashed line = total calculated fit, dark green thick solid line = Fe(II) phase, light green thick solid line = Fe(II) phase, thin red lines = goethite, blue dotted line = hematite, grey area = Fe(III)-bearing phase (probably unidentified clays like berthierine). See Table S1 for the hyperfine parameters.

3.1-3-2- Bioreduction of the iron ores

To assess the effect of iron-reducing bacterial activity on the transformation of the two types of iron ore, AIO and IIO powders were incubated with *S. putrefaciens* in a defined medium with formate (HCOO^-) as the electron donor. The Fe(III) reduction course was followed for both iron ores. The increase in the Fe(II) was determined through time for AIO and IIO (Fig. 7 and Fig. 8, respectively). In addition, the evolution of $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ was compared to an abiotic control (with a dead bacterial cell suspension). Regarding the controls, Fe(II) was found to increase significantly ($p < 0.01$, Student test) after 14 and 35 days for AIO and IIO, respectively, which indicated the bioreduction of Fe(III). In both cases, at 80 days, the ratios $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ were not significantly different from those at 480 days ($p > 0.01$, Student test), indicating that the bioreduction was accomplished in ~80 days. Up to 26 % and 20 % of Fe(III) was thus reduced by *S. putrefaciens* for AIO and IIO, respectively (Fig. 7 and Fig. 8). It is worth stressing the fact that the calculated standard deviations were due the sampling

method of the iron ore suspension. The fast settling of the ore particles leads to a heterogeneous sampling by syringe and thus, little accuracy. Interestingly, at the end of the bioreduction, when the amount of Fe(II) was stabilized, the ratio Fe(II)/Fe_{TOT} obtained was the same for both iron ores (~40 %, calculated from Fig. 7 and Fig. 8). The bioreduction extent of the synthetic goethite was significantly lower (9.4%, data not shown), however, and other studies (with *Shewanella* spp) have shown similar results for other synthetic goethites (Table 2). It is worth noting that after 15 days, the pH was around 9 in each culture.

The positive control with lepidocrocite, performed with the same cell suspension, showed a reduction extent of 45% (\pm 5%), indicating that bacterial cells are efficient at reducing Fe(III) in the iron oxide mineral. Thus, the bioreduction extent of iron ore samples should be assigned to the solid properties and not on the cell activity.

Table 2

Non-exhaustive survey of bioreduction extent of geologic and synthetic goethite by iron-reducing bacteria. AIO = aged iron ore, IIO = intact iron ore.

Minerals	Reduction extent (% Fe(II)/Fe _{TOT})	References
Geologic goethite		
AIO (mainly goethite)	26	This study
IIO (mainly goethite)	20	This study
Milford (goethite)	12.2	Roden and Zachara (1996)
Milford (goethite)	65.5	Zachara <i>et al.</i> (1998)
Eatontown (goethite)	8.8 / 9.2 ^a	Kukkadapu <i>et al.</i> (2001)
Synthetic goethite	9.4	This study
	12.6 ^b	Roden and Zachara (1996)
	10 ^c	Liu <i>et al.</i> (2001)
	12.2 ^d	Kukkadapu <i>et al.</i> (2001)
	9.2	Zachara <i>et al.</i> (1998)
	7.1	Ekstrom <i>et al.</i> (2010)

^a Depending on the buffer used: PIPES / HCO₃⁻

^b High surface area goethite

^c For 100 mM goethite

^d Medium surface area

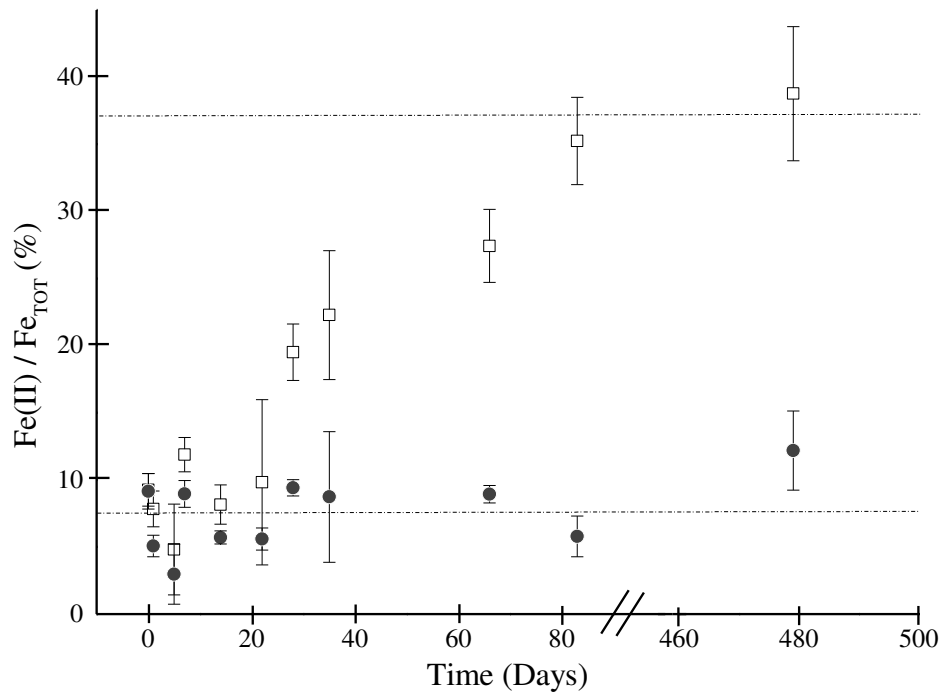


Figure 7.

Evolution of the Fe(II)/Fe_{TOT} ratio (%) overtime for the aged iron ore (AIO) with *Shewanella putrefaciens* (open squares) or in the control with suspension of heat killed cells (black circles). The bottom dashed line represents the mean value of the initial ratio and the top dashed line represents the mean value of the final ratio after reduction (from 80 and 480 days).

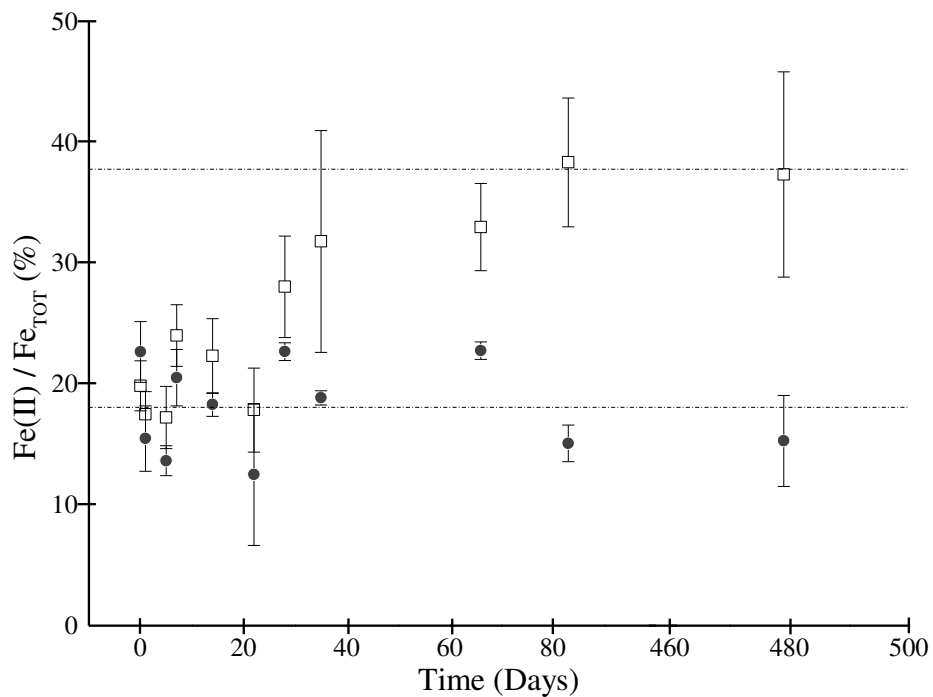


Figure 8.

Evolution of the Fe(II)/Fe_{TOT} ratio (%) overtime for the intact iron ore (IIO) with *Shewanella putrefaciens* (open squares) or in the control with heat killed cells suspension (black circles). The bottom dashed line represents the mean value of the initial ratio and the top dashed line represents the mean value of the final ratio after reduction (from 80 and 480 days).

3.1-3-3- Characterization of the iron ore after bioreduction

For both iron ores, only solid Fe(II) was found after bioreduction, suggesting precipitation (or a sorption) of the Fe(II) produce from bioreduction. Therefore, the iron ore minerals characterisation after the microbial incubation was assumed to take into account all the Fe(II) resulting from the bioreduction.

Aged iron ore

The darkening of the medium over time was the main macroscopic change observed. DRIFTS and TMS revealed significant modifications to the mineral composition of the ore after the bioreduction (Fig. 2 and Fig. 4, Table 1) but these changes were not backed up by the findings of XRD analysis (Fig. 3). In DRIFTS analysis, the relative intensity of each band was compared and the Si-O stretching vibration was used as a reference to compare with other bands (Fig. 4 and Fig. 5). The O-H stretching vibration (between 2600 and 3600 cm^{-1}), which is related either to H_2O or goethite, was detected before and after bioreduction but its relative intensity was found to be significantly lower after bioreduction. Since the main vibration band of H_2O (around 1660 cm^{-1} , Madejová *et al.*, 2001) has the same relative intensity before and after bioreduction, the decrease, in relative intensity, of the O-H stretching vibration was probably due to the loss of goethite. Also, the goethite doublet (809 and 916 cm^{-1}) decreased in terms of relative intensity after the bioreduction process, thus indicating that goethite is the Fe(III) oxide support used for bacterial metabolism. This is confirmed by the Mössbauer analyses where the relative abundance of goethite is reduced from 86% to 73% after bioreduction (Table 1). The Al-substitution is about 0.266 mol mol^{-1} ($\text{Al}/(\text{Al} + \text{Fe})$). No significant bioreduction of hematite occurred in AIO, as is indicated by the presence of a shoulder and a band (3720 cm^{-1} and 3700 cm^{-1} , respectively) specific to hematite (Cornell and Schwertmann, 2003), before and after the bioreduction. The slight decrease showed by TMS is assumed not to be significant (Table 1).

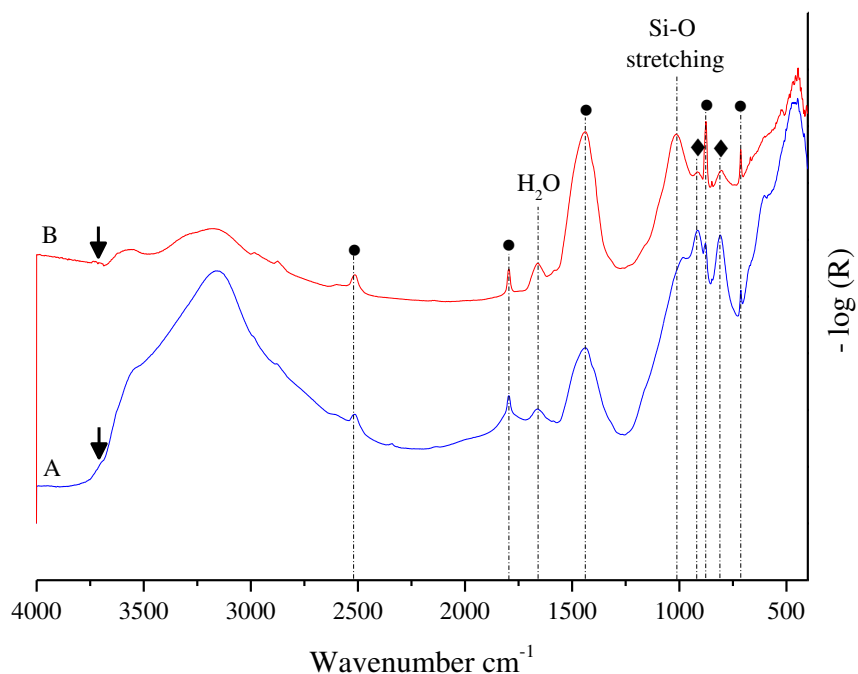


Figure 4.

DRIFTS spectra of raw aged iron ore (AIO) (A) and after the bio-reduction (B). • corresponds to carbonate vibrations, ◆ corresponds to goethite vibrations (doublet) and black arrow corresponds to hematite (a shoulder and a band).

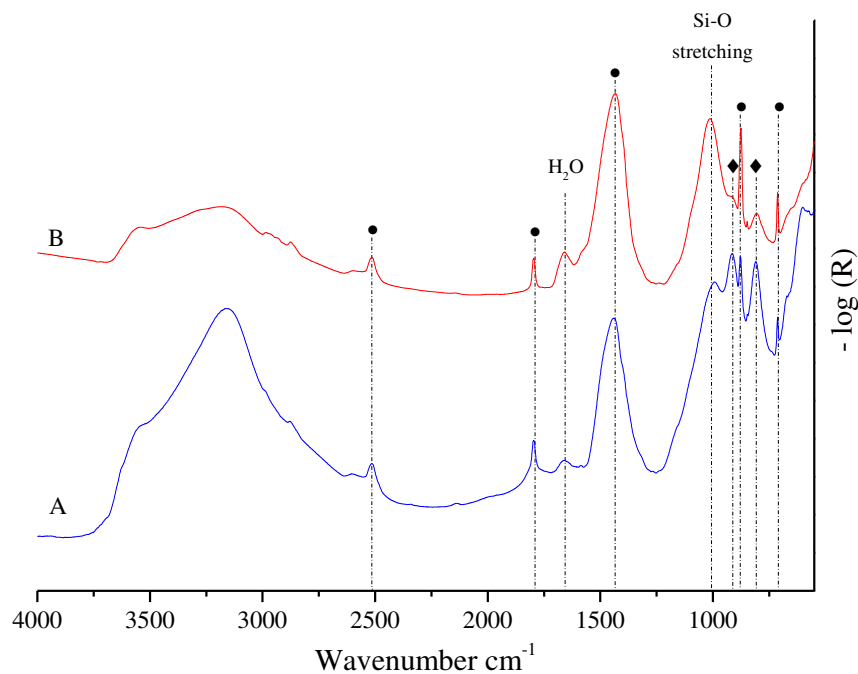


Figure 5.

DRIFTS spectra of raw intact iron ore (IIO) (A) and after the bio-reduction (B). • corresponds to carbonate vibrations, ◆ corresponds to goethite vibrations (doublet).

As mentioned earlier, the relative intensity of the goethite doublet in DRIFTS analysis decreased whereas the carbonate main band increased (asymmetric internal stretching mode, 1440 cm^{-1} , Huang and Kerr, 1960; Dubrawski *et al.*, 1989). The observation of the in-plane bending vibration (713 cm^{-1}) enabled us to determine the carbonate bearing phase (calcite, siderite or ankerite), as proposed by Huang and Kerr (1960) (illustrated in Fig. S2). However, like with raw samples (see section 3.1), the calcite band in AIO after bioreduction probably hid the siderite and/or ankerite vibrations. Nonetheless, Mössbauer data showed an increase of the Fe(II) phase (from 0% to 7%, Table 1) which suggests that the Fe(II) phase formation is strongly associated to the reduction of goethite. This Fe(II) phase was not clearly identified by TMS, but the hyperfine parameters are similar to the geologic siderite present in a siderite rock sample (CS = 1.39 mm/s, QS = 2.13 mm/s vs CS = 1.35 mm/s, QS = 2.06 mm/s, at 77 K, see Table S1). At 10 K, the bioreduced AIO however presents two octets identified as Fe(II) phase (Fig. 2c) while the siderite rock sample presents one octet at 8 K (Fig. 9). TEM analysis allowed us to characterize this new-formed Fe(II) phase as a “poorly crystalline” precipitate, with crumpled paper-like shape (Fig. 6f). These crumpled paper-like crystals cover a large amount of goethite grains (referred as crumpled paper therein) (Fig. 6b). The EDX analysis on this Fe(II) precipitate gives atomic and weight ratios close to the formula of siderite. So, this Fe(II) phase is probably co-precipitated with carbonate ions.

Two ferrous carbonates other than siderite could be considered: ankerite and chukanovite ($\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$). The ankerite exhibits by TMS at 12 K a paramagnetic doublet (De Grave and Votchen, 1985), whereas all the Fe^{2+} sites of AIO are magnetically ordered (Fig. 2c). Moreover, to our knowledge, ankerite has never been reported as a secondary mineral from iron bioreduction, contrary to chukanovite (Kukkadapu *et al.*, 2005; Ona-Nguema *et al.*, 2009; Sergent *et al.*, 2011; Jorand *et al.*, 2013). By DRIFTS, chukanovite can be discriminated from siderite and calcite by two major bands at 1525 and 1350 cm^{-1} (Remazeilles and Refait, 2009), such bands were not found in our spectra for bioreduced AIO; however they could be hidden by the calcite bands. Also, a TMS (at 10K) study on synthetic chukanovite (unpublished data) showed that, in spite of the presence of two octets of Fe(II), the value of CS, QS and H did not match with the octet of the formed Fe(II) phase. Thus, the Mössbauer parameters of the Fe(II) phases observed by bioreduction of goethite in iron ore do not necessarily correspond to chukanovite or siderite. We can only conclude on the basis of the Mössbauer and DRIFTS spectroscopies that there is a carbonate mineral containing an Fe(II) phase with probably Fe substitution phenomena with other divalent cations.

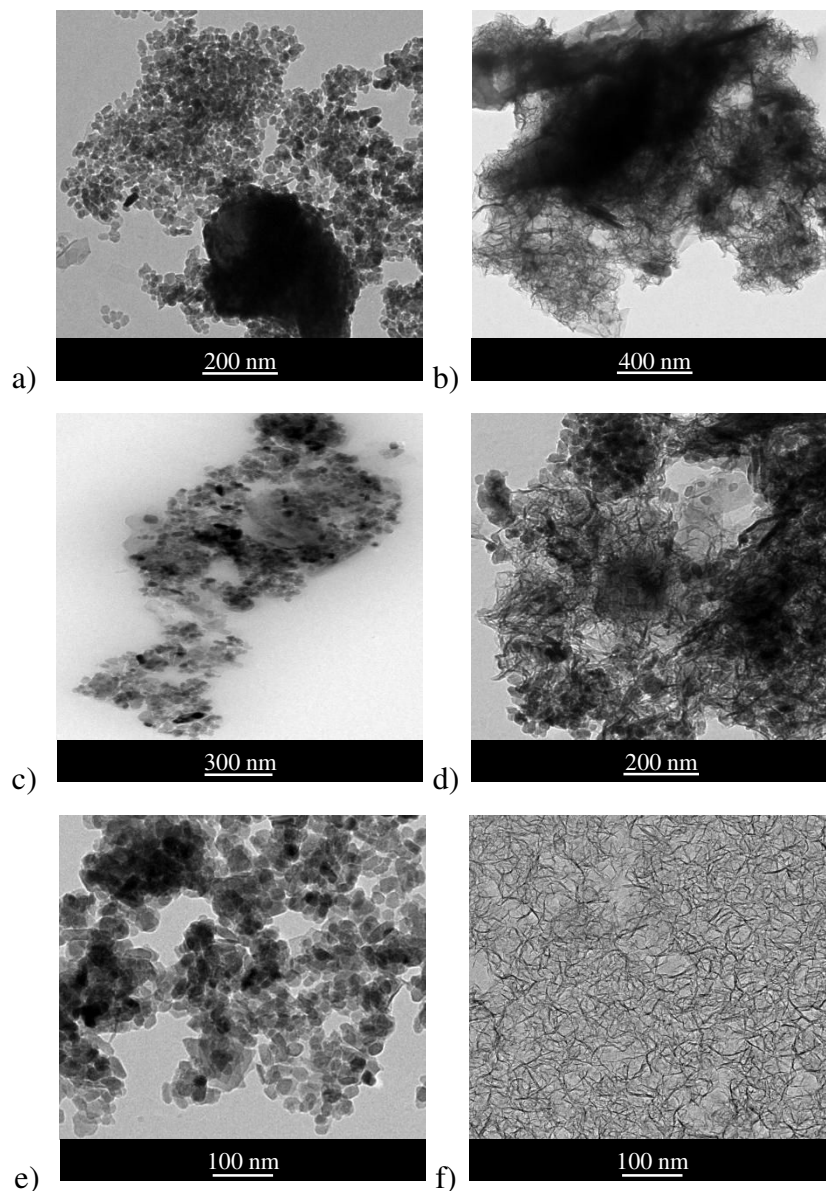


Figure 6.

Transmission electronic microscopy images of raw aged iron ore and raw intact iron ores (a) and (c), respectively; and the same ore after bioreduction by *Shewanella putrefaciens*, (b) and (d), respectively. Detailed views of goethite grains constituting the ore (e) and of crumpled paper-like crystals formed after the bioreduction (f).

Intact iron ore (IIO)

As with AIO, XRD analysis did not distinguish any significant difference between raw and bioreduced IIO (Fig. 3) even if the medium also darkened over time. From TMS, goethite was the only Fe(III) phase that decreased (from 81 to 59%, Table 1), thus goethite is also the main Fe(III) oxide phase reduced by *S. putrefaciens*. An Al-substitution of $0.279 \text{ mol mol}^{-1}$ (Al/(Al + Fe)) was calculated, which is higher than in the raw sample. The relative abundance of

berthierine and the other Fe(II) phase, which might be siderite (regarding the hyperfine parameters), increased significantly after bioreduction (from 7% to 13% and from 7% to 21%, respectively, Table 1). As with AIO, two octets corresponding to Fe(II) phases were detected at 9 K (Fig. 2d). Even if the hyperfine parameters are different from those obtained with geologic siderite, we cannot exclude these phases as siderite-like minerals (see Table S1), which we discuss further below.

3₁-4. Discussion

3₁-4-1- Iron reduction extent

Our data indicate that the iron-reducing bacterium *S. putrefaciens* was effective at reducing both the IIO and AIO and especially the goethite constituting these geologic materials. These results were unexpected since other reducible iron oxides, such as hematite or Fe(III)-bearing-clays, were present in the iron ore and were not significantly reduced. However, as previously shown with synthetic iron oxides, hematite was found to be significantly less reducible than goethite (e.g. Roden and Zachara, 1996) and we cannot rule out the possibility that some hematite was reduced but not detected by the analytical methods. Otherwise, another point already referred to in a previous study (Zachara *et al.*, 1998) remains questionable, namely, how do the microorganisms differentiate and isolate the iron oxides in a mixture of mineral phases and what controls the bioavailability of the Fe(III) in iron ore?

The microbial iron reduction extent of goethite in our iron ore samples was more than twice as high as for a synthetic goethite (~10% of the total iron). This matches with literature data showing that geologic iron oxides were more, or at least equivalently, bio-reducible than their synthetic counterparts (Table 2). Zachara *et al.* (1998) found that up to 65% of iron oxide (goethite) from subsurface sediments was reduced by *S. putrefaciens*, while for synthetic goethite only 9% was reduced. The present report shows that Fe(III) in iron ore exhibits similar “behaviour” to that of other geologic iron oxides as regards to bacterial reduction.

Several hypothesis to explain such discrepancies between synthetic and geologic Fe³⁺ oxides are proposed and discussed below: i) SSA and solubility; ii) Al-substitution, and iii) sorption of Fe(II) on the active site.

3₁-4-1-1- Solubility and specific surface area

The different reactivity levels of natural and synthetic Fe(III) oxides could be due to a difference in bio-availability of the Fe(III). That would signify that the Fe(III) in a mixture of several mineral phases is more available for microbial reduction than in a pure phase (synthetic goethite). If most of the oxides are available for bioreduction (Weber *et al.*, 2006), a hierarchy of "bioreducibility" was evidenced in the following order (from the most to the least reducible): hydrous ferric oxide ~ 6 line-ferrihydrite > lepidocrocite > goethite > hematite (Zachara *et al.*, 1998; Hansel *et al.*, 2003; Bonneville *et al.*, 2009). SSA was proposed as a factor influencing the bioreduction extent (Roden and Zachara, 1996). However, BET theory is only valid for a single-phase sample. Thus, it is not relevant to consider SSA data between synthetic and geologic goethite within a heterogeneous iron ore. One would expect that Fe(III) in goethite associated with the oolithe in the iron ore is less accessible to bacteria than in synthetic iron oxide. Larsen and Postma (2001) and Bonneville *et al.* (2009) proposed that the solubility of the Fe(III) oxides - rather than SSA - is the main factor governing chemical and microbial iron reduction, respectively. We have not attempted to determine the solubility of the geological goethite in iron ore as this would require a full study and to our knowledge there is no data on this. In addition, the crystal morphology and size, which are expected to differ between synthetic and geologic oxide (Cornell and Schwertmann, 2003), could also contribute to their chemical reactivity.

3₁-4-1-2- Al-substitution

The evidence of isomorphous iron/aluminium substitutions found in the goethite of the iron ores, corresponded to 0.248 and 0.251 mol mol⁻¹ (Al/(Al + Fe)) for IIO and AIO, respectively. Al-substitution was supposed to affect the Fe(III) oxide reactivity (Zachara *et al.*, 1995). However there is controversial data in the literature about the effect of Al-substitution on the reduction of Fe(III) oxides. For example, Boussherine *et al.* (1999) showed that Al-substituted goethite was reduced less than pure goethite, and similar results were obtained on Al-substituted magnetite (Jentzch *et al.*, 2007). Other authors have reported that natural/synthetic Al-substituted goethite was not bioreduced differently from synthetic Al-free goethite (Kukkadapu *et al.*, 2001; Ekstrom *et al.*, 2010). The slight difference in Al-substitution between AIO and IIO does not seem to explain the difference in the extent of the reduction, as well as the different extents of reduction between natural and synthetic goethite, which is Al-

free (data not shown). Furthermore, the Al-substitution rate is related to the crystal size of iron oxides (Cornell and Schwertmann, 2003). Cutting *et al.* (2009) observed using a synthetic goethite mineral that a good correlation exists between the crystal size and the initial rate of Fe(III) reduction. By examining the mean crystal size (coherent domains) of AIO and IIO from XRD analyses, calculated in accordance with the Scherrer equation (Barthélémy *et al.*, 2012), geologic goethite is nano-crystalline (29.4 ± 0.6 nm). This structure could induce more reactivity than synthetic goethite (53 ± 0.5 nm) and this could partially explain the different extents of bioreduction of synthetic and geologic iron oxide.

3₁-4-1-3- Sorption of Fe(II)

Fe(II) sorption or precipitation on Fe(III) sites of synthetic Fe(III) oxides were shown to influence the extent of Fe(III) bioreduction and especially the end of the bioreduction reaction which was found to occur earlier than the theoretical prediction when Fe(II) sorption on Fe(III) sites is significant (Fredrickson *et al.*, 1998; Urrutia *et al.*, 1999; Roden and Urrutia, 1999; Liu *et al.*, 2001, Hansel *et al.*, 2004). In the case of geologic oxides, surfaces other than iron oxides could adsorb the Fe(II). Indeed, Urrutia *et al.* (1999) showed that sorption of Fe(II) on aluminium oxides and layered silicates, instead of on Fe(III) sites, enhanced the bacterial reduction. Both AIO and IIO are made up of silicate minerals such as quartz (tectosilicate) and berthierine (phyllosilicate) as shown by TMS (Table 1, Fig. S1 and Table S1). The adsorption properties of mineral surfaces, depending of the point of zero charge (PZC) (Kosmulski, 2001), are influenced by pH and surface precipitates which could affect the Fe(III) bioreduction (Shimizu *et al.*, 2013). Considering the PZC of quartz (< 5), some clay minerals (smectite, montmorillonite, kaolinite with PZC < 6) or pyrex glass (~4) (Kosmulski, 2001), minerals other than Fe(III) oxides could exhibit negative surface charge to adsorb biogenic Fe(II) at circumneutral pH.

3₁-4-2- Biomineralization of iron ore

Several parameters have been described as influencing or controlling the nature of the secondary Fe(II)-bearing mineral obtained from Fe(III) bioreduction. These are for example - the nature and relative concentration of ions in the medium, the cell density and/or organic polymers, the nature of the Fe(III) species and electron donor (Fredrickson *et al.*, 1998; Zachara *et al.*, 2002; Zegeye *et al.*, 2005; O'Loughlin *et al.*, 2010; Sergent *et al.*, 2011; Jorand

et al., 2013; Zeng and Tice, 2014). Indeed, regarding the low phosphate concentrations ($\sim 7 \mu\text{M}$), no vivianite could have significantly precipitated. The formation of magnetite or green rusts from bioreduction of goethite has never been reported to our knowledge and only siderite was indicated as the result of goethite bioreduction (Liu *et al.*, 2001; Ona-Nguema, 2003). Sulfate ($\sim 9 \text{ mM}$) and alkaline pH were reported to inhibit magnetite formation (Zachara *et al.*, 2002; Behrends and Van Cappellen, 2007) and, on the contrary, the high cell concentrations and alkaline pH would promote siderite formation (Fredrickson *et al.*, 1998, Zachara *et al.*, 2002), which is the case in our experiments. Liu *et al.* (2001) reduced goethite to siderite with 30 mM of HCO_3^- , and Roh *et al.* (2003) obtained siderite from akaganeite with the same concentration of HCO_3^- . In the present study, since no carbonate was added in the SMW (the incubation medium), only the oxidation of formate, the organic electron donor, could significantly provide carbonate for the formation of siderite. Thus, the stoichiometry of the reduction of Fe(III) by formate indicates a ratio of two Fe(III) ions per formate, by considering a reduction of 20-26 % of the Fe(III) in the iron ore suspension (containing 16 or 28.3 mM of Fe(III) for AIO and IIO, respectively), we can expect the production of 2 to 3 mM of carbonate, available for siderite. Most studies have reported that siderite precipitates with a cubic (Fredrickson *et al.*, 1998; Roh *et al.*, 2003, Zeng and Tice, 2014), disc-like shape or flake (Roh *et al.*, 2003) or pseudorhomboidal shape (Liu *et al.*, 2001) in the presence of a relatively large amount of carbonate (30 mM) or Ca^{2+} (10 mM). In the SMW, where salt concentrations of Ca^{2+} and CO_3^{2-} were much more lower (e.g. $\text{Ca}^{2+} < 1.7 \text{ mM}$), the “siderite” obtained had the appearance of crumpled paper, suggesting a flake-like shape of the crystals. This could be related to the lack of the counter ions such as Ca^{2+} or CO_3^{2-} .

Giving the various hyperfine parameters of the siderite paramagnetic doublet in the literature depending the temperature (Sawicki and Brown, 1998; Fajardo *et al.*, 2004), it is necessary to go below the transition phase (Néel temperature (T_N): 38 K; Forester and Koon, 1969; Sawicki and Brown, 1998), in order to obtain a precise spectrum of siderite. The Mössbauer signature of a geologic siderite and of a geologic siderite associated with a biofilm (Forester and Koon, 1969; Sawicki and Brown, 1998) are close to the Mössbauer data of the rock siderite sample used as reference (Table S1). However, for AIO and IIO, after bioreduction, two Fe(II) octet sites were obtained in both cases (Fig. 2, Table S1 [Annexe 1]). As previously seen, compared to the rock siderite sample, the hyperfine parameters are slightly different (Table S1 [Annexe 1]). To conclude, we cannot state unambiguously that the secondary mineral obtained from the bioreduction of the iron ore was siderite, but we can claim that this phase is a ferrous carbonate.

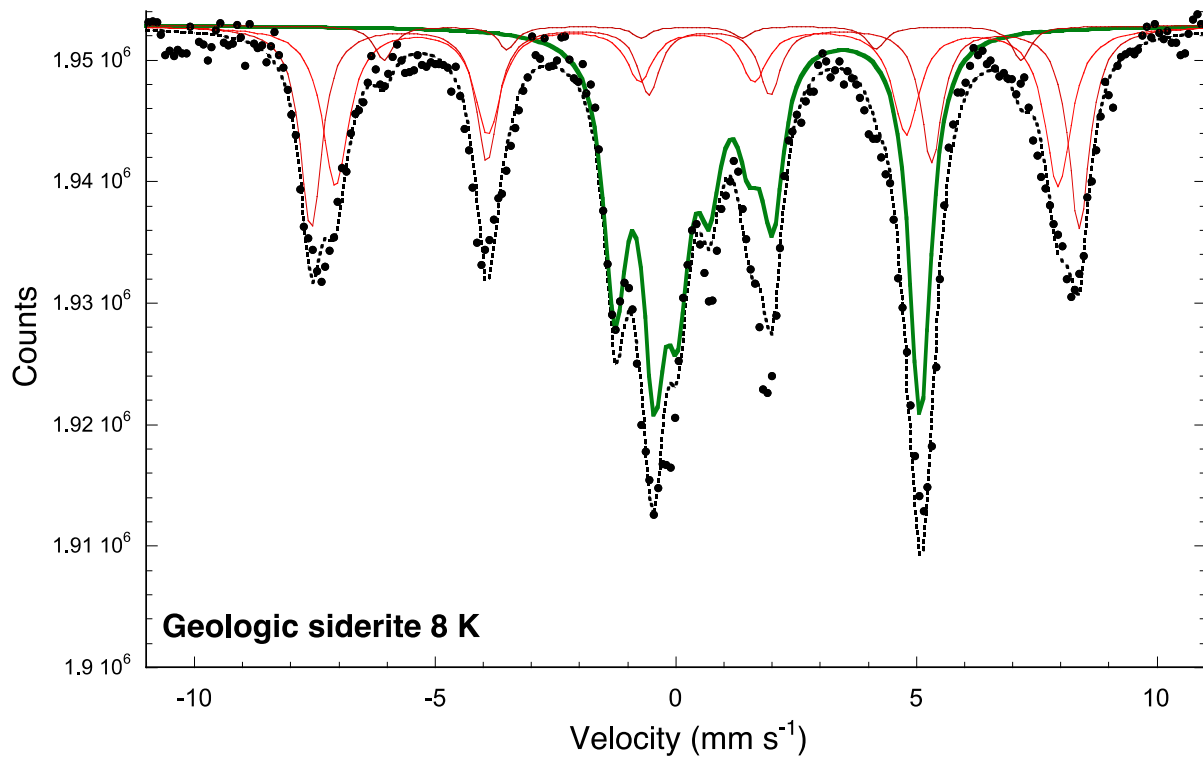


Figure 9.

Mössbauer spectrum at 8 K of the rock sample used as geologic reference for siderite. Legend: black circle = experimental data, dashed line = total calculated fit, solid green line = siderite, red thin solid lines = goethite.

3₁-4-3-. Implications for underground iron mines

The mineralogical ageing of iron ore (rock forming pillars) during mining which corresponds to an alteration (i.e. oxidation of inter-oolitic siderite) triggered by chemical and biochemical processes under oxidizing mine atmosphere, was found to result in the decrease in inter-oolitic cohesion (due to the loss of siderite cement) and mechanical strength. This is probably one of the main mechanisms responsible for the mine collapses. The local government thought that mine flooding (i.e. anoxic conditions) would stop this ageing (i.e. oxidation) process. To gain a clearer understanding of mine flooding consequences, we explored the potential impact of chemoorganotrophic bacteria (under anoxic conditions) on the reduction of Fe(III) oolitic goethite and/or Fe(III) inter-oolitic hematite.

This work clearly showed that IRB metabolism could combine oxidation of the organic matter (around 1 mg L⁻¹ in mine water) with the reduction of the Fe(III) oxides (essentially goethite) contained in iron ore as an electron acceptor, thus inducing neoformation of a siderite-like mineral. The metabolic groups of IRB and sulfate reducing bacteria were known to be present

in the underground iron mines (from enrichments in specific growth media where the sole electron acceptor available to sustain growth was Fe(III) or sulphate; data not shown). It is worth emphasizing that sulphate reducing bacteria could also contribute to an indirect Fe(III) reduction *via* biogenic sulphide (Canfield, 1989), this bacterial activity needs to be addressed in a future study in order to consider the effect of biogenic sulphur in iron ore transformation. In our study, bio-chemo-mineralogical reactions were obtained in rock powders to intensify their reactivity but also to facilitate sampling and analysis. The kinetics for solid rock samples should probably be greatly slower. In addition, according to the size of pillars in iron mines (about 20 m large), the impact of microbial reduction on the whole pillar structure will depend on: i) the time elapsed since mine flooding (at the very end of the 20th century), which is longer than the experimental time in the laboratory but shorter than the geological time which allowed the diagenetic links between oolites and inter-oolitic siderite to ensure the iron ore (inter-oolitic) cohesion; ii) the bacterial capacity to diffuse through fractures or macro-pores and react in all the oxidised parts of the pillar. We therefore consider that the IRB reduction of Fe(III) oxides (essentially goethite) in iron ore can potentially produce a siderite-like mineral and extend through the whole pillar. Regarding the IRB reduction in a micro-niche and on a long time scale, a neo-formed mineral may crystallize, which is commonly observed in geological/soil environments, and may supersede diagenetic links and give iron ore back the inter-oolitic cohesion it lost during the ageing/oxidizing process. Indeed, the impact of neo-mineralization of a siderite-like mineral (through biochemical processes) on the inter-oolitic cohesion and mechanical strength of iron ore pillars is a key point for the evaluation of the long-term stability of underground iron mines (under anoxic conditions). However, additional investigations will be needed to ensure whether this siderite-like mineral could really rebuild a cement able to improve the stability of iron ore pillars. Micro-mechanical (indentation tests) and macro-mechanical (short- and long-term compressive tests) characterizations on intact and aged iron ore, before and after bioreduction, need to be carried out to assess the mechanical properties of iron ore and indeed, these mechanical studies are in progress.

3₁-5. Conclusion

The bioreduction extent of intact and aged iron ore by an iron-reducing bacterial model (*S. putrefaciens*) reached 20% and 26%, respectively (6 N HCl extraction method). XRD diffractograms did not show any difference in mineralogical composition after bioreduction and therefore DRIFTS and TMS analyses were used. DRIFTS clearly showed a decrease of

goethite after bioreduction, which was confirmed by TMS (decrease of about 20%). Concomitantly, an Fe(II) carbonate phase increased proportionately. TMS (at low temperature: below 38 K) clearly showed an octet site (barely observed in DRIFT spectra). TEM images showed a poorly crystallized Fe(II) carbonate phase with a crumpled paper-like shape covering a large amount of goethite grains. The structural disorder explains the absence of this newly formed Fe(II) phase in the XRD diffractograms. Thus, natural goethite in iron ore is a potential electron acceptor for DIRBs and is more reduced than chemically synthesized oxides (probably because of nano-crystallinity of goethite and all “impurities” within iron ore) and the final mineralogy is complex since the biomineralized Fe(II)-carbonate phases were not clearly identify, even with TMS.

In the future could the neo-formed phase (through biochemical processes) give iron ore back the inter-oolitic cohesion it lost during the ageing/oxidizing process and strengthen iron ore pillars in underground mines? This is indeed a key point concerning the estimation of the long-term stability of underground iron mines (under anoxic conditions). Mechanical tests on aged and intact iron ore, before and after bioreduction, are in progress to assess the impact of bioreduction on mechanical properties.

Acknowledgements

This research was carried out thanks to subsidies from the Lorraine Region. The authors express their gratitude to these public authorities. The authors thank Dr Sébastien Naille and Aurélien Renard (LCPME, Nancy, France) for the crystal size calculations and the BET analysis. The authors are grateful to Professor Andreas Kappler and Dr Emily Denise Melton (University of Tübingen) for their advice to improve the Fe(II) and Fe_{TOT} measurements. Finally, we thank Simon Poulton (Leeds University) for proof-reading the manuscript.

3.2 Impact des sulfures biogénérés par les bactéries sulfato-réductrices sur les minerais de fer intacts et vieillis ainsi que divers autres oxydes de fer.

3₂-1- Introduction

L'impact des sulfures est principalement connu dans les phénomènes de corrosion (Enning *et al.*, 2012), où l'enjeu économique est de taille. En effet, le coût engendré par la corrosion issue des sulfures (d'origine biologique ou chimique) a été estimé à 2 à 3% du PIB des pays développés (Enning and Garrelfs, 2014). Les sulfures biogénérés sont issus de la réduction des sulfates (SO_4^{2-}) par les bactéries sulfato-réductrices (BSRs). Ces microorganismes ne sont pas tributaires de la seule réduction des sulfates. Ils sont capables de métaboliser un grand nombre d'acides organiques comme source de carbone (e.g. lactate, acétate, pyruvate, succinate, glycérol, ...) ou d'électrons d'origine inorganique (H_2 , CO_2) et réduire divers accepteurs d'électrons (SO_4^{2-} , NO_3^- , O_2 ...) (Barton and Tomei, 1995). Les BSRs sont capables d'interagir avec des métaux lourds (Hg^{2+} , Cr(IV) , SeO_3^{2-} , Barton and Tomei, 1995), des radionucléides (U(VI), Lovley *et al.*, 1993) ou encore le pétrole (Magot *et al.*, 2000). Ces bactéries sont également capables de déchlorination (Warner *et al.*, 2002). Ces procaryotes très adaptables sont retrouvés au sein de nombreux environnements tels que les sédiments marins ou d'eau douce, les pipelines, les dorsales océaniques, ... (Muyzer and Stam, 2008). Par conséquent, retrouver de tels microorganismes au sein des mines est envisageable. L'eau de mine de Lorraine est riche en sulfates ($\sim 1,5 \text{ g L}^{-1}$) ce qui en fait un environnement viable pour les BSRs. Or les sulfures produits métaboliquement par les BSRs, *via* la sulfato-réduction sont des espèces fortement réductrices ($E^0 (\text{SO}_4^{2-}/\text{HS}^-)$, pH 7, 25°C) = - 0,217 V, Johnson and Hallberg, 2008). Ainsi, dans un environnement riche en minerai de fer composé entre 80% (minerai intact) et 95% (minerai vieilli) de Fe(III), les réactions potentielles entre Fe (III) et HS^- sont très importantes. Diverses études ont cherché à comprendre les mécanismes liés à la réduction des oxydes de Fe(III) par les sulfures. Des études menées sur les sulfures chimiques et les oxydes de Fe(III) ont montré que la réaction est dépendante de la surface spécifique de l'oxyde ainsi que du pH (Dos Santos Afonso *et al.*, 1992; Peiffer *et al.*, 1992). De plus, la surface des oxydes de Fe(III) au sein des deux minerais de fer est disponible pour les bactéries ferri-réductrices (Maitte *et al.*, 2015). Par conséquent, des composés chimiques comme les sulfures devraient aussi réagir avec les minerais de fer. De plus, le pH neutre de l'eau de mine favoriserait cette réaction (Peiffer *et al.*, 1992). Un consensus est retrouvé dans la littérature scientifique sur les minéraux formés lors de la réduction du Fe(III) par les sulfures. Un précurseur FeS est formé qui se transforme rapidement en mackinawite ou pyrrhotite déstructurée et instable (Wilkins and Barnes, 1996; Neal *et al.*, 2001). Ces dernières se transforment ensuite en greigite puis en pyrite (FeS_2)

(Wan *et al.*, 2014). Néanmoins, pour que cette transformation $\text{FeS} \rightarrow \text{FeS}_2$ se réalise, des polysulfures sont nécessaires (Wilkins and Barnes, 1996). Ces derniers sont produits lors de l'oxydation des sulfures (Pyzik, 1981).

L'objectif de ce chapitre est de connaître la réactivité des minerais de fer vis à vis des BSRs et de la comparer à celle des oxydes synthétiques (lépidocrocite et goethite) ainsi qu'à celle d'une hématite naturelle. L'intérêt est de connaître les éventuels minéraux formés suite à la réaction. En effet, ces derniers pourraient éventuellement modifier la résistance mécanique du minerai de fer au sein des piliers de soutien.

3₂-2-Matériels et méthodes

3₂-2-1- Enrichissement des bactéries sulfato-réductrices

L'eau de mine, riche en sulfate ($\sim 1,5 \text{ g L}^{-1}$) et en carbone organique ($\sim 1,5 \text{ mg L}^{-1}$), est un habitat potentiel pour les bactéries sulfato-réductrices. C'est pourquoi des cultures d'enrichissement ont été réalisées. Un inoculum d'eau de mine a été utilisé. Celui-ci a été recueilli à partir d'un ancien puits d'aération (250 m de profondeur) sur le site de Bassompierre (57, France). Il a été introduit (5% v/v) dans le milieu de croissance DSMZ 63 composé de (par litre) : 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de NH_4Cl , 1 g de Na_2SO_4 , 1 g d'extrait de levures, 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 2 mL de DL-Na-Lactate (80%). La croissance s'est déroulée en 1 mois environ. L'activité des BSR se traduit par la présence de précipités noirs de FeS (Fig. 1). La même expérience a été réalisée avec l'eau de surface en provenance des galeries du premier niveau mais sans résultats. Le repiquage des souches à partir du flacon d'enrichissement nécessite 5 à 10 jours d'incubation (30°C et à l'obscurité), même après 1 an de stockage. Le "consortium minier" a été utilisé afin de représenter les métabolismes sulfato-réducteurs présents au sein de l'eau de mine.



Figure 1: Photographies des flacons d'enrichissement des bactéries sulfato-réductrices. A gauche, le milieu inoculé avec de l'eau de mine (galerie du premier niveau) et à droite, avec l'eau du puits d'aération (-250 m). La formation d'un précipité noir (FeS) caractérise la réduction des sulfates en sulfures, et s'accompagne d'une odeur caractéristique de soufre (œuf pourri).

3₂-2-2- Matériaux utilisés pendant les différentes expériences

Différents matériaux ont été utilisés lors des incubations avec le consortium minier. Les deux minerais de fer (vieilli et intact) ainsi qu'une roche identifiée par spectrométrie infrarouge à réflexion diffuse en tant qu'hématite et à la couleur rouge caractéristique (Fig. 2A). L'hématite possède un ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}} < 1\%$. Une goethite de synthèse (Fig. 2B, synthétisée selon la méthode proposée par Schwertmann and Cornell, 2000) ainsi que de la lépidocrocite de synthèse (Fig. 3, synthétisée selon la méthode proposée par Ona-Nguema *et al.*, 2002) ont également été utilisées.

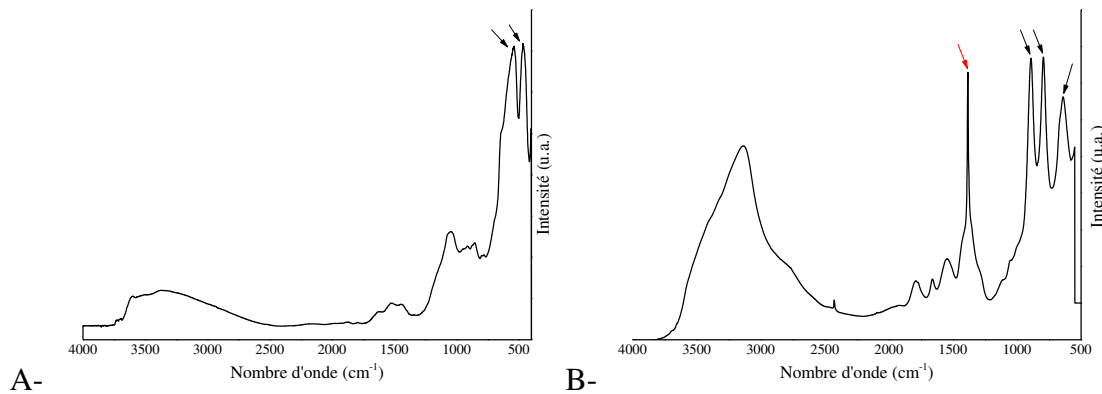


Figure 2: Spectres infrarouges en réflexion diffuse. (A) Hématite naturelle où les deux pics indiqués par des flèches (467 et 537 cm^{-1}) sont caractéristiques de l'hématite (Cornell and Schwertmann, 2003). (B) Goethite de synthèse avec trois pics caractéristiques (flèches noires) à 640 , 795 et 890 cm^{-1} (Cornell and Schwertmann, 2003). La flèche rouge (1382 cm^{-1}) représente les nitrates provenant de l'acide nitrique qui a servi à retirer le plus grand nombre possible d'ions carbonates (Miller and Wilkins, 1952).

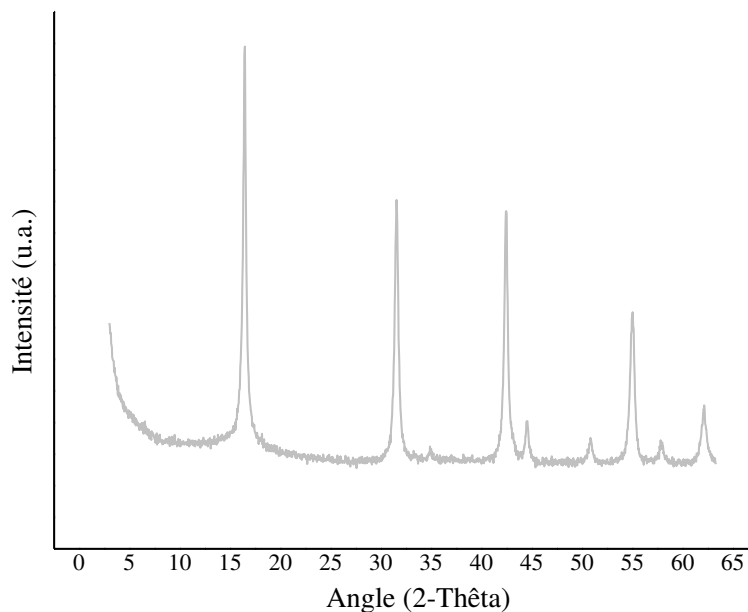


Figure 3: Diffractogramme de la lépidocrocite de synthèse.

3₂-2-3- Incubation des BSRs avec les minéraux

3₂-2-3-1- Pré-culture

La suspension des flacons d'enrichissement (après 3 repiquages successifs) a été utilisée comme inoculum afin d'ensemencer le milieu DSMZ 63, sans Fe(II), et supplémenté avec 30 mM de pyruvate (CH₃COCOONa).

3₂-2-3-2- Mise en place des incubations

Deux cent cinquante milligrammes de minerai de fer intact, vieilli, d'hématite ou de lépidocrocite (100 mg de goethite) ont été mélangés à 80 mL de milieu M_{SWM} (voir composition Chapitre 2), complémenté de 30 mM de pyruvate et d'une solution d'éléments traces et de vitamines (voir le Chapitre 2 pour la composition). La suspension a été ajustée à pH 7. Cinq millilitres de l'inoculum ont été injectés afin d'obtenir une concentration finale d'environ 3×10⁶ bactéries mL⁻¹. Chaque essai a été réalisé en duplicat. Deux témoins abiotiques contenant les minerais intact et vieilli ont été ensemencés avec un inoculum inactivé par la chaleur (121°C pendant 15 min). Chaque essai a été placé à 30°C et à l'obscurité.

3₂-2-4- Expériences de réduction avec les sulfures chimiques

Des expériences abiotiques ont été réalisées pour observer les interactions entre les minéraux et les sulfures chimiques. Les suspensions sont composées de 100 mg de minéraux et 80 ml de milieu M_{SWM} (pH 7). Une solution de 0,5 M de Na₂S•9H₂O a été additionnée pour obtenir des concentrations finales à 7 et 50 mM. Les flacons sont placés à 30°C et à l'obscurité. Après environ 15 jours d'incubation, les flacons ont été analysés.

3₂-2-5- Analyses chimiques et physico-chimiques

Le dosage du fer a été réalisé par la méthode de la ferrozine décrite dans le Chapitre 2. La méthode de dosage des sulfates, sulfites et thiosulfates par HPIC y est également décrite ainsi que les analyses du solide (DRIFT, DRX, MET). La spectrométrie Raman a également été utilisée en suivant la méthode décrite par Carteret *et al.* (2013). La longueur d'onde à 532 nm a été utilisée.

3₂-3- Résultats

3₂-3-1- Réaction entre les minéraux et les sulfures d'origine chimique

A pH 7, les sulfures sont majoritairement sous forme de H₂S et HS⁻ (pKa = 7). En présence d'oxyde de Fe(III) la réaction est spontanée et forte (Peiffer *et al.*, 1992). Il est intéressant d'observer l'aspect des différents oxydes après l'ajout de la solution de Na₂S. Alors que la lépidocrocite semble être solubilisée avec un aspect vert-bleu sombre, la goethite, l'hématite et les deux minerais de fer ont flocculé (Fig. 4). Cet aspect floconneux a entraîné d'importantes difficultés d'échantillonnage, notamment au regard de l'homogénéité de l'échantillon prélevé.



Figure 4: Photographie des flacons de réactions avec les sulfures chimiques avec la goethite (à gauche) et l'hématite naturelle (à droite). Les flocons sont difficiles à disperser, il est donc difficile d'obtenir un aliquot homogène à la seringue.

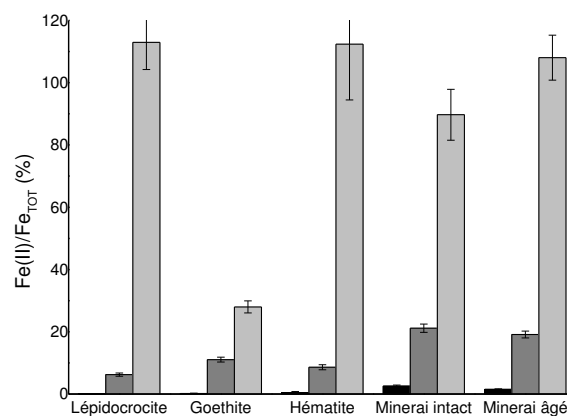


Figure 5: Réaction entre la lépidocrocite, la goethite, l'hématite naturelle, le minerai intact et le minerai vieilli et les sulfures: colonnes noires - valeurs initiales; colonnes gris foncé - 7 mM de Na₂S; colonnes gris clair - 50 mM de Na₂S.

Les trois oxydes de fer ont été réduits par les sulfures chimiques (Fig. 5). Il faut noter que le ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ du minerai intact initial est assez éloigné de son ratio habituel (5% vs 15-20%). Cette valeur a été confirmée par un second dosage. Il faut également noter que la réduction entraînée par 50 mM de sulfures doit être interprétée avec précaution. En effet les écarts-type sont importants ce qui est sans doute lié à l'échantillonnage difficile dû à la floculation des solides (Fig. 5).

3₂-3-2- Réaction entre les minéraux et les sulfures biogénérés par les BSRs

Les sulfures biogénérés ont été capables de réduire les différents oxydes de Fe(III) (~ 80%) et les deux minerais de fer (~ 60%) (Fig. 7). La réduction du Fe(III) s'accompagne parallèlement d'une diminution de la concentration en sulfates et en thiosulfates, ces derniers ayant été consommés entièrement en quelques jours. Les témoins négatifs n'ont pas été réduits, confirmant ainsi que les sulfures sont à l'origine de la réduction.

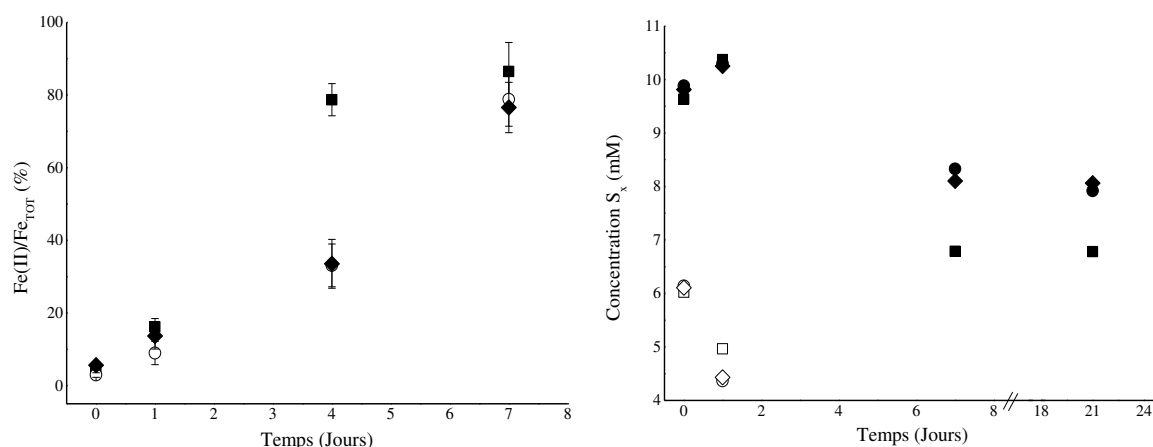


Figure 6: (à gauche) Évolution du ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ lors des incubations entre la lépidocrocite (■), la goethite (○) et l'hématite (◆) et les BSRs. Après 21 jours, le ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ mesuré est supérieur à 100% dans les 3 cas, et ce sur 2 mesures. (à droite) Suivi des concentrations des sulfates (SO_4^{2-} , symbole noir) et des thiosulfates ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, symbole blanc) avec la lépidocrocite (carré), de la goethite (rond) et de l'hématite (losange). *Il faut noter que du thiosulfate a été détecté dans les incubations. Ce dernier provient de la solution de pyruvate mais son origine précise est inconnue. En effet, aucun thiosulfate n'a été mesuré dans une nouvelle solution de pyruvate synthétisée à partir des mêmes produits.*

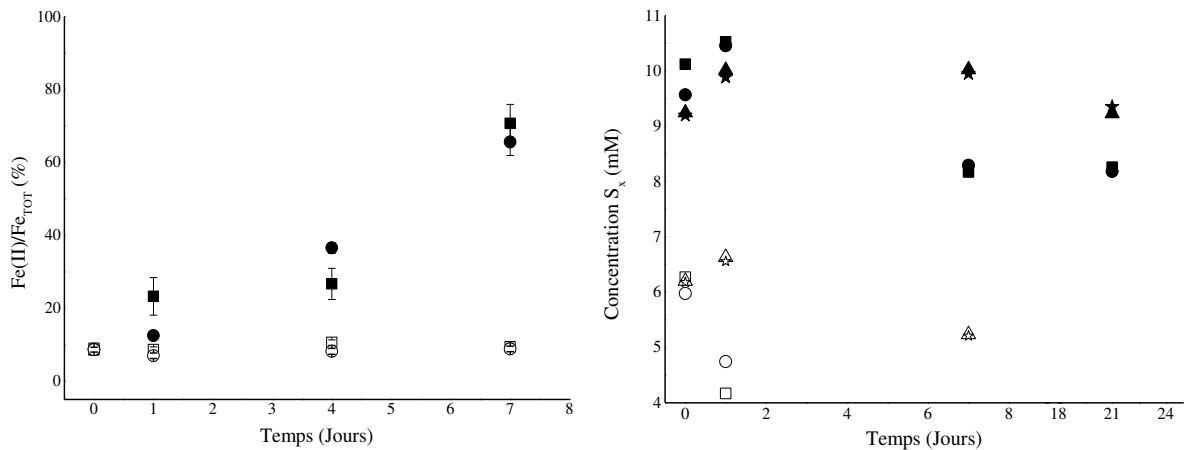


Figure 7: (à gauche) Évolution du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} lors des incubations entre le minerai intact (■), le minerai vieilli (●) et leurs témoins abiotiques respectifs (□ et ○) avec les BSRs. Après 21 jours, le ratio Fe(II)/Fe_{TOT} mesuré est supérieur à 100% dans les 2 cas, et ce sur 2 mesures. (à droite) Suivi des concentrations des sulfates (SO₄²⁻, symbole noir) et des thiosulfates (S₂O₃²⁻, symbole blanc) avec le minerai intact (carré) et son témoin abiotique (triangle) ainsi que le minerai vieilli (rond) et de son témoin abiotique (étoile). Il faut noter que du thiosulfate a été détecté dans les incubations. Ce dernier provient de la solution de pyruvate mais son origine précise est inconnue. En effet, aucun thiosulfate n'a été mesuré dans une nouvelle solution de pyruvate synthétisée à partir des mêmes produits.

3₂-3-3- Altération minéralogique des oxydes de fer par les BSRs

Seules l'hématite naturelle, la goethite et la lépidocrocite ont été analysées par spectrométrie Raman et DRX (sauf l'hématite naturelle) (Fig. 8 à 10). Comme vu au Chapitre 3-1, les analyses par spectrométrie infrarouge et DRX ont données des résultats mitigés pour les minerais de fer intacts et vieillis. En effet, les modifications minéralogiques n'ont été déterminées qu'à l'aide de méthodes plus spécifiques telle que la spectroscopie Mössbauer. C'est pourquoi seuls les oxydes de fer synthétiques ainsi que l'hématite naturelle ont été analysés.

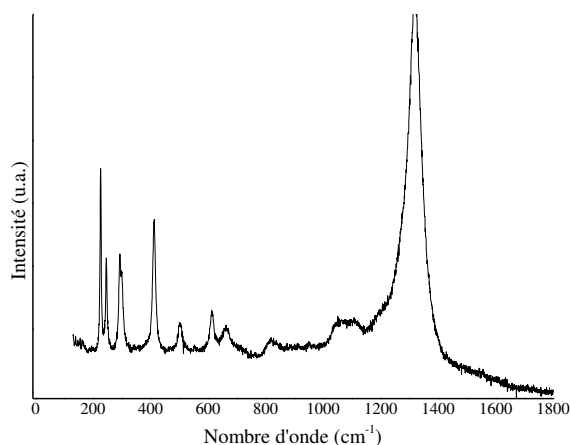


Figure 8: Spectres Raman de l'hématite naturelle incubée avec les BSRs. Tous les pics observés sont caractéristiques de l'hématite (Das and Hendry, 2011).

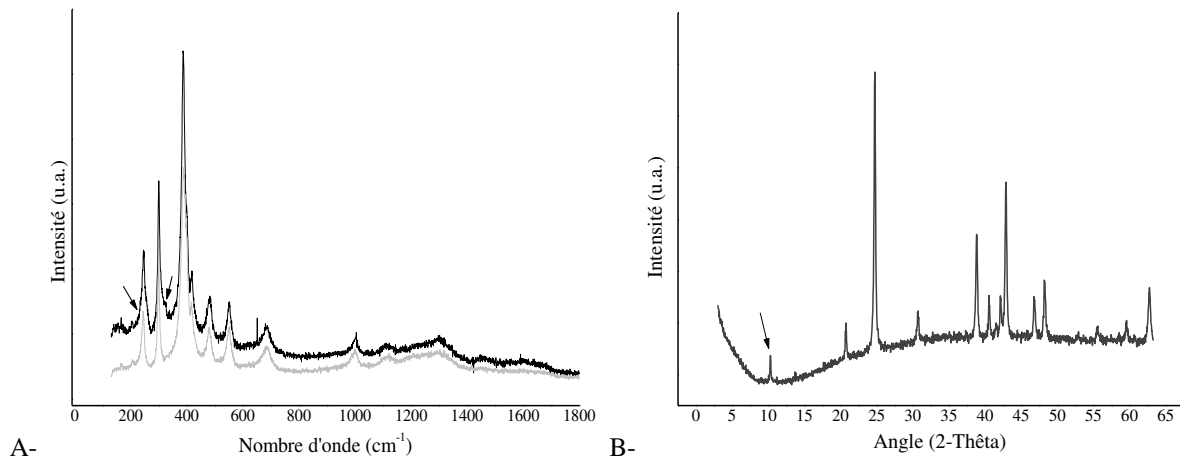


Figure 9: (A) Spectres Raman de la goethite synthétique avant incubation (en gris) et après incubation (en noir) avec les BSRs. La seule différence apparente provient d'un élargissement à la base des pics indiqué par les flèches noires (244 cm^{-1} et 300 cm^{-1}). Tous les pics observés sont caractéristiques de la goethite (Das and Hendry, 2011). (B) Diffractogramme de la goethite après incubation avec les BSRs. Hormis le pic indiqué par la flèche ($d= 0,989\text{ nm}$), il n'y a pas de nouvelle phase minérale formée au cours de la réduction (Cornell and Schwertmann, 2003).

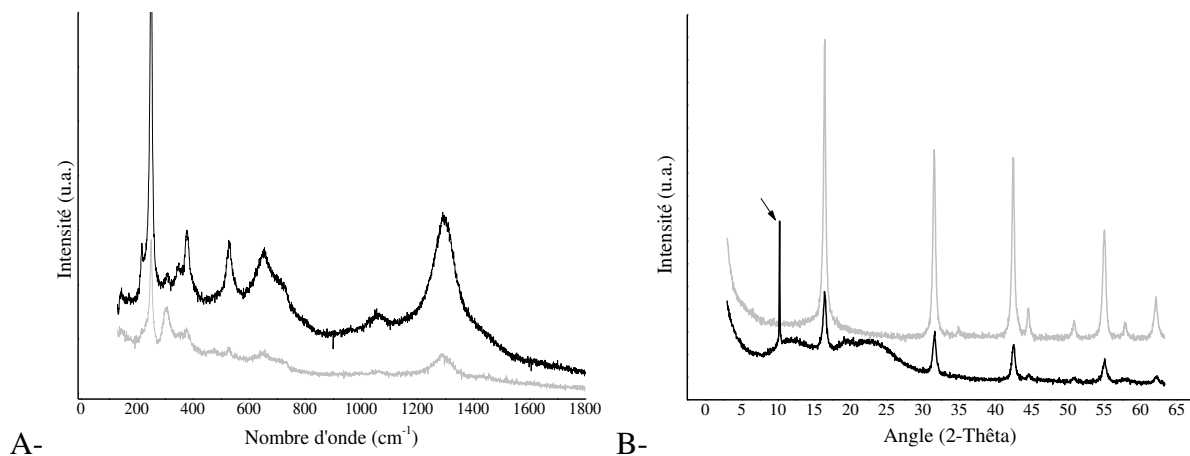


Figure 10: (A) Spectres Raman de la lépidocrocite de synthèse incubée avec les BSRs (en gris) comparé à son homologue avant incubation(en noir). Il est clairement observable que de nombreux pics caractéristiques ont fortement diminué en intensité. Néanmoins il n'y a pas de nouveaux pics formés. (B) Diffractogramme de la lépidocrocite avant (en gris) et après (en noir) incubation avec les BSRs. Hormis le pic indiqué par la flèche ($d= 0,992\text{ nm}$), il n'y pas de nouvelle phase minérale formée au cours de la réduction.

L'hématite naturelle est représentée par 6 bandes majoritaires ($222, 230, 290, 408, 490$ and 607 cm^{-1} , Das and Hendry, 2011) qui sont toutes présentes dans la Figure 8. Au vu de l'importante réduction qui a eu lieu ($> 60\%$, Fig. 6), la formation d'une phase minérale Fe-S a été envisagée. Or, aucun nouveau pic qui pourrait appartenir à un nouveau minéral n'a été détecté. Des conclusions similaires ont été faites pour la goethite de synthèse (Fig. 9). En effet, par

spectrométrie Raman, seul un élargissement à la base des bandes à 244 cm^{-1} et 300 cm^{-1} a été constaté, les autres pics restant caractéristiques de la goethite (Fig. 9A, Das and Hendry, 2011). Cet élargissement pourrait être dû à la formation d'une phase amorphe à la surface des grains. Sur le diffractogramme (Fig. 9B), un seul pic n'appartenant pas à la goethite a été identifié ($d= 0,989\text{ nm}$). Cependant l'identification d'un seul et unique pic est impossible car ce dernier ne représente qu'une seule face du cristal du nouveau minéral formé (communication personnel du Dr. Isabelle Bihannic, LIEC, Nancy). Or, la finesse de la raie montre que ce minéral est très bien cristallisé. Une approximation peut être faite sur la kornélite ou la laurenite dont l'une des raies se situe à environ $d= 0,989\text{ nm}$ (Ling *et al.*, 2009). Il est tout de fois curieux de constater que, pour un même échantillon, une analyse montre une probable phase amorphe alors que l'autre analyse montre une phase plutôt cristallisée. La même raie a été détectée sur le diffractogramme de la lépidocrocite après incubation ($d = 0,992$, Fig.7B). De plus, l'intensité des pics du spectre Raman de la lépidocrocite après réduction est amoindrie (Fig. 7A). En revanche il n'y a toujours pas de nouvelles bandes après réduction qui serait caractéristique d'un autre minéral. Ainsi, malgré l'importante réduction des oxydes de Fe(III), la spectrométrie Raman et la diffraction aux rayons X n'ont pas permis de détecter la formation de nouvelles phases minérales. Afin de déterminer la raison du changement de spectre Raman de la lépidocrocite, des analyses par XPS ont été réalisées.

32-3-4- Analyse des expériences lépidocrocite- H_2S et lépidocrocite-SRB par XPS

L'analyse des spectres XPS de la lépidocrocite permet d'obtenir différentes informations selon qu'elle a été réduite chimiquement ou biologiquement. C'est l'analyse du pic $\text{Fe}2p_{3/2}$ qui est considérée principalement.

La lépidocrocite est caractérisée par une liaison Fe(III)-O à 711 eV (Mullet *et al.*, 2002). Lorsqu'elle est réduite par les sulfures chimiques, il a été constaté un déplacement du pic $\text{Fe}2p_{3/2}$ vers une plus basse énergie de liaison (Fig. 11). Un pic majeur a été détecté à $710,6\text{ eV}$ ce qui est caractéristique d'une liaison Fe(III)-S (Mullet *et al.*, 2002). Sur ce même pic, un épaulement significatif à $707,7\text{ eV}$ a été observé. Il est assimilé à une liaison Fe(II)-S (Neal *et al.*, 2001). Les espèces sulfureuses présentes à la surface des grains de lépidocrocite ont également été analysées. Deux pics associés au monosulfide, S^{2-} , et un pic associé au sulfite, SO_3^{2-} ont été détectés ($160,3$, $161,6$ et $167,7\text{ eV}$ respectivement, Fig. 12). Ainsi, un minéral

fer-soufre a été formé durant la réduction par les sulfures chimiques. Ce minéral pourrait être de la mackinawite (Mullet *et al.*, 2002) ou de la pyrrhotite (Neal *et al.*, 2001).

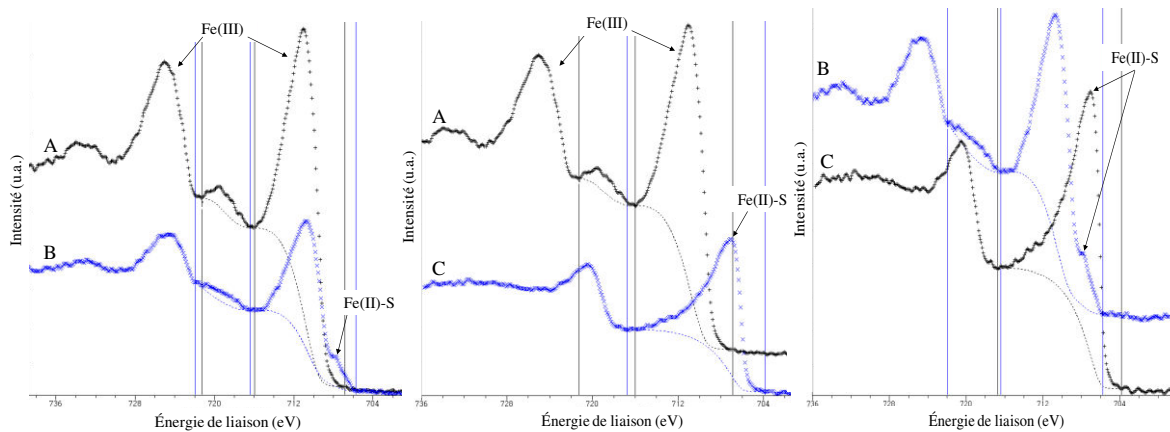


Figure 11: Comparaison deux à deux des spectres obtenus par XPS de la lépidocrocite (A), de la lépidocrocite après réaction avec les sulfures chimiques (B) ou les BSRs (C). Les deux pics représentent les électrons éjectés des atomes de fer: $Fe2p_{1/2}$ à gauche et $Fe2p_{3/2}$ à droite. Entre les deux se trouve le pic satellite. La valeur du pic $Fe2p_{3/2}$ sert à identifier la nature de l'atome auquel il est lié. Pour (A), l'énergie de liaison est de 711 eV soit une liaison Fe-O et de 707,7 et 706,8 eV pour (B) et (C) respectivement soit une liaison Fe(II)-S (Mullet *et al.*, 2002).

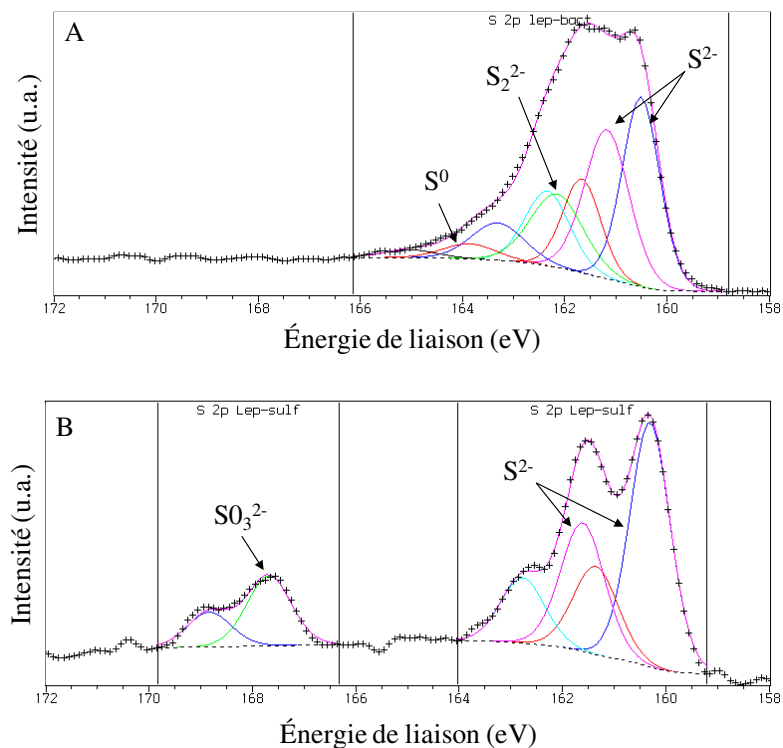


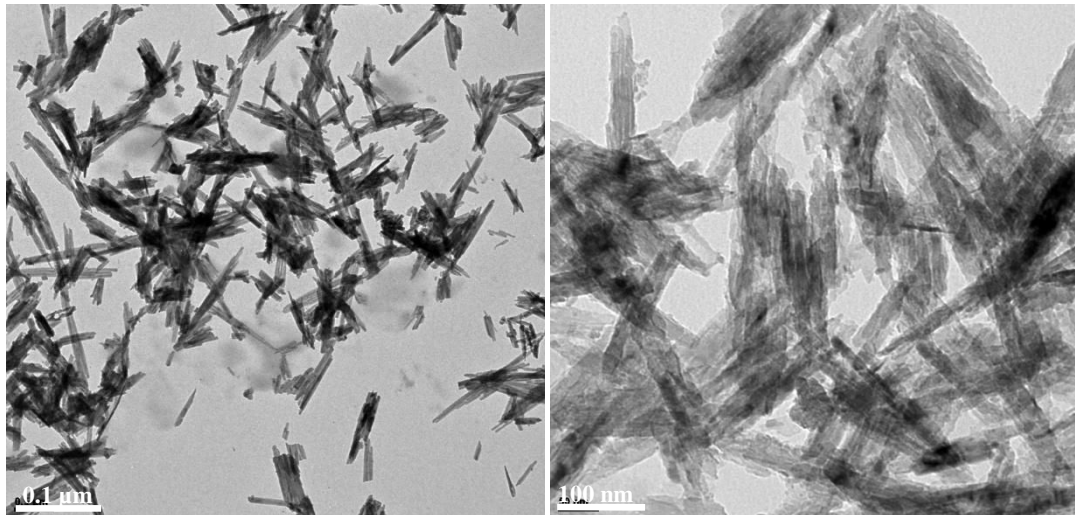
Figure 12: Déconvolution du spectre $S2p$ correspondant à l'élément soufre. Le cadre A correspond aux espèces sulfurées retrouvées à la surface de la lépidocrocite lorsqu'elle a réagit avec les BSRs et avec les sulfures chimiques dans le cadre B. Les flèches indiquent les pics des différentes espèces pour le signal $S2p_{3/2}$ avec pour répartition : S^{2-} 75%, S_2^{2-} 21% et S^0 4% (A) et S^{2-} 83% et SO_3^{2-} 17% (B).

En revanche, en présence des BSRs, les pics $Fe2p_{1/2}$ et $Fe2p_{3/2}$ ont été déplacés vers de plus faibles énergies de liaisons, 720,5 et 706,8 eV respectivement, indiquant que la réduction semble totale à la surface des grains analysés (Fig. 11). L'énergie du pic $Fe2p_{3/2}$ a été identifiée comme une liaison Fe(II)-S (Mullet *et al.*, 2002). L'analyse de la déconvolution du signal $S2p$ (Fig. 12) a montré que l'ion S^{2-} est l'espèce ionique dominante (160,5 et 161,1 eV). Il a également été retrouvé du disulfure (S_2^{2-} , 162,1 eV) et du soufre élémentaire (S^0 , 163,9 eV). Contrairement à la réaction avec les sulfures chimiques, la transformation observée à la surface de la lépidocrocite est difficile à caractériser (Pratt *et al.*, 1994b; Neal et al., 2001; Mullet *et al.*, 2002). Une étude comparable de Herbert *et al.* (1998) a montré que le sulfure de fer formé aurait une composition similaire à la greigite mais composé de mackinawite déstructurée.

3.2-3-5- Observation au microscope électronique à transmission (MET) de la lépidocrocite après réaction biotique et abiotique

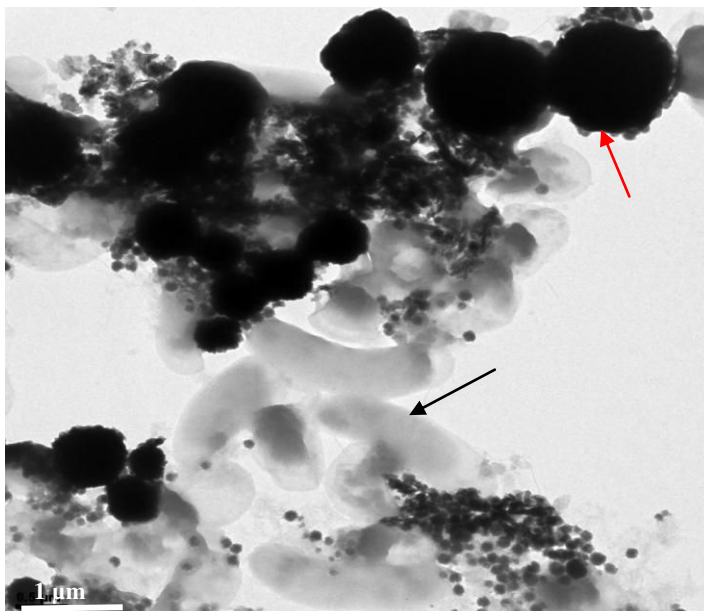
Plusieurs analyses MET ont été réalisées afin de compléter les analyses Raman et XPS sur la lépidocrocite réduite chimiquement et *via* les BSRs. Il est important de noter que les analyses Raman ont été réalisées en juillet 2014, les analyses XPS en Septembre-Octobre 2014 et les analyses MET en mars 2015. Les minéraux à base de sulfures, sont relativement instables dans le temps, la pyrite exceptée (Herbert *et al.*, 1998). Il faut donc être précautionneux quant à l'interprétation et l'association des divers résultats. En effet, la réaction a pu évoluer.

La réduction par les sulfures chimiques, malgré l'évolution positive du ratio $Fe(II)/Fe_{TOT}$ (Fig.5), n'a pas été suivie par des modifications minéralogiques visibles de la lépidocrocite. Seule une petite quantité de soufre a été détectée à la surface des aiguilles de lépidocrocite dont l'aspect est clairement "rongé" (Fig. 13). En revanche, après incubation avec les BSRs, différentes phases minérales distinctes ont été observées. La majorité des minéraux formés suite à la réduction sont des globules de pyrite (Fig. 14). D'autres minéraux fer-soufre ont été observés: de la cattierite (CoS_2) ou de la jamborite ($Ni_{2+1-x}Co_{3+x}(OH)_{2-x}(SO_4)_x \cdot nH_2O$ où [$x \leq 1/3$; $n \leq (1-x)$]) (Fig. 15A), de la pyrrhotite ($Fe_{0,89}S$) (Fig. 15B) et de la sphalerite (ZnS) ou de la wurtzite (ZnS) (Fig. 15C). Zinc, cobalt et nickel pourraient provenir de la solution d'éléments traces qui a été ajoutée au milieu de culture.



Elément	P%	A%
O	35,54	59,69
Si	11,50	11,00
S	3,95	3,31
Fe	45,16	21,73

Figure 13: Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de la lépidocrocite avant réduction par les sulfures chimiques (à gauche) et après réduction chimique (à droite). Après réduction les aiguilles sont comme "rongées". L'analyse EDS (Tableau) montre que très peu d'atome S sont présents à la surface des aiguilles (A%, % d'atomes et P%, % de masse des atomes) (auteur B. Maitte).



Elément	P%	A%
O	0,77	1,94
Si	1,92	2,76
S	46,40	58,46
Fe	50,91	36,83

Figure 14: Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de la lépidocrocite après réduction par les BSRs (auteur B. Maitte). La flèche noire indique une bactérie et la flèche rouge de la pyrite. Le tableau ci-dessus est le résultat de l'analyse EDS sur le globule noir indiqué par la flèche. Le ratio Fe/S, 1/3 - 2/3 (A%, % d'atomes en nombre, et P%, % de masse d'atomes en masse), oriente l'identification vers la pyrite (Hellige *et al.*, 2012).

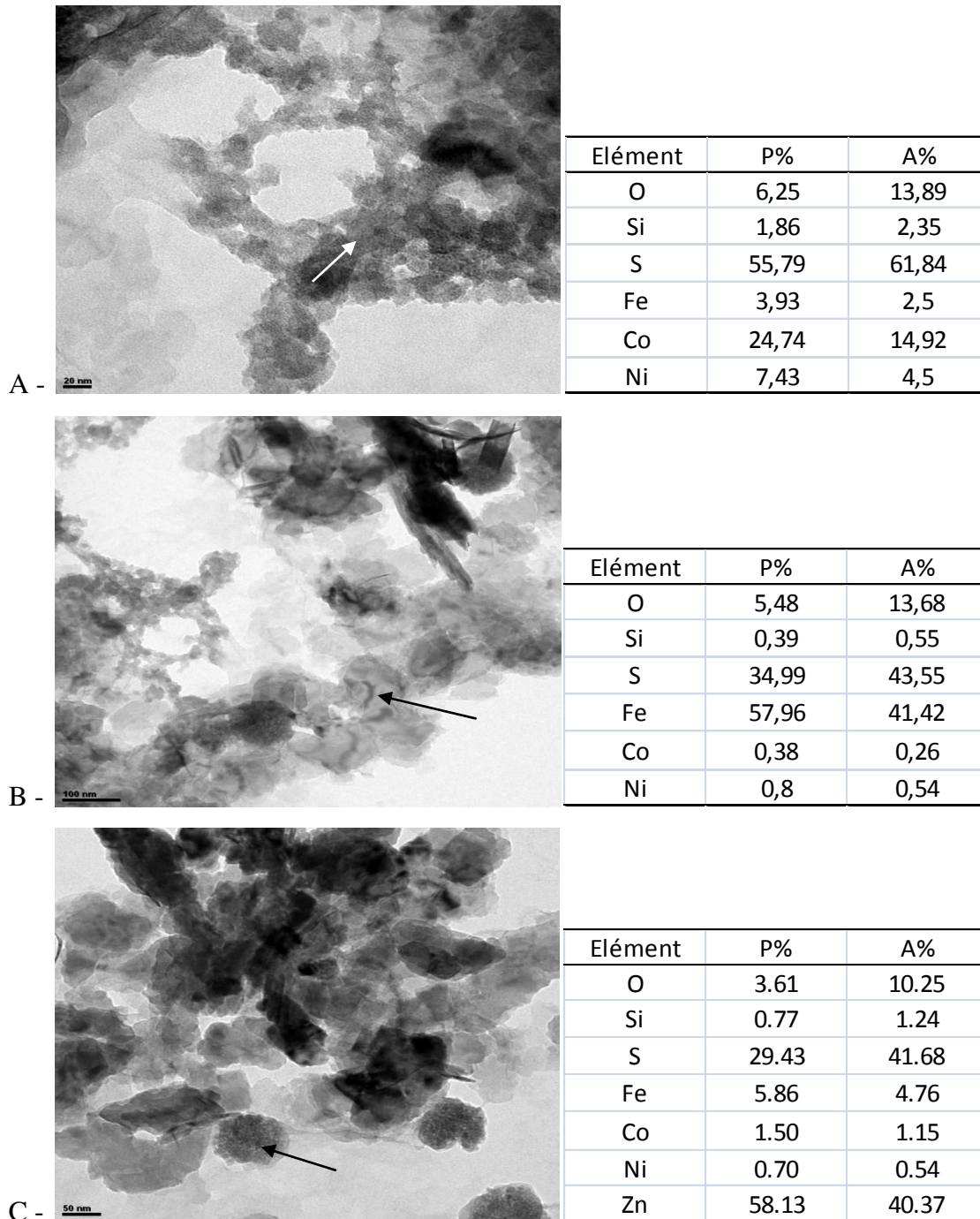


Figure 15: Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de la lépidocrocite après réduction par les BSRs (auteur B. Maitte). Différents minéraux, autres que la pyrite ou la lépidocrocite, ont été observés. Les tableaux à droite des photos représentent les résultats des analyses des sondes EDS sur les minéraux indiqués par les flèches. (A) pourrait être de la cattierite (CoS_2) ou jamborite ($\text{Ni}_{2+1-x}\text{Co}_3+x(\text{OH})_2-x(\text{SO}_4)_x \cdot n\text{H}_2\text{O}$ où $[x \leq 1/3; n \leq (1-x)]$). (B) pourrait être de la pyrrhotite ($\text{Fe}_{0,89}\text{S}$). (C) pourrait être de la sphalerite (ZnS) ou wurtzite (ZnS).

3₂-4- Discussion

3₂-4-1- Impact des sulfures sur le dosage Fe(II) / Fe_{TOT}

Les résultats obtenus par la méthode de dosage par la ferrozine ont parfois été surprenants. En effet, le ratio a pu parfois dépasser les 100 % (e.g. 160%, Fig. 5, lépidocrocite). La question a été posée de savoir si les sulfures ont la capacité d'altérer le dosage comme certains autres ions divalents (e.g. Cu²⁺, Stookey, 1970). Dans ce cadre, 50 mM de sulfures ont été ajoutés à une extraction acide de Fe(III) ainsi qu'aux gammes étalons de Fe(II) et Fe_{TOT}. Aucune déviation n'a été observée. Ces résultats sont en accord avec Li *et al.* (2004, 2006). Les sulfures n'induisent pas de biais lors du dosage du Fe(II) et du Fe_{TOT}.

3₂-4-2- Réactions des sulfures chimiques avec le Fe(III).

Les deux concentrations en sulfures utilisés montrent des résultats différents. Avec 7 mM de sulfures, une réduction d'environ 20% a été observée sur les minerais de fer et 8% en moyenne pour l'hématite naturelle, la goethite et la lépidocrocite. Li *et al.* (2006) ont observé des résultats similaires avec de la goethite et de l'hématite de synthèse. En revanche, avec une concentration de 50 mM la réduction a été totale. Wan *et al.* (2014) ont obtenus des résultats similaires avec de la goethite et de la lépidocrocite. Ces auteurs ont également démontré l'importance du ratio Fe/S pour expliquer le taux de réduction mesuré. En effet, pour un ratio Fe/S > 1 la réduction a été de 16% pour la goethite et 9% pour la lépidocrocite alors que pour un Fe/S < 1 la réduction a été totale (Wan *et al.*, 2014). Les résultats obtenus ici sont en accord avec ces auteurs car pour 7 mM de sulfures (ratio Fe/S ~ 2) la réduction a été de 11% pour la goethite et 6% pour la lépidocrocite. De plus, la réduction a été totale avec 50 mM de NaS₂ soit Fe/S = 0,3. Malgré une formule brute identique, goethite et lépidocrocite ont montré une réactivité différente vis à vis des sulfures. Ceci est dû au fait que la réaction entre Fe(III) et S(-II) est contrôlée par la surface de l'oxyde de fer : la surface spécifique de la lépidocrocite est supérieure à celle de la goethite (Pyzik and Sommer, 1981; Peiffer *et al.*, 1992). Ceci est valable pour d'autres oxydes de fer (Dos Santos Afonso et Stumm., 1992 ; Poulton *et al.*, 2002). Il a également été constaté que peu importe l'oxyde de départ, la séquence de formation des minéraux fer-soufre reste la même : mackinawite → greigite/pyrrhotite → pyrite (Wilkins and Barnes, 1996). La mackinawite formée à partir du précurseur FeS est souvent instable et se transforme rapidement en greigite ou pyrrhotite. La pyrite se forme ensuite par perte des ions Fe(II) (Wilkins and Barnes, 1996; Hellige *et al.*, 2012). Les sulfures

sont unanimement oxydés en S^0 et polysulfures; ces derniers étant les précurseurs indispensables pour la formation de la pyrite (Peiffer et al., 1992; Hellige *et al.*, 2012; Wan et al., 2014). Au regard des clichés MET, aucun nouveau minéral n'a été formé malgré 1 an de réaction. Li et al (2006) et Hellige et al (2012) ont également remarqué qu'aucun nouveau minéral n'a été formé après la réduction. En revanche ils ont observé un aspect différent des cristaux de lépidocrocite ou goethite dont les aiguilles sont raccourcies et plus étalées. La présence de nano-mackinawite a été démontrée sur les bords des différents cristaux (Hellige *et al.*, 2012).

Pour conclure sur les taux de réduction observés, une nette différence a été constatée entre la réduction du Fe(III) par les sulfures d'origine biologique par rapport aux sulfures d'origine chimique. En effet, d'après Cypionka (1995), la réduction de 1 mole de sulfate donne 1 mole de sulfure et la réduction de 1 mole de thiosulfate donne 0,5 mole de sulfures. Par conséquent, dans l'expérience avec le minerai intact, environ 6 mM de sulfures biogénérés ont réduit environ 60% du Fe(III) disponible alors que 7 mM de sulfures d'origine chimique n'ont réduit qu'environ 10% du Fe(III) provenant du minerai de fer. La différence principale est la présence des bactéries dont les membranes sont connues comme des "catalyseurs", augmentant ainsi l'intensité de certaines réactions chimiques.

3₂-4-3-Réaction des sulfures biogénérés par les bactéries sulfato-réductrices avec le Fe(III)

Plus de 60% de réduction a été mesurée pour la goethite, la lépidocrocite et l'hématite naturelle. Ces résultats sont concordant avec de précédentes études (Peiffer *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2006). Les sulfures ont été biogénérés à partir des sulfates et des thiosulfates par la sulfato-réduction bactérienne. Les thiosulfates sont des produits intermédiaires de la réduction des sulfates en sulfures (Thauer *et al.*, 1977). Il a été constaté que les thiosulfates ont été consommés avant les sulfates. Ceci est dû au fait que l'activation de la réduction des sulfates chez les BSRs nécessite la consommation d'une molécule d'ATP alors que la réduction des thiosulfates n'en nécessite pas (Cypionka, 1995). Ils ont donc été réduits jusqu'à leur consommation complète. Il a été constaté une légère augmentation de la concentration des sulfates dans les premiers jours. C'est dû à la dismutation des thiosulfates en sulfates et sulfures par les BSRs, fournissant de l'ATP à ces dernières (Cypionka, 1995). Alors que les sulfures chimiques à une concentration de 7mM n'ont réduit qu'environ 20% du Fe(III) du minerai de fer, les sulfures biogénérés ont réduits ~ 65% du minerai de fer (intact et réduit)

pour une concentration calculée d'environ 6 mM. Les sulfures biogénérés sont donc plus efficaces que les sulfures chimiques pour réduire le minerai de fer ainsi que les oxydes de fer. Des résultats similaires ont été obtenus par Li *et al.* (2006). Ceci est certainement lié à la présence des bactéries qui pourraient alors être des sites catalytiques (membranes).

DRX et spectrométrie Raman ont été dans l'incapacité de décrire la nouvelle phase minérale formée après la réduction par les BSR. Ceci a également été le cas pour Neal *et al.* (2001) qui n'ont pu observer sur le diffractogramme de l'hématite réduites par les BSRs qu'un seul pic analysable et qui ne représente qu'une face des cristaux de pyrrhotite. Li *et al.* (2004) ont travaillé sur la réduction de la nontronite. Malgré une perte importante du signal de la nontronite en DRX après réduction, aucune nouvelle phase minérale n'a pu être décrite. Ainsi, peu de temps après la réaction, l'analyse des phases néoformées nécessite l'utilisation de méthodes analytiques visant l'atome tel que la spectroscopie Mössbauer ou l'XPS (Zegeye *et al.*, 2007). Cependant, plusieurs mois après l'incubation, les analyses MET ont bien montré la formation de globules de pyrites (Li *et al.*, 2006). Par conséquent, à l'échelle géologique et dans le cas des mines de Lorraine, la formation de pyrite via la sulfato-réduction est un phénomène envisageable.

3₂-4-4 Implications pour le minerai de fer et l'impact au niveau des mines

Vu la relative uniformité des résultats des études précédentes sur les sulfures chimiques ou biogénérés (Peiffer *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2004 et 2006; Wan *et al.*, 2014; Neal *et al.*, 2001; Zegeye *et al.*, 2007) et les résultats obtenus ici, il est possible d'extrapoler de manière relativement sûre l'évolution des minerais de fer en présence de BSRs au sein des mines. La goethite, oxyde de fer majoritaire des minerais de fer serait réduite de façon conséquente par les sulfures générés par la sulfato-réduction bactérienne. A terme, de la pyrite serait formée non seulement à la surface mais également au sein même de la roche compte tenu de la forte porosité du minerai de fer. L'impact sur la résistance mécanique du minerai de fer de la formation d'une telle phase minérale est certainement une étude intéressante à réaliser.

Il est nécessaire d'ajouter que la sulfato-réduction pourrait également changer la biochimie dans l'environnement immédiat des BSRs. En effet, la sulfato réduction entraîne la formation de S⁰ et de sulfures (H₂S) ce qui entrainerait une acidification locale du milieu (Cypionka, 1995). L'acidification peut favoriser le développement de bactéries modérément acidophiles

telles que *Acidithiobacillus ferroxydans* qui sont de plus capables d'oxyder le soufre élémentaire et de réduire le Fe(III) (Johnson and Hallberg, 2008).

4.1. Conclusion générale au chapitre 3

Dans ce chapitre, il a été démontré au cours des différentes incubations que les souches réductrices, directes ou indirectes, sont capables d'intéragir avec le Fe(III) présent au sein du minéral de fer, notamment la goethite, l'oxyde de fer majoritaire. Les taux de réduction observés sont différents entre les deux types de métabolismes. Les souches réductrices (IRB) telles que *S. putrefaciens* sont capables de réduire jusqu'à 25% du Fe(III) du minéral de fer. La réduction est d'intérêt métabolique pour la souche et elle nécessite soit un contact direct avec l'oxyde soit la sécrétion de navette à électron. En revanche, les BSR n'utilisent pas le Fe(III) pour des besoins métaboliques mais la réduction métabolique des sulfates va par contre produire des sulfures. Ces derniers sont les agents de la réduction de Fe(III) en Fe(II) au sein du minéral de fer. Le taux de réductions est d'environ 60%. La nouvelle composition minéralogique du minéral de fer suite à ces incubations a été recherchée. Les IRB vont entrainer la formation d'un minéral de type carbonate ferreux ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}_3$) proche de la sidérite. Ce minéral n'a pu être identifié formellement malgré les nombreuses analyses mise en oeuvre. En revanche, les BSR entraine la formation de la pyrite (FeS).

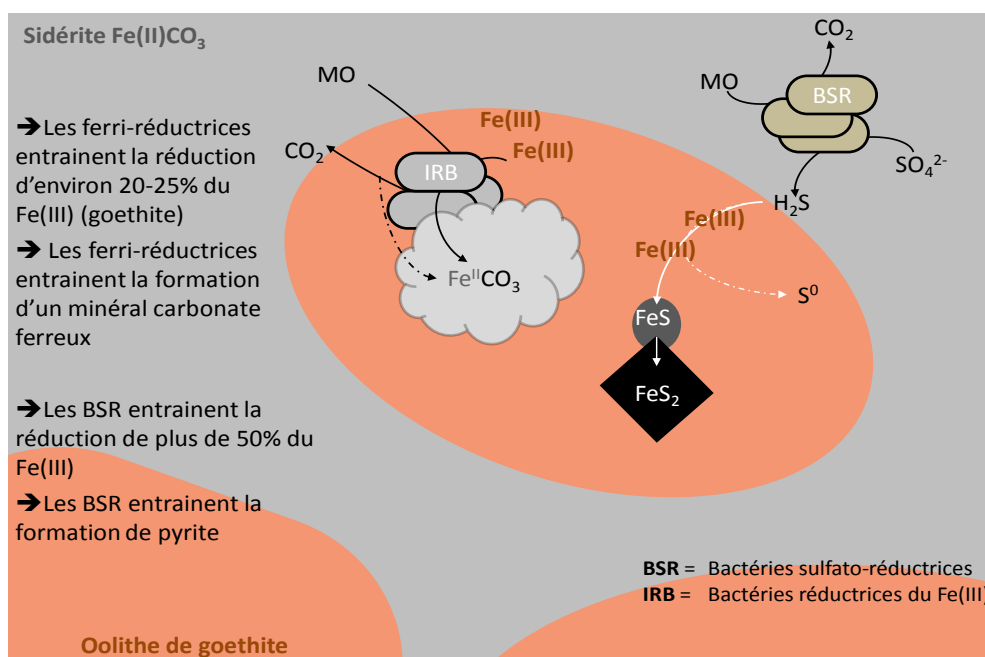


Figure 16 : Schéma des réactions de réductions biologiques potentielles au sein des mines de fer (auteur B. Maitte).

Chapitre 4 : Oxydation du minerai de fer intact et d'une roche de sidérite naturelle

4.1 Introduction

Les mines de fer de Lorraine sont riches en Fe(III) mais également en Fe(II). Si le Fe(II) est plus présent au sein du minerai de fer intact que du minerai vieilli, il est également présent dans la pyrite (FeS_2) des marnes intercalaires qui se retrouve entre chaque niveau de galerie (Grgic, 2001). La pyrite est aussi présente, mais en petite quantité, dans le minerai de fer (Grgic, 2001). A l'instar des bactéries ferri-réductrices, les mines de fer sont susceptibles d'accueillir des bactéries oxydantes du Fe(II). Les bactéries capables d'oxyder le Fe(II) sont regroupées en quatre groupes physiologiques (Hedrich *et al.*, 2011): les bactéries acidophiles (aérobies), les bactéries neutrophiles (micro-aérophiles), les bactéries réductrices des nitrates et les bactéries phototrophes (anaérobies). Parmi ces groupes, nous avons retenus deux souches de bactéries réductrices du nitrate : i) *Acidovorax sp.* souche BoFeN1, qui est censée coupler l'oxydation du Fe(II) à la réduction du nitrate (Kappler *et al.*, 2005), et ii) *Klebsiella mobilis*, une entérobactérie qui réduit le nitrate en nitrite mais qui n'utilise pas le fer pour des réactions dissimilatrice (i.e. en relation avec la production d'énergie). Une souche photo-oxydante : *Rhodospirillum rubrum* TIE-1 (Jiao *et al.*, 2005) a également été sélectionnée comme modèle de l'oxydation du Fe(II) bien qu'aucune lumière, ne parvient au sein des mines. Enfin, pour le groupe acidophile, c'est *Acidithiobacillus ferroxydans* qui a été retenu comme modèle, la présence de telles bactéries n'est pas à exclure au sein des mines, notamment dans les zones micro-aérobies riches en pyrite (Grgic, 2001).

Mises en évidence pour la première fois par Straub *et al.* (1996), les bactéries anaérobies, ferro-oxydantes réductrices des nitrates (IONRB pour *iron-oxidizing nitrate reducing bacteria*) ont été l'objet de nombreuses études jusqu'à aujourd'hui. En 2001, Weber *et al.* ont démontré que ces procaryotes sont capables de catalyser l'oxydation du Fe(II) minéral par les nitrates plus rapidement que les nitrites seuls. Les nitrites oxydent le $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$, le Fe(II) minéral (e.g. : rouille verte) ainsi que le Fe(II) sorbé sur un oxyde de Fe(III) (Sorensen and Thorling, 1991 ; Hansen *et al.*, 1994 ; Tai and Dempsey, 2009). L'oxydation du Fe(II) par les IONRB a été démontrée sur de la sidérite formée par coprécipitation (Na_2CO_3 - FeCl_2 , Rakshit *et al.*, 2008) ou encore sur une argile, la nontronite, préalablement bioréduite (Shelobolina *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Or la thèse de l'oxydation enzymatique du Fe(II) par les IONRB a récemment été remise en question, notamment par leur auteurs (Klueglein et Kappler., 2013 ; Klueglein *et al.*, 2013) et par Etique *et al.* (2014). D'une part il a été montré qu'une grande partie de l'oxydation du Fe(II) avait lieu en fait lors de l'extraction acide des minéraux que subissent les échantillons avant le dosage du fer, et n'était pas dû à une réaction enzymatique.

En effet, les nitrites, à pH acide, forment de l'acide nitrique, HNO_2 , qui se décompose spontanément en NO et N_2O . De fait, la consommation des nitrites s'en trouvait exacerbée, et la disparition des espèces azotées en gaz laissait penser à une véritable dénitrification. NO et N_2O sont des espèces azotées très réactives vis à vis du Fe(II), selon les équations suivantes (Nelson and Bremner, 1970 ; Klueglein et Kappler., 2013). D'autre part, la culture de *K. mobilis*, bactérie réductrice de nitrate (et non dénitrifiante) en présence de Fe(II), ou de bactéries dénitrifiantes, donnait les mêmes types d'encroûtement par des oxydes de Fe(III) par réactions des nitrite biogénérés (issus de la respiration des nitrate) avec le Fe(II), alors que les souches n'utilisaient pas le Fe(II) en tant que donneur d'électrons (Klueglein *et al.*, 2013 ; Etique *et al.*, 2014). Par ailleurs, la présence d'une source organique d'électrons endogène (e.g. glycogène) est suffisante pour conduire à des oxydations significatives de Fe(II), pouvant alors laisser croire, en absence d'un apport exogène de donneur d'électrons, à un métabolisme litotrophe (utilisation de donneur inorganique d'électrons). Il est tout à fait possible que ce soit aussi le cas avec BoFeN1.

La réaction entre les nitrites biogénérés et le Fe(II) a été souligné une première fois par Weber *et al.* (2001) mais, appuyé par une modélisation informatique ainsi que la non-oxydation d'une sidérite biogénique - exceptée par des nitrites biogénérés, l'influence de l'oxydation abiotique du Fe(II) avait alors été considérée comme négligeable lorsque des souches nitrate-dépendantes étaient présentes. Or, Carlson *et al.* (2013) ont démontré que la souche *Acidovorax ebreus* est bien capable d'oxyder enzymatiquement le Fe(II) en présence de nitrate, nitrite et d'oxyde nitrique (NO). Le Fe(II) soluble pénètre dans le périplasme de la cellule et interagit alors avec les protéines impliquées dans la respiration des nitrates. Les sites catalytiques impliqués restent cependant à déterminer. Dans le même temps, des réactions abiotiques se produisent à l'extérieur de la cellule entre le Fe(II) - soluble et minéral - et les espèces azotées produites par la respiration (NO_2^- et NO). Par conséquent, les nitrites biogénérés contribuent significativement à l'oxydation abiotique du Fe(II), mais on ne peut exclure définitivement l'existence d'une oxydation enzymatique du Fe(II) par les IONRB.

Pour les procaryotes phototrophes et les microorganismes acidophiles l'oxydation enzymatique a bien été démontrée (Weber *et al.*, 2006; Bird *et al.*, 2011; Hedrich *et al.*, 2011). Les phototrophes oxydantes du Fe(II) peuvent être des phototrophes vertes sulfureuses, pourpres non sulfureuses (e.g. TIE-1) et pourpres sulfureuses (Kappler et Newman, 2004). La souche TIE-1 est retrouvée dans les sédiments du lac Constance (Allemagne, Jiao *et al.*, 2005). Si le $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ est rapidement et complètement oxydé (4-5 jours), les minerais ferreux

sont plus difficiles à oxyder. En effet, vivianite, magnétite et pyrite n'ont pas été oxydés par de tels microbes (Kappler et Newman, 2004). En revanche, sidérite et FeS ont pu être oxydés (Kappler et Newman, 2004). Cependant les auteurs ne présentent pas si la sidérite a été formée par coprécipitation ou si c'est un minéral extrait du sol. De plus, les résultats d'oxydation de la sidérite ne sont pas non plus montrés. Selon les auteurs, l'oxydation a eu lieu car la sidérite et le FeS se sont partiellement solubilisés dans le milieu (Kappler et Newman, 2004). Il est intéressant de noter que seules 7 souches phototrophes ferro-oxydantes ont été jusqu'à présent recensées (Hegler *et al.*, 2008), montrant que ce métabolisme n'intervient que dans des zones spécifiques. Une récente étude de Melton *et al.* (2012) a démontré que les IONRB et bactéries phototrophes sont capables de cohabiter au sein d'une même niche écologique. Même si les phototrophes surpassent les nitrates-dépendantes pour l'utilisation du Fe(II), cela ne peut se faire que durant le jour et avec un ensoleillement suffisant.

Comme indiqué plus haut, la possibilité de retrouver des acidophiles au sein des mines est une hypothèse envisageable. En effet, le pH neutre (environ 7) n'est pas nécessairement un obstacle à leur développement. En effet, certaines espèces sont capables de se développer à pH modérément acide (pH 5-6) et à faible concentration en oxygène (Johnson and Hallberg, 2008). En tenant compte de la pyrite présente dans les marnes intercalaires, la présence éventuelle de micro-niches légèrement acides et peu concentrées en O₂ est possible. Et si jamais le dioxygène venait à manquer, certaines souches acidophiles hétérotrophes ou mixotrophes sont capables de réduire le Fe(III) en conditions anaérobies et en présence de petits acides organiques (Johnson and Hallberg, 2008). Souche autotrophe, *Acidithiobacillus ferroxidans* fixe le CO₂. Cette fixation est très étroitement liée à l'oxydation du Fe(II). Les électrons permettent la réduction de l'oxygène et la réduction du NAD(P). Le NAD(P)H ainsi formé va participer à la fixation du CO₂ par la RuBisCO (So *et al.*, 2004). La réduction de l'oxygène consomme les protons ce qui permet leur transfert à travers la pompe à protons menant à la formation de l'ATP (adénosine triphosphate), source d'énergie de la cellule (Ingledeew, 1982).

L'objectif de ce chapitre est d'observer les phénomènes d'oxydation pouvant être liés à une oxydation chimique par les nitrites, l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ainsi que l'oxydation biologique directe par TIE-1 et *At. ferroxydans* et indirecte par la synthèse de nitrites biogénérés par BoFeN1 et *K. mobilis* (Stewart, 1988).

4.2 Matériels et Méthodes

Le minerai de fer intact et un échantillon naturel de sidérite (roche riche en sidérite) ont été utilisés. Étant plus riches en Fe(II) que le minerai vieilli, leur oxydation devrait être plus facile à déceler et à quantifier que le minerai vieilli qui, étant très peu concentré en Fe(II) (environ 5% Fe(II)/Fe_{TOT}), n'a pas été considéré ici.

4-2-1- Préparation des échantillons

Un lavage à l'acide chlorhydrique 0,5 M a été réalisé pendant 10 min sous agitation en condition anoxique. La poudre a été ensuite centrifugée à 14500 rpm pendant 5 min puis rincée à l'eau distillée préalablement dégazée par barbotage d'azote et équilibrée en condition anoxique. La poudre ainsi lavée a été séchée dans un dessiccateur. Cette poudre a été utilisée pour les incubations avec les différentes souches bactériennes sélectionnées ou en condition abiotique.

4-2-2- Préparation des souches

Cette préparation est décrite dans le Chapitre 2. Les souches sélectionnées sont *Acidithiobacillus ferroxidans* (*At. ferroxydans* - acidophile), *Rhodopseudomonas palustris* souche TIE-1 (dite TIE-1 par la suite - phototrophe), *Acidovorax sp.* souche BoFeN1 (dite BoFeN1 par la suite - nitrate réductrice) et *Klebsiella mobilis* (nommée également *Enterobacter aerogenes*, nitrate réductrice).

Lors des incubations, le milieu minéral (sans Fe(II)) du milieu de culture DSMZ 882 a été utilisé pour *At. ferroxidans* (« milieu AtF »), le milieu spécifique à TIE-1 pour la souche TIE-1 et le milieu spécifique à BoFeN1 et *K. mobilis* (« milieu LPM »). La composition de ces différents milieux est donnée dans le Chapitre 2 (Tableau 3, 4 et 5). En raison du temps imparti pour terminer les expériences, ces milieux ont été choisis par rapport à l'eau de mine synthétique afin d'assurer les conditions de réactions optimales des différentes souches.

4-2-3- Préparation des incubations

La mise en place des suspensions a eu lieu en milieu stérile, sous condition anoxique pour les souches TIE-1, BoFeN1 et *K. mobilis* et à la flamme (bec Bunsen) pour *At. ferroxydans*. Deux cent cinquante grammes de minerai de fer et sidérite, préalablement lavés à l'HCl, ont été ajoutés à 80 mL de chaque milieu. Le pH des solutions a été contrôlé et ajusté à 7 (sauf *At. ferroxydans*, pH 3). Les suspensions ont ensuite été inoculées à 1×10^7 cellules mL⁻¹ environ pour TIE-1, BoFeN1 et *K. mobilis* et 1×10^9 cellules mL⁻¹ pour *At. ferroxydans*. Une fois

inoculés, les flacons de l'essai TIE-1 ont été placés à 20°C et sous excitation lumineuse (ampoule incandescente qui émet un spectre lumineux dans les longueurs d'ondes 590 et 870 nm afin d'exciter les caroténoïdes et la bactériochlorophylle α , Jiao *et al.*, 2005). Au préalable, un barbotage d'hydrogène (80/20 H₂/N₂, Messer) a été réalisé afin de stimuler la croissance et l'oxydation du Fe(II) comme suggéré par Jiao *et al.* (2005). Dix millimolaires d'acétate de sodium et de lactate de sodium ont été ajoutés dans les flacons inoculés avec BoFeN1 et *K. mobilis*, respectivement, ainsi que 10 mM de nitrate (NaNO₃). Ces deux essais ont été placés à l'obscurité et 30°C. Les essais d'oxydation par *At. ferroxydans* ont été placés sous agitation (250 rpm) dans deux atmosphères distinctes : atmosphère aérobie (21% d'O₂, 20°C) et atmosphère micro-aérobie en chambre hypoxie (CoyLab) avec 4% d'O₂ (20°C). Chaque flacon a été protégé de la lumière par un film d'aluminium afin d'optimiser la croissance (communication personnelle du Dr Christian Mustin, LIEC, Université de Nancy). Du coton cardé a été utilisé afin de favoriser les échanges gazeux entre l'espace de tête du flacon et l'atmosphère environnante tout en conservant la stérilité. Il est à noter que la chambre hypoxie possède une atmosphère N₂-O₂. Or, afin que *At. ferroxydans* oxyde le Fe(II) dans les mêmes conditions qu'en atmosphère "normale", du CO₂ est nécessaire. Le CO₂ a été apporté en faisant réagir dans la chambre hypoxie, 75g de carbonate de sodium (NaHCO₃) et du HCl (6M) en excès, selon l'équation suivante:



Soit une concentration finale en CO₂ d'environ 400 ppm dans la boîte hypoxie.

4-2-4- Oxydation par l'O₂ atmosphérique

Afin d'étudier l'impact de l'oxygène, les minerais (250 mg de minerai de fer intact et sidérite) ont été dispersés au sein de 50 mL du milieu de culture pour BoFeN1 (pH 7) et le milieu AtF (pH 3). Les suspensions ont été agitées à l'aide de barreaux magnétiques (300 rpm) en condition atmosphérique (21% d'oxygène) et dans une boîte hypoxie (4% d'oxygène, Coy Laboratory) et 20 °C. L'évaporation a réduit de 50% le volume de chacun des flacons et après deux ajouts de milieu afin de rectifier le volume au volume initial, l'expérience a été arrêtée. Une expérience sans agitation, 21% d'oxygène et 20 °C a également été mise en place afin de connaître l'influence potentielle de l'agitation sur la vitesse d'oxydation.

4-2-5- Oxydation par le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant puissant. Son utilisation a été testée afin de préparer les expériences du Chapitre 5. En effet, il est plus réactif que le dioxygène. Deux cent cinquante milligrammes de minerai de fer intact et de sidérite naturelle ont été mélangés avec 50 mL de H₂O₂ à 35%. La réaction est très exothermique avec dégagement de chaleur et de vapeur. La réaction a été réalisée pendant 24h à 20°C. Le volume étant très faible à la fin de la réaction, l'équivalent du volume évaporé a été ajouté afin d'effectuer le prélèvement. L'échantillon a été rincé plusieurs fois à l'eau distillée afin de stopper complètement la réaction.

4-2-6- Oxydation par les nitrates et nitrites (réactions abiotiques) sur Fe(II) soluble

En condition anaérobie et dans 60 mL de milieu LPM préalablement dégazé à l'azote, 10 mM de Fe(II) soluble (FeCl₂ - solution mère à 1 M, dégazée) ont été ajoutés ainsi que 10 mM de nitrates (NaNO₃) et de nitrites (NaNO₂) respectivement (solution mère à 1M, dégazée). Le pH a été ajusté à 7,0 ± 0,1. Les flacons ont été placés à 30°C et à l'obscurité pendant la réaction. Une expérience d'oxydation de la sidérite naturelle par les nitrites a été également mise en place avec 50 et 100 mM de NO₂⁻

Nota: A cause de la colonne échangeuse d'anions vieillissante, certaines pannes sont survenues sur l'HPLC, retardant les dosages. Par conséquent, les nitrites ont réagi avec le Fe(II) présents dans les tubes de prélèvement; Ceci entraîne une sous estimation de la concentration en nitrites pour les prélèvements à 0, 1, 2 et 3 jours. Une solution, trouvée tardivement, est d'exposer les tubes de prélèvement à l'air libre afin que l'oxygène réagisse avec le Fe(II) et avant les nitrites (Weber et al., 2001).

4-2-7- Dosage du Fer, des nitrates et des nitrites.

Ces dosages ont été réalisés conformément aux méthodes décrites dans le Chapitre 2 (p 10 et 11): un dosage par la ferrozine pour le fer (Fe(II) et Fe_{TOT}) et par HPLC pour les nitrates et les nitrites. Les ions ammoniums ont été dosés par le dosage colorimétrique utilisant des solutions de salicylate et nitropusside (Baethgen and Alley, 1989).

4.3 Résultats

4-3-1- La couche de passivation des minerais riches en Fe(II)

Le minerai de fer intact ainsi que la sidérite naturelle ont été stockés sans précaution particulière, notamment vis à vis de l'oxydation par l'oxygène. Néanmoins aucune diminution du ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ n'a été observé sur le minerai de fer, même 15 ans après son extraction du sol comparé aux valeurs de Grgic, 2001. Quant à la roche de sidérite, elle nous a été fournie à partir des stocks de roches que possède le laboratoire Géoressources. Sans identification précise, il est difficile d'estimer depuis combien de temps la roche a été exposée à l'air. Malgré cela, le ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ (mesuré par dosage colorimétrique) est de 30 à 35% pour la sidérite naturelle et d'environ 48% par spectroscopie Mössbauer (Fig. 9 Chapitre 3₁). Les mêmes proportions sont respectées pour le minerai intact (Chapitre 3-1). Or si l'oxygène oxyde spontanément le Fe(II) et que les minerais sont stables depuis plusieurs années, la conclusion est qu'une couche de protection existe à la surface des minerais, empêchant l'oxydation des sites de Fe(II). Cette couche protectrice est sans doute liée à un phénomène de passivation. Ce phénomène, connu pour la protection des aciers inoxydables (Maller, 1998), a été suggéré comme une cause potentielle de l'arrêt de la réduction de certains oxydes de Fe(III) (e.g. goethite) soumis à la bioréduction (Liu *et al.*, 2001). Si la nature de cette couche n'a pas été déterminée de manière exacte, il est probable qu'elle soit ferrique. En effet, le spectre Mössbauer de la sidérite, après déconvolution, montre trois sites Fe de la goethite. La base des pics de la goethite dans ce spectre est large et n'apparaît qu'à basse température (77K Fig. 1), signifiant une goethite peu cristallisée. En effet, à température ambiante, lorsque la goethite est cristallisée, un sextet apparaît (Fig. 1). Afin de confirmer la présence de goethite à la surface des grains de sidérite, une expérience de réduction a été réalisée avec *S. putrefaciens* (voir préparation de la souche Chapitre 2). Le fer, contenu dans la sidérite, soumis à la bioréduction, a été dosé après 2 mois d'incubation ; le ratio initial de $34\% \pm 2\%$ a évolué et atteint $57\% \pm 4\%$. De plus, la sidérite bioréduite a été analysée par Mössbauer ($\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}} = 55\%$, Fig. 2). Il est clairement visible que les pics correspondant à la goethite sont moins larges. Ainsi une couche de passivation de type goethite est bien présente sur les sites Fe(II) de sidérite. Ceci a également été démontré à partir de pyrite oxydée dont la surface est couverte de goethite et dont les processus d'oxydation se sont arrêtés une fois la surface recouverte de goethite (Zeng *et al.*, 2013). Il en est de même pour la magnétite et l'ilmenite (White *et al.*, 1994).

Alors qu'aucun $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ n'a été détecté pour le minerai de fer intact et la sidérite naturelle en suspension à pH neutre, après 10 min dans l'HCl (0,5 M), des concentrations en Fe(II) et Fe(III) ont été détectées (Table 1). Le lavage acide a pu sensiblement augmenter le nombre de sites de Fe(II) accessibles à l'oxydation en enlevant une partie de cette couche de passivation.

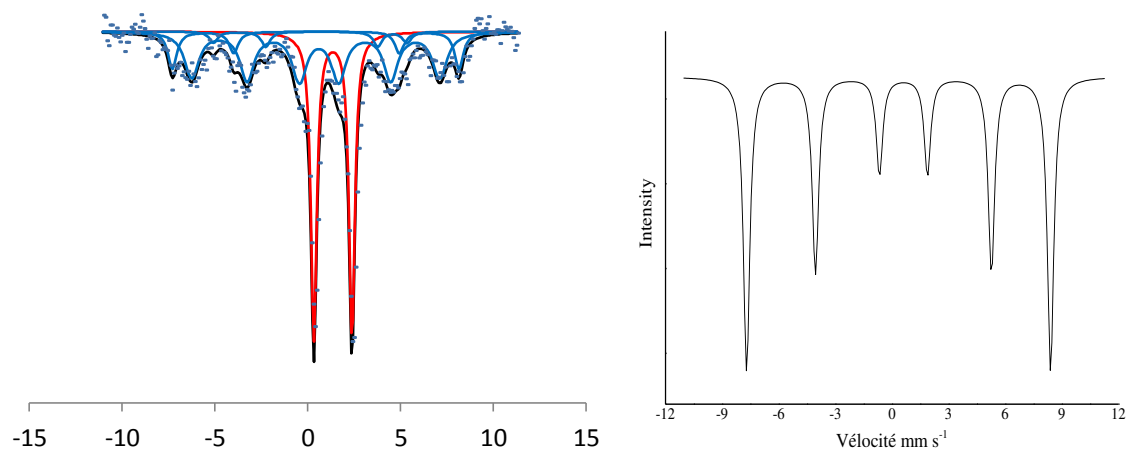


Figure 1: Spectre Mössbauer de la roche de sidérite à 77K (à gauche) et de la goéthite à température ambiante (à droite). La sidérite naturelle est représentée en rouge et la goéthite en bleu.

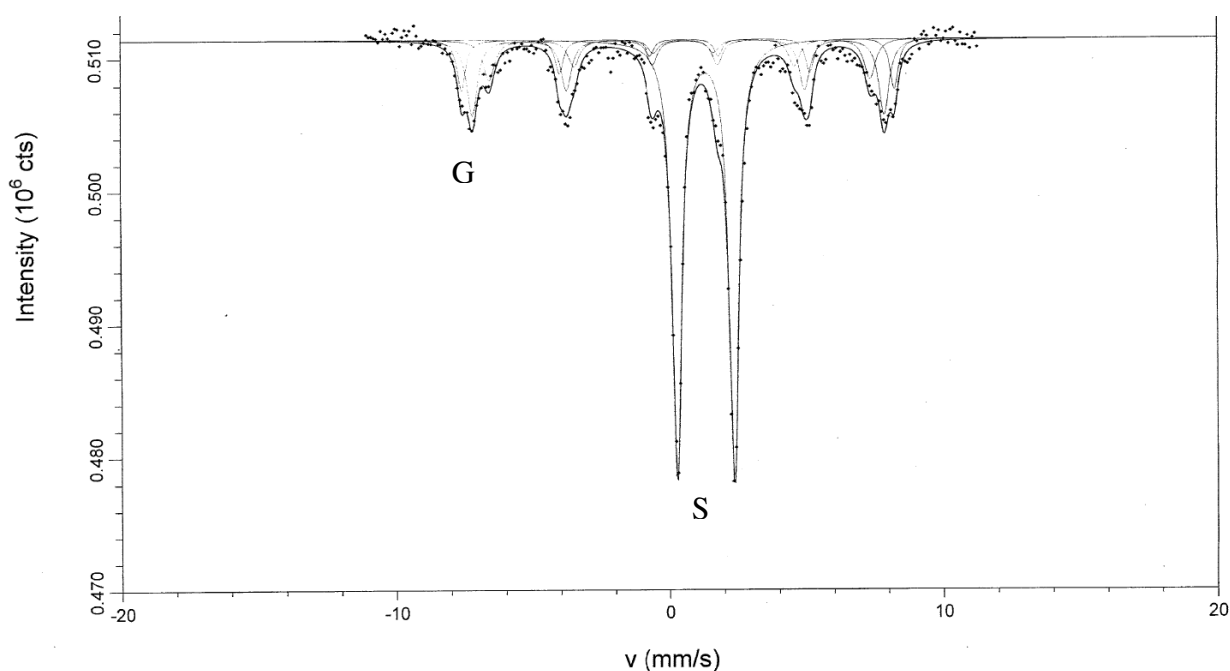


Figure 2: Spectre Mössbauer de la sidérite bioréduite par *S. putrefaciens* à 77K. G = sextet de goéthite, S = doublet de sidérite.

Table 1: Concentration en Fe(II) et Fe(III) minimum mesurées après 10 min dans l'acide chlorhydrique (0,5 M) sous agitation. Ces concentrations sont opposées à celle obtenues lorsque les minerais sont en suspension dans un milieu à pH neutre. Dans ce cas, aucun Fe(II) n'est détecté et les concentrations en Fe(III) sont inférieures à 30 μM .

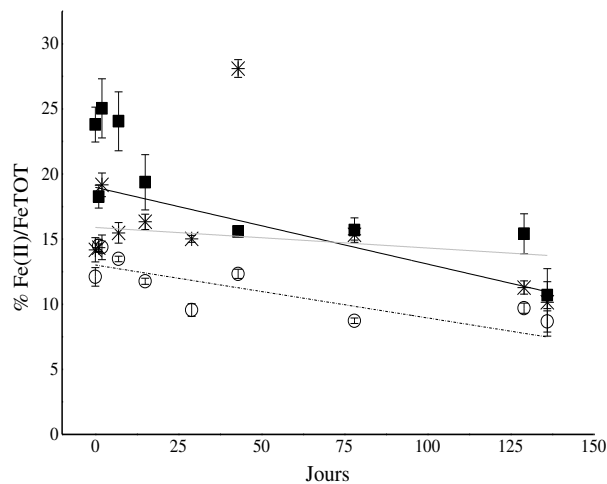
	Fe(II) (μM)	Fe(III) (μM)
Minerai Intact	200	100
Sidérite	600	400

4-3-2 - Oxydation chimique

4-3-2-1- Par le dioxygène atmosphérique (O_2)

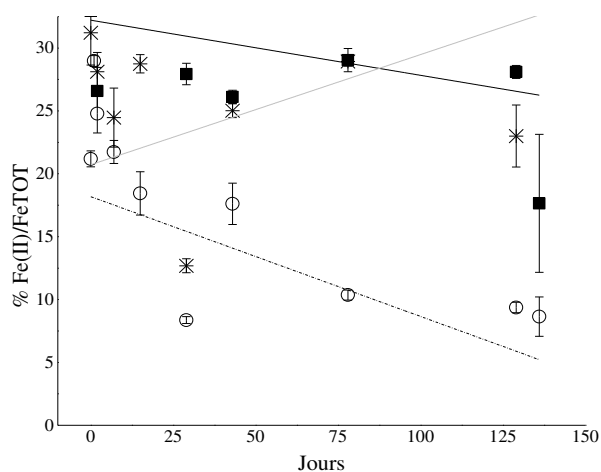
L'oxydation spontanée du Fe(II) soluble (aux pH > 5) et de la rouille verte est bien documentée (Trolard *et al.*, 1996 et les références citées par ces auteurs). En revanche l'oxydation du Fe(II) contenu au sein d'un minerai de fer et de « sidérite naturelle », n'est pas connu. Les résultats de suivi du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} au cours de l'oxydation par O_2 sont présentés dans les Figures 3, 4, 5 et 6.

Hormis l'expérience sidérite - LPM en atmosphère normale (Fig. 4) et les essais sans agitation (Fig. 3 à 6), toutes les autres expériences montrent une tendance à l'oxydation au cours du temps (pente négative de la régression linéaire). Afin de déterminer si la pente est significative (si il y a eu une oxydation), indépendamment des différentes valeurs qui semblent diminuer au cours du temps, une analyse ANOVA a été réalisée à l'aide du logiciel Origin9. Lorsque la valeur indiquée dans les tableaux des figures 3 à 6 est inférieure à 0,05, alors une oxydation a bien eu lieu. La première constatation est que, peu importe l'expérience, à atmosphère standard et sans agitation, aucune oxydation n'a eu lieu. Ensuite, la sidérite a été oxydée par l' O_2 uniquement à pH 3 en condition microaérobie et aérobie. En revanche, le minerai intact a été oxydé en aérobie aux deux pH mais uniquement à pH 7 en microaérobie. Ces expériences ont été réalisés à pH 7 et pH 3 afin de comparer les cinétiques d'oxydation, respectivement avec les bactéries réductrices des nitrates et les bactéries acidophiles.



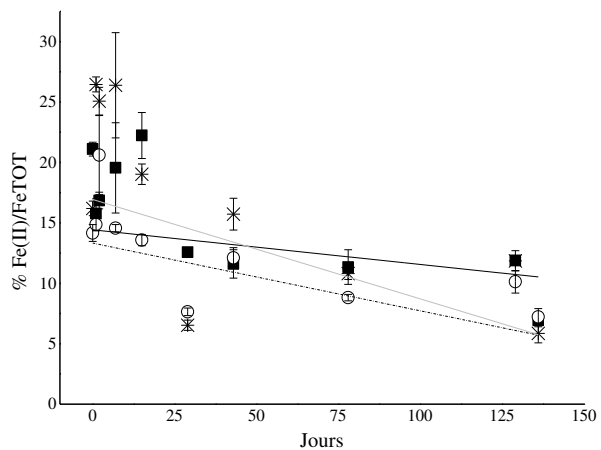
Condition	Pente de la régression linéaire	p-value ANOVA
Microaérobie + agitation	-0,059	0,018
Aérobie + agitation	-0,04	0,003
Aérobie sans agitation	-0,015	0,597

Figure 3: Évolution du ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ au cours du temps de la suspension de minéral intact dans le milieu LPM (pH 7). Condition microaérobie = carrés noirs et pente - trait continu noir; Condition aérobie = ronds blancs et pente - trait pointillé noir; Condition aérobie sans agitation = étoiles et pente - trait continu gris. Le tableau rend compte du % Fe(II) oxydé par jour (pente) seulement si le résultat de l'ANOVA (analyse de la variance, p-value) est inférieur à 0,05. Si p-value > 0,05 alors la pente n'est pas significativement différente de 0 (pas d'oxydation).



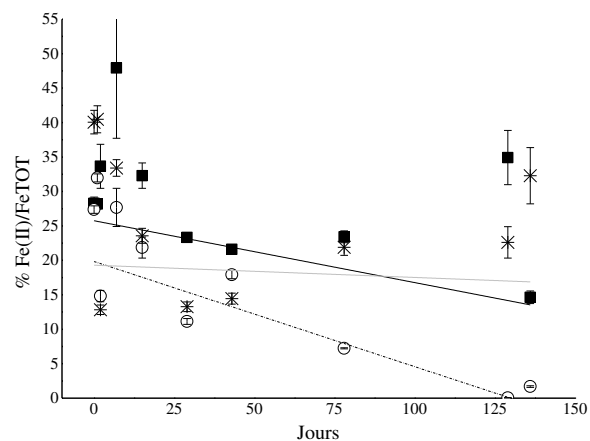
Condition	Pente de la régression linéaire	p-value ANOVA
Microaérobie + agitation	-0,043	0,089
Aérobie + agitation	-0,095	0,093
Aérobie sans agitation	0,087	0,267

Figure 4: Évolution du ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ au cours du temps de la suspension de sidérite dans le milieu LPM (pH 7). Condition microaérobie = carrés noirs et pente - trait continu noir; Condition aérobie = ronds blancs et pente - trait pointillé noir; Condition aérobie sans agitation = étoiles et pente - trait continu gris. Le tableau rend compte du % Fe(II) oxydé par jour (pente) seulement si le résultat de l'ANOVA (analyse de la variance, p-value) est inférieur à 0,05. Si p-value > 0,05 alors la pente n'est pas significativement différente de 0 (pas d'oxydation).



Condition	Pente de la régression linéaire	p-value ANOVA
Microaérobie + agitation	-0,028	0,082
Aérobie + agitation	-0,056	0,023
Aérobie sans agitation	-0,082	0,112

Figure 5: Évolution du ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ au cours du temps de la suspension de minerai intact dans le milieu AtF (pH 3). Condition microaérobie = carrés noirs et pente - trait continu noir; Condition aérobie = ronds blancs et pente - trait pointillé noir; Condition aérobie sans agitation = étoiles et pente - trait continu gris. Le tableau rend compte du % Fe(II) oxydé par jour (pente) seulement si le résultat de l'ANOVA (analyse de la variance, p-value) est inférieur à 0,05. Si p-value > 0,05 alors la pente n'est pas significativement différente de 0 (pas d'oxydation).



Condition	Pente de la régression linéaire	p-value ANOVA
Microaérobie + agitation	-0,089	0,011
Aérobie + agitation	-0,152	< 0,001
Aérobie sans agitation	-0,017	0,898

Figure 6: Évolution du ratio $\text{Fe(II)/Fe}_{\text{TOT}}$ au cours du temps de la suspension de sidérite dans le milieu AtF (pH 3). Condition microaérobie = carrés noirs et pente - trait continu noir; Condition aérobie = ronds blancs et pente - trait pointillé noir; Condition aérobie sans agitation = étoiles et pente - trait continu gris. Le tableau rend compte du % Fe(II) oxydé par jour (pente) seulement si le résultat de l'ANOVA (analyse de la variance, p-value) est inférieur à 0,05. Si p-value > 0,05 alors la pente n'est pas significativement différente de 0 (pas d'oxydation).

La première constatation est que le pH ne semble pas favoriser l'oxydation des deux échantillons. Or, l'hypothèse plausible initiale était que l'acidité augmenterait la solubilisation du Fe(II) et du Fe(III) (et donc éliminerait la couche de passivation, augmentant de fait le nombre de sites de Fe(II) accessible à l'O₂) ce qui favoriserait, dans le temps, l'oxydation par rapport au milieu neutre. Et cela malgré le fait que l'oxydation du Fe(II) en milieu acide par

l'O₂ soit plus lente (Stumm & Morgan, 1981). La sidérite tend à confirmer cette hypothèse car elle est oxydée en milieu acide (Fig. 6) et non en milieu neutre (Fig. 4). Le minerai intact est oxydé en condition aérobie quelque soit le pH. En revanche le minerai intact est oxydé en microaérobie à pH 7 (Fig. 3) et non en microaérobie à pH 3 (Fig. 5) ce qui tend à rejeter l'hypothèse de départ. Néanmoins, il est possible de relativiser ce résultat en constatant que les valeurs en début d'expérience (minerai intact-pH 7-microaérobie) sont plus élevées que celles de l'expérience à pH acide et cela a pu influencer le résultat de l'ANOVA. L'oxydation du Fe(II) par O₂ semble donc être favorisée à pH acide.

La seconde constatation est que les vitesses d'oxydation (% Fe(II)/Fe_{TOT} j⁻¹), déterminées par la pente de la régression linéaire, sont à utiliser avec précaution. En effet, pour chaque expérience le coefficient de corrélation au carré (R²) est inférieur à 0,5 montrant ainsi que la régression linéaire n'est sans doute pas le modèle mathématique le plus adapté. Cependant, d'autres modèles tels que la courbe de décroissance exponentielle n'ont pas donnés de meilleurs résultats.

Néanmoins, l'oxydation par l'O₂ a bien lieu sur les échantillons de minerai intact et de sidérite en poudre lorsque ceux-ci sont en suspension et agités (dans le temps de l'expérience). La quantité d'oxygène présent ne semble pas significativement accélérer les vitesses d'oxydation.

4-3-2-2- par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Après 24 heures de réaction, le fer a été dosé (Fig. 7). Il en résulte qu'environ 80% du Fe(II) du minerai intact ont été oxydés et 90% pour la sidérite. L'oxydation qu'entraîne le peroxyde d'hydrogène est importante et rapide.

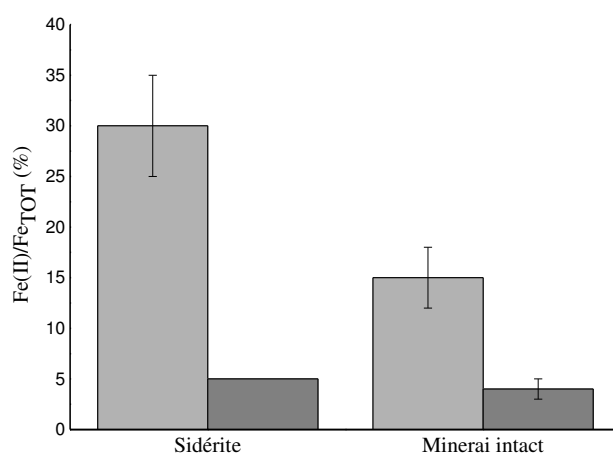


Figure 7: Ratio Fe(II)/Fe_{TOT} du minerai intact et de la sidérite avant (gris clair) et après (gris foncé) réaction avec le peroxyde d'hydrogène. L'expérience a été réalisée en triplicat.

4-3-2-3- par les nitrates (NO_3^-) et les nitrites (NO_2^-)

Les résultats de l'oxydation du Fe(II) soluble par les nitrates et les nitrites sont présentés dans la Figure 8.

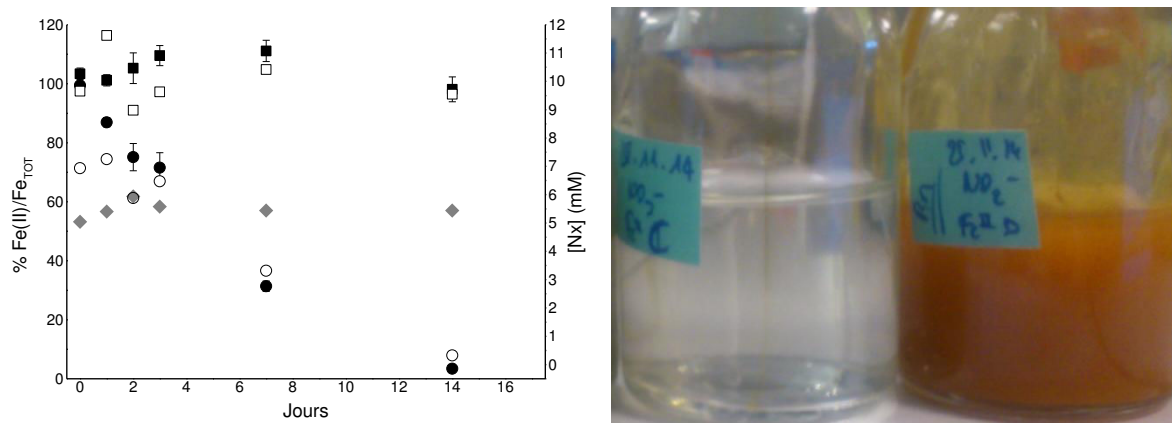


Figure 8: A gauche, évolution du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} lors des réactions d'oxydation avec les nitrates (carré noir) et les nitrites (rond noir) (n=3). Les espèces ioniques NO₃⁻ (carré blanc) et NO₂⁻ (rond blanc) ont été dosées par chromatographie liquide (axe de droite) (n = 1). L'ammonium (losange gris) a été dosé par une méthode colorimétrique. A droite, photographie des flacons de réaction du Fe(II) soluble avec les nitrates (à gauche) et les nitrites (à droite) après 14 jours de réaction.

La Figure 8 montre que les nitrates ne sont pas réduits dans le temps de l'expérience. Si les nitrates peuvent oxyder le Fe(II), cette cinétique est très lente et souvent considérée comme négligeable (Rakshit *et al.*, 2008). Il est constaté en revanche que le Fe(II) soluble a été oxydé rapidement par les nitrites, formant ainsi un oxyde de Fe(III) (e.g. goethite, Park and Dempsey, 2005). La stœchiométrie de réaction est 1 mole de nitrite réduit environ 2 à 3 moles de Fe(II) (Hansen *et al.*, 1994; Tai and Dempsey, 2009; Kampschreur *et al.*, 2011). Or, au regard des résultats présentés dans la Figure 8, il semble que ce ratio soit plus proche de 1 pour 1. Cependant, comme précisé dans le paragraphe 4-2-6, une oxydation du Fe(II) a eu lieu dans le flacon de prélèvement. La concentration en NO₂⁻ a donc été sous-estimée. Hormis à pH basique (> 8), ce n'est pas de l'ammonium (NH₄⁺) qui est formé mais du NO qui est réduit à son tour par le Fe(II) en N₂O (Tai and Dempsey, 2009). Ceci semble être le cas dans cette expérience car l'ammonium mesuré correspond à celui du milieu réactionnel initial (environ 5,61 mM).

La sidérite naturelle ainsi que de la rouille verte sulfatée (formée par co-précipitation) ont été mises en présence de nitrites. Si la rouille verte sulfatée a été oxydée en 10-15 jours (Fe(II)/Fe_{TOT} - T₀ = 60% ± 6,3 ; T_f = 1,7% ± 2,0), la sidérite n'a pas été oxydée même après 1,5 an. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Hansen *et al.* (1994) pour l'oxydation de la

rouille verte dont la goethite est le produit final. Dans notre cas, même si la sidérite n'a pas été oxydée, les nitrites ont été réduits. En effet, dans deux essais, où environ 50 et 100 mM de nitrite sont présents initialement, la concentration mesurée après 1,5 an est de 0,4 mM et 0,75 mM respectivement. Or, aucun autre réducteur des nitrites n'a été ajouté (hormis ceux présent au sein du minerai mais dont les réactions sont sans doute négligeables face aux concentrations initiales en nitrites). Cependant, Rakshit *et al.* (2008) ont montré que de la sidérite (formée par coprécipitation) est bien oxydée par les nitrites donnant de la lépidocrocite et du N₂O. Si aucune analyse de solide n'a été réalisée, la non modification du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} suggère que la minéralogie n'a pas changé. La sidérite naturelle a donc pu être le catalyseur de la réduction des nitrites (Tai and Dempsey, 2009). Ce point est développé dans la discussion.

4-3-3- Oxydation du fer par BoFeN1 et *Klebsiella mobilis*

Les résultats de l'oxydation par BoFeN1 sont présentés dans les Figures 9 et 10, et 11 et 12 pour *K. mobilis*.

Avec BoFeN1, le Fe(II) soluble et le Fe(II) de la rouille verte sont oxydés (Figs. 8 et 9). Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus précédemment par Kappler *et al.* (2005). Il est intéressant de noter que si la rouille verte peut être oxydée par les nitrites, il a été démontré qu'elle est aussi formée à partir de l'oxydation du Fe(II) soluble et de sidérite formée par coprécipitation (Etique *et al.*, 2014). Lors de cette expérience, nitrate et nitrite ont été dosés à l'aide de bandelette colorimétrique (QUANTOFIX[®]). Malgré l'imprécision de ces bandelettes, il a été observé que la réduction des nitrates a bien eu lieu et qu'aucun nitrite n'a été détecté. Les nitrites formés auraient été consommés par réaction avec Fe(II). Les mêmes constatations ont été observées au cours des expériences avec *K. mobilis* (Figs. 11 et 12).

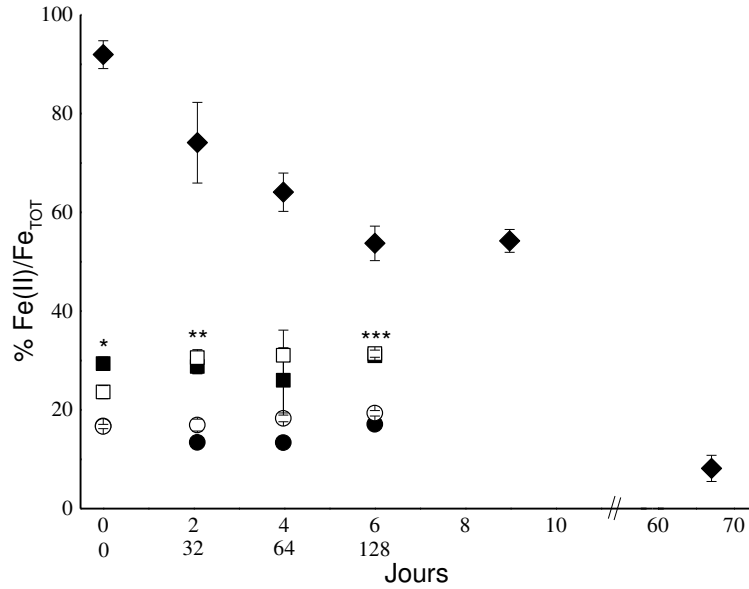


Figure 9: Évolution du ratio $\text{Fe(II)}/\text{Fe}_{\text{TOT}}$ avec BoFeN1 en présence de : Fe(II) soluble (◆), minerai de fer intact (■), sidérite naturelle (●). Les symboles vides correspondent aux contrôles abiotiques (sans bactéries) en présence de minerai de fer intact (□) et de sidérite naturelle (○). Sur l'abscisse, le premier axe (en haut) correspond au temps de réaction de BoFeN1 avec le Fe(II) soluble et le second (bas) avec le minerai de fer intact et la sidérite. Pour les incubations avec les minerais (valeurs valables pour minerai de fer intact et sidérite), les concentrations en nitrates et nitrites ont été suivies par dosage colorimétrique instantané (bandelettes QUANTOFIX®): *, $[\text{NO}_3^-] \approx 30 \text{ mM}$ et $[\text{NO}_2^-] \approx 0 \text{ mM}$; **, $[\text{NO}_3^-] \approx 15 \text{ mM}$ et $[\text{NO}_2^-] \approx 0 \text{ mM}$ et ***, $[\text{NO}_3^-] \approx 0 \text{ mM}$ et $[\text{NO}_2^-] \approx 0 \text{ mM}$. Dans les témoins, les concentrations en nitrates et nitrites sont constantes au cours du temps avec $[\text{NO}_3^-] \approx 30 \text{ mM}$ et $[\text{NO}_2^-] \approx 0 \text{ mM}$.

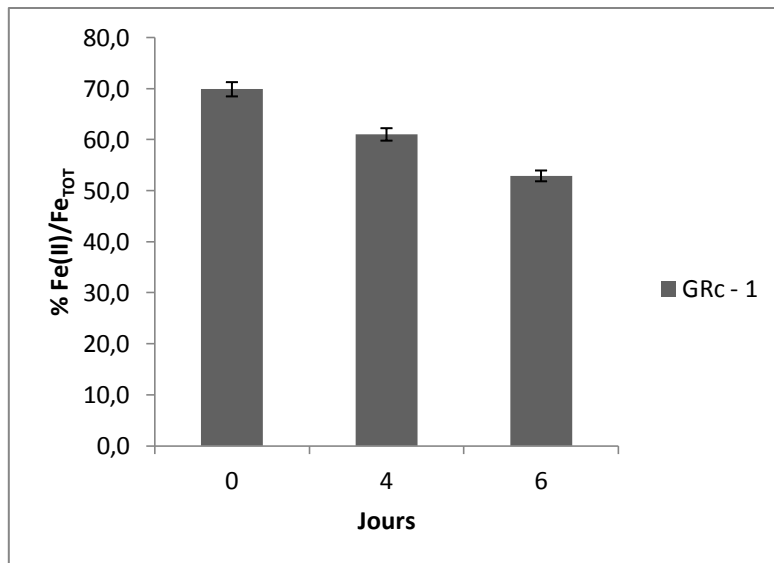


Figure 10: Évolution du ratio $\text{Fe(II)}/\text{Fe}_{\text{TOT}}$ de la rouille verte carbonatée incubé en présence de BoFeN1.

En revanche, et de la même manière que les expériences abiotiques, les nitrites biogénérés n'ont pu oxyder ni la sidérite ni le minerai de fer intact. Une étude menée par Weber *et al.* (2001) a montré que de la sidérite, formée par coprécipitation ou formée à partir de HFO bioréduit, a été oxydée par les nitrites biogénérés, alors qu'aucune oxydation n'a été observée par voie chimique. De la même manière, des sédiments bioréduits (initialement riches en Fe(III)) ont bien été oxydés par les nitrites (Weber *et al.*, 2001) et plus rapidement par les nitrites biogénérés que les nitrites chimiques, probablement à cause de la nature faiblement cristallisée du minéral formé à l'issue de la bioréduction. Il semble donc que les nitrites, biogénérés ou non, soient capables d'oxyder du Fe(II) faiblement cristallisé mais pas lorsque ce dernier à une cristallinité plus importante, et ce malgré l'évidente réduction des nitrites au cours de l'incubation. Il est possible que l'efficacité du lavage soit relative et ne favorise pas l'oxydation.

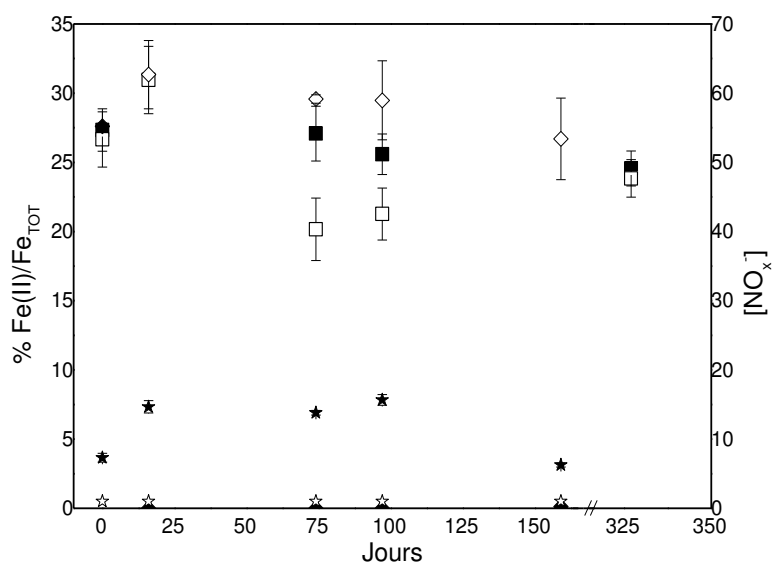


Figure 11: Évolution du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} au cours des incubations sidérite - *K. mobilis* (carré noir, expérience biotique) et de la sidérite seule (carré blanc, expérience abiotique). Les concentrations en nitrates et des nitrites (en mM) ont été dosées par HPLC avec : nitrates (losange noir) et nitrites biotiques (étoile noire); nitrates (losange blanc) et nitrites abiotiques (étoile blanche).

Que ce soit avec la sidérite (Fig. 11) ou le minerai de fer intact (Fig. 12), aucune oxydation significative n'est survenue bien que les nitrates aient été réduits par la souche bactérienne *K. mobilis*. Par conséquent, l'espèce bactérienne réduisant les nitrates n'impacte pas de manière significative l'oxydation du Fe(II) du minerai.

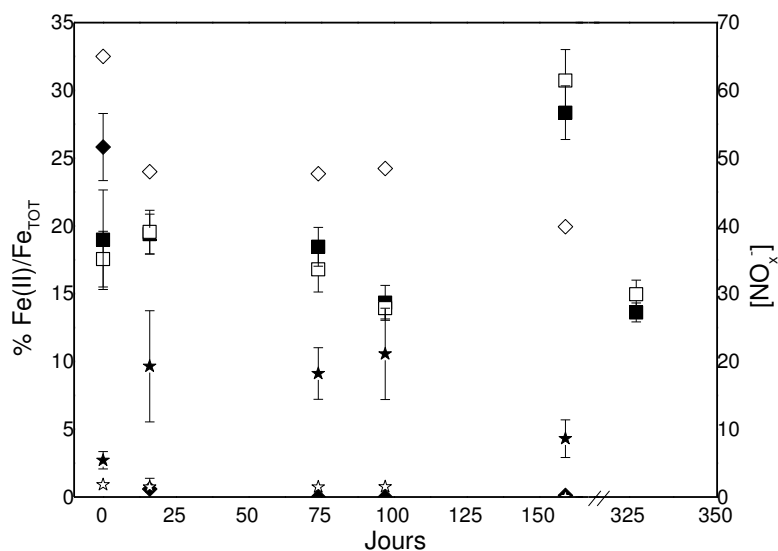


Figure 12: Évolution du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} au cours des incubations minéral intact - *K. mobilis* (carré noir, expérience biotique) et du minéral intact seul (carré blanc, expérience abiotique). Les concentrations en nitrates et des nitrites (en mM) ont été dosées par HPLC avec : nitrates (losange noir) et nitrites biotiques (étoile noire); nitrates-abiotiques (losange blanc) et nitrites-abiotiques (étoile blanche).

4-3-4 Oxydation par TIE-1

Rhodopseudomonas palustris souche TIE-1 a bien oxydé le Fe(II) soluble ainsi que celui provenant de la rouille verte carbonatée (Fig. 13). Il est intéressant de noter que de la photooxydation a eu lieu (Fig. 13) mais qu'elle s'est stabilisée quand environ 50% du Fe(II) sont oxydés. Le minéral mixte est de couleur noire évoquant la magnétite mais aucune propriété magnétique n'a été constatée avec un barreau aimanté. Les résultats sont discutés ci-après.

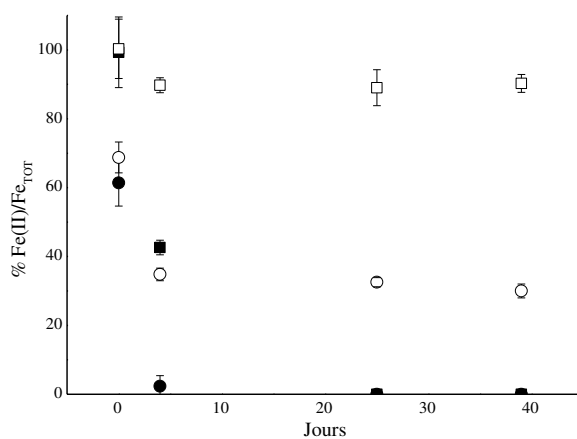


Figure 13: Évolution du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} au cours des incubations Fe(II) soluble - souche TIE-1 (carré noir), Fe(II) soluble seul (carré blanc), de la rouille verte carbonatée - souche TIE-1 (rond noir) et de la rouille verte carbonatée seule (rond blanc).

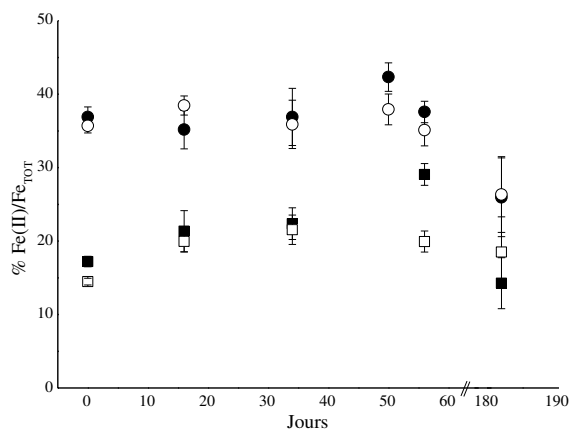


Figure 14: Évolution du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} au cours des incubations minéral de fer intact - souche TIE-1 (carré noir), du minéral de fer intact seul (carré blanc), de la sidérite - souche TIE-1 (rond noir) et de la sidérite seule (rond blanc).

4-3-5 Oxydation par *Acidithiobacillus ferrooxydans*

At. ferrooxydans a oxydé le minéral intact et la sidérite naturelle (Fig. 13). Cela débute après 8 jours d'incubation et le ratio Fe(II)/Fe_{TOT} est inférieur à 5% après 15 jours d'incubation. Au regard des résultats, il n'y a pas de différence notable entre les conditions aérobies et microaérobies.

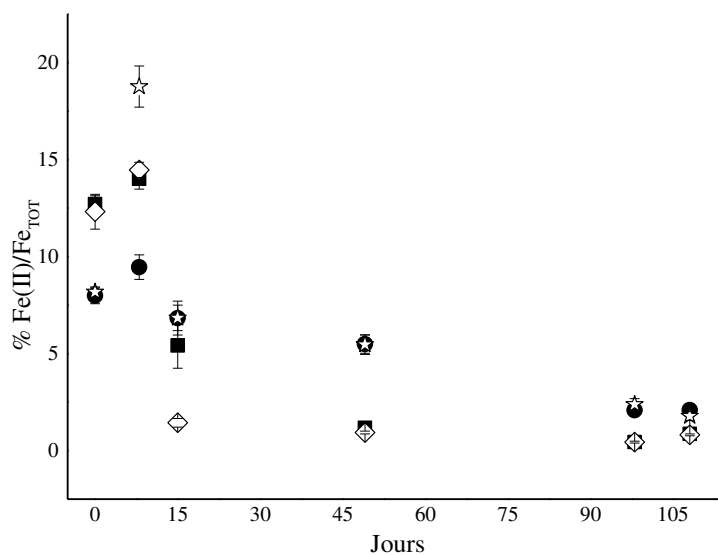


Figure 13: Évolution du ratio Fe(II)/Fe_{TOT} au cours des incubations sidérite - souche *At. ferrooxydans* en condition microaérobie (carré noir) et aérobie (losange blanc) ainsi que minéral de fer intact - souche *At. ferrooxydans* en condition microaérobie (rond noir) et aérobie (étoile blanche).

4.4 Discussion

L'oxydation du minerai de fer intact et de la sidérite naturelle par *At. ferrooxydans* a été plus rapide que l'oxydation chimique par l'O₂. En effet, à pH comparable, la souche acidophile a oxydé 10% du minerai de fer et de la sidérite en 15 jours environ alors que l'O₂ en a oxydé 10% en plus de 50 jours en condition aérobie. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'études sur l'oxydation de la pyrite (Bacelar-Nicolau and Johnson, 1999) où la biooxydation par *At. ferrooxydans* débute immédiatement et où l'oxygène n'entraîne pas d'oxydation dans les 50 jours de leur expérience. Le Fe(III) produit par les acidophiles précipite et forme de la ferrihydrite qui est le précurseur d'oxydes de fer plus stables tels que la goethite ou l'hématite (Konhauser, 1997). En revanche, dans les drainages miniers acides, riches en sulfures, le Fe(III) produit lors de la biooxydation est réduit rapidement (Osorio *et al.*, 2013).

Dans les mines de fer de Lorraine, deux cas sont alors envisageables. D'une part, en condition oxydante (microaérobie), la souche acidophile, probablement au sein d'un biofilm (Vera *et al.*, 2009), utiliserait le Fe(II) présent dans les piliers (sidérite du minerai de fer) ou au sein des marnes intercalaires (pyrite, Grgic, 2001). En plus d'entraîner l'oxydation des minerais de fer ou de la pyrite, une acidification locale du pH serait attendue, accélérant encore le processus d'oxydation (Descotes *et al.*, 2004; Mielke *et al.*, 2003). D'autre part, si l'activité des BSR est considérée (voir Chapitre 3₂), alors les sulfures biogénérés (H₂S) pourraient entraîner la réduction du Fe(III) formé par les acidophiles (Osorio *et al.*, 2013) et former des minéraux fer-soufre tels que la mélanterite (FeSO₄•7H₂O, Fortin *et al.*, 1996). De plus, il est intéressant de retenir l'activité ferri-réductrice de certaines souches acidophiles (Johnson and Hallberg, 2008) qui pourrait alors s'ajouter à celle des IRB et des BSR. Si la réduction par *At. ferrooxydans* n'a pas été vérifiée ici, les références qui le démontrent sont nombreuses (Johnson and McGinness, 1991; Rowe and Johnson, 2007; Johnson and Hallberg, 2008). Enfin, la température des mines (environ 13°C) n'est pas un obstacle à l'activité métabolique de certaines souches acidophiles (Hallberg *et al.*, 2010).

Les phototrophes sont capables d'oxyder le Fe(II) soluble (Ehrenreich and Widdel, 1994; Kappler et Newman, 2004). L'oxydation de la sidérite a été démontrée par Kappler and Newman (2004). Il n'est cependant pas précisé par les auteurs si c'est une roche naturelle ou le produit d'une co-précipitation. Même si l'oxydation de la sidérite est lente (4-6 semaines), les auteurs la considèrent comme complète.

Dans notre étude, le Fe(II) soluble et la rouille verte, dont le Fe(II) est biodisponible immédiatement, ont bien été oxydés. En revanche, aucune oxydation du minerai de fer intact

et de la sidérite naturelle n'a été mesurée, et cela en 6 semaines. Dans l'étude menée par Kappler et Newman (2004), la constante de solubilité de la sidérite a été déterminée. Ce serait un paramètre expliquant pourquoi la sidérite de leur étude a été oxydée et non la vivianite ou la pyrite, à pH neutre. Il serait alors intéressant de déterminer la constante de solubilité de la sidérite naturelle de notre étude et la comparer à celle de ces auteurs, afin de savoir si ce facteur explique l'oxydation de leur sidérite par rapport à celle de notre étude. Néanmoins cela suggère que le Fe^{II} de minerai de fer et sidérite sont peu disponibles pour l'oxydation biologique, même pour des bactéries phototrophes.

A l'instar des phototrophes, les bactéries nitrates-réductrices ont oxydé, sans doute *via* les nitrites, le $\text{Fe}(\text{II})$ soluble et la rouille verte, mais pas le minerai de fer intact ni la sidérite naturelle. Les mêmes résultats ont été obtenus par les nitrites chimiques. L'oxydation du $\text{Fe}(\text{II})$ soluble et de la rouille verte par les nitrites chimiques est connue (Hansen *et al.*, 1994, 1996 1997; Kampschreur *et al.*, 2011; Matocha *et al.*, 2012). Le couplage enzymatique réduction nitrate - oxydation $\text{Fe}(\text{II})$ par les procaryotes nitrate-dépendants (Straub *et al.*, 1996) a quant à lui peut-être été surestimé (Klueglein et Kappler., 2013). Néanmoins, les diverses études portées sur le devenir des nitrates et du $\text{Fe}(\text{II})$ après réaction restent valables, les bactéries étant des acteurs indirects de l'oxydation par la production de nitrites. Ainsi, les nitrites biogénérés sont capables d'oxyder la sidérite formée par coprécipitation (Weber *et al.*, 2001; Rakshit *et al.*, 2008). Cette sidérite est "amorphe" ce qui est la différence majeure comparée à la sidérite naturelle de cette étude ainsi que la sidérite du minerai de fer intact. Pourtant nitrates et nitrites ont bien été réduits (Figs. 9 et 12) et probablement en NO et N_2O (Kampschreur *et al.*, 2011).

Si les nitrites ont été réduits mais que le ratio $\text{Fe}(\text{II})/\text{Fe}_{\text{TOT}}$ n'a pas évolué, quelle est l'origine des électrons ayant servi à réaliser cette réduction ? Une première hypothèse est que les nitrites ont bien été réduits par le $\text{Fe}(\text{II})$ mais que la concentration de $\text{Fe}(\text{II})$ oxydée est trop faible pour être détectable du fait de l'hétérogénéité du minerai (voir § 2-4-1). Or, dans l'expérience BoFeN1 - sidérite naturelle, la concentration en nitrates (et donc après réduction en nitrites) est d'environ 30 mM. Ainsi, en tenant compte de la stœchiométrie reconnue de 1 mole de nitrite pour 2 moles de $\text{Fe}(\text{II})$, en théorie, environ 60 mM de $\text{Fe}(\text{II})$ sont théoriquement oxydables. Or, pour 250 g de sidérite naturelle, la concentration initiale en $\text{Fe}(\text{II})$ est d'environ 3 à 7 mM de $\text{Fe}(\text{II})$. Par conséquent, malgré l'hétérogénéité du minéral, les nitrites sont en excès ils n'ont pas oxydé le $\text{Fe}(\text{II})$. Ce raisonnement est similaire pour le minerai de fer. La seconde hypothèse rejoint les résultats présentés par Tai et Dempsey (2009)

qui ont montré que le Fe(II) sorbé à la surface d'un oxyde de Fe(III) n'a pas été oxydé par les nitrites, contrairement au Fe(II) soluble présent simultanément. Ces résultats peuvent être associés aux travaux de William et Scherer (2004) qui ont montré qu'une oxydation du Fe(II) sorbé à la surface de la goethite entraîne un transfert des électrons dans la masse de l'oxyde. Par la suite ces électrons réduisent le Fe(III) de surface en Fe(II) (Fig. 15). Mais dans ce cas, le Fe(II) minéral, présent à la surface de la sidérite et cotoyant un oxyde de fer, possède-t-il les mêmes propriétés physico-chimique que le Fe(II) sorbé à la surface d'un oxyde de fer? De plus amples expériences sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse

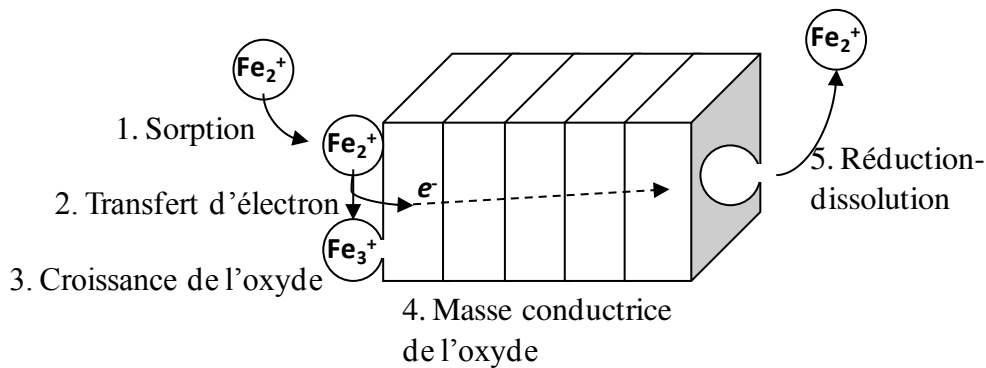


Figure 15: Modèle conceptuel expliquant comment les atomes de la goethite et le Fe(II) soluble se mélangent via un phénomène de croissance du cristal de goethite (vers la gauche) et de dissolution (à droite) à des sites séparés (adapté de Handler *et al.*, 2008).

En conclusion, seule la souche acidophile a été capable d'oxyder le minerai de fer intact et la sidérite naturelle. Il serait alors intéressant de savoir si les souches acidophiles sont : i) présentes au sein des mines de fer de Lorraine et ii) capables d'oxyder suffisamment le ciment interoolitique pour altérer les propriétés mécaniques du minerai de fer. Les nitrites formés par les bactéries nitrate-réductrices ont été réduits mais aucune oxydation du Fe(II) n'a été mesurée. De telles bactéries ont été enrichies à partir d'eau de mine. Par conséquent, ce métabolisme peut avoir un impact éventuel sur les propriétés mécaniques du minerai de fer, mais il est alors nécessaire de comprendre comment les nitrites qui sont réduits, n'entraînent pas l'oxydation du minerai de fer.

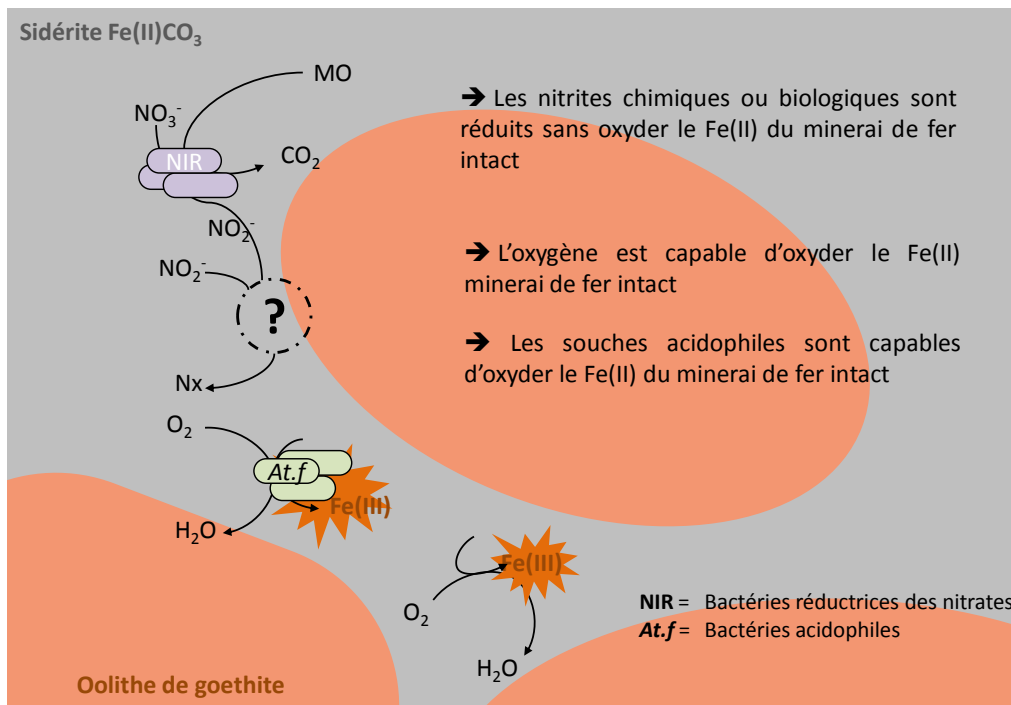


Figure 16: Schéma des réactions d'oxydation biologiques et chimiques potentielles au sein des mines de fer (auteur B. Maitte).

**Chapitre 5 : Étude des propriétés mécaniques
du minerai de fer lorrain après réduction et
oxydation, chimique ou biologique.**

5.1 Introduction

Nous l'avons vu précédemment, l'oxydation ou la réduction bactérienne n'est possible que si les conditions sont réunies. Au sein des mines, c'est probablement le cas pour les bactéries ferri-réductrices et les bactéries sulfato-réductrices et, dans une moindre mesure, celles des bactéries nitrates-réductrices ou acidophiles modérées. Si les réactions d'oxydation et de réduction ont été établies sur le minerai en poudre, l'effet de ces réactions sur l'altération des propriétés mécaniques des minerais de fer doit être évaluée sur des formes physiques entières du matériau afin de pouvoir réaliser des expériences macro/micro mécaniques : éprouvettes cylindriques pour les essais de compression simple (instantanée ou fluage) et barrettes pour la micro-indentation. Les éprouvettes ont été utilisées dans les études précédentes du minerai de fer lorrain afin de déterminer les propriétés mécaniques de chacun des deux types de minerais (intact et vieilli) ainsi que la modélisation de leur comportement en tant que piliers de mine (Grgic, 2001). Dagalier *et al.* (2002) ont montré que l'altération du minerai natif est liée à l'exploitation des mines et notamment la conséquence de la ventilation des galeries (atmosphère minière oxydante). L'altération correspond à la perte du ciment inter-oolitique (de la sidérite majoritairement), alors remplacé par des silicates (berthiérine) et des oxydes de fer (hématite).

L'impact de cette altération a été étudié vis-à-vis de la stabilité des mines. Des études de comportement mécanique à court et long terme ont été mises en place à la fois sur les piliers vieillis et intacts ainsi que sur les marnes intercalaires présentes au niveau des toits des galeries (Grgic *et al.*, 2003; 2005; 2006; 2013; 2014). Une étude a montré l'impact de la porosité inter-oolitique sur la cohésion du minerai de fer, notamment par l'impact de l'effet de succion - capacité du matériau à absorber l'eau (Grgic *et al.*, 2005) - où il a été constaté que le matériau, saturé, est plus résistant aux effets de compressions (compression uni-axiale). Par différentes modélisations du comportement des piliers lors de la phase aérobie (e.g. la phase d'exploitation) et de la phase de re-saturation (e.g. fin du pompage et remonté des eaux aux sein des galeries), il a été démontré que l'instabilité (apparition de zones de tensions mécaniques) survient lorsque l'eau réinvestit les piliers (Grgic *et al.*, 2006). Ces tensions s'atténuent au fur et à mesure que l'eau réinvestit les pores de la roche (resaturation à l'arrêt des pompes d'exhaure) mais leur effet transitoire est suffisant pour induire la rupture des roches, notamment au toit des galeries. Par ailleurs, l'oxydation des piliers de minerai de fer pendant la phase aérobie de ventilation (i.e., pendant l'exploitation) est également une des causes majeures de leur rupture car elle induit la disparition du ciment inter-oolitique de

sidérite et ainsi une diminution de la cohésion et de la résistance du matériau. Les piliers de minerai, qui reprennent les contraintes (principalement uniaxiales) induites par l'épaisseur du recouvrement (200-250 m de profondeur), sont ainsi fragilisés et cèderaient plus facilement sous ce poids. Malgré les effondrements survenus suite à l'arrêt des pompes d'exhaure, l'ennoisement des mines a sans doute ralenti l'oxydation des piliers via le retour de conditions plus réductrices (Grgic *et al.*, 2013).

Mais aucun milieu n'étant biogéochimiquement inerte, il est aujourd'hui nécessaire de d'identifier les réactions biochimiques affectant les propriétés mécaniques du minerai de fer. Pour ce faire, des incubations d'éprouvettes de minerai cylindriques et de barrettes ont été réalisées avec des bactéries ferri-réductrices. L'activité ferri-réductrice étant la seule activité bactérienne ayant eu un effet significatif sur le minerai dans le temps imparti (voir Chapitre 3₁). Après incubation, les éprouvettes et les barrettes ont été soumises, respectivement, à la compression uni-axiale et à la micro-indentation.

5-1-1- Comportement mécanique des roches : définitions

5-1-1-1 Généralités

Lors de l'application d'une contrainte, la roche va se déformer. Cette déformation peut être élastique, plastique ou fragile :

- La déformation élastique est réversible. En effet, si la contrainte est supprimée, le matériau reprend sa forme initiale. Cette déformation est valable pour de faibles contraintes.

- La déformation plastique est irréversible. Même après arrêt des contraintes, le matériau ne retrouvera pas son état initial, sa déformation est permanente.

- La déformation fragile correspond à la rupture de la roche. Celle-ci peut avoir lieu après la déformation élastique, alors le matériau est dit fragile, ou après la déformation plastique, alors le matériau est dit ductile (Fig. 1).

Ainsi, une roche peut être fragile ou ductile en fonction de sa rupture durant sa phase élastique ou plastique. Pour le premier, la rupture est rapide, alors que pour le second la rupture est lente et implique de grandes déformations.

Il existe trois types de contraintes :

- la compression qui consiste en l'écrasement du matériau,
- l'extension qui consiste à étirer le matériau avec des forces à l'orientation opposée

- et enfin le cisaillement où les forces sont de sens opposé mais appliquées aux extrémités du matériau (Fig. 1).

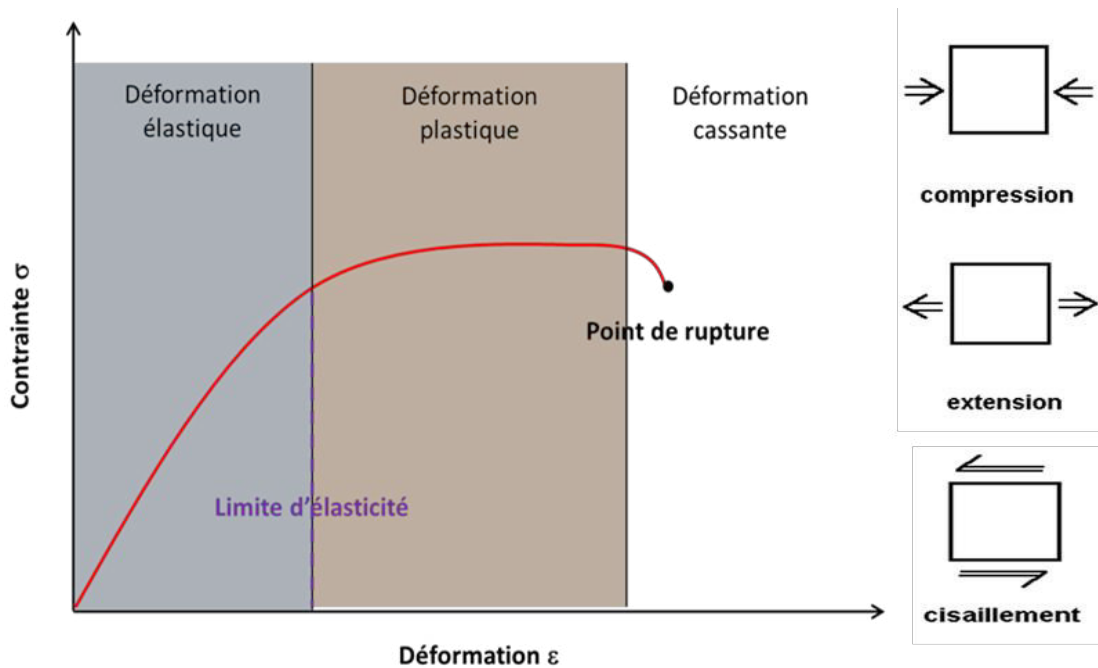


Figure 1: Schéma représentatif des différentes déformations subies par un matériau ductile (à gauche); associé aux différents modes de contraintes (à droite) (adapté de Fortunier, 2009).

5-1-1-2- Les propriétés élastiques des matériaux

Afin de caractériser un matériau au laboratoire, certaines mesures peuvent être effectuées sur leurs propriétés mécaniques telles que :

- La déformation (ϵ) qui correspond au rapport de l'allongement du matériau sur sa longueur initiale. Cette valeur est sans unité.

- Le module de Young (E) qui est le rapport entre la contrainte et le début de la déformation. Il est exprimé en pascal (Pa) et défini au cours d'expériences de compression (uni-axiale ou triaxiale). La loi de Hooke pour un matériau isotrope en compression uniaxiale le définit par :

$$\sigma = E \times \epsilon \quad (1)$$

où σ est la contrainte (souvent exprimé en MPa) et ϵ est la déformation. Un matériau dont le module de Young est très élevé est dit rigide. Quelques valeurs sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Exemple de valeur du module de Young pour quelques matériaux

Roche	Module de Young (en GPa)	Référence
magnétite	183	Chicot <i>et al.</i> , 2011
hématite	215 - 350	Chicot <i>et al.</i> , 2011
goethite	358	Chicot <i>et al.</i> , 2011

- Le coefficient de Poisson (ν) caractérise le rapport entre la déformabilité radiale/latérale et axiale. Il est de 0,35 pour le minerai de fer lorrain (Grgic *et al.*, 2013).

Tous ces caractères sont utilisés lors des expériences de mécanique des roches.

5.2 Matériels et méthodes

Pour les expériences d'indentation et de compression simple, les minerais vieilli et intact ont été utilisés. Les échantillons de minerai vieilli proviennent de blocs de roche prélevés au sein de piliers ayant subi une ventilation pendant 70 ans ou plus (oxydation). Les échantillons de minerai sain ont été prélevés à partir de piliers beaucoup plus récents (10-20 ans) et non oxydés. Seuls les faciès les plus ferrifères ont été retenus. En effet, le minerai de fer est représenté par deux faciès différents : un ferrifère et un carbonaté. Si le faciès ferrifère est riche en fer (30 - 35%) et de couleur allant du vert-gris (état sain) au rouge-brun (état vieilli oxydé), le faciès carbonaté est quant à lui riche en calcite (et donc plus pauvre en fer), aisément identifiable aux zones blanches du minerai. C'est la nature ferrifère du minerai, oxydable, qui est à l'origine des modifications des propriétés mécaniques du minerai et donc du "vieillessement" du minerai de fer (Grgic, 2001).

5-2-1- Indentation

Chaque échantillon a été taillé afin de former une barrette pouvant être introduite dans les flacons de réaction. Chaque barrette de minerai vieilli mesure environ 10 cm de long, 1 cm de large et 0,5 mm d'épaisseur. Pour le minerai sain, pour des raisons liées à la source du minerai, la longueur est de 5 cm environ, 1 cm de large et 0,5 mm d'épaisseur. Deux barrettes par flacon ont été introduites. Pour chaque incubation différente, 10 points d'indentation ont été prévus. Or, à cause de la fragilité intrinsèque du matériau, certains points d'indentation ont

entraîné la rupture des barrettes avant ou pendant les phases de chargement - déchargement, entraînant une analyse incomplète de certains points.

Le poinçon utilisé (P10-AA5, Fig. 2C) est de type cylindrique, 0,997 mm de diamètre et en acier avec traitement de surface pour augmenter la rigidité. Les paramètres d'indentation sont: vitesse de chargement 0,02 mm min⁻¹, enfoncement maximal 0,3 mm, charge maximale 80 N (minerai vieilli) et 120 N (minerai intact), relaxation 3 min et déchargement 50 %. Les cycles de chargement - déchargement se situent à 40, 70 et 100 N (uniquement pour le minerai intact). Tous les échantillons ont été traités en condition saturée par une immersion de 15 min avant la mesure puis par l'adjonction continue de milieu de culture (pour préserver au mieux l'anaérobie) ou eau du robinet (pour les échantillons initiaux), afin de maintenir l'état de saturation du minerai. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel MicroCalc qui permet de tracer les tangentes aux courbes de déchargement (Fig. 3). Ceci donne directement la valeur du module de Young selon les formules (Oliver and Pharr, 1992 ; 2004):

$$\frac{1}{Er} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}$$

$$S = \frac{dF}{dP} = 2Er\sqrt{A/\pi}$$

avec S = la rigidité mesurée, A = l'aire projetée du contact élastique, Er = le module de Young réduit, Ei et vi le module de Young et le coefficient de Poisson de l'indentateur, et E et ν le module de Young et le coefficient de Poisson du minerai. Ce dernier ayant été fixé à 0,35 sur le logiciel qui pilote l'expérience (Grgic *et al.*, 2013).

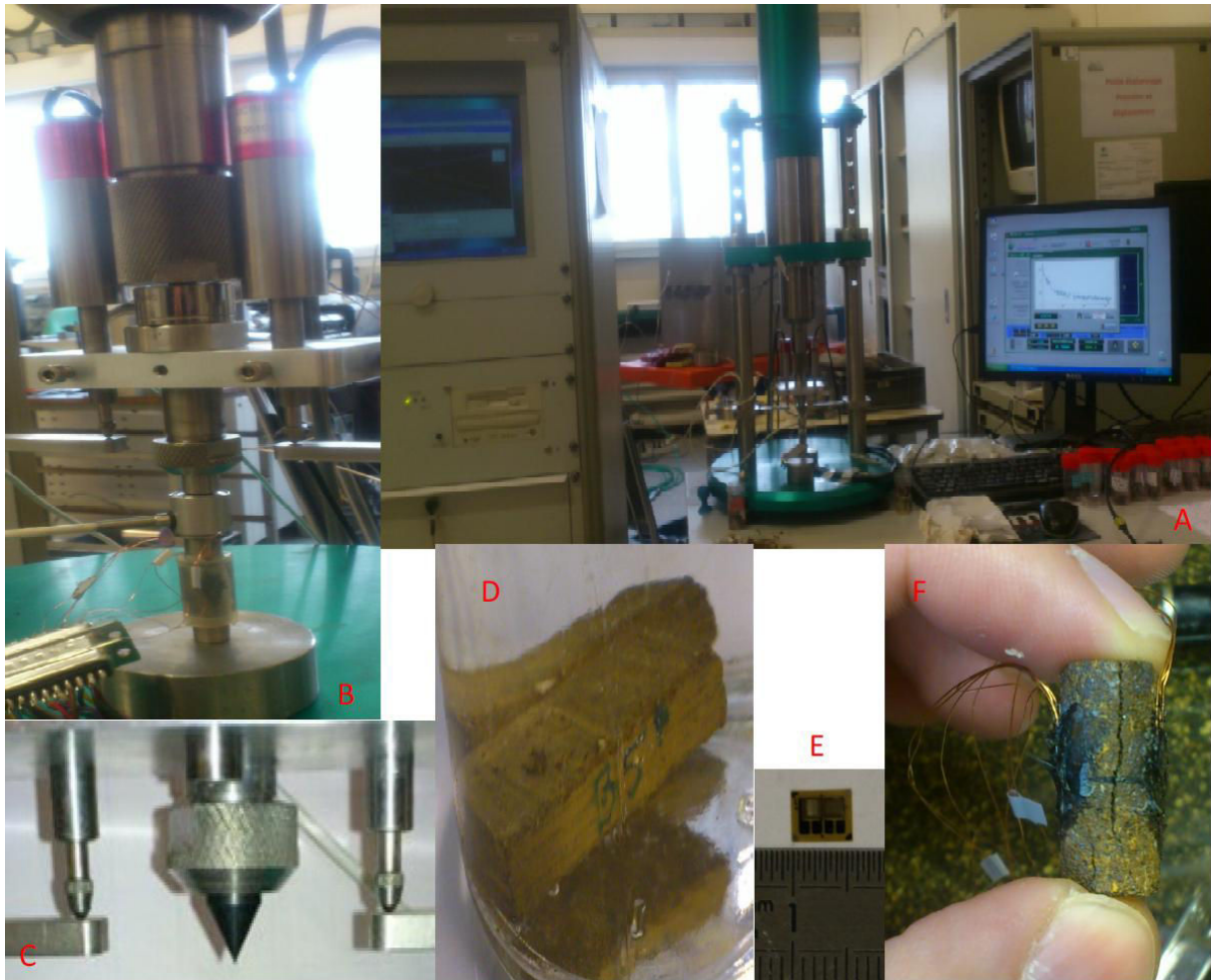


Figure 2: Photographies de l'appareil permettant la compression simple et l'indentation (A et B). (A) représente, de gauche à droite, la centrale d'acquisition des capteurs de déformations, le système de piston, prodiguant une force contrôlée, et l'ordinateur pilotant le piston et mesurant le déplacement et la force ; (B) représente le système de piston (tube central) et les capteurs de mesure de déplacement situé de part et d'autre du piston (capteurs LVDT). L'utilisation de l'un ou l'autre se fait par le changement de la pointe en contact avec le matériau, un cylindre de diamètre 1 cm pour la compression, ou une pointe conique pour l'indentation (C). En (D) est présentée une barrette de minerai de fer intact dans un flacon d'incubation. (F) est une éprouvette équipée pour la compression simple. Sous la couche noire de silicone se trouve une jauge de déformation 350Ω présentée en (E).

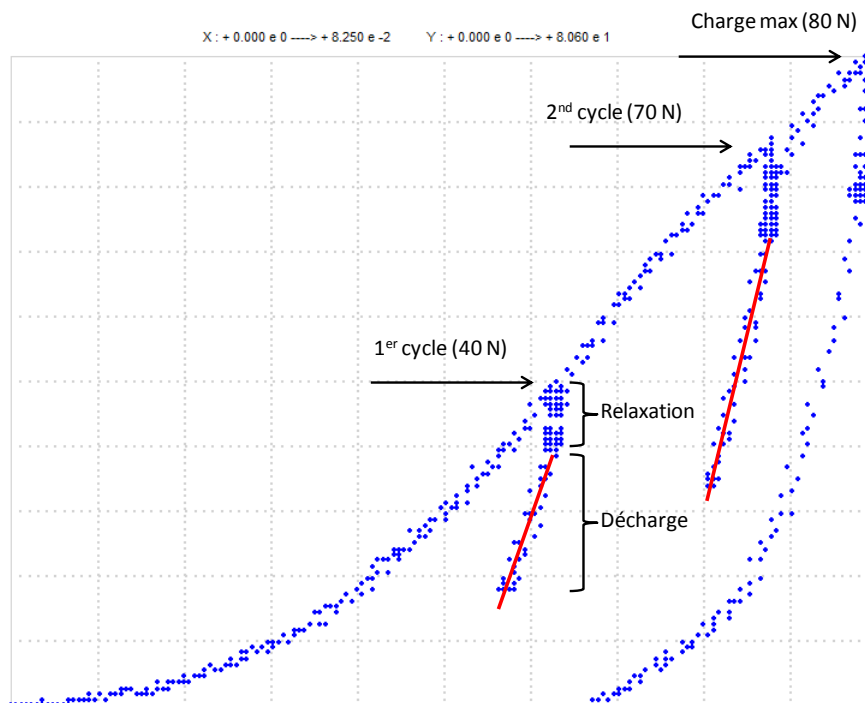


Figure 3 : Exemple d'obtention du module de Young à partir du logiciel MicroCalc. Le trait rouge correspond au tracé de la régression linéaire des moindres carrés, dont la pente fournit le module de Young après traitement par le logiciel. Les cycles de déchargement/rechargement servent à mesurer les paramètres élastiques. En effet les paramètres élastiques sont mesurés à partir des courbes de déchargement car elles correspondent au comportement réversible, donc purement élastique, du matériau. Une phase de relaxation est effectuée avant chaque décharge de la contrainte afin de dissiper les effets visqueux qui pourraient perturber la mesure des paramètres élastiques pendant le déchargement.

5-2-2- La compression simple

Chaque échantillon a été carotté et rectifié de manière à obtenir une éprouvette (cylindre) de 1 cm de diamètre et de 2 cm ($\pm 0,1$) de hauteur environ (Fig. 2F). Ensuite, les éprouvettes sont équipées de deux jauges de déformation extensométriques, situées au centre de l'éprouvette et diamétralement opposées (350Ω , *Micro-Measurements*, Fig. 2E). Chaque jauge mesure les déformations axiale et latérale. Elles sont collées à l'aide d'une résine qui sert également d'isolant vis à vis de l'eau interstitielle (AE et agent durcissant type-10, *Micro-Measurements*). La résine est constituée d'une base et d'un catalyseur qui sont mélangés à 2/3 - 1/3. Des fils d'étain sont soudés à même la jauge pour la relier à la centrale d'acquisition (Fig. 2A, à gauche). Enfin une seconde couche de résine est ajoutée pour isoler la jauge et ses fils. Ceci évite les interactions électriques avec l'eau de saturation. Enfin, une couche de silicone (Autos-Bateaux, RUBSON) est ajoutée afin de protéger les points de soudures entre fils et jauges lors de la mise en place de la jaquette. Pour les échantillons bioréduits et réduits

chimiquement, l'équipement des jauges a été réalisé sous un flux d'azote (99,9%) et sous cloche. Soixante-douze heures sont nécessaires à la préparation d'une éprouvette à cause des différents temps de séchage, de la résine et du silicone. Une fois prête, l'éprouvette équipée est mise à saturation pendant 15 min dans le milieu de culture ou l'eau du robinet. La saturation est maintenue au cours de l'essai à l'aide d'une jaquette qui entoure l'éprouvette. Des cales en acier (diamètre 1 cm, hauteur 0,5 cm) sont ajoutées à chaque extrémité. Elles permettent de maintenir l'éprouvette debout et surtout un meilleur contact avec le piston. La compression est pilotée par la même machine que l'indentation (Fig. 2A, à droite). Les paramètres sont : vitesse de chargement $0,03 \text{ mm min}^{-1}$, temps de relaxation 10 min et déchargement 50%. Les cycles de chargement - déchargement se situent à 250, 500, 750, 1500, 2000 et 3000 N. La tangente à la pente de la courbe de déchargement de la jauge axiale est tracée donnant ainsi le module de Young (E). Le coefficient de Poisson (ν) est déterminé par le rapport, en valeur absolue, entre le module de Young et la pente de la courbe de déchargement de la jauge latérale.

5-2-3- Mise en place des expériences de fluages

Trois expériences de fluage ont été menées simultanément sur du minerai de fer intact afin d'observer l'effet des réactions d'oxydation lorsque l'éprouvette est soumise à une contrainte permanente. La base de chacune des éprouvettes étaient en contact avec son milieu réactionnel : i) au contact du milieu M_{SWM} - le témoin, ii) au contact d'une solution de peroxyde d'hydrogène renouvelé tous les 7 jours, iii) au contact du milieu M_{SWM} saturé en O_2 (90% O_2 -10% CO_2 , Air Liquide). Le milieu M_{SWM} a été saturé suite à un barbotage à l' O_2 , puis l'adjonction quotidienne de 0,5 bar d' O_2 dans la solution au contact de l'éprouvette.

Les paramètres sélectionnés sont : palier de fluage à 3 MPa, vitesse de chargement à 0,25 MPa et déchargement à 50%. Avant et après chaque palier, un déchargement a été effectué. Chaque palier a duré environ 15 jours. La Figure 3 montre une cellule de fluage.

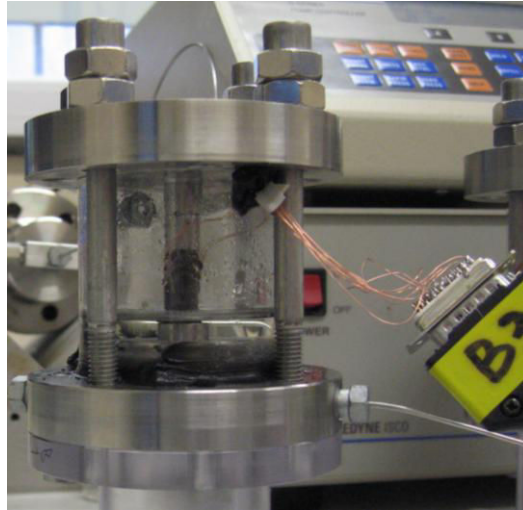


Figure 3 : Photographie d'une cellule de fluage. La contrainte est délivrée par un piston qui est poussé par de l'huile. Le piston se trouve à la base de l'éprouvette. Les déformations sont mesurées par des jauges extensométriques.

5-2-4- Mise en place des réactions chimiques et biologiques

Pour les réactions abiotiques, éprouvettes et barrettes ont été immergées pendant 15 jours en présence de H_2O_2 (50 mL) ou H_2S (50 mL de solution à 250 mM). Ce temps d'incubation a été déterminé d'après des expériences préliminaires sur poudre et sur les éprouvettes. Par exemple, les réactions avec H_2O_2 sur le minerai en poudre sont courtes (quelques minutes). Une fois la réaction terminée, tout le Fe(II) est oxydé. Lors des tests sur éprouvettes, un bullage intense s'est produit en présence de H_2O_2 (Fig. 2A - Annexe 5). Une fois que le bullage est terminé et que l'adjonction de H_2O_2 ne réamorçait pas la réaction, la réaction a été considérée comme terminée. Cette oxydation a uniquement été réalisée sur le minerai de fer intact (voir § 4-2).

Pour les réactions biotiques, éprouvettes (en duplicat) et barrettes (10 points d'indentation) ont été incubées en présence de 10^8 à 10^9 cellules mL^{-1} de *Shewanella putrefaciens* dans 85 mL de milieu M_{SWM} (supplémenté en vitamines et éléments traces) et 50 mM de formiate, en condition anoxique. La préparation complète de la souche et la composition du milieu sont disponibles dans le chapitre 2. Des tests de viabilité de la souche ont été réalisés tous les 30 jours environ sur gélose nutritive. Une fois les tests négatifs, en boîte à gant, chaque incubation a été entièrement renouvelée (M_{SWM} + *S. putrefaciens* + formiate). Après 4, 15 et 19 mois (échantillon nommé respectivement T4, T15 et T19), les échantillons ont été placés à 4°C afin de stopper la réaction biologique et ce jusqu'à l'analyse mécanique.

5.3 Résultats

5-3-1- Compression simple

Premièrement, les jauges, très fragiles, sont collées sur l'éprouvette à l'aide d'une résine qui, si elle n'affecte pas les propriétés mécaniques, va être absorbé par le minéral qui est poreux. Il est possible que cela entraîne un décollement des jauges pendant les différentes étapes de préparation comme la soudure des fils d'étain ou la mise en place de la jaquette maintenant les conditions de saturation. Surtout pendant cette dernière étape où 1 jauge (axiale ou latérale) a été régulièrement perdue (50% des cas). De plus, au cours de la mesure, les jauges ont pu également cesser de fonctionner (passage en "*offscale*", hors échelle). Pour cette taille d'échantillon, il est sans doute nécessaire de trouver une alternative afin que les mesures puissent être effectuées dans des conditions plus favorables.

Les valeurs des seuils de rupture, module de Young, déformation latérale et coefficient de Poisson sont données dans les Tableaux 1 et 2. Idéalement, l'aspect des courbes de déformation axiale, latérale et volumique ressemble à la Figure 4A. Mais lorsque les capteurs font défaut, les courbes sont plus anarchiques (Fig. 4B). Le module latéral représente la déformation latérale du matériau comprimé. Il est représenté négativement. Le coefficient de Poisson est calculé comme la valeur absolue de la différence entre le module de Young et le module latéral.

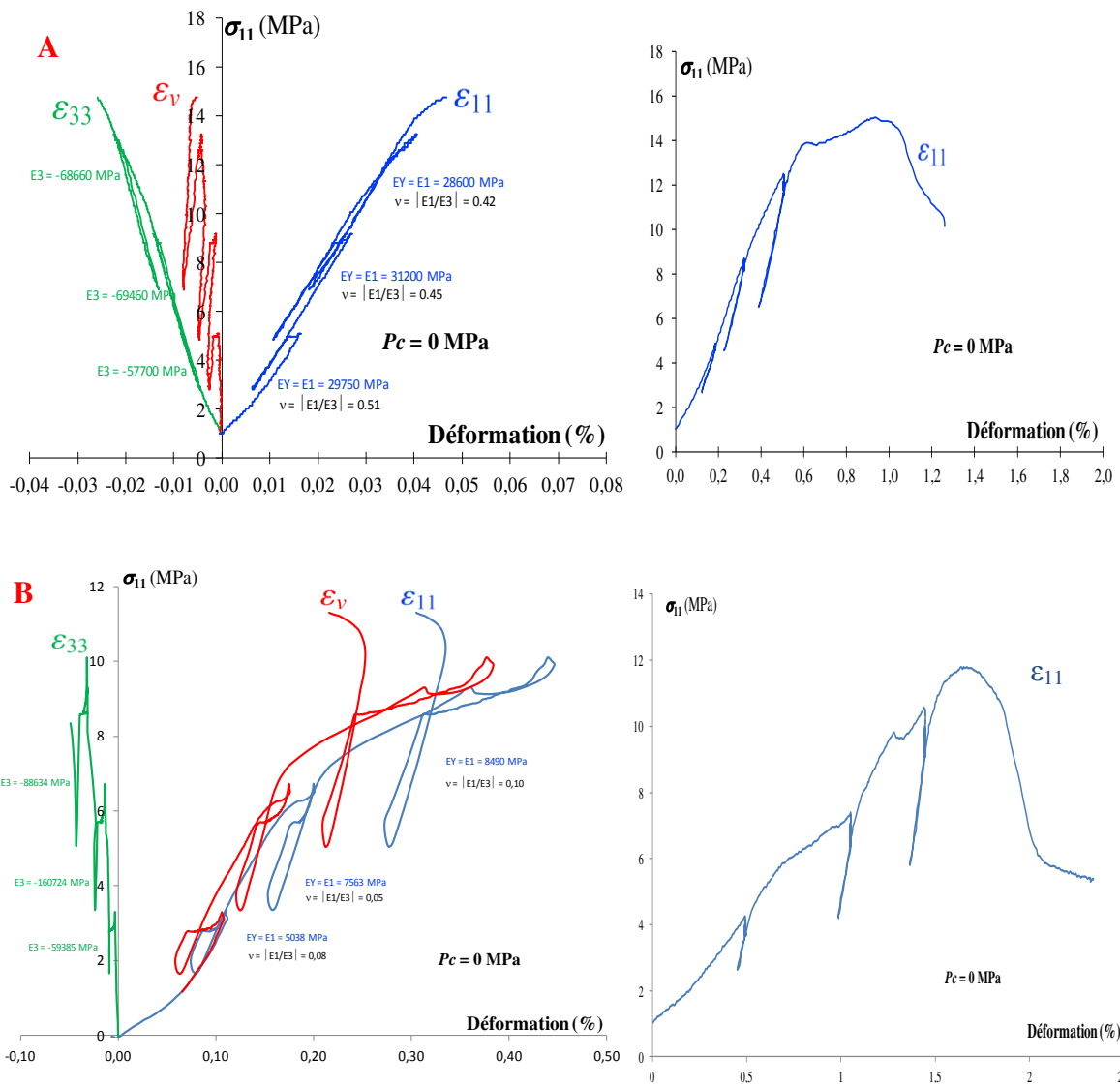


Figure 4 : A gauche, courbe de déformation axiale, latérale et volumétrique d'un minerai sain [(**A**) échantillon de minerai intact et (**B**) échantillon de minerai intact bioréduit]. A droite, mesure du capteur LVDT correspondant au même échantillon. Légende: ϵ_{33} = déformation latérale et les valeurs correspondantes à chaque cycle (en vert), ϵ_v = déformation volumétrique, ϵ_{11} = déformation axiale et les valeurs correspondantes à chaque cycle (en bleu), EY = module de Young, σ = contrainte appliquée, P_c = pression de confinement, ν = coefficient de Poisson.

Tableau 1 : Valeurs obtenues suite aux essais de compressions sur les différents échantillons de minerai vieilli (ag). Le seuil de rupture est donné en contrainte effective sur la surface de l'éprouvette (MPa). Le module de Young moyen des cycles de chargement-déchargement pour les jauges axiales et latérales est indiqué. Les tests statistiques (t-test et test de Wilcoxon, bilatéral, $\alpha = 5\%$) sont réalisés à l'aide des moyennes des duplicats ((1) et (2)). La moyenne de chaque échantillon, ayant subi la bioréduction, a été confrontée à la moyenne des éprouvettes initiales (Échantillon ag1 à ag8). La p-value du résultat du test est présentée.

Échantillon de minerai vieilli	Seuil de rupture (Mpa)	Module de Young (Mpa)	Module latéral (MPa)	Coefficient de poisson	t-test	Test Wilcoxon	
						axiale	latérale
ag1	5,58	7099	68436	0,10			
ag2	3,66	7881	30674	0,26			
ag3	7,69	3984	2276	1,75			
ag4	2,97	nd	nd	nd			
ag5	3,05	nd	nd	nd	-	-	-
ag6	1,94	nd	nd	nd			
ag7	3,64	8895	13369	0,67			
ag8	4,35	7186	29210	0,25			
T _{ag4} (1)*	3,56	nd	36731	nd	0,61	0,25	0,25
T _{ag4} (2)	14,89	14156	66420	0,21			
T _{ag15} (1)	6,90	7879	11913	0,72	0,02	0,75	0,50
T _{ag15} (2)	4,88	7414	15946	0,46			
T _{ag19} (1)	3,70	6525	46382	nd			
T _{ag19} (2)	3,47	nd	25849	nd	0,947	0,50	1
T _{ag19} (3)	9,52	15628	94036	0,18			
T _{ag19} abio (1)	4,87	6642	21351	0,31	0,65	0,50	0,25
T _{ag19} abio (2)	6,58	9763	50525	0,20			

nd = non déterminé lors de la compression; abio = minerai incubé sans *S. putrefaciens*

*T_{ag4} (1) = échantillon de minerai vieilli (ag) incubé pendant 4 mois avec *S. putrefaciens*, 1^{er} duplicat. (15 et 19 correspondent à 15 et 19 mois respectivement).

La valeur indiquée pour le module de Young est la moyenne des cycles de chargement-déchargement lors de la compression de l'échantillon. La moyenne est calculée à l'aide de 1 à 5 valeurs selon le nombre de cycle effectué.

Tableau 2 : Valeurs obtenues suite aux essais de compressions sur les différents échantillons de minerai intact (in). Le seuil de rupture est donné en contrainte effective sur la surface de l'éprouvette (MPa). Le module de Young moyen des cycles de chargement-déchargement pour les jauges axiales et latérales est indiqué. Les tests statistiques (t-test et test de Wilcoxon, bilatéral, $\alpha = 5\%$) sont réalisés à l'aide des moyennes des duplicats ((1) et (2)). La moyenne de chaque échantillon, ayant subi la bioréduction, a été confrontée à la moyenne des éprouvettes brutes (Échantillon in1 à in9). La p-value du résultat du test est présentée.

Échantillon	seuil de rupture (Mpa)	Module de Young (Mpa)	Module latéral (MPa)	Coefficient de poisson	t-test	Test Wilcoxon	
						axiale	latérale
in1	2,67	nd	nd	nd	exclu	exclu	exclu
in2	23,07	13121	105824	0,15			
in3	17,75	14181	133777	0,11			
in4	21,81	9168	80628	0,12			
in5	18,84	8609	56765	0,15			
in6	19,83	13201	70280	0,19	-	-	-
in7	16,03	11219	40265	0,28			
in8	22,40	14804	85245	0,18			
in9	16,04	29877	65297	0,46			
T _{in4} (1)	9,37	13855	28956	0,48			
T _{in4} (2)	18,43	7823	50053	0,16	0,53	0,81	0,31
T _{in15} (1)	10,49	nd	250614	nd			
T _{in15} (2)	18,92	12473	47397	0,26	0,55	0,75	0,43
T _{in19} (1)	10,49	7030	102914	0,08			
T _{in19} (2)	14,57	6993	46929	0,17	0,1	0,14	1
T _{in19} (3)	15,22	9578	71542	0,13			
T _{in19 abio} (1)	7,00	7355	38236	0,19			
T _{in19 abio} (2)	20,10	nd	72764	nd	0,59	0,50	0,81
T _{H2O2} (1)	17,95	8270	48635	0,13			
T _{H2O2} (2)	14,88	9601	66472	0,15	0,10	0,31	0,65
T _{H2S} (1)	16,69	9680	161450	0,07			
T _{H2S} (2)	21,30	17927	97960	0,17	0,46	0,20	0,15
T _{H2S} (3)	15,81	79729	93254	0,89			

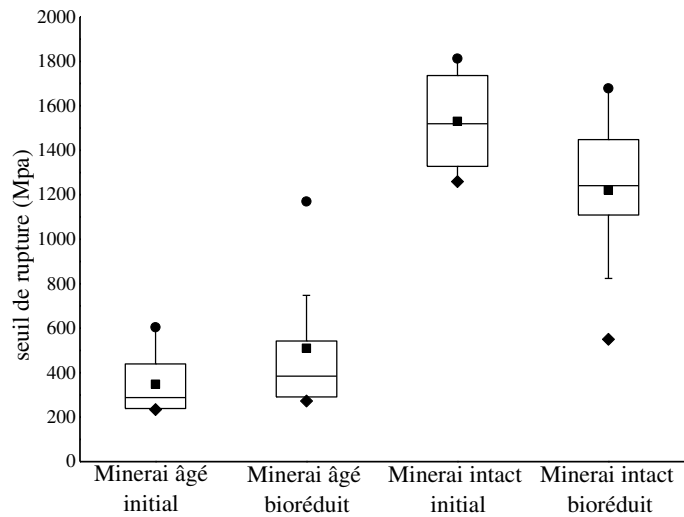
nd = non déterminé lors de la compression; abio = minerai incubé sans *S. putrefaciens*

*T_{in4} (1) = échantillon de minerai intact (in) incubé pendant 4 mois avec *S. putrefaciens*, 1er duplicat. (15 et 19 correspondent à 15 et 19 mois respectivement). H₂O₂ et H₂S réfèrent aux expériences chimiques d'oxydation et de réduction, respectivement.

La valeur indiquée pour le module de Young est la moyenne des cycles de chargement-déchargement lors de la compression de l'échantillon. La moyenne est calculée à l'aide de 1 à 5 valeurs.

Les Tableaux 1 et 2 présentent deux résultats. Le premier est que les propriétés élastiques (modules de Young et latéral) ne sont pas impactés par les réactions d'oxydation ou de réduction. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études (Grgic, 2001; Grgic *et al.*, 2013). Le second est que les seuils de ruptures ne semblent pas non plus être impactés par les réactions d'oxydation et de réduction. Cependant, il faut noter que les essais n'ont pu être réalisés que sur un petit nombre d'échantillons, ce qui pourrait expliquer qu'aucune différence n'apparaît entre les minerais initiaux et les minerais traités, c'est-à-dire les minerais ayant subi une oxydation ou une réduction (Tableaux 1 et 2). Aucune différence statistique n'apparaît lorsque la comparaison est faite entre les minerais traités et les témoins abiotiques (Annexe 5 - Tableau A1 et A2) ou les minerais traités entre eux (Annexe 5 - Tableau 3 et 4).

Les seuils de ruptures des minerais intacts et vieillis, initiaux ou traités, ont été comparés entre eux (Fig. 5). Les résultats montrent qu'il existe une différence significative entre les minerais intacts et vieillis initiaux. Le minerai vieilli possède un seuil de rupture inférieur à celui du minerai intact. Ce résultat est en accord avec l'étude menée par Grgic *et al.*, 2013. Le second résultat significatif est que les échantillons de minerai intacts initiaux et traités sont significativement différents. Cependant, si trois valeurs (échantillon T_{in4} (1), T_{in15} (1) et T_{in19} (1)) dont les seuils de rupture sont inférieurs aux autres, sont retirées, le résultat du test de Student montre alors que les minerais intacts initiaux et traités sont identiques (p -value = 0,084). Le seuil inférieur de rupture de ces trois échantillons pourrait être dû à l'apparition des microfissures au sein des éprouvettes lors de la préparation (carottage) et non au traitement subi. Par conséquent, il est délicat de considérer que minerais intacts initiaux et traités sont différents.



	minerai intact initial	minerai intact bioréduit	minerai vieilli initial	minerai vieilli bioréduit
minerai intact initial	-	0,042	< 0,001	< 0,001
minerai intact bioréduit		-	< 0,001	0,008
minerai vieilli initial			-	0,23

Figure 5: Représentation boxplot des différents seuils de rupture des échantillons initiaux et traités pour chaque minerai de fer. Chaque série correspond à l'ensemble des valeurs obtenues pour les échantillons initiaux et traités et par minerai. Pour chaque série, la valeur la plus basse a été retirée afin que chaque série suive une loi normale de distribution (Test de Shapiro-Wilk). Le tableau de la Figure 5 donne les résultats obtenus pour le test de Student (t-test, bilatéral) avec $\alpha = 5\%$.

Ainsi, après les différentes comparaisons statistiques, seul le seuil de rupture semble être statistiquement différent entre minerai vieilli et minerai intact (Grgic *et al.*, 2013). Il est néanmoins possible que l'association des différentes variables au sein d'une étude multivariée puisse donner d'autres résultats. C'est dans le but de vérifier cette hypothèse qu'une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée.

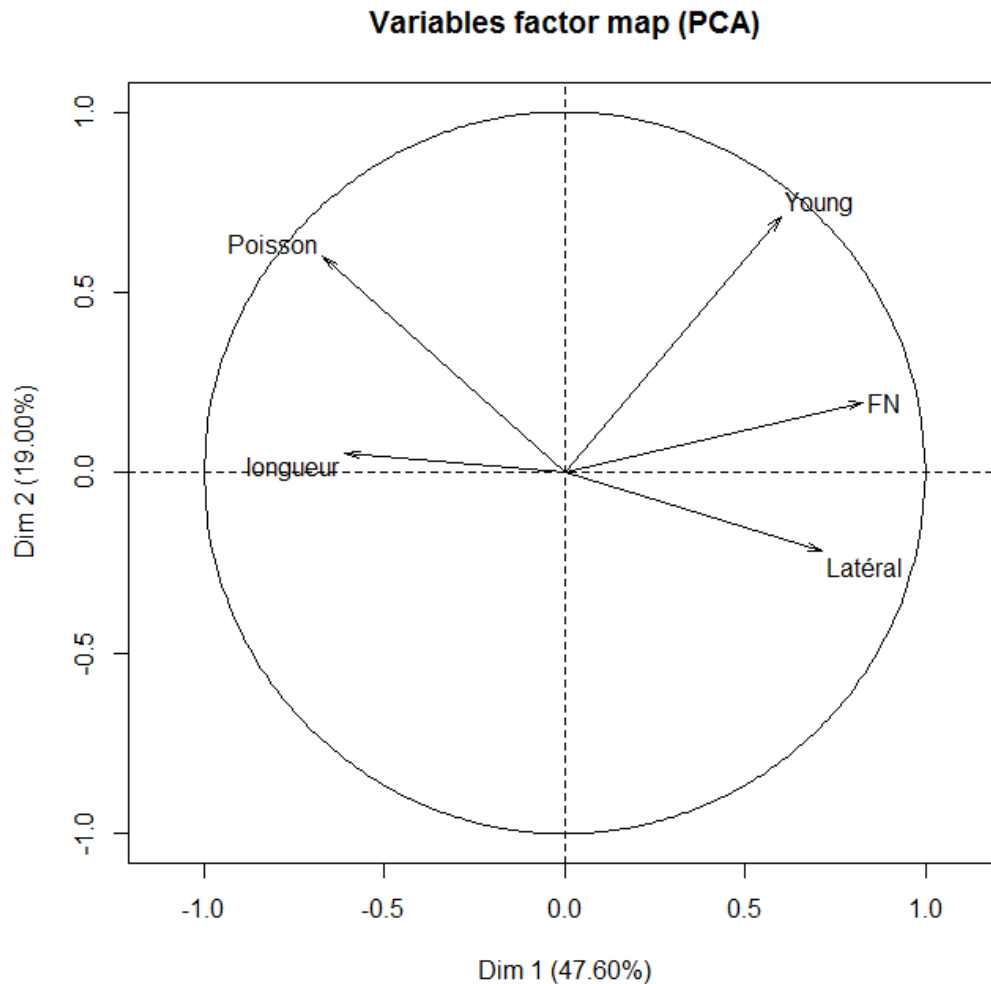


Figure 6 : Variable influençant les dimensions de l'ACP. La longueur de la flèche indique l'importance de la variable sur les données ainsi que leur influence sur les différentes dimensions principales. Légende: longueur = taille de l'éprouvette, FN = seuil de rupture, Young = module de Young, latéral = déformation latérale et Poisson = coefficient de Poisson. FN est la variable majoritaire de la dimension 1(Dim 1) avec la déformation latérale dans une moindre mesure. Le module de Young contribue à l'axe 2 (Dim 2) avec dans une moindre mesure le module de Poisson (voir Tableau A5 - Annexe 5 pour les différentes contributions).

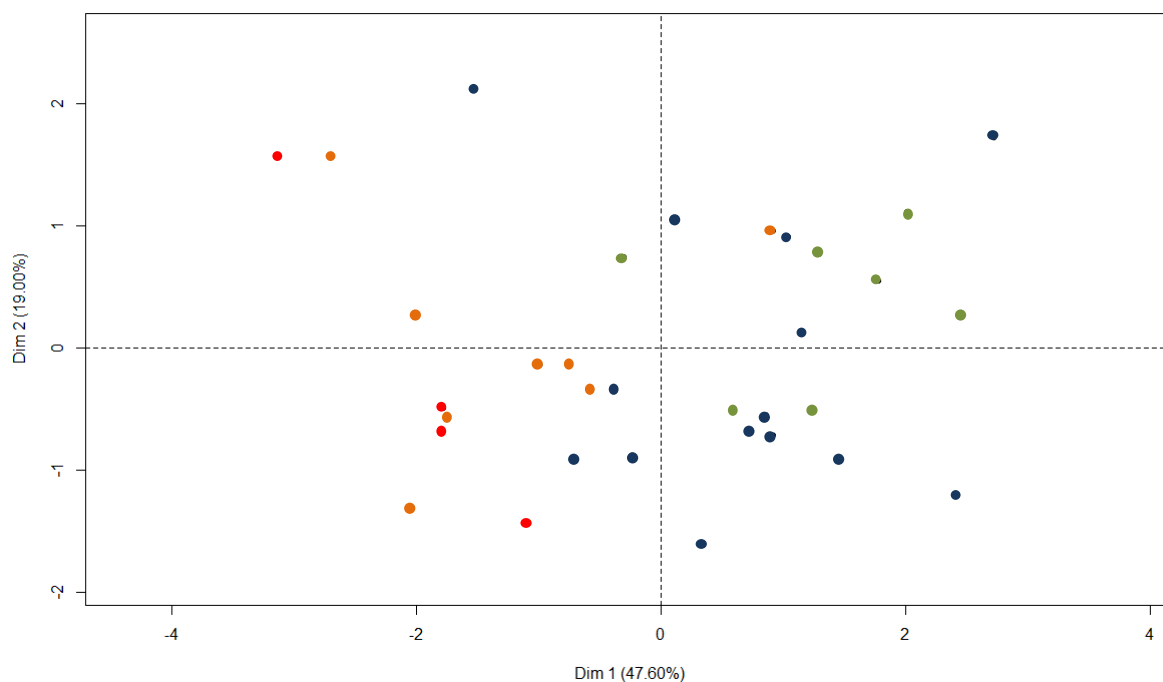


Figure 7 : Analyse ACP des individus (échantillons). En rouge sont représentés les échantillons de minerai vieilli à l'état initial et en orange ceux ayant subi la bioréduction bactérienne. En vert sont représentés les échantillons de minerai intact à l'état initial et en bleu ceux ayant subi la bioréduction bactérienne ou réaction chimique (H_2S et H_2O_2). La liste des échantillons utilisés pour la construction de l'ACP est disponible dans le Tableau A6 de l'Annexe 5. Trois échantillons ont été écartés pour la construction de l'ACP car trop influencés par une des variables (échantillon concerné : ag3, in9 et T_{H_2S} (3)).

L'ACP a été réalisée à l'aide de 5 variables : la taille de l'éprouvette, le seuil de rupture, le module de Young (ou déformation axiale), la déformation latérale et le coefficient de Poisson. La Figure 6 trace le graphique d'influence des variables. La dimension 1 (en abscisse) est construite à partir du seuil de rupture et, dans une moindre mesure, de la déformation latérale. Le seuil de rupture compte pour 47,6 % d'influence sur la position de chacun des points. C'est par conséquent la variable qui discrimine le plus les échantillons entre eux. En revanche, module de Young et coefficient de Poisson contribuent équitablement à l'axe 2 (ordonnée). Ces deux paramètres comptent pour 19 % d'influence sur la position de chacun des points. La longueur a surtout une influence dans la dimension 3. Cette variable n'a donc que peu d'impact sur la différenciation des échantillons de longueur similaire. Deux autres dimensions existent mais contribuent à moins de 20 % du cumul des variances (voir Tableau A5 - Annexe 5). Une fois encore, le seuil de rupture semble être la variable majoritaire expliquant la différence entre les échantillons.

La Figure 7 représente les échantillons dans les 5 dimensions. Chacun des échantillons est placé en fonction de son rapport aux différentes variables. Afin de simplifier le graphique, les échantillons ont été regroupés par catégorie : minerais vieillis et intacts, initial ou traité. Hormis certaines exceptions, le minerai sain se trouve à droite de l'axe alors que le minerai vieilli se trouve à gauche. Ce résultat, est retrouvé dans le dendrogramme découlant de l'ACP (Fig. A1 - Annexe 5). Ainsi le minerai intact est plus influencé par la force amenant au seuil de rupture que le minerai vieilli. De plus, l'ensemble des données est plutôt distribué sur l'abscisse. Cela indique que le module de Young influence peu la différenciation entre minerais vieillis et intacts (Grgic, 2001; Grgic *et al.*, 2013).

5-3-2- L'indentation

Minerais vieillis et minerais intacts ont subi respectivement 2 et 3 cycles d'indentation à 40, 70 et 100 N (uniquement pour le minerai intact). Or, pour le minerai intact, il a été constaté que le cycle à 40 N est trop influencé par la fermeture des espaces entre les cales qui soutiennent l'échantillon, entraînant un effet parasite sur le premier cycle d'indentation. Ce cycle a donc été ignoré. Il faut noter que toute fissuration que l'indentation entraîne sur la barrette, conduit à la fin de l'essai. Mais, dans ces cas là, les cycles effectués ont été pris en compte. Une fois la mesure effectuée, le module de Young a été déterminé à l'aide du logiciel MicroCalc en traçant la tangente à la courbe de déchargement et ce à chaque cycle (Fig. 1). L'ensemble des données récoltées est présenté dans les Tableaux A7 et A8 de l'annexe 5. Comme les éprouvettes, les barrettes ont été incubées en présence de *Shewanella putrefaciens* dont les réactions ont été arrêtées à 4, 15 et 19 mois. Ces dates sont respectivement représentées par les notations $T_{ag/in4}$, $T_{ag/in15}$ et $T_{ag/in19}$ où ag/in représente la notation pour minerai de fer vieilli (ag) et intact (in). En plus d'obtenir le module de Young associé à l'indentation, des tests statistiques ont été réalisés afin de comparer les valeurs des échantillons entre eux et, *in fine*, déterminer l'impact de la bioréduction vis à vis des échantillons initiaux.

5-3-2-1- Minerais vieillis

Afin de pouvoir utiliser le test de Student avec une plus grande fiabilité, les valeurs d'indentations de chaque cycle (40 N et 70 N) pour un même échantillon, ont été comparées. Cela dans le but d'obtenir un pool de valeur plus important et ainsi augmenter la fiabilité des tests de comparaison. Pour les minerais vieillis initiaux, les tests effectués montrent qu'il

existe des différences significatives intra-échantillon et inter-échantillon entre les deux cycles d'indentation (Fig. 8). Par conséquent, aucun regroupement n'a pu être effectué. Ainsi les différentes comparaisons entre minerai initial et traité ont été réalisées pour chaque cycle séparément. La Figure 9 présente la comparaison du cycle à 40 N. Hormis trois tests, tous les résultats obtenus montrent qu'il n'existe aucune différence significative entre les différents échantillons. La même conclusion est obtenue par la comparaison des échantillons pour le cycle à 70 N (Fig. 10). Par conséquent, la bioréduction n'a entraîné aucune modification mesurable sur le minerai vieilli.

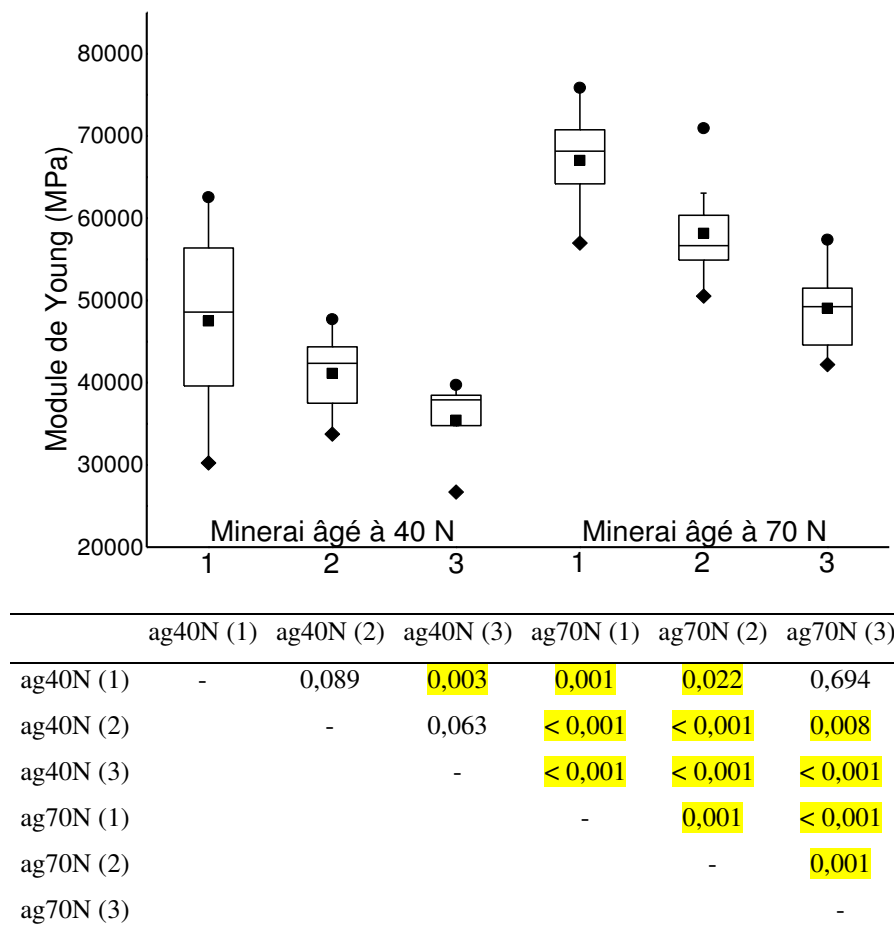
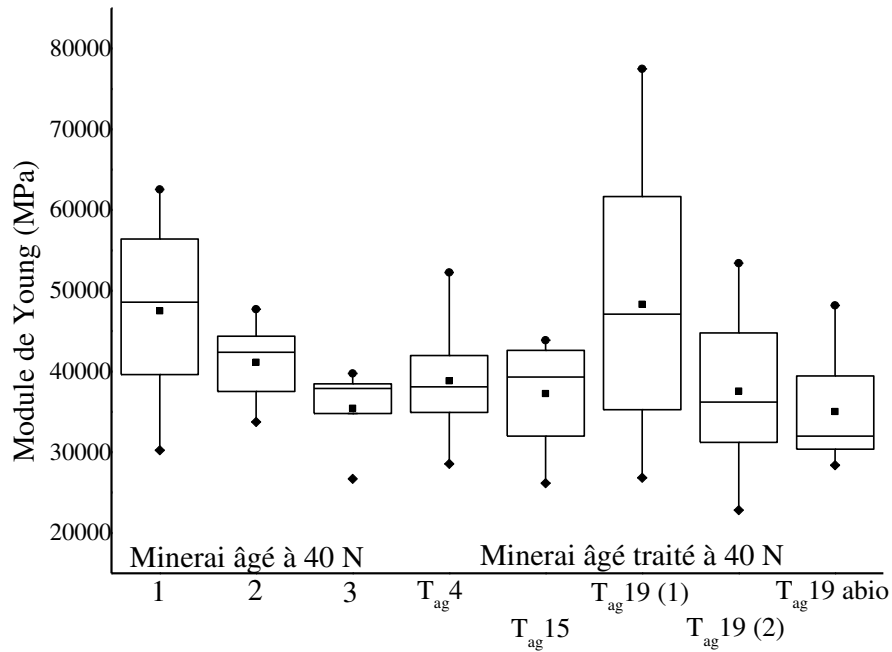
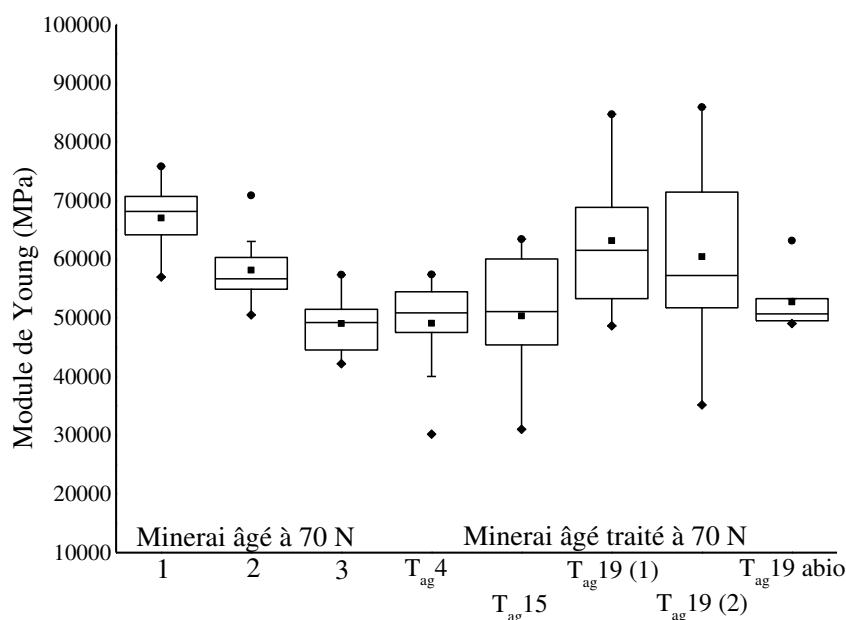


Figure 8 : Représentation boxplot des 10 points d'indentation des trois échantillons initiaux de minerai vieilli à 40 et 70 N (soit les 2 cycles de chargement - déchargement). Les séries suivent des lois normales (test de Shapiro-Wilk). Les séries ont été comparées entre elles par un test apparié de Student (bilatéral, $\alpha = 5$). Le tableau inséré montre ces résultats.



	ag40N (1)	ag40N (2)	ag40N (3)	T _{ag} 4	T _{ag} 15	T _{ag} 19 (1)	T _{ag} 19 (2)	T _{ag} 19 abio
ag40N (1)	-	0,089	0,003	0,033	0,010	0,900	0,108	0,003
ag40N (2)		-	0,063	0,190	0,076	0,251	0,217	0,058
ag40N (3)			-	0,289	0,442	0,111	0,552	0,973
T _{ag} 4				-	0,880	0,083	0,849	0,476
T _{ag} 15					-	0,103	0,928	0,557
T _{ag} 19 (1)						-	0,080	0,062
T _{ag} 19 (2)							-	0,654
T _{ag} 19 abio								-

Figure 9 : Représentation boxplot des 10 points d'indentation à 40 N des trois échantillons bruts de minerai vieilli (ag40N) et les échantillons ayant été mis en incubation avec *Shewanella putrefaciens* (T_{ag}4, T_{ag}15 et T_{ag}19) et le témoin abiotique (T_{ag}19 abio). Les séries suivent des lois normales (test de Shapiro-Wilk). Les séries ont été comparées entre elles par un test apparié de Student (bilatéral, $\alpha = 5\%$). Les résultats des tests sont présentés dans le tableau inséré.



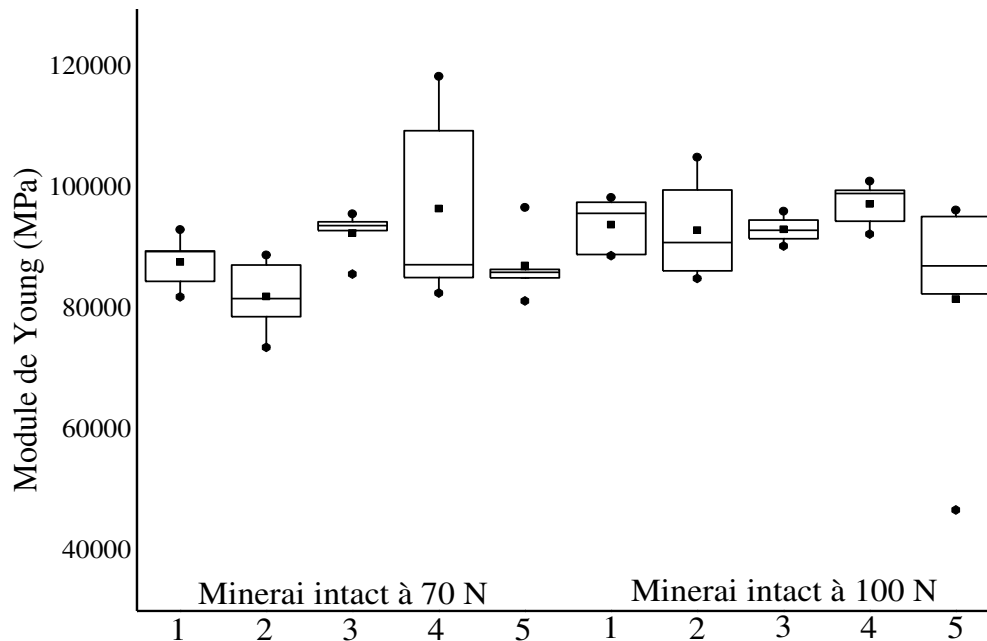
	ag70N (1)	ag70N (2)	ag70N (3)	T _{ag} 4	T _{ag} 15	T _{ag} 19 (1)	T _{ag} 19 (2)	T _{ag} 19 abio
ag70N (1)	-	0,001	0,000	0,002	0,022	0,166	0,214	0,001
ag70N (2)		-	0,001	0,040	0,225	0,322	0,810	0,001
ag70N (3)			-	0,989	0,852	0,037	0,140	0,263
T _{ag} 4				-	0,974	0,004	0,054	0,289
T _{ag} 15					-	0,156	0,337	0,732
T _{ag} 19 (1)						-	0,602	0,008
T _{ag} 19 (2)							-	0,163
T _{ag} 19 abio								-

Figure 10: Représentation boxplot des 10 points d'indentation à 70 N des trois échantillons bruts de minerai vieilli (ag70N) et les échantillons ayant été mis en incubation avec *Shewanella putrefaciens* (T_{ag}4, T_{ag}15 et T_{ag}19) et un abiotique (T_{ag}19 abio). Les séries suivent des lois normales (test de Shapiro-Wilk). Les séries ont été comparées entre elles par un test apparié de Student (bilatéral, $\alpha = 5\%$). Les résultats des tests sont présentés dans le tableau " inséré. Seul l'échantillon ag70N (1) est différent des autres. Par conséquent, les autres étant égaux le plus souvent, la conclusion est qu'il n'existe pas de différence entre les échantillons initiaux et traités.

5-3-2-2- Minerai intact

De la même manière que précédemment, des comparaisons des points d'indentation entre les échantillons de minerai intact ont été réalisés. La Figure 11 présente les résultats obtenus pour les minerais intacts initiaux aux cycles 70 N et 100 N. Contrairement au minerai vieilli initial, les résultats de l'indentation sont identiques entre les valeurs d'un même cycle et de l'autre cycle (41/45 tests effectués). Il a donc été considéré que toutes les valeurs d'indentation du minerai intact initial faisaient parti d'un même ensemble de valeurs. De la même manière, les points d'indentations des échantillons incubés en présence de *S. putrefaciens* à 4, 15 et 19

mois ont été comparés entre eux (Fig. 12). Il en résulte que les duplicats de chacun des temps d'incubation sont égaux. Les valeurs d'indentation ont donc été regroupées afin d'être comparées avec celles du minerai intact initial (Fig. 13). Les valeurs d'indentation des duplicats du témoin abiotique et des échantillons oxydés par H₂O₂ ont également été regroupées puis comparées aux valeurs du minerai initial (Fig. 13).



	in70 N(1)	in70N (2)	in70N (3)	in70N (4)	in70N (5)	in100N (1)	in100N (2)	in100N (3)	in100N (4)	in100N (5)
in70N (1)	-	0,129	0,051	0,33	0,869	0,08	0,400	0,0557	0,001	0,486
in70N (2)		-	0,004	0,140	0,172	0,065	0,0425	0,088	0,009	0,967
in70N (3)			-	0,654	0,165	0,689	0,813	0,709	0,088	0,322
in70N (4)				-	0,166	0,757	0,538	0,465	0,921	0,180
in70N (5)					-	0,186	0,331	0,229	0,0126	0,562
in100N (1)						-	0,950	0,869	0,251	0,210
in100N (2)							-	0,983	0,557	0,471
in100N (3)								-	0,108	0,311
in100N (4)									-	0,110
in100N (5)										-

Figure 11: Représentation boxplot des points d'indentation des cinq échantillons initiaux de minerai intact à 70 N et 100 N, en duplicat. Les séries suivent des lois normales (test de Shapiro-Wilk). Les séries ont été comparées entre elles par un test apparié de Student (bilatéral, $\alpha = 5\%$). Les résultats des tests sont présentés dans le tableau inséré. Il est possible de considérer toutes les valeurs d'indentation obtenues comme significativement égales.

La comparaison entre le minerai intact initial et le minerai intact oxydé par H₂O₂ montre que la réaction d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène entraîne une diminution de la valeur du

module de Young mesurée par indentation. Aucune différence significative n'a été observée entre le minerai intact initial et le minerai du témoin abiotique. Par conséquent, le milieu d'incubation n'induit aucun changement sur le minerai. Aucune différence n'a été observée entre le minerai initial et le minerai incubé pendant 4 mois avec la souche ferri-réductrice. En revanche, des différences significatives ont été observées entre le minerai intact initial et les échantillons incubés pendant 15 et 19 mois avec *S. putrefaciens*. Par conséquent, la bioréduction entraîne une augmentation de la valeur du module de Young mesurée par indentation.

Finalement, les valeurs des minerais vieillis et intact initiaux ont été comparées par un test de Student (bilatéral, $\alpha = 5\%$). Il existe une différence significative entre le module de Young des deux minerais ($p\text{-value} < 0,001$). Ceci correspond à une précédente étude de Grgic *et al.*, (2013).

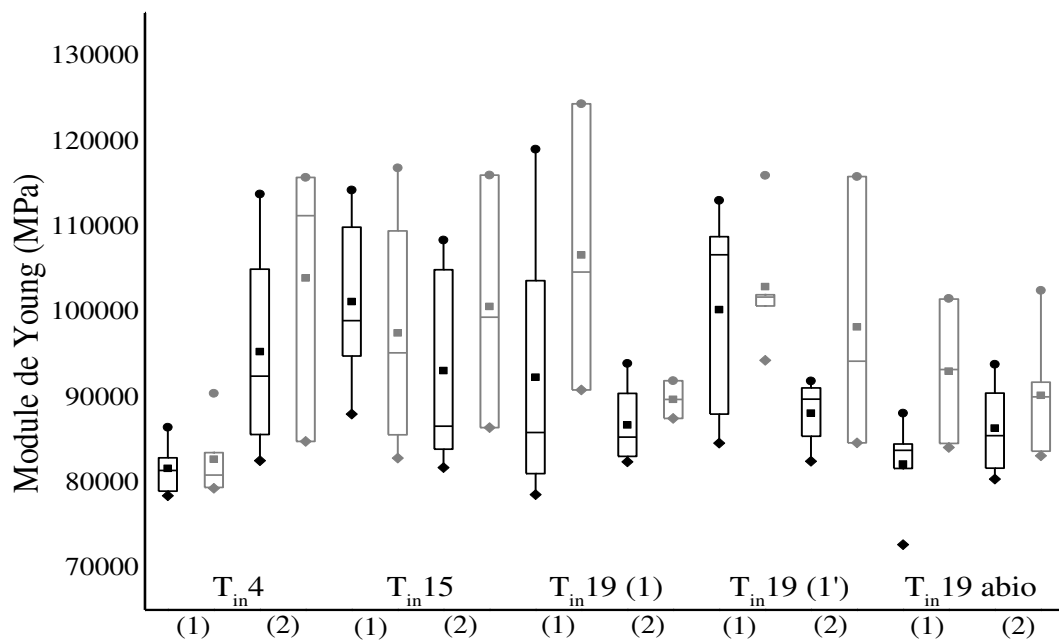
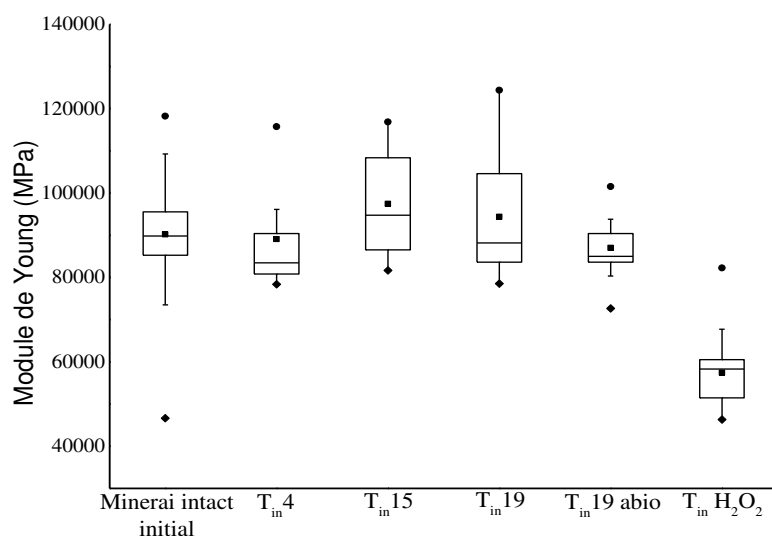


Figure 12 : Représentation boxplot des points d'indentation des échantillons de minerai intact à 70 N (boxplot noires) et 100 N (boxplot grises) ayant été mis en présence de *Shewanella putrefaciens*, en duplicat ((1) et (2)) (T_{in}19 abio qui correspond aux échantillons abiotiques). Les séries suivent des lois normales (test de Shapiro-Wilk) excepté T_{in}19 (1-2) 100 N. Les séries ont été comparées entre elles par un test apparié de Student (bilatéral, $\alpha = 5\%$). les résultats des différents tests sont présentés dans l'annexe 5 - Tableau A9. Les duplicats sont égaux et hormis quelques exceptions (18/200 tests réalisés), il n'y a pas de différence significative entre les différents temps d'incubation.



	minerai intact initial	T _{in} 4	T _{in} 15	T _{in} 19	T _{in} 19 abio	T _{in} H ₂ O ₂
minerai intact initial	-	0,58	0,01	0,03	0,40	< 0.001
T _{in} 4		-	0,051	0,25	0,56	< 0.001
T _{in} 15			-	0,52	0,01	< 0.001
T _{in} 19				-	0,02	< 0.001
T _{in} 19 abio					-	< 0.001
T _{in} H ₂ O ₂						-

Figure 13 : Représentation boxplot des points d'indentation des différents échantillons de minerai intact initiaux et traités par bioréduction ou oxydation. Pour chacun des réplicats, les valeurs ont été regroupées (voir explication du texte). Les séries ont été comparées entre elles par un test apparié de Student (bilatéral, $\alpha = 5\%$). Les résultats sont présentés dans le tableau inséré.

5-3-3- Le fluage

Lors des essais de fluages, comme lors des essais de compression uniaxiale, des jauges mesurant les déformations axiales et latérales ont été mises en place sur les éprouvettes. Malheureusement, au cours de l'expérience de fluage, les jauges ont cessé de fonctionner, ne permettant pas d'obtenir de données exploitables. Cependant, une rupture différée a été observée entre les différentes expériences. En effet, les éprouvettes de minerai de fer intact ont rompues à 8,7 et 8,8 MPa pour les conditions oxydantes représentées par O₂ et H₂O₂, respectivement, alors que le témoin a rompu à 13,7 MPa. Ces ruptures surviennent après 60 jours de fluage pour les conditions oxydantes et 90 jours pour le témoin.

5.4 Discussion

Les essais de compression simple n'ont montré aucune différence significative entre les échantillons initiaux et les échantillons bio-réduits ou oxydés et réduits chimiquement, et cela pour les deux minerais.

Contrairement aux réactions biologiques, les réactions chimiques ne sont pas soumises aux effets de tailles des mésopores présents dans les minerais et leurs cinétiques de réaction sont plus rapides. Malgré cela, les réactions chimiques n'ont pas modifié significativement le seuil de rupture des éprouvettes. Pour l'oxydation par H_2O_2 , un barbotage intense a eu lieu durant les premiers jours de réaction (Fig. A2- Annexe 5) jusqu'à l'arrêt de ce bullage après 15 jours. Renouveler le peroxyde d'hydrogène n'a pas réamorcé de bullage signifiant que le minerai n'a plus de réactivité vis à vis du peroxyde d'hydrogène. Cette réaction d'oxydation sur minerai en poudre a entraîné une perte quasi totale du Fe(II) présent ($Fe(II)/Fe_{TOT} < 1\%$, voir Chapitre 4). La même conclusion est atteinte pour la réaction de réduction avec H_2S . Une fois la réaction terminée, l'éprouvette n'était plus de couleur ocre mais verte (Fig. 14). Cependant les différentes étapes d'équipement de l'éprouvette afin d'être compressées, ont entraîné une réoxydation apparente de l'éprouvette (retour à une couleur ocre-orange).



Figure 14 : Éprouvette de minerai intact (2 cm de long) ayant subi une réduction chimique par des sulfures (H_2S). La couleur ocre-brune originale a été modifiée.

Par conséquent, malgré la certitude que les réactions chimiques d'oxydation et de réduction ont eu lieu, l'impact sur la structure même du minerai n'est pas mesurable lorsque celui-ci est sous forme d'éprouvette. Cependant, le nombre d'échantillon testé dans ces deux conditions est faible. Il est possible qu'avec un nombre plus important d'échantillons (> 30), des différences significatives apparaissent.

Les bactéries ferri-réductrices possèdent la capacité d'utiliser le Fe(III) minéral directement sous sa forme solide, cela a été démontré au Chapitre 3₁. De plus, elles ont la possibilité

d'utiliser des navettes à électron exogènes (e.g. les acides humiques) ou les produire (e.g. les sidérophores) (Royer *et al.*, 2002). Les navettes à électron sont des molécules qui ont donc la possibilité d'atteindre les zones inaccessible physiquement par la bactérie (Andrew *et al.*, 2003). Malgré cela, la bioréduction des éprouvettes par *S. putrefaciens* n'a pas suffisamment modifié les propriétés mécaniques des éprouvettes, notamment le seuil de ruptures, pour les différencier des minerais initiaux. Soit le temps d'incubation était trop court pour la formation de la néophase de carbonate ferreux, soit cette même phase n'a pu obtenir une cristallinité suffisante dans le temps de l'expérience, ne permettant pas une augmentation de la cohésion du minerai de fer.

Pour les essais menés en indentation, le minerai vieilli n'a pas permis de conclure quant à une différence entre le minerai vieilli initial et le minerai vieilli ayant subi la bioréduction. Cela peut en partie s'expliquer par la difficulté d'analyser ce matériau en indentation par rapport au minerai intact. En effet, le minerai vieilli est constitué d'une porosité suffisamment importante pour entraîner un enfoncement du poinçon jusqu'au seuil d'enfoncement maximal, ce qui entraîne l'arrêt de la mesure. Il est possible d'augmenter ce seuil mais cela conduit à l'apparition de fissures dans la plupart des cas, empêchant ainsi la suite de la mesure. De plus, contrairement au minerai intact, la mise en place d'un cycle de chargement-déchargement à 100N - où l'effet de la fermeture des espaces entre les cales est faible - est délicate car dans 2/3 des cas il y a apparition de fissures avant d'atteindre ce cycle.

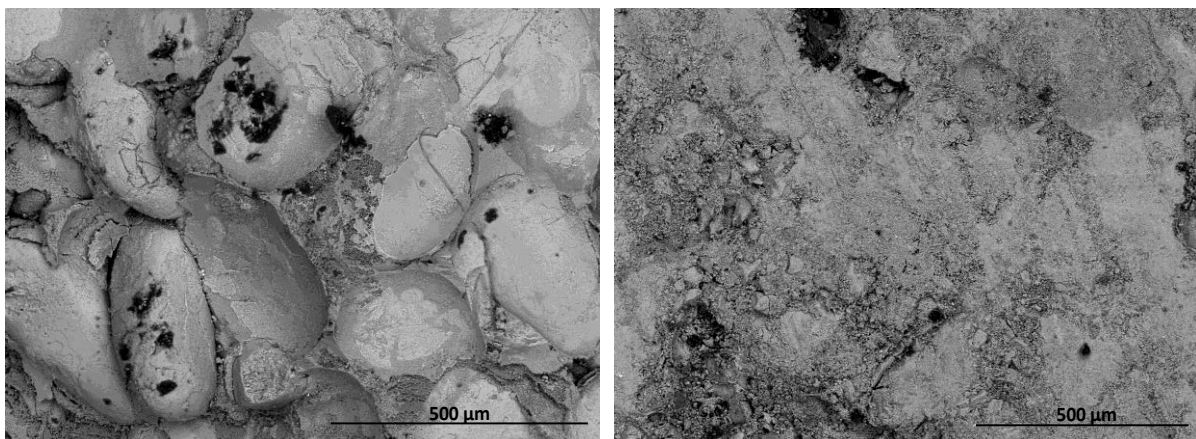


Figure 15: Observations en microscopie à balayage d'une fraction brute du minerai intact (à gauche) et de la surface d'une barrette de minerai intact (à droite) La taille du matériau pour créer la barrette rend impossible toute analyse par cette méthode.

Pour le minerai vieilli l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène a entraîné une diminution du module de Young alors que la bioréduction a mené à une augmentation de la valeur de ce module élastique. En théorie, le peroxyde d'hydrogène a pu réagir avec la sidérite présente

dans le ciment interoolithique. Cela aurait conduit à sa disparition et entraîné une diminution du module de Young. Dans le cas de la bioréduction, c'est la formation d'une nouvelle phase de carbonate ferreux qui pourrait être à l'origine de l'augmentation du module élastique. Afin d'observer ces modifications minéralogiques des analyses MEB ont été réalisées. Cependant la taille qui a été réalisée afin de créer les barrettes ne permet pas de distinguer les différents composants du minerai de fer (Fig. 15).

Pour conclure, la micro-indentation a permis de montrer que l'oxydation chimique et la bioréduction entraîne une modification du module de Young sur les barrettes de minerai de fer intact. L'analyse du minerai vieilli par cette méthode est plus délicate et nécessiterait une autre méthode d'analyse du module de Young (e.g. test oedométrique, Ouglova *et al.*, 2006). La compression uniaxiale n'a pas non plus permis de distinguer les échantillons initiaux des échantillons bioréduits, oxydés ou réduits chimiquement. Le faible nombre d'échantillons analysé et le temps insuffisant de l'incubation peuvent expliquer de tels résultats. De plus, notamment dans le cas des échantillons bioréduits et réduits chimiquement, les méthodes de compression et d'indentation sont peu adaptées à l'étude des échantillons sensibles à l'oxygène. En effet, pour l'indentation par exemple, une fois l'échantillon soumis à la mesure, l'oxydation peut débuter. Afin de "limiter" l'oxydation par l'air, l'échantillon a été continuellement saturé par la solution d'incubation, mettant entre le minerai et l'atmosphère une couche de liquide anoxique. Ce problème lié à l'oxydation par l'air est encore plus important pour les éprouvettes utilisées pour la compression. En effet, en plus de l'expérience de compression simple, il est nécessaire d'équiper les éprouvettes de jauges de mesure. Cette préparation n'a pu être effectuée en boîte à gant à cause de la dimension des jauges à coller et des soudures à réaliser. Enfin, les essais de fluage ont montré une rupture différée du minerai de fer intact lorsque celui-ci est soumis à une condition oxydante par rapport à un témoin exposé à l'air ambiant. L'intérêt de ces essais est qu'ils sont plus représentatifs des contraintes mécaniques qui s'exercent sur les piliers de soutien des mines. De plus, le fluage permet également d'exposer directement l'échantillon à des réactions chimiques ou biologiques alors qu'il est soumis à une contrainte. Les perspectives à ces travaux sont intéressantes car cela serait, à notre connaissance, la première fois qu'il serait montré l'impact de l'activité bactérienne sur les propriétés mécaniques d'une roche telle que le minerai de fer.

DISCUSSION - CONCLUSIONS GENERALES

Durant la diagenèse du minerai de fer de Lorraine, les conditions réductrices ont permis la formation d'un ciment de sidérite et berthiérine entre les oolithes riches en goethite. Pendant 180 milliards d'années et avant le début de l'exploitation minière, les roches étaient saturées en eau et équilibrées chimiquement. Aucune réaction d'oxydation majeure n'est survenue pendant cette période. En revanche, pendant l'exploitation, les eaux d'exhaures ont été pompées et les galeries ventilées. Cela a entraîné la désaturation (séchage des roches) et la mise en place de conditions menant à l'oxydation des minéraux ferreux et à la formation de minéraux ferriques. A la fin de l'exploitation, la fin des pompages a permis la remontée de la nappe phréatique entraînant la resaturation des roches en eau. Les conditions anaérobies ont alors été rétablies avec sans doute certaines zones micro-aérobies. Dès lors, quelles conséquences pourraient avoir des réactions d'oxydation et de réduction, biologiques ou chimiques, qui découleraient de ces conditions aéro et anaérobies successives, sur les propriétés minéralogiques et mécaniques du minerai de fer ? L'objectif de la thèse était d'apporter des éléments de réponse à cette question.

Avant les incubations bactériennes avec les minerais de fer (en poudre), nous avons cherché à vérifier la présence des groupes métaboliques bactériens que nous avons ciblés car susceptibles d'être présents dans la mine et d'interagir avec le fer. Par enrichissements en milieux spécifiques nous avons ainsi validé la présence d'activités ferri-réductrices, nitrate-réductrices, et sulfato-réductrices, mais pas ferroxydantes acidophiles..

Les souches ferri-réductrices, représentées par *S. putrefaciens* dans notre étude, ont réduit la goethite présente au sein des oolithes du minerai de fer. L'originalité de ce travail est que le minéral est naturel et non synthétique comme dans la grande majorité des études précédentes. Il a été démontré que les bactéries réduisent de manière plus importante la goethite naturelle que la goethite synthétique. Contrairement aux études sur la goethite synthétique, la phase minérale formée n'a pu être identifiée avec certitude en tant que sidérite bien qu'elle soit de type carbonate ferreux. Néanmoins, après un certain temps, cette phase pourrait se cristalliser en sidérite. Ce point mérite d'être étudié dans de futurs travaux. En effet, la sidérite est un constituant majeur du ciment interoolitique, dont la disparition est à l'origine de la perte de cohésion du minerai de fer, et par extension à l'origine de la fragilité des piliers. Par conséquent, si ce carbonate ferreux se cristallise en sidérite, un nouveau ciment pourrait se former entre les oolithes ce qui, éventuellement, améliorerait la cohésion du minerai de fer. C'est pourquoi des expériences d'incubation ont été réalisées pendant 19

mois, afin de tester la résistance mécanique du minerai de fer par compression uniaxiale et micro-indentation. Si la compression n'a pas permis d'observer de différences significatives des propriétés mécaniques après bioréduction, la micro-indentation a permis de détecter un effet de la bioréduction. Cet effet est une amélioration sensible du module de Young du minerai de fer. Il est donc possible, *a priori*, que le ciment de carbonate ferreux d'origine biologique puisse améliorer la résistance du minerai. Cela nécessiterait une incubation plus longue des éprouvettes de minerai de fer vouées à la compression.

Un consortium de bactéries sulfato-réductrices a également été utilisé lors de cette étude. L'intérêt d'un tel métabolisme provient des sulfures formés en fin de réaction. Les sulfures sont très réactifs vis-à-vis du Fe(III) et la réaction mène à la formation, *in fine*, de pyrite. Nous avons observé que, quelque soit la nature de l'oxyde de Fe(III), la bioréduction indirecte est importante (> 60 %). La goethite, oxyde de Fe(III) majoritaire du minerai de fer, serait la plus exposée à la réduction par les sulfures. Il est nécessaire de vérifier ce point par des analyses tel que le Mössbauer. Par manque de temps, l'effet de la pyrite sur les propriétés mécaniques du minerai de fer n'a pu être étudié. Pourtant, vu l'importance de cette réduction, la formation de la pyrite à la surface ou entre les oolites pourrait améliorer ou diminuer la cohésion du minerai.

A l'instar de la réduction, des métabolismes d'oxydation directe et indirecte ont été étudiés. Deux souches de bactéries nitrate-réductrices ont été utilisées. Les nitrites, produits par ces souches *via* la réduction des nitrates, sont connus comme oxydants du Fe(II). L'objectif de cette étude était de déterminer la réactivité des nitrites vis-à-vis du ciment de sidérite. Si le Fe(II) soluble et la rouille verte ont été oxydés, aucune oxydation du minerai de fer n'a été observée. Pourtant, les nitrates ont bien été réduits et aucun nitrite n'a été détecté. Le devenir des nitrites ainsi que l'analyse de la minéralogie du minerai n'ont pu être étudiés dans le temps imparti à l'étude. Néanmoins, l'importance des réactions Fe(II)-nitrites est sans doute faible au sein des mines. En effet, la quantité de nitrates mesurée dans l'eau de mine est de quelques micromolaires. Ajouté au fait qu'aucune oxydation n'a été observée, cette réaction semble donc négligeable.

Une souche acidophile a été utilisée. Les expériences ont montré qu'elle était capable d'oxyder le Fe(II) contenu dans le minerai de fer. Par manque de temps, aucune analyse minéralogique n'a pu être réalisée sur le minerai après cette biooxydation. Néanmoins l'hypothèse retenue est que la sidérite - phase majoritaire du Fe(II) - a été oxydée. Cette oxydation mène probablement à la formation de goethite ou d'hématite, qui sont les oxydes de Fe(III) les plus stables. Parallèlement, des expériences d'oxydation chimiques ont été réalisées

avec du dioxygène et du peroxyde d'hydrogène. Si l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène est rapide et exothermique, l'oxydation par le dioxygène est plus lente que la biooxydation. Cela montre que l'altération du minerai de fer lors de l'exploitation minière est bien liée à la ventilation mais pourrait également être due à la colonisation de bactéries acidophiles exogènes, souvent retrouvées dans les exploitations minières. Il est intéressant de noter, que de nombreuses souches acidophiles sont capables, en condition anaérobie, de réduire le Fe(III) couplé à l'oxydation du S^0 , produit par de l'activité sulfato-réductrices. Par conséquent, les acidophiles pourraient aussi être des acteurs de la bioréduction.

Les propriétés mécaniques sont différentes entre le minerai de fer intact (i.e. avec ciment de sidérite) et le minerai de fer vieilli (i.e. sans ciment de sidérite) qui a subi la ventilation pendant l'exploitation. L'analyse du minerai de fer intact après oxydation par le peroxyde d'hydrogène n'a montré aucune différence par rapport au minerai de fer initial lors de la compression uniaxiale. En revanche, une détérioration du module de Young a été observée lors de la micro-indentation. Il est possible qu'à l'échelle de l'éprouvette, l'oxydation, trop rapide, n'ait eu lieu qu'à la surface des minéraux de sidérite ce qui n'a pas entraîné de perte de cohésion du minerai de fer. Cependant, la micro-indentation étudie la surface du minerai sur laquelle l'oxydation a pu être plus importante. Sur le minerai en poudre, l'oxydation par les bactéries acidophiles et l'oxygène est plus lente que l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène. Il serait alors intéressant de déterminer si cette oxydation, plus lente, permet une meilleure détérioration du ciment de sidérite et par conséquent une perte de cohésion du minerai de fer, visible en compression uniaxiale. Cette hypothèse est appuyée par les résultats des premières expériences de fluage (expérience mécanique à long terme) où l'échantillon oxydé par O_2 a rompu à un niveau de contrainte inférieur à celui du le témoin (9 MPa et 13 MPa, respectivement). Il faut noter que dans ce cas l'oxydation a été continue sur 60 jours.

Les perspectives d'études aux travaux présentés dans cette thèse sont nombreuses. D'une part, les analyses post-incubations bactériennes sur la nouvelle minéralogie du minerai de fer sont à approfondir, notamment dans le cas des incubations avec les bactéries sulfato-réductrices et les souches acidophiles. L'existence de souches oxydantes acidophiles reste encore à démontrer, même si leur présence au sein des mines est possible. Dans le cas des mines de Lorraine, les acidophiles seraient alors présentes au sein de zones aux conditions microaérobie et pH modérément acide (pH 4 à 6). D'autre part, l'étude de la modification des propriétés mécaniques du minerai de fer soumis à l'activité bactérienne, mérite d'être approfondie, notamment la bioréduction où des premiers effets ont été observés. Il est

néanmoins nécessaire de changer la taille des éprouvettes utilisées lors de la compression uniaxiale afin de pouvoir mesurer l'effet des différentes réactions chimiques ou biologiques testées. En effet, la petite taille des éprouvettes testées est fortement soumise à des effets de surface lors du carottage. Il faudrait utiliser des éprouvettes plus grandes, mais dans ce cas, la durée des incubations devra certainement être allongée. Enfin, les essais de fluage, plus proches des conditions réelles de la mine, devront être réalisés sur des échantillons préalablement bioréduits ou alors, adapter les cellules de fluages pour permettre les incubations directement avec l'éprouvette soumise au fluage.

En résumé, l'exploitation des mines a entraîné des modifications chimiques et mécaniques de la roche. La fragilité des piliers de soutien est directement liée à la perte du ciment de sidérite interoolitique du minerai de fer. Ceci est dû à la ventilation et peut-être à des souches oxydantes exogènes. La fin de l'exploitation et le retour de conditions anaérobies réductrices ont permis le développement, entre autres, de bactéries ferri-réductrices et sulfato-réductrices. Ces bactéries sont capables de réduire la goethite qui compose les oolithes. Les souches sulfato-réductrices réduisent le minerai de fer *via* la production de sulfures et permettent la formation de pyrite. La constitution d'un ciment interoolitique de pyrite sur la cohésion du minerai de fer nécessite d'être étudiée. Quant aux bactéries ferri-réductrices, elles permettent la formation d'une phase minérale de carbonate ferreux. Cette phase, en se cristallisant, pourrait reformer de la sidérite et ainsi améliorer la cohésion du minerai et par extension celle des piliers.

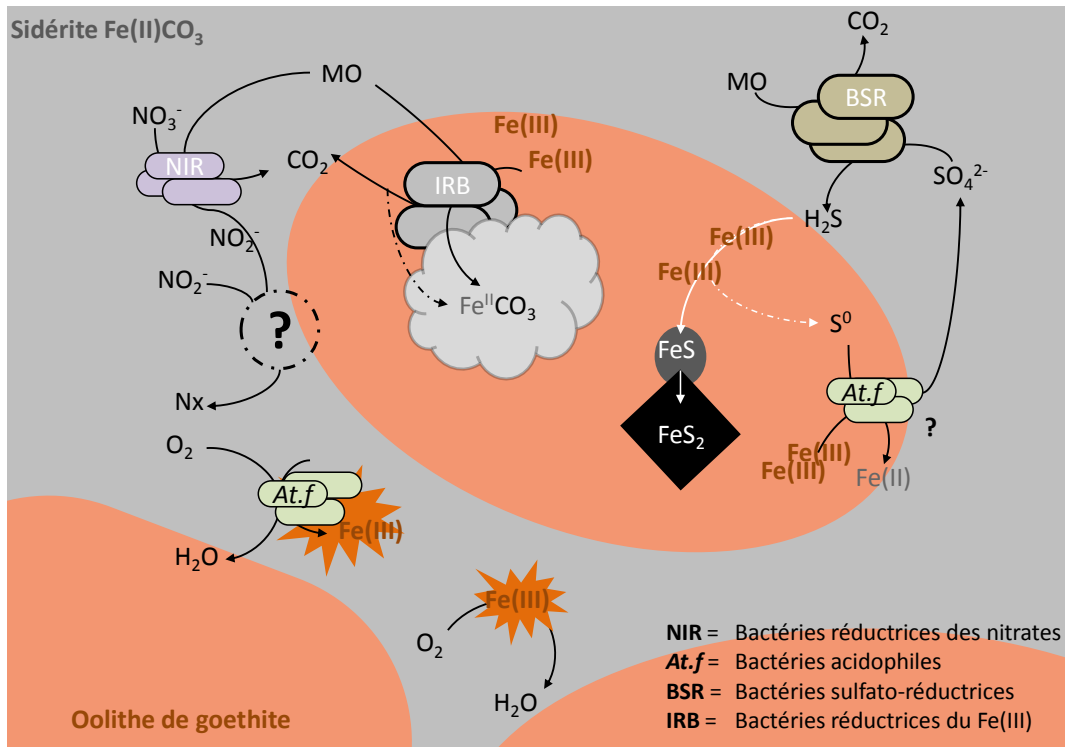


Figure 1: Schéma de conclusion des expériences et résultats menés au cours de cette thèse (auteur B. Maitte).

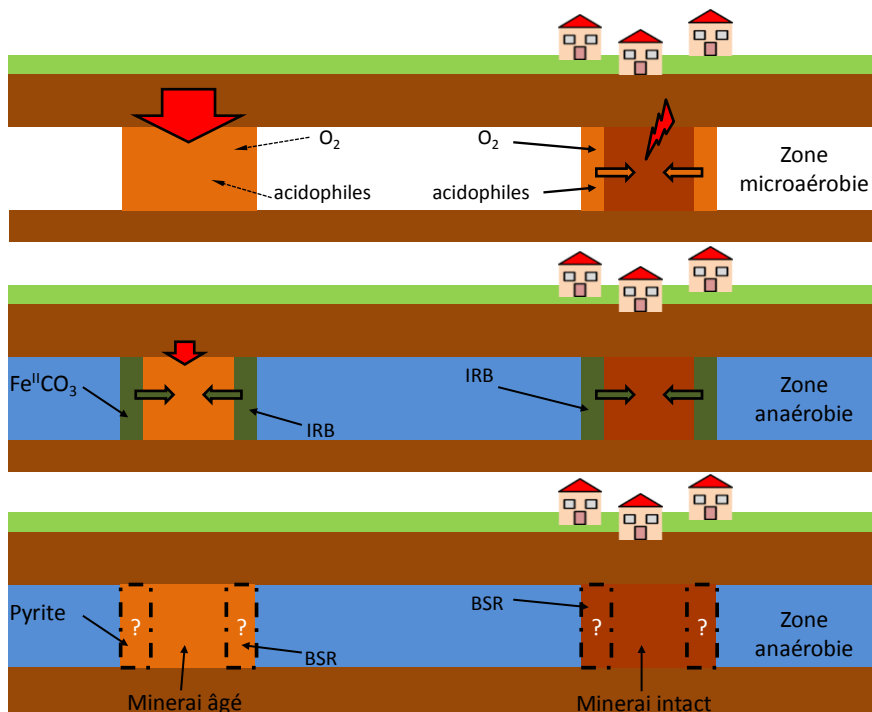


Figure 2: Schéma de conclusion de l'impact potentiel des résultats obtenus sur les piliers au sein des mines (auteur B. Maitte).

Références Bibliographiques

ADES (2015) Portail national d'accès aux données sur les eaux souterraines (service public d'information sur l'eau) :

http://www.ades.eaufrance.fr/FicheSyntheseQualito.aspx?code=01138X0184/G14BIS&type_qualito=1&type_pt_eau=3 (dernière consultation en octobre 2015).

Andrews S.C., Robinson A.K. and Rodríguez-Quiñones F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 215–237

Bacelar-Nicolau P. and Johnson D. B., 1999. Leaching of Pyrite by Acidophilic Heterotrophic Iron-Oxidizing Bacteria in Pure and Mixed Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 585–590

Baethgen W.E. and Alley M.M., 1989. A manual coliremetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 20, 961-969

Baker-Austin C. and Dopson M., 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *TRENDS in Microbiology* 115, 165-171

Barthélémy, K., Naille, S., Despas, C., Ruby, C., Mallet, M., 2012. Carbonated ferric green rust as a new material for efficient phosphate removal. *Journal of Colloid and Interface Science* 384, 121–127. doi:10.1016/j.jcis.2012.06.038.

Barton L.L. and Tomei F.A., 1995. Characteristics and activities of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology Handbooks Sulfate reducing Bacteria* volume 8, chapitre 1. Edited by Larry L. Braton, university of New Mexico.

Behrends, T., Van Cappellen, P., 2007. Transformation of hematite into magnetite during dissimilatory iron reduction - Conditions and mechanisms. *Geomicrobiology Journal* 24, 403-416. doi: 10.1080/01490450701436497.

Besnard K., Senfaute G. et Thoraval A., 2010. Synthèse des travaux de recherche « Après-mine » (GISOS)

Bird, L.J., Bonnefoy, V., Newman, D.K., 2011. Bioenergetics challenges of microbial iron metabolisms. *Trends in Microbiology*, 19, 330-340.

Bonnefoy V. and Holmes D.S., 2011. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environmental Microbiology Minireview*.

Bonneville, S., Behrends, T., Van Cappellen, P., 2009. Solubility and dissimilatory reduction of iron(III) oxyhydroxides: A linear free energy relationship. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 5273-5282. doi:10.1016/j.gca.2009.06.006.

Bourman R.P., Fitzpatrick R.W. and Self P.G., 1993. Character and origin of ferruginous voidal concretions in weathered triassic sediment of the telford basin, south australia. *Proceeding of the 10th international clay conference* 346-354

Bousserrhine, N., Gasser, U.G., Jeanroy, E., Berthelin, J., 1999. Bacterial and chemical reductive dissolution of Mn-, Co-, Cr-, and Al-substituted goethites. *Geomicrobiology Journal* 16, 245-258. doi: 10.1080/014904599270622.

- Caccavo Jr. F., Lonergan D.J., Lovley D.R., Davis M., Stolz J.F. and McInerney M.J., 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov. a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. Applied and Environmental Microbiology 60, 3752-3759
- Canfield D.E., 1989. Reactive iron in marine sediments. Geochimica et Cosmochimica Acta 53, 619-632
- Carlson H.K., Clark I.C., Blazewicz S.J., Iavarone A.T., Coates J.D., 2013. Fe(II) oxidation is an innate capability of nitrate-reducing bacteria that involves abiotic and biotic reactions. Journal of Bacteriology 195, 3260–3268
- Carteret C., De La Pierre M., Dossot M., Pascale F., Erba A. and Dovesi R., 2013. The vibrational spectrum of CaCO₃ aragonite: A combined experimental and quantum-mechanical investigation. The Journal of Chemical Physics 138, 014201
- Cavalier-Smith T., 2002. The neomuran origin of archaeobacteria the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 7–76
- Chicot D., Mendoza J., Zaoui A., Louis G., Lepingle V., Roudet F. and Lesage J., 2011. Mechanical properties of magnetite (Fe₃O₄), hematite (α -Fe₂O₃) and goethite (α -FeOOH) by instrumented indentation and molecular dynamics analysis. Materials Chemistry and Physics 129, 862– 870
- Comtrade Labs, 2013. comtrade.un.org/db/ (dernière consultation en octobre 2015).
- Cornell, R.M., Schwertmann, U., 2003. The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses. Second, completely revised and extended edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Croal L.R., Jiao Y. and Newman D.K., 2007. The *fox* Operon from *Rhodobacter* Strain SW2 Promotes Phototrophic Fe(II) Oxidation in *Rhodobacter capsulatus* SB1003. Journal of Bacteriology 189, 1774–1782
- Cutting, R.S., Coker, V.S., Fellowes, J.W., Lloyd, J.R., Vaughan, D.J., 2009. Mineralogical and morphological constraints on the reduction of Fe(III) minerals by *Geobacter sulfurreducens*. Geochimica et Cosmochimica Acta 73, 4004-4022. doi:10.1016/j.gca.2009.04.009.
- Cypionka H., 1995. Solute Transport and Cell Energetics. Biotechnology Handbooks *Sulfate reducing Bacteria* volume 8, chapitre 1. Edited by Larry L. Braton, university of New Mexico
- Dagallier, G., Grgic, D., Homand, F., 2002. Mineralogical and microtextural characterisation of the anthropic-origin ageing of iron ore in Lorraine (France). Comptes Rendus Geoscience, 334, 455-462. doi: 10.1016/S1631-0713(02)01783-2.
- Das S. and Hendry M.J., 2011. Application of Raman spectroscopy to identify iron minerals commonly found in mine wastes. Chemical Geology 290, 101-108
- De Grave E. and Vochten R., 1985. An ⁵⁷Fe Mössbauer Effect Study of Ankerite. Physics and Chemistry of Minerals 12, 108-113
- Descostes M., Vitorge P. and C. Beaucaire, 2004. Pyrite dissolution in acidic media Geochimica et Cosmochimica Acta 68, 4559-4569
- DFAT (2014) Composition of Trade, Australia 2013-2014 - Department of Foreign, Affairs and Trade, ISBN 978-1-74322-196-9 (PDF format)
- Dieter G.E.Jr., 1961 Mechanical metallurgy. Metallurgy and metallurgical engineering series, McGraw-Hill book compagny.

- Dos Santos Afonso M. and Stumm, W., 1992. Reductive dissolution of iron(III) (hydr)oxides by hydrogen sulfide. *Langmuir* 8, 1671–1675.
- Drobner E., Huber H. and Stetter K.O., 1990. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2922-2923
- Dubrawski, J.V., Channon, A-L., Warne, S.St.J., 1989. Examination of the siderite-magnesite mineral series by Fourier transform infrared spectroscopy. *American Mineralogist* 74, 187-190.
- Duchêne F., 2008. « Les affaissements miniers dans le bassin ferrifère lorrain : quand le territoire re-politise la gestion du risque » Développement durable et territoires [En ligne] Dossier 11 : Catastrophes et Territoires. URL : <http://developpementdurable.revues.org/7073> (dernière consultation en septembre 2015).
- Ehrenreich A. and Widdel F., 1994. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4517-4526
- Ekstrom, E.B., Learman, D.R., Madden, A.S., Hansel, C.M., 2010. Contrasting effects of Al substitution on microbial reduction of Fe(III) (hydr)oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 7086-7099. doi:10.1016/j.gca.2010.09.008.
- Emerson D. and Ghiorse W.C., 1993. Ultrastructure and Chemical Composition of the Sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. *Journal of Bacteriology* 175 7808-7818.
- Emerson D. and Moyer C.L., 2002. Neutrophilic Fe-Oxidizing Bacteria Are Abundant at the Loihi Seamount Hydrothermal Vents and Play a Major Role in Fe Oxide Deposition. *Applied And Environmental Microbiology* 68, 3085–3093
- Emerson D., Field E.k., Chertkov O., Davenport K.W., Goodwin L., Munk C., Nolan M. and Woyke T., 2013. Comparative genomics of fresh water Fe-oxidizing bacteria: implications for physiology ecology and systematics. *Frontiers in microbiology* 4, art 254
- Emerson D., Fleming E.J. and McBeth J.M., 2010. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annual Review in Microbiology* 64, 561–83
- Enning D., Venzlaff H., Garrelfs J., Dinh H.T., Meyer V., Mayrhofer K., Hassel A.W., Stratmann M. and Widdel F., 2012. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust. *Environmental Microbiology* 14, 1772–1787
- Enning D. and Garrelfs J., 2014. Corrosion of Iron by Sulfate-Reducing Bacteria: New Views of an Old Problem. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1226-1236.
- Etique M., Zegeye A., Grégoire B., Carteret C. and Ruby C., 2014. Nitrate reduction by mixed iron(II-III) hydroxycarbonate green rust in the presence of phosphate anions: The key parameters influencing the ammonium selectivity. *Water Research* 62, 29–39
- Etique, M., Jorand, F. P. A., Ruby, C., 2015. Magnetite as a precursor for green rust through the hydrogenotrophic activity of the iron-reducing bacteria *Shewanella putrefaciens*. *Geobiology*. In press
- Fajardo, M., Pérez Alcázar, G.A., Moreira, A.M., Speziali, N.L., 2004. Mössbauer and XRD comparative study of host rock and iron rich mineral samples from Paz del Rio Iron Ore Mineral Mine in Colombia. *Hyperfine Interactions* 156/157, 395-402. doi: 10.1023/B:HYPE.0000043259.56999.98.
- Flynn T.M., O’Loughlin E.J., Mishra I.B., DiChristina T.J. and Kemner K.M., 2014. Sulfur-mediated electron shuttling during bacterial iron reduction. *Science* 344, 1039-1042

- Forester, D.W., Koon, N.C., 1969. Mössbauer investigation of metamagnetic FeCO₃. *Journal of Applied Physics* 40, 1316-1317.
- Fortin D., Davis B. and Beveridge T.J., 1996. Role of *Thiobacillus* and sulfate-reducing bacteria in iron biocycling in oxic and acidic mine tailings. *FEMS Microbiology Ecology* 21, 11-24
- Fortunier R. 2009. Comportement mécanique des matériaux. Ecole Nationale Supérieure des mines de Saint-Etienne, 83 pages.
- Fredrickson J.K. and Gorby Y.A., 1996. Environmental processes mediated by iron-reducing bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 287-294
- Fredrickson J.K., Zachara J.M., Kennedy D.W., Dong h., Onstott T.C., Hinman N.W. and Li S-M., 1998. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 3239–3257
- Gorby Y.A., Yanina S., McLean J.S., Rosso K.M., Moyles D., [...], Nealson K.H. and Fredrickson J.K., 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103, 1358–11363
- Grgic D., 2001. Modélisation du comportement à court et à long terme des roches de la formation ferrifère lorraine. Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France
- Grgic D., 2014. Constitutive modelling of the elastic-plastic, viscoplastic and damage behaviour of hard porous rocks within the unified theory of inelastic flow. *Acta Geotechnica*, « Online First », 1-32., doi: 10.1007/s11440-014-0356-6.
- Grgic D., Giot R., Homand F. and Giraud A., 2005. Effect of suction on the mechanical behaviour of iron ore rock *Int J Numer Anal Meth Geomech* 29, 789-827
- Grgic D., Giot, R., Homand, F., Giraud, A., 2005. Effect of suction on the mechanical behaviour of iron ore rock. *International Journal for Numerical and Analytical Methods in Geomechanics* 29, 789–827. doi: 10.1002/nag.438.
- Grgic D., Giraud A. and Auvray C., 2013 Impact of chemical weathering on micro/macro-mechanical properties of oolitic iron ore *International Journal of Rock Mechanics & Mining Sciences* 64, 236–245
- Grgic D., Homand F. and Giraud A., 2006 Modelling of the drying and flooding of underground iron mines in Lorraine (France). *Int J Rock Mech Mining Sci* 43, 388-407
- Grgic D., Homand F. and Hoxha D., 2003. A short- and long- term rheological model to predict iron mine collapses in Lorraine (France) *Computers and Geotechnics* 30, 557-570
- Grgic, D., Giraud, A., 2014. The influence of different fluids on the static fatigue of a porous rock: Poro-mechanical coupling versus chemical effects. *Mechanics of Materials* 71, 34-51. doi: org/10.1016/j.mechmat.2013.06.011.
- Grgic, D., Giraud, A., Auvray, C., 2013. Impact of chemical weathering on micro/macro-mechanical properties of oolitic iron ore. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences* 64, 236-245. doi: org/10.1016/j.ijrmms.2013.09.005.
- Grgic, D., Homand, F., Giraud, A., 2006. Modeling of the drying and flooding of underground iron mines in Lorraine (France). *International Journal of Rock Mechanics & Mining Sciences* 43, 388–407. doi: 10.1016/j.ijrmms.2005.07.004.

- Hallberg K.B., Gonzalez-Toril E. and Johnson D.B., 2010. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14, 9–19
- Hallberg R. and Ferris F.G., 2004. Biomineralization by *Gallionella*. *Geomicrobiology Journal* 21, 5325-5330
- Hallberg R. and Tai C-W., 2014. Multiwall Carbon Nanotubes and Nanofibers in *Gallionella*. *Geomicrobiology Journal* 31, 764-768
- Handler R.M., Beard B.L., Johnson C.M. and Scherer M. M., 2009. Atom exchange between aqueous Fe(II) and goethite: an Fe isotope tracer study. *Environmental Science & Technology* 43, 1102–1107
- Hanert H.H., 1989. Budding and/or appendaged bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 3, 1974-1979 - Edited by J T Staley M P Bryant N Pfennig & J G Holt Baltimore: Williams & Wilkins
- Hansel, C.M., Benner, S.G., Neiss, J., Dohnalkova, A., Kukkadapu, R.K., Fendorf, S., 2003. Secondary mineralization pathways induced by dissimilatory iron reduction of ferrihydrite under advective flow. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 2977-2992. doi: 10.1016/S0016-7037(03)00276-X.
- Hansel, C.M., Benner, S.G., Nico, P., Fendorf, S., 2004. Structural constraints of ferric (hydr)oxides on dissimilatory iron reduction and the fate of Fe(II). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 3217-3229. doi: 10.1016/j.gca.2003.10.041.
- Hansen H.C.B., Borggaard O.K. & Sorensen J., 1994. Evaluation of the free energy of formation of Fe(II)-Fe(III) hydroxide-sulphate (green rust) and its reduction of nitrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58, 2599-2608
- Hedrich S., Schlomann M. and Johnson D.B., 2011. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology* 157, 1551–1564
- Hegler, F., Posth, N.R., Jiang, J., Kappler, A., 2008. Physiology of phototrophic iron(II)-oxidizing bacteria: implications for modern and ancient environments. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 250-260. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00592.x.
- Hellige K., Pollok K., Larese-Casanova P., Behrends T. and Peiffer S., 2012. Pathways of ferrous iron mineral formation upon sulfidation of lepidocrocite surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 81, 69–81
- Herbert R. B., Benner S. G., Pratt A. R., and Blowes D. W., 1998. Surface chemistry and morphology of poorly crystalline iron sulfides precipitated in media containing sulfate-reducing bacteria. *Chemical Geology* 144, 87–97
- Hernandez M.E. and Newman D.K., 2001. Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Science* 58, 1562–1571
- Holmer M. and Storkholm P., 2001. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. *Freshwater Biology* 46, 431-451
- Huang, C.K., Kerr, P.F., 1960. Infrared study of carbonate minerals. *American Mineralogist*, 45, 311-324.
- Ilbert M. and Bonnefoy V., 2013. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 1827, 161–175

INERIS, 2006. *Synthèse des études et travaux menés dans le contexte du bassin ferrifère lorrain*. Report study, DRS-06-75685/R01, EAT-DRS-03 project, *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (Under the supervision of the French Ministry of Ecology, Sustainable Development and Energy)*, 69 pp.

Ingledeu W.J., 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*, the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochimica et Biophysica Acta* 683, 89–117

Islam F.S., Pederick R.L., Gault A.G., Adams L.K., Poly D.A., Charnock J.M. and Lloyd J.R., 2005. Interactions between the Fe(III)-Reducing Bacterium *Geobacter sulfurreducens* and Arsenate and Capture of the Metalloid by Biogenic Fe(II). *Applied And Environmental Microbiology* 71, 8642–8648

Jakobsen R. and Postma D., 1999. Redox zoning rates of sulfate reduction and interactions with Fe-reduction and methanogenesis in a shallow sandy aquifer, Rømø, Denmark. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, 137–151

Jentzch, T.L., Chun, C.L., Gabor, R.S., Penn, L.R., 2007. Influence of aluminum substitution on the reactivity of magnetite nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry* 111, 10247-10253.

Jiao Y., Kappler A., Croal L.R. and Newman D.K., 2005. Isolation and Characterization of a Genetically Tractable Photoautotrophic Fe(II)-Oxidizing Bacterium, *Rhodospseudomonas palustris* Strain TIE-1. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 84487–4496

Johnson D.B. and Hallberg K.B., 2008. Carbon iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology* 54, 201-255

Johnson D.B. and McGinness S., 1991. Ferric Iron Reduction by Acidophilic Heterotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 207-211

Jorand, F., Appenzeller, B., Abdelmoula, M., Refait, P., Block, J.-C., Genin, J.-M.R., 2000. Assessment of vivianite formation in *Shewanella putrefaciens* culture. *Environmental Technology* 21, 1001-1005. doi: 10.1080/09593330.2000.9618985.

Jorand, F.P.A., Sergent, AS., Remy, P-P., Bihannic, I., Ghanbaja, J., Lartiges, B., Hanna, K., Zegeye, A., 2013. Contribution of anionic vs neutral polymers to the formation of green rust 1 from γ -FeOOH bioreduction. *Geomicrobiology Journal* 30, 600-615. doi: 10.1080/01490451.2012.746403.

Jorand F. Zegeye A., Ghanbaja J., Abdelmoula M. 2011 The formation of green rust induced by tropical river biofilm components. *Science of the Total Environment* 409, 2586-2596.

Kampschreur M.J., Kleerebezem R., W.J.M. de Vet W. and van Loosdrecht M.C.M., 2011. Reduced iron induced nitric oxide and nitrous oxide emission. *Water Research* 45, 5945-5952

Kappler A and Straub K.L., 2005. Geomicrobiological cycling of iron. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 59,85-108

Kappler A. and Newman D.K., 2004. Formation of Fe(III)-minerals by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 1217–1226

Kappler A., Schink B. and Newman D.K., 2005. Fe(III) mineral formation and cell encrustation by the nitrate-dependent Fe(II)-oxidizer strain BoFeN1. *Geobiology* 3, 235–245

Kelly D.P. and Wood A.P., 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 511-51

- Klueglein N. and Kappler A., 2013. Abiotic oxidation of Fe(II) by reactive nitrogen species in cultures of the nitrate-reducing Fe(II) oxidizer *Acidovorax* sp BoFeN1 – questioning the existence of enzymatic Fe(II) oxidation. *Geobiology* 11, 180–190
- Klueglein N., Zeitvogel F., Stierhof Y.-D., Floetenmeyer M., Konhauser K.O., Kappler A., Obst M., 2014. Potential role of nitrite for abiotic Fe(II) oxidation and cell encrustation during nitrate reduction by denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1051–1061.
- Konhauser K.O., 1997. Bacterial iron biomineralisation in nature. *FEMS microbiology reviews* 20, 315-326
- Konhauser K.O., Newman D.K. and Kappler A., 2005 The potential significance of microbial Fe(III) reduction during deposition of Precambrian banded iron formations. *Geobiology* 3, 167–177
- Kosmulski, M., 2001. Chemical properties of material surfaces. *Surfactant Science Series*, vol 102, CRC Press, VIII, 753 S, New York. ISBN-10: 0824705602.
- Kotska J.E. and Nealon K.H., 1995. Dissolution and reduction of magnetite by bacteria. *Environmental Science & Technology* 29, 2535–2540
- Kruger J. 2011. Cost of metallic corrosion, p 15–20. In Revie RW (ed), *Uhlig's corrosion handbook*, 3rd ed. Wiley, Hoboken, NJ
- Kukkadapu, R.K., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., Kennedy, D.W., Dohnalkova, A.C., McCready, D.E., 2005. Ferrous hydroxyl carbonate is a stable transformation product of biogenic magnetite. *American Mineralogist* 90, 510–515.
- Kukkadapu, R.K., Zachara, J.M., Smith, S.C., Fredrickson, J.K., Liu, C., 2001. Dissimilatory bacterial reduction of Al-substituted goethite in subsurface sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 2913-2924. doi: 10.1016/S0016-7037(01)00656-1.
- Lacombe Barron J. and Lueking D.R., 1990. Growth and Maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* Cells. *Applied And Environmental Microbiology* 2801-2806
- Lafuente B, Downs R T, Yang H, Stone N (2015) The power of databases: the RRUFF project. In: *Highlights in Mineralogical Crystallography*, T Armbruster and R M Danisi, eds. Berlin, Germany, W. De Gruyter, pp 1-30”
- Larsen, O., Postma, D., 2001. Kinetics of reductive bulk dissolution of lepidocrocite, ferrihydrite, and goethite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 1367-1379. doi: 10.1016/S0016-7037(00)00623-2.
- Li Y-L, Vali H., Sears S.K., Yang J., Deng B-L, Zhang C.L., 2004. Iron reduction and alteration of nontronite N_{Au}-2 by a sulfate-reducing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 3251–3260
- Li Y-L., Vali H., Yang J., Phelps T.J. and Zhang C.L., 2006. Reduction of Iron Oxides Enhanced by a Sulfate-Reducing Bacterium and Biogenic H₂S. *Geomicrobiology Journal* 23, 103-117
- Lies D.P., Hernandez M.E., Kappler A., Mielke R.E., Gralnick J.A. and Newman D.K., 2005. *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4414–4426
- Ling Z.C., Wang A. and Li C., 2009. Comparative spectroscopic study of three ferric sulfates: kornelite, lausenite and pentahydrate. 40th Lunar and Planetary Conference, pdf n° 1867.
- Liu C., Kota S., Zachara J.M., Fredrickson J.K. and Brinkman C.K., 2001. Kinetic analysis of the bacterial reduction of goethite. *Environmental Science & Technology* 35, 2482-2490.

- Lloyd J.R., 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 411-425
- Lovley D.R. and Phillips E.J.P., 1987. Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2636-2641
- Lovley D.R., Holmes D.E. and Nevin K.P., 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Advances in microbial physiology* 49, 219-286
- Lovley D.R., Roden E.E., Phillips E.J.P. and Woodward J.C., 1993. Enzymatic iron and uranium reduction by sulfatereducing bacteria. *Marine Geology* 113, 41-53.
- Lovley, D.R., Stolz, J.F., Nord, Jr., G.L., Phillips, E.J.P., 1987. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* 330, 252-254. doi: 10.1038/330252a0.
- Lower S.K, Hochella Jr. M.F. and Beveridge T.J., 2001. Bacterial Recognition of Mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and α -FeOOH. *Science* 292, 1360-1362
- Mackenzie, K.J.D., Berezowski, R.M., 1984. Thermal and Mössbauer studies of iron-containing hydrous silicates V berthierine. *Thermochimica Acta* 74, 291-312. doi: 10.1016/0040-6031(84)80030-1.
- Madejová, J., Komadel, P., 2001. Baseline studies of the clay minerals society source clays: infrared methods. *Clays and Clay Minerals*, 49, 410-432.
- Magot M., Bernard O. and Bharat P.K.C., 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 103-116.
- Maller R.R., 1998. Passivation of stainless steel. *Trends in food science & technology* 9, 28-32
- Man Jae Kwon, Boyanov M., Antonopoulos D.A., Brulc J.M., Johnston E.R., Skinner K.A., Kemner K.M. and O'Loughlin E.J., 2014. Effects of dissimilatory sulfate reduction on Fe(III) (hydr)oxide reduction and microbial community development. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 129, 177-190
- Matocha C.J., Dhakal P. and Pyzola S.M., 2012. The role of abiotic and coupled biotic/abiotic mineral controlled redox processes in nitrate reduction. In : *Advances in Agronomy*. Donald L. Sparks (Editor). Burlington: Academic Press, 115, 181-214.
- Melton E.D., Schmidt C. and Kappler A., 2012. Microbial iron(II) oxidation in littoral fresh water lake sediment: the potential for competition between phototrophic vs nitrate-reducing iron(II)-oxidizers. *Frontiers in Microbiology* 3, art 171.
- Melton E.D., Stief P., Behrens S., Kappler A. and Schmidt C., 2014. High spatial resolution of distribution and interconnections between Fe- and N-redox processes in profundal lake sediments. *Environmental Microbiology*, minireview.
- Mielke R.E., Pace D.L., Porter T. and Southam G., 2003. A critical stage in the formation of acid mine drainage: Colonization of pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* under pH-neutral conditions. *Geobiology* 1, 81-90
- Miller F.A. and Wilkins C.H., 1952. Infrared spectra and characteristic frequencies of inorganic ions: their use in qualitative analysis. *Analytical Chemistry* 24, 1253-1294
- Miot J., Benzerara K., Obst M., Kappler A., Hegler F., Schädler S., Bouchez C., Guyot F. and Morin G., 2009a. Extracellular Iron Biomineralization by Photoautotrophic Iron-Oxidizing Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology* 75 p 5586-5591

- Miot J., Benzerara K., Morin G., Bernard S., Beyssac O., Larquet E., Kappler A. and Guyot F., 2009b. Transformation of vivianite by anaerobic nitrate-reducing iron-oxidizing bacteria. *Geobiology* 7, 373–384
- Mullet M., Boursiquot S., Abdelmoula M., Génin J.-M. and Ehrhardt J. J., 2002. Surface chemistry and structural properties of mackinawite prepared by reaction of sulfide ions with metallic iron. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 829–836.
- Muyzer G. and Stams A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature, review in microbiology* 6, 441-454.
- Myers, C., and Myers J., 1997. Outer membrane cytochromes of *Shewanella putrefaciens* MR-1: spectral analysis, and purification of the 83-kDa *c*-type cytochrome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1326, 307-318.
- Neal A.L, Techkarnjanaruk S., Dohnalkova A., McCready D., Peyton B.M. and Geesey G.G. 2001. Iron sulfides and sulfur species produced at hematite surface in the presence of sulfate-reducing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 223–235
- Nelson D.W., Bremner J.M., 1970. Gaseous products of nitrite decomposition in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 2, 203–215.
- Nevin K.P. and Lovley D.R., 2002. Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiology Journal* 19, 141-159.
- Norrish, K., Taylor, R.M., 1961. The isomorphous replacement of iron by aluminium in soil goethites. *Journal of Soil Science* 12, 294-306. doi: 10.1111/j.1365-2389.1961.tb00919.x.
- O'Loughlin, E.J., Gorski, C.A., Scherer, M.M., Boyanov, M.I., Kemner, K.M., 2010. Effects of oxyanions, natural organic matter, and bacterial cell numbers on the bioreduction of lepidocrocite (γ -FeOOH) and the formation of secondary mineralization products. *Environmental Science & Technology* 15, 4570-4576. doi: 10.1021/es100294w.
- Oliver W.C. and Pharr G.M., 1992. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research* 7,1564–83
- Oliver W.C. and Pharr G.M.A, 2004. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: advances in understanding and refinements to methodology. *Journal of Materials Research* 19, 3–20
- Ona-Nguema G., Abdelmoula M., Jorand F., Benali O., Géhin A., Block, J.-C. and Génin, J-M.R., 2002. Iron(II, III) hydroxycarbonate green rust formation and stabilization from lepidocrocite bioreduction. *Environmental Science & Technology* 36, 16-20
- Ona-Nguema, G., 2003. PhD Thesis: Biogenèse d'hydroxysels mixtes Fe(II-III) de type rouille verte en culture de *Shewanella putrefaciens*. Université Henri Poincaré, Nancy, France.
- Ona-Nguema, G., Carteret, C., Benali, O., Abdelmoula, M., Génin, J-M.R., Jorand F., 2004. Competitive formation of hydroxy-carbonate green rust I vs hydroxysulphate green rust II in *Shewanella putrefaciens* cultures. *Geomicrobiology Journal*, 21, 79-90. doi: 10.1080/01490450490266316.
- Ona-Nguema, G., Morin, G., Wang, Y., Menguy, N., Juillot, F., Olivi, L., Aquilanti, G., Abdelmoula, M., Ruby, C., Bargar, J. R., Guyot, F., Calas, G., Brown, G. E. (2009) Arsenite sequestration at the surface of nano-Fe(OH)₂, ferrous-carbonate hydroxide, and green-rust after bioreduction of arsenic-sorbed lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73, 1359-1381.

- Osorio H., Mangold S., Denis Y., Ñancucheo I., Esparza M., Johnson D.B., Bonnefoy V., Dopson M. and Holmes D.S. Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 2172–2181
- Ouglova A., Berthaud Y., François M. and Foct F., 2006. Mechanical properties of an iron oxide formed by corrosion in reinforced concrete structures. *Corrosion science* 48, 3988 -4000
- Park B. and Dempsey B.A., 2005. Heterogeneous oxidation of Fe(II) on ferric oxide at neutral pH and a low partial pressure of O₂. *Environmental Science & Technology* 39, 6494–6500
- Payne W.J., 1973. Reduction of nitrogenous oxides by micro-organisms. *Bacteriological Reviews* 37, 409-452.
- Peiffer S., dos Santos Afonso M., Wehrli B. and Gachtert R., 1992. Kinetics and mechanism of the reaction of H₂S with lepidocrocite. *Environmental Science & Technology* 26, 2408-2413
- Petit D., Boutin J-N. et Rat M., 2002. Les affaissements miniers des mines de fer de Lorraine, Rapport de Mission. Conseil Général des Ponts et Chaussées : conseil général des mines, 99 pages.
- Postma D., 1981. Formation of siderite and vivianite and the pore-water composition of a Recent bog sediment in Denmark. *Chemical geology* 31, 225-244.
- Poulton S.W., 2003. Sulfide oxidation and iron dissolution kinetics during the reaction of dissolved sulfide with ferrihydrite. *Chemical Geology* 202, 79– 94
- Poulton S.W., Krom M.D., Van Rijnb J. and Raiswell R., 2002. The use of hydrous iron (III) oxides for the removal of hydrogen sulphide in aqueous systems. *Water Research* 36, 825–834
- Pratt A. R., Nesbitt H. W. and Muir I. J., 1994b. Generation of acids from mine waste: Oxidative leaching of pyrrhotite in dilute H₂SO₄ solutions at pH 3.0. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 5147–5159
- Pyzik A.J. and Sommer S.E., 1981. Sedimentary iron monosulfides: kinetics and mechanism of formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 687-698
- Rakshit S., Matocha C J. and Mark S.C., 2008. Nitrite reduction by siderite. *Soil Science Society of America Journal* 72, 1070-1077
- Rancourt, D, Ping, J.Y., 1991. Voigt-based methods for arbitrary-shaped static hyperfine distribution in Mössbauer spectroscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 58, 85-97. doi: 10.1016/0168-583X(91)95681-3.
- Rawlings D.E., Tributsch H. and Hansford G.S., 1999. Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* 145, 5–13
- Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T. and Lovley D.R., 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature Letters* 435, 1098-1101
- Roden E.E. and Urrutia M.M., 2002. Influence of Biogenic Fe(II) on Bacterial Crystalline Fe(III) Oxide Reduction. *Geomicrobiology Journal* 19, 209–251
- Roden, E.E., Urrutia, M.M., 1999. Ferrous iron removal promotes microbial reduction of crystalline iron(III) oxides. *Environmental Science & Technology* 33, 1847-1853. doi: 10.1021/es9809859.

Roden, E.E., Zachara, J.M., 1996. Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environmental Science & Technology* 30, 1618-1628. doi 0013-936X/96/0930-1618\$12.00/0.

Roh Y., Zhang C-L., Vali H., Lauf R.J., Zhou J. and Phelps T.J., 2003. Biogeochemical and environmental factors in Fe biomineralization: magnetite and siderite formation. *Clay and Clay Minerals* 51, 83–95

Rowe O.F. and Johnson D.B., 2008. Comparison of ferric iron generation by different species of acidophilic bacteria immobilized in packed-bed reactors. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 68–77

Royer R., Burgos W.D., Fisher A., Unz R.F. and Dempsey B., 2002. Enhancement of Biological Reduction of Hematite by Electron Shuttling and Fe(II) Complexation. *Environmental Science & Technology* 36, 1939-1946

Ruan, H.D., Frost, R.L., Klopogge, J.T., Duaong, L., 2002. Infrared spectroscopy of goethite dehydroxylation. II. Effect of aluminium substitution on the behaviour of hydroxyl units. *Spectrochimica Acta Part A* 58, 479-491. doi: 10.1016/S1386-1425(01)00556-X.

Salmo Ghoreychi et Didier Synthèse des études et travaux menés dans le contexte du bassin ferrifère lorrain 2006

Sawicki, J.A., Brown, D.A., 1998. Investigation of microbial-mineral interactions by Mössbauer spectroscopy. *Hyperfine Interactions* 117, 371-382. doi: 10.1023/A:1012626923056.

Schwertmann U. and Cornell R.M., 2000. *Iron Oxides in the Laboratory. Preparation and Characterization. Second, Completely Revised and Extended Edition*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Schwertmann U. and Taylor R.M., 1979. Natural and synthetic poorly crystallized lepidocrocite. *Clay Minerals* 14, 285- 294

Sergent, A.S., Jorand, F., Hanna, K., 2011. Effects of Si-bearing minerals on the nature of secondary iron mineral products from lepidocrocite bioreduction. *Chemical Geology* 289, 86-97. doi:10.1016/j.chemgeo.2011.07.016.

Shelobolina E., Konishi H., Xu H., Benzine J., Xiong M., Wu T., Blöthe M. and Roden E.E., 2012. Isolation of phyllosilicate–iron redox cycling microorganisms from an illite–smectite rich hydromorphic soil. *Frontiers in Microbiology* 3, art 134.

Shimizu, M., Zhou, J., Schröder, C., Obst, M., Kappler, A., Borch, T., 2013. Dissimilatory reduction and transformation of ferrihydrite-humic acid coprecipitates. *Environmental Science & Technology* 47, 13375-13384. doi: 10.1021/es402812j.

Singer E., Emerson D., Webb E.A., Barco R.A. and Kuenen J.G., 2011. *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1 the First Genome of a Marine Fe(II) Oxidizing Zetaproteobacterium. *PLoS ONE* 6, e25386

Snoeyenbos-West O.L., Nevin K.P., Anderson R.T. and Lovley D.R., 2000. Enrichment of *Geobacter* Species in Response to Stimulation of Fe(III) Reduction in Sandy Aquifer Sediments. *Microbial Ecology* 39, 153-167.

So A.K., Espie G.S., Williams E.B., Shively J.M., Heinhorst S. and Cannon G.C. 2004. A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. *Journal of Bacteriology* 186, 623–630

Sorensen J. and Thorling L., 1991. Stimulation by lepidocrocite (γ -FeOOH) of Fe(II)-dependent nitrite reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 1289–1294

- Stewart V., 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiology Review* 52, 190-232
- Stookey L., 1970. Two new spectrophotometric reagents for copper. *Talanta*, 17 644-647
- Straub K.L., Benz M., Schink B. and Widdel F., 1996. Anaerobic Nitrate-Dependent Microbial Oxidation of Ferrous Iron. *Applied And Environmental Microbiology* 62 1458–1460
- Straub K.L., Kappler A. and Schink B., 2005. Enrichment and isolation of ferric-iron- and humic-acid-reducing bacteria. *Methods in enzymology* 397, 58-77
- Stucki J. W. (1988) Structural iron in smectites. In *Iron in Soils and Clay Minerals* (ed. J. W. Stucki, B. A. Goodman, and U. Schwertmann), pp. 625– 675. D. Reidel.
- Stucki, J.W., Kostka, J.E., 2006. Microbial reduction of iron in smectite. *Comptes Rendus - Geoscience*, 338, 468-475. doi : 10.1016/j.crte.2006.04.010.
- Stumm W. and Morgan J.J., 1981. *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. 1st edition, Wiley New York.
- Tai Y.L. and Dempsey B.A., 2009. Nitrite reduction with hydrous ferric oxide and Fe(II): stoichiometry, rate, and mechanism. *Water research* 43, 546-552
- Taylor K.G. and Konhauser K.O., 2011. Iron in earth surface systems: a major player in chemical and biological processes. *Elements* 7, 83-88
- Temple K.L. and Colmer A.R., 1951. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 62, 605–611.
- Thauer R.K., Jungermann K. and Decker K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews* 41, 100-180.
- Trolard F., Abdelmoula M., Bourrié G., Humbert B. and Génin J-M.R., 1996. Evidence of the occurrence of a "green rust" component in hydromorphic soils. Proposition of the existence of a new mineral: "fougerite". *C.R. Académie des Sciences de Paris* 323, 1015-1022.
- Urrutia M.M., Roden E.E. and Zachara J.M., 1999. Influence of aqueous and solid-phase Fe(II) complexants on microbial reduction of crystalline iron(III) oxides. *Environmental Science & Technology* 33, 4022–4028
- Urrutia, M.M., Roden, E.E., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., 1998. Microbial and surface chemistry controls on reduction of synthetic Fe(III) oxide minerals by the dissimilatory iron-reducing bacterium *Shewanella alga*. *Geomicrobiology Journal* 15, 269-291. doi: 10.1080/01490459809378083.
- Vandenbergh R.E., Barrero C.A., da Costa G.M., Van San E., De Grave E. (2000) Mössbauer characterization of iron oxides and (oxy)hydroxides: the present state of the art. *Hyperfine Interactions* 126, 247-259.
- Vatter A. E. and Wolfe R. S., 1956. Electron microscopy of *Gallionella Ferruginea*. *Journal of Bacteriology* 72, 248-252.
- Venkateswaran K., Moser D.P, Dollhopf M.E., Lies D.P., Saffarini D.A., MacGregor B.J., Rigelberg D.B., White D.C., Nishijima M, Sano H., Burghardt J., Stackebrandt E. and Nealson K.H., 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *I* and description of *I* nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 705-724

- Vera M., Rohwerder T., Bellenberg S., Sand W., Denis Y. and Bonnefoy V., 2009. Characterization of biofilm formation by the bioleaching acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a microarray transcriptome analysis. *Advanced Materials Research* 71-73, 175-178
- Vollrath S., Behrends T. and Van Cappellen P., 2012. Oxygen Dependency of Neutrophilic Fe(II) Oxidation by *Leptothrix* Differs from Abiotic Reaction. *Geomicrobiology Journal* 29, 6 550-560
- Wan M., Shchukarev A., Lohmayer R., Planer-Friedrich B., and Peiffer S., 2014. Occurrence of Surface Polysulfides during the Interaction between Ferric (Hydr)Oxides and Aqueous Sulfide. *Environmental Science & Technology* 48, 5076–5084
- Warner K.A., Gilmour Cynthia C. and Capone D.G., 2002. Reductive dechlorination of 2,4-dichlorophenol and related microbial processes under limiting and non-limiting sulfate concentration in anaerobic mid-Chesapeake Bay sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 40, 159-165
- Weber K.A., Achenbach L.A. and Coates J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Review in Microbiology* 4, 752–764
- Weber, K.A., Picardal F.W. AND Roden E.E., 2001. Microbially catalyzed nitrate-dependent oxidation of Biogenic solid-phase Fe(II) compounds. *Environmental Science & Technology* 35, 1644-1650
- White A.F., Peterson M.L. and Hochella M.F., 1994. Electrochemistry and dissolution kinetics of magnetite and ilmenite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 1859-1875
- Widdel F., Schnell S., Heising S., Ehrenreich A., Assmus B. and Schink B., (1993) Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Nature* 362, 834-836
- Widdel, F., Bak, F., 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, in: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (Eds.), *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer Verlag, New York, pp 3352-3378. doi: 10.1007/978-1-4757-2191-1_21.
- Wielinga B., Mizuba M., Hansel C.M. and Fendorf S., 2001. Iron Promoted Reduction of Chromate by Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria. *Environmental Science & Technology* 35, 522-527
- Wilkin R.T. and Barnes H.L., 1996. Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60, 4167-4179
- Wilkins R.T. and Barnes H., 1996. Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60, 4167-4179
- William A. and Scherer M.M., 2004. Spectroscopic evidence for Fe(II)-Fe(III) electron transfer at the iron oxide-water interface. *Environmental Science & Technology* 38, 4782-4790
- Yilmaz I. and Sendir H., 2002. Correlation of Schmidt hardness with unconfined compressive strength and Young's modulus in gypsum from Sivas (Turkey). *Engineering Geology* 66, 211–219
- Zachara J.M., Fredrickson J.K., Li S-M., Kennedy D.W., Smith S.C. and Gassman P.L., 1998. Bacterial reduction of crystalline Fe³⁺ oxides in single phase suspensions and subsurface materials. *American Mineralogist* 83, 1426–1443
- Zachara, J.M, Fredrickson, J.K., Li, S-M., Kennedy, D.W., Smith, S.C., Gassman, P.L., 1998. Bacterial reduction of crystalline Fe³⁺ oxides in single phase suspensions and subsurface materials. *American Mineralogist* 83, 1426-1443. doi: 0003–004X/98/1112–1426.

Zachara, J.M, Smith, S.C., Kuzel, S., 1995. Adsorption and dissociation of Co-EDTA complexes in iron oxide-containing subsurface sands. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 4825-4844. doi: 10.1016/0016-7037(95)00340-1.

Zegeye A., Huguet L., Abdelmoula M., Carteret C., Mullet M. and Jorand F., 2007. Biogenic hydroxysulfate green rust, a potential electron acceptor for SRB activity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 5450-5462

Zegeye A., Ona-Nguema G., Carteret C., Huguet L., Abdelmoula M. and Jorand, F., 2005. Formation of hydroxysulphate green rust 2 as a single iron(II-III) mineral in microbial culture. *Geomicrobiology Journal* 22, 389-99.

Zeng S., Li J., Schumann R. and Smart R., 2013. Effect of pH and dissolved silicate on the formation of surface passivation layers for reducing pyrite oxidation. *Computational Water, Energy and Environmental Engineering* 2013, 50-55

Zeng, Z., Tice, M.M., 2014. Promotion and nucleation of carbonate precipitation during microbial iron reduction. *Geobiology* 12, 362-371. doi: 10.1111/gbi.12090.

Zhao L., Dong H., Kukkadapu R., Agrawal A., Liu D., Zhang J., Edelmann R.E., 2013. Biological oxidation of Fe(II) in reduced nontronite coupled with nitrate reduction by *Pseudogulbenkiania sp.* Strain 2002. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 119, 231–247

ANNEXES

9.1. Annexe au Chapitre 3₁

Supplementary material for:

Remineralization of ferrous carbonate from bioreduction of natural goethite in the Lorraine iron-ore (*Minette*) by *Shewanella putrefaciens*

Baptiste Maitte^{1, 2}, Frédéric P.A. Jorand^{2*}, Dragan Grgic¹, Mustapha Abdelmoula³ and Cédric Carteret²

¹ Université de Lorraine/CNRS/CREGU, Georessources Laboratory, BP 40, 54501
Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Université de Lorraine, LCPME, UMR 7564 CNRS-UL, 405, rue de Vandœuvre 54602
Villers-lès-Nancy, France

³ CNRS, LCPME, UMR 7564 CNRS-UL, 405, rue de Vandœuvre 54602 Villers-lès-Nancy,
France

*Corresponding author: frederic.jorand@univ-lorraine.fr

Table S1. Mössbauer hyperfine parameters and relative abundance of components in aged iron ore (AIO) and intact iron ore (IIO) (initial and bioreduced). CS = center shift, QS = quadrupole splitting, H = magnetic hyperfine field, RA = Relative abundance. Larger CS and QS correspond to ferrous state, whereas smaller correspond to the ferric state. All data provided from the present study except metamagnetic siderite and geologic siderite.

Sample name	Fe state	CS (mm s ⁻¹)	QS (mm s ⁻¹)	H (kOe)	Attribution	RA (%)
Initial AIO (77K)	Fe ^{II}	1.21	2.87	-	Berthierine	6
	Fe ^{III}	0.45	0.39	-	Fe(III) phase	2
	Fe ^{III}	0.48	- 0.13	470	Goethite	35
	Fe ^{III}	0.47	- 0.13	489	Goethite	51
	Fe ^{III}	0.40	0.007	533	Hematite	6
Bioreduced AIO (77K)	Fe ^{II}	1.46	2.91	-	Berthierine	10
	Fe ^{II}	1.39	2.13	-	Fe(II) phase	7
	Fe ^{III}	0.17	1.17	-	Fe(III) phase	6
	Fe ^{III}	0.48	- 0.35	488	Goethite	46
	Fe ^{III}	0.49	0.16	489	Goethite	26
	Fe ^{III}	0.41	- 0.50	452	Goethite	2
	Fe ^{III}	0.55	- 0.2	529	Hematite	4
Initial IIO (77K)	Fe ^{II}	1.20	2.86	-	Berthierine	7
	Fe ^{II}	1.25	2.33	-	Siderite (?)	7
	Fe ^{III}	0.63	0.63	-	Fe(III) phase	5
	Fe ^{III}	0.47	- 0.13	480	Goethite	22
	Fe ^{III}	0.47	- 0.12	495	Goethite	35
	Fe ^{III}	0.47	- 0.13	465	Goethite	11
	Fe ^{III}	0.49	- 0.13	446	Goethite	4
	Fe ^{III}	0.48	- 0.11	421	Goethite	9
Bioreduced IIO (38K)	Fe ^{II}	1.24	2.91	-	Berthierine	13
	Fe ^{II}	1.36	2.33	-	Fe(II) phase	21
	Fe ^{III}	0.29	0.75	-	Fe(III) phase	7
	Fe ^{III}	0.48	- 0.12	497	Goethite	59

(Continued next page)

Table S1. Continuation and ending

Sample name	Fe state	CS (mm/s)	QS (mm/s)	H (kOe)	Attribution	RA (%)
Bioreduced AIO (10 K)	Fe ^{II}	2.42	2.12	106	Fe(II) phase	15
	Fe ^{II}	0.50	2.17	78	Fe(II) phase	13
	Fe ^{III}	0.35	-0.001	477	Goethite	} 48
	Fe ^{III}	0.66	-0.59	503	Goethite	
	Fe ^{III}	0.40	-0.11	526	Hematite	19
	Fe ^{III}	0.24	1.12	-	Fe(III) phase	5
Bioreduced IIO (9 K)	Fe ^{II}	1.75	4.23	88	Fe(II) phase	16
	Fe ^{II}	0.99	0.117	101	Fe(II) phase	20
	Fe ^{III}	0.18	0.58	-	Fe(III) phase	5
	Fe ^{III}	0.47	-0.25	499	Goethite	59
Siderite rock sample (77 K)	Fe ^{II}	1.35	2.06	-	Siderite	40
	Fe ^{III}	0.44	-0.30	323	Goethite	5
	Fe ^{III}	0.44	-0.02	478	Goethite	11
	Fe ^{III}	0.51	-0.08	414	Goethite	44
Siderite rock sample (8 K)	Fe ^{II}	1.35	2.09	166	Siderite	48
	Fe ^{III}	0.55	-0.29	494	Goethite	24
	Fe ^{III}	0.44	-0.002	465	Goethite	24
	Fe ^{III}	0.44	0.23	410	Goethite	4
Metamagnetic FeCO ₃ (2.5 K) ¹	Fe ^{II}	1.36	2.06	184	Siderite	/
Geologic siderite (4.5 K) ²	Fe ^{II}	1.35	2.04	182	Siderite	/

¹ From Forester, D.W., Koon, N.C., 1969. Mössbauer investigation of metamagnetic FeCO₃. *Journal of Applied Physics* 40, 1316-1317..

² From Sawicki, J.A., Brown, D.A., 1998. Investigation of microbial-mineral interactions by Mössbauer spectroscopy. *Hyperfine Interactions* 117, 371-382. doi: [10.1023/A:1012626923056](https://doi.org/10.1023/A:1012626923056).



Figure S1.

Cylinders (3.8 cm in diameter) and powder of intact iron ore (IIO, at the top) and aged/oxidized iron ore (AIO, at the bottom).

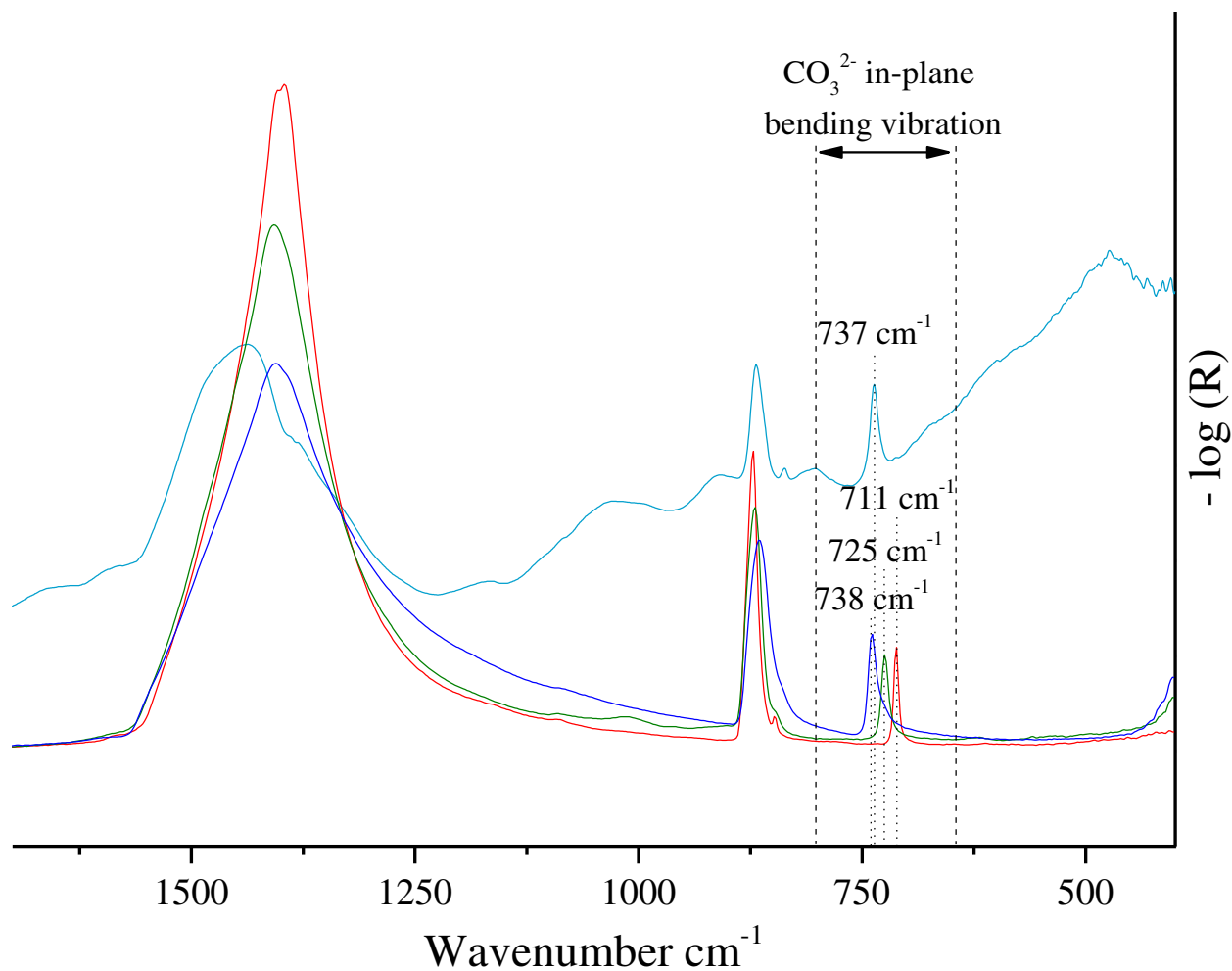


Figure S2.

DRIFTS spectra of various carbonate bearing minerals - calcite reference mineral (red line, R050009.1), siderite reference mineral (dark blue line, R050262.1), ankerite reference mineral (green line, R050181.1) and the siderite rock mineral (blue line, from Georesources laboratory collection). Calcite, siderite and ankerite reference data derived from the Ruff database (Downs, 2006). Siderite rock mineral comes from the Georesources Laboratory Collection, Vandœuvre-les-Nancy, France).

9.2. Annexe Chapitre 5

Tableau A1: Résultats des tests de Wilcoxon pour la comparaison des différents seuils de rupture des échantillons de minerai vieilli (bilatéral, $\alpha = 5\%$).

		Échantillon				
		Brut	071013	260914	120115	AB
Échantillon	Brut	-	1	0,5	0,75	1
	071013		-	1	1	1
	260914			-	0,5	1
	120115				-	0,5
	AB					-

Tableau A2: Résultats des tests de Wilcoxon pour la comparaison des différents seuils de rupture des échantillons de minerai intact (bilatéral, $\alpha = 5\%$).

		Échantillon						
		Brut	071013	260914	120115	AB	H ₂ O ₂	H ₂ S
Échantillon	Brut	-	1	1	0,25	1	0,5	0,5
	071013		-	0,5	1	1	1	0,5
	260914			-	1	1	1	0,5
	120115				-	1	1	0,25
	AB					-	1	0,5
	H ₂ O ₂						-	1
	H ₂ S							-

Tableau A3: Résultats des tests de Wilcoxon pour la comparaison des différentes jauges axiales et latérales des échantillons de minerai vieilli (bilatéral, $\alpha = 5\%$).

	Échantillon						
	AXIALE	Brut	071013	260914	120115	AB	
Échantillon	Brut	-	0,25	0,75	0,5	0,5	
	71013		-	0,25	0,75	0,25	
	260914			-	0,5	0,5	
	120115				-	0,5	
	AB					-	
	LATERALE						
	Brut	-	0,25	0,5	1	0,25	
	71013		-	0,25	0,875	0,25	
	260914			-	0,25	0,25	
	120115				-	0,75	
	AB					-	

Tableau 4: Résultats des tests de Wilcoxon pour la comparaison des différentes jauges axiales et latérales des échantillons de minerai intact (bilatéral, $\alpha = 5\%$).

	Échantillon								
	AXIALE	Brut	071013	260914	120115	AB	H ₂ O ₂	H ₂ S	
Échantillon	Brut	-	0,81	0,75	0,14	0,5	0,31	0,2	
	071013		-	1	0,31	0,61	1	0,62	
	260914			-	0,25	0,38	0,5	1	
	120115				-	0,5	0,56	0,007	
	AB					-	0,5	0,5	
	H ₂ O ₂						-	0,062	
	H ₂ S							-	
	LATERALE								
	Brut	-	0,31	0,43	1	0,81	0,65	0,15	
	071013		-	0,18	0,31	0,06	0,06	0,06	
	260914			-	0,56	0,31	0,43	0,68	
	120115				-	0,62	0,42	0,46	
	AB					-	0,62	0,062	
	H ₂ O ₂						-	0,15	
H ₂ S							-		

Tableau A5: Tableau des dimensions construisant l'ACP.

	Valeur propre	Pourcentage de la variance	Pourcentage cumulatif des variances
composante 1	2,3798411	47,596821	47,59682
composante 2	0,9501575	19,003151	66,59997
composante 3	0,8090395	16,180790	82,78076
composante 4	0,5191598	10,383196	93,16396
composante 5	0,3418021	6,836041	100,00000

Tableau A6: Tableau des contributions des variables à l'ACP (en %).

	Dimension 1	Dimension 2	Dimension 3	Dimension 4	Dimension 5
FN	28,89516	4,0116191	1,169428	22,23432153	43,689467
Young	15,17521	53,0445656	5,600276	0,03108359	26,148865
Latéral	21,45078	4,9590648	24,381305	43,37859490	5,830253
Poisson	18,85891	37,6844753	1,942579	20,02387843	21,490154
Longueur	15,61993	0,3002753	66,906411	14,33212155	2,841262

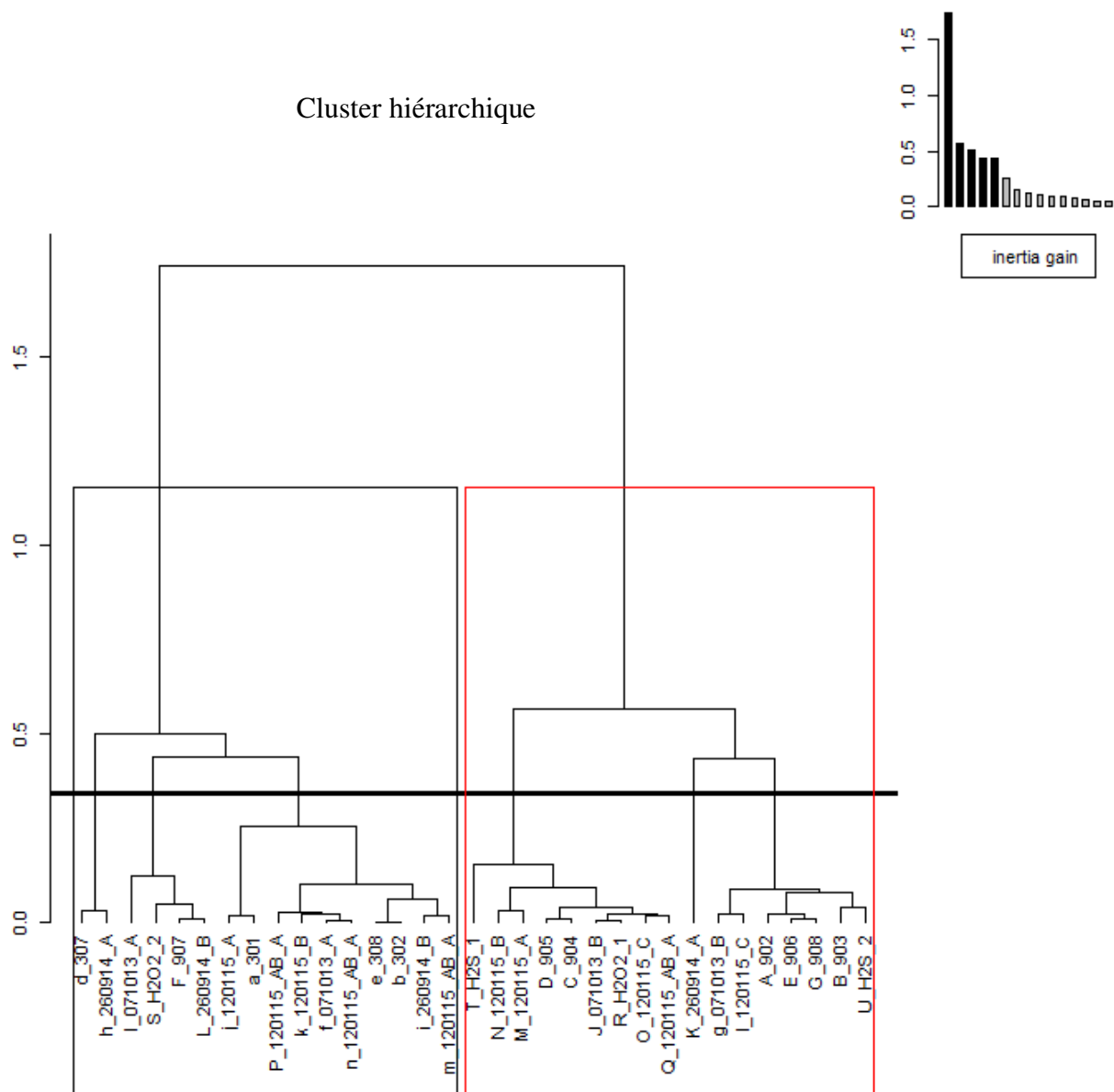


Figure A1: Dendrogramme résultant de l'ACP. Les deux groupes regroupent bien les échantillons de minerai vieilli (cadre noir) et ceux du minerai intact (cadre rouge). Les éprouvettes de minerai vieilli sont représentées par un lettre minuscule au début de chaque nom, c'est une majuscule pour le minerai sain.

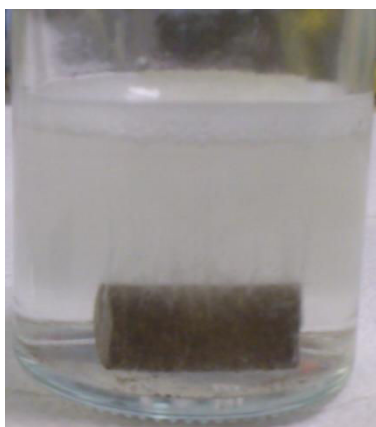


Figure A2: Photographie de la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et une éprouvette de minerai intact. La présence des bulles indique la forte réaction qui se produit (dégagement de chaleur et augmentation de la pression si le flacon est clos).

Tableau A7 : Valeurs du module de Young obtenues suite à l'indentation du minerai vieilli.

Éch.	indent t n°	Module de Young (Mpa)		Éch.	indent n°	Module de Young (Mpa)		Éch.	indent n°	Module de Young (Mpa)		Éch.	indent n°	Module de Young (Mpa)	
		40 N	70 N			40 N	70 N			40 N	70 N			40 N	70 N
brut 1	1	30250	-	brut 3	1	37900	49240	A1 Fin 260914	1	26813	60077	A3 Fin 120115	1	35269	60709
	2	38180	64180		2	26690	43490		2	26159	45434		2	56581	68881
	3	39610	64450		3	28210	44570		3	40404	46311		3	62712	64454
	4	56730	70750		4	38480	50870		4	37194	31028		4	77497	84733
	5	56390	75100		5	36010	57380		5	43854	63447		5	38950	53301
	6	48540	68810		6	39010	51510		6	41655	55896		6	47447	61533
	7	62560	75860		7	39740	49100		7	-	-		7	26825	-
	8	49180	68170		8	34790	42200		8	38250	-		8	46777	-
	9	48660	59070		9	37990	53140		9	43601	-		9	29359	48658
	10	44820	56990		10	-	-		10	-	-		10	61681	-
brut 2	1	36640	-	A2 Fin 071013	1	34926	47527	A4 Fin 120115	1	-	-	AB Fin 120115	1	30707	49632
	2	42370	55990		2	35500	54477		2	-	-		2	33288	51751
	3	44360	55390		3	28564	40036		3	33636	-		3	28374	49049
	4	46360	57650		4	46654	57223		4	32993	52273		4	44728	63197
	5	47720	70930		5	31711			5	44264	71482		5	30369	-
	6	38700	63050		6	40472	54142		6	38772	57253		6	30360	-
	7	37510	54460		7	35855	50014		7	45260	85970		7	48194	53328
	8	42740	57360		8	40351	30206		8	53413	69212		8	34137	49540
	9	33760	50520		9	41964	57411		9	22811	35176		9	-	-
	10	-	-		10	52276	50900		10	29423	51757		10	-	-

Tableau A8: Valeurs du module de Young obtenues suite à l'indentation du minerai intact.

Éch.	indent n°	Module de Young (Mpa)		Éch.	indent n°	Module de Young (Mpa)		Éch.	indent n°	Module de Young (Mpa)		Éch.	indent n°	Module de Young (Mpa)	
		70 N	100 N			70 N	100 N			70 N	100 N			70 N	100 N
brut 1	1	92900	98201	B5 FIN 071013	1	82844	80799	B1 FIN 120115	1	88175	104618	B2 AB FIN 120115	1	72659	101385
	2	84363	88808		2	86401	79360		2	119030	124355		2	83701	84036
	3	89387	88636		3	78398	79269		3	83429	90807		3	81589	101532
	4	81823	97439		4	81347	90394		4	78530	-		4	88064	84977
	5	89320	95629		5	78913	83450		5	-	-		5	84446	-
brut 2	1	81550	84868	B8 FIN 071013	1	96135	84768	B3 FIN 120115	1	82374	91885	B12 AB FIN 120115	1	80350	83609
	2	88742	104839		2	-	-		2	93888	-		2	81626	89990
	3	87089	94128		3	88673	-		3	86912	87457		3	93795	91693
	4	73497	-		4	82496	115711		4	83617	-		4	90420	102476
	5	78535	87407		5	113752	111243		5	-	-		5	85432	83058
brut 3	1	93574	95923	B7 FIN 260914	1	87969	82794	B4 FIN 120115	1	87971	94273	H202 -1	1	56270	49608
	2	95492	90221		2	98936	102027		2	113032	100645		2	60892	66277
	3	92767	-		3	94758	88247		3	84542	101964		3	46337	46917
	4	85584	92570		4	114244	116841		4	106650	101692		4	59165	57957
	5	94233	93040		5	109868	-		5	108762	115959		5	60890	67726
brut 4	1	87106	98902	B9 FIN 260914	1	104880	99328	B6 FIN 120115	1	91855	94164	H202 -2	1	53273	59228
	2	84988	92201		2	108365	-		2	85380	-		2	46476	58648
	3	118197	100908		3	81687	-		3	82422	84585		3	48186	59966
	4	109257	94298		4	83860	115981		4	89714	115810		4	54788	60160
	5	82444	99396		5	86539	86394		5	91031	-		5	54284	82257
brut 5	1	81135	96160												
	2	84960	46644												
	3	96557	95069												
	4	85899	82307												
	5	86371	86944												

Tableau A9: Résultats des tests de Student ($\alpha=5\%$) entre les différentes séries de mesure d'indentation du minerai intact incubé avec *S. putrefaciens*, ainsi que l'échantillon abiotique.

	T _{in} 4 (1) - 70N	T _{in} 4 (1) - 100N	T _{in} 4 (2) - 70N	T _{in} 4 (2) - 100N	Tin15 (1) - 70N	Tin15 (1) - 100N	Tin15 (2) - 70N	Tin15 (2) - 100N	Tin19 (1-1) - 70N	Tin19 (1-1) - 100N	Tin19 (1-2) - 70N	Tin19 (1-2) - 100N	Tin19 (2-1) - 70N	Tin19 (2-1) - 100N	Tin19 (2-2) - 70N	Tin19 (2-2) - 100N	Tin19 abio (1) - 70N	Tin19 abio (1) - 100N	Tin19 abio (2) - 70N	Tin19 abio (2) - 100N
T _{in} 4 (1) - 70N	-	0,72	0,16	0,16	0,02	0,13	0,06	0,10	0,28	0,08	0,12	0,42	0,02	0,01	0,04	0,30	0,87	0,17	0,27	0,08
T _{in} 4 (1) - 100N		-	0,06	0,14	0,01	0,14	0,01	0,07	0,42	0,11	0,41	0,09	0,03	0,01	0,05	0,18	0,80	0,21	0,25	0,04
T _{in} 4 (2) - 70N			-	0,38	0,48	0,72	0,96	0,28	0,84	0,19	0,38	0,32	0,73	0,57	0,24	0,53	0,11	0,83	0,32	0,56
T _{in} 4 (2) - 100N				-	0,26	0,16	0,73	0,79	0,56	0,84	0,14	0,65	0,44	0,57	0,29	0,69	0,06	0,61	0,16	0,17
Tin15 (1) - 70N					-	0,59	0,43	0,47	0,60	0,28	0,13	0,70	0,83	0,66	0,05	0,71	0,00	0,58	0,03	0,06
Tin15 (1) - 100N						-	0,82	0,24	0,69	0,13	0,25	0,85	0,91	0,76	0,28	0,64	0,05	0,70	0,24	0,30
Tin15 (2) - 70N							-	0,63	0,70	0,22	0,29	0,14	0,38	0,28	0,42	0,99	0,20	0,86	0,44	0,72
Tin15 (2) - 100N								-	0,46	0,03	0,20	0,33	0,21	0,87	0,23	0,90	0,12	0,75	0,33	0,31
Tin19 (1-1) - 70N									-	0,10	0,48	0,57	0,50	0,49	0,65	0,95	0,35	0,96	0,65	0,98
Tin19 (1-1) - 100N										-	0,14	0,29	0,06	0,53	0,17	0,70	0,10	0,55	0,25	0,22
Tin19 (1-2) - 70N											-	0,88	0,15	0,01	0,89	0,44	0,22	0,41	0,98	0,36
Tin19 (1-2) - 100N												-	0,60	0,39	0,49	0,93	0,38	0,72	0,20	0,69
Tin19 (2-1) - 70N													-	0,63	0,10	0,63	0,02	0,70	0,12	0,18
Tin19 (2-1) - 100N														-	0,02	0,94	0,00	0,35	0,01	0,08
Tin19 (2-2) - 70N															-	0,40	0,16	0,37	0,67	0,66
Tin19 (2-2) - 100N																-	0,19	0,73	0,14	0,37
Tin19 abio (1) - 70N																	-	0,23	0,17	0,04
Tin19 abio (1) - 100N																		-	0,33	0,90
Tin19 abio (2) - 70N																			-	0,25
Tin19 abio (2) - 100N																				-

RESUME

Les effondrements miniers en Lorraine (France) ont pour origine la rupture des piliers de soutien constitués de minerai de fer. Leur rupture n'est pas seulement due aux seules contraintes mécaniques qu'exerce le recouvrement mais également aux différentes transformations minéralogiques du minerai de fer, compromettant sa cohésion et sa résistance et par conséquent, la stabilité des piliers. On parle alors d'altération/vieillesse minéralogique du minerai de fer. Les mécanismes chimiques qui entraînent ces transformations minéralogiques sont désormais bien connus mais l'influence de l'activité bactérienne n'est pas encore bien comprise. Des travaux préliminaires ayant soulevé le rôle possible des activités microbiennes, ce travail de thèse s'est alors appliqué à identifier les métabolismes bactériens susceptibles de réagir avec le minerai de fer en conditions aérobie et anaérobie, et à en caractériser les effets physico-chimiques, minéralogiques et mécaniques.

Les groupes métaboliques bactériens suspectés d'être impliqués dans ces réactions (activités ferri-réductrices, ferro-oxydantes et sulfato-réductrices) ont été identifiés dans les eaux de mine et incubés en présence du minerai de fer, en souche pure ou avec un consortium issu de l'eau de mine. Les bactéries ferri-réductrices (IRB), sulfato-réductrices (BSR) et acidophiles ferro-oxydantes ont été les seules qui, dans les conditions de laboratoire, ont impacté significativement le minerai en modifiant le ratio Fe(II)/Fe(III). Une phase ferro-carbonatée et de la pyrite se sont formées respectivement au cours des incubations avec les IRB et BSR, et ont été caractérisées par analyse du solide (spectroscopies infrarouge en réflexion diffuse (DRIFTS) et Mössbauer et par diffraction aux rayons X). Des bactéries nitrate-réductrices ont aussi été testées et aucune modification significative du ratio Fe(II)/Fe(III) du minerai de fer n'a été observée. Enfin, les propriétés mécaniques du minerai de fer ont été mesurées après les réactions d'oxydo-réduction biologiques et purement chimiques. Des modifications sensibles de ces propriétés mécaniques par rapport à l'état initial ont ainsi pu être mises en évidence. Sur la base de ces résultats, l'hypothèse de l'altération mécanique du minerai de fer par des activités microbiennes est donc tout à fait réaliste.

Mots-clés: minerai de fer, bactéries ferri-réductrices, bactéries ferro-oxydantes, bactéries sulfato-réductrices, analyses minéralogiques, propriétés mécaniques.

SUMMARY

Mine collapses occurred in Lorraine (France) because of the failure of safety pillars made of iron ore. Their failure is not only due to the mechanic stresses applied by the overburden, but also due to the various mineralogical transformations in iron ore which decrease material cohesion and resistance and thus stability of pillars. This is called mineralogical alteration/ageing of iron ore. Chemical mechanisms inducing these mineralogical transformations are now well known but the influence of microbial activity is not well understood yet. Preliminary works have raised the possible role of microbial activity, then the focus of this work was to identify the various bacterial metabolisms capable of reacting with iron ore and to characterize the physico-chemical, mineralogical and mechanical effects.

The bacterial metabolism groups possibly implied in these reactions (iron-reducing (IRB), iron-oxidizing and sulfate-reducing bacteria (SRB)) were identified from the mine water. As pure strain or as consortium, these bacteria were incubated with iron ore. Under laboratory conditions, only iron-reducing, sulfate-reducing and acidophilic iron-oxidizing bacteria impacted iron ore samples by modifying the Fe(II)/Fe(III) ratio. A ferrous-carbonate phase and pyrite were formed during incubations with IRB and SRB, respectively. These minerals were characterized from analysis of the solid phase (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS), Mössbauer spectroscopy and X-ray diffraction). The impact nitrate-reducing bacteria was also tested but the Fe(II)/Fe(III) ratio of iron ore was not modified significantly. Finally, mechanical properties of iron ore were measured after microbial and purely chemical redox reactions. Discernible modifications of these mechanical properties were observed. From these results, the alteration of iron ore mechanical properties by bacterial activities is a realistic assumption.

Keywords: iron ore, iron-reducing bacteria, iron-oxidizing bacteria, sulfate-reducing bacteria, mineralogical analyses, mechanical properties.