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

Université Henri Poincaré NANCY 1

U.F.R. S.T.M.P
Groupe de Formation Doctorale
des Sciences de la Terre

THESE
présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Henri-Poincaré, Nancy I
en Géomicrobiologie

par

Valérie TONIAZZO

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHEQUE

Approche des mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* grâce à la modélisation morpho-chimique de la surface minérale : rôle fondamental des phases superficielles oxydées

le 10 février 1998

Membres du jury :

Président :	J. Berthelin, Directeur de Recherche, CPB-CNRS, Nancy
Rapporteurs :	R. Erre, Professeur, Université d'Orléans, Orléans R. Guay, Professeur, Université Laval, Sainte-Foy, Québec
Examinateurs :	J. Cases, Directeur de Recherche, LEM-CNRS, Nancy C. Mustin, Chargé de Recherche, CPB-CNRS, Nancy P. Rouxhet, Professeur, Université de Louvain, Belgique
Invités :	M. Bellières, Ingénieur, COGEMA, Vélizy-Villacoublay A. Marcé, Ingénieur, ADEME, Paris D. Morin, Ingénieur, BRGM, Orléans

CNRS CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CPB

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

A mes parents

AVANT PROPOS

"L'expérience ne trompe jamais, c'est notre jugement seul qui s'égare en nous promettant des résultats qui ne découlent pas directement de notre expérimentation."

Cette maxime de Léonard de Vinci nous met en garde contre la tentation d'utiliser des modèles simples pour rendre compte de phénomènes naturels, et d'ignorer ou de détourner le sens de toute expérimentation qui pourrait invalider ces considérations théoriques. La science moderne a fait l'apologie des modèles mathématiques mais on apprend à nos dépens que les systèmes complexes sont difficilement modélisables, à moins de formuler des hypothèses simplificatrices.
Afin de décrire et d'appréhender au mieux le comportement de tels systèmes, il est important de conserver une approche naturaliste des phénomènes et une certaine proximité avec l'objet étudié. Cela suppose une observation à des échelles multiples et le couplage d'un grand nombre de techniques et de méthodologies.
C'est pourquoi un tel travail de recherche ne peut avoir lieu sans le secours de nombreux collaborateurs dont les compétences sont aussi précieuses que variées.

Mes premiers remerciement vont à Jacques BERTHELIN, directeur du Centre de Pédologie Biologique, pour sa confiance et ses précieux conseils, ainsi qu'à l'ADEME, à la COGEMA et au BRGM, principaux initiateurs du vaste programme dans lequel s'inscrit cette thèse.

J'adresse aussi mes plus vifs remerciements aux membres du jury : M. CASES, M. ERRE, M. GUAY et M. ROUXHET qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

J'aimerais par ailleurs exprimer ma gratitude aux techniciens et ingénieurs du CPB, et en particulier à G. BELGY, B. GÉRARD, J.M. PORTAL et J. ROUILLER qui ont bien voulu mettre leur sérieux et leur savoir-faire au service de cette étude. Je n'oublie pas Evelyne JEANROY qui a su donner à ce mémoire son poli final.

Une pensée particulière aux étudiants du laboratoire qui, grâce à leur humour et à leur joie de vivre, ont ponctué ces trois années d'instants mémorables. Je n'oublie pas Fabienne MÉLINE qui, en plus de m'avoir initiée avec talent à la microbiologie, est devenue une amie très chère. Son calme à toute épreuve et sa juste appréciation des événements ont su m'apaiser dans les périodes de doute.

Cette étude a également occasionné des rencontres et des collaborations très enrichissantes avec divers laboratoires et centres de recherche :

Avec le CRMD*, tout d'abord, au sein de l'équipe jeune et dynamique du professeur René ERRE. Un grand merci à Marylène VAYER et Roland BENOÎT qui ont su transformer les longues soirées passées au laboratoire en moments tout à fait sympathiques.

Avec le LEM**, où j'ai trouvé des collaborateurs efficaces et dévoués. Je pense en particulier à Odile BARRES et Frédéric VILLIÉRAS.
Une attention toute spéciale à Michelle FRANÇOIS qui, en plus de son assistance scientifique, m'a offert une amitié précieuse et un soutien moral salvateur dans certains moments difficiles.
J'ai également une dette envers Philippe DE DONATO, dont la bonne humeur a accompagné mes premiers stages d'été au LEM. La formation qu'il m'y a dispensée aura contribué a me donner le goût de la recherche et je lui suis reconnaissante de m'avoir, en quelque sorte, "mis le pied à l'étrier". A ce titre, je remercie aussi Jean CASES et toute son équipe pour leur chaleureux accueil.

Avec le Laboratoire d'Informatique et d'Analyse des Données. Un grand merci au professeur J.L. MALLET, à Richard COGNOT et spécialement à Dominique MALÉCOT pour toutes ces heures passées à l'analyse souvent fastidieuse d'un nombre immodéré d'images.

Enfin, avec le LCPE***, où le sérieux et les compétences de Bernard HUMBERT auront été déterminants pour ce travail.

Cette étude a également occasionné un séjour à l'Université Iztapalapa de Mexico. J'adresse mes plus sincères remerciements à Ignacio GONZALEZ et à Isabelle LAZARO pour le temps précieux qu'ils ont consacré à compléter ma formation en électrochimie, ainsi qu'à Marcos MONROY qui a si parfaitement organisé ce séjour.

Je tiens aussi à rendre un hommage particulier à Christian MUSTIN, principal encadrant de cette thèse, et dont j'admire les qualités de cœur tout autant que la valeur scientifique hors du commun. Son enthousiasme et son dévouement ont été un exemple durant ces trois années de recherche. Plus qu'un guide ou un maître, il reste un ami attentif.

Je n'oublie pas mes parents et ma sœur Frédérique dont la présence réconfortante et la tendresse au quotidien ont été vitales pour la réalisation de ce travail.

*CRMD : Centre de Recherche sur la Matière Divisée, UMR 131 du CNRS, 1b, rue de la Ferrolerie 45000 ORLEANS La Source.
**L.E.M. : Laboratoire Environnement et Minéralurgie, B.P. 4, rue du Doyen Roubault, 54501 VANDŒUVRE-lès-NANCY Cedex.
***LCPE : Laboratoire de Chimie Physique pour l'Environnement, UMR 9992 du CNRS, 405 rue de Vandœuvre, 54600 VILLERS-LÈS-NANCY.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 1

ORIENTATION DE L'ÉTUDE 3

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA BACTÉRIE : *Thiobacillus ferrooxidans* 7

1. Particularités morphologiques et structurales 7

2. Physiologie et énergétique cellulaire 8

II. LA PYRITE 13

1. Généralités 13

2. Propriétés physiques (LOWSON, 1982) 14

3. Oxydation 17

a. Oxydation aqueuse par l'oxygène dissout 17
b. Oxydation aqueuse par les ions ferriques 19
c. Dissolution non-stoechiométrique de la pyrite et développement de phases superficielles oxydées 20

III. L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL : LE PROCESSUS DE BIOLIXIVIATION 23

1. Généralités 23

2. Adhésion et mécanismes d'oxydation (in)directs 24

3. La biolixiviation et les phases superficielles de la pyrite 29

CONCLUSION 31

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL 33

1. La bactérie 34
a. Origine de l'inoculum et conditions de culture 34
b. Numération 35

2. Les pyrites 35
a. Origine et nature 35
b. Broyage et tamisage. 36

3. Dispositifs de culture 36
a. Les flacons sérums 36
b. Les mini-réacteurs 37

II. METHODES D'ETUDE DE L'INTERFACE *THIOBACILLUS FERROOXIDANS* /PYRITE 38

1. Description des états de surface de la pyrite 38
a. Elutions sélectives et dosage des phases superficielles 38
b. Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS) 42
c. Spectrométrie Raman 45
d. Microscopies 49
La Microscopie Electronique à Balayage (MEB) 49
La Microscopie à Force Atomique (AFM) 49

2. Dynamique et réactivité de l'interface 59
a. Electrochimie 59
b. Suivi d'un réacteur de biolixiviation 62

Chapitre I

CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE LA SURFACE DES PYRITES À L'ÉTAT NATUREL

I. ETUDE DES PYRITES PAR SPECTROSCOPIE DE PHOTO-ELECTRONS X 66

1. Les pyrites autoclavées 67

2. Les pyrites à l'état naturel 71
a. Pyrite K 71
b. Pyrite Es 72

II. ETUDE DES PYRITES PAR SPECTROMÉTRIE RAMAN 75

1. Les pyrites autoclavées 75

2. Les pyrites à l'état naturel 77
a. Pyrite K 77
b. Pyrite Es 79

III. QUANTIFICATION DES PHASES SUPERFICIELLES OXYDÉES 83

1. Le soufre élémentaire de surface S_8 83
a. Pyrite K 83
b. Pyrite Es 85

2. Dosage du fer total de surface 86

IV. ETUDE DE LA RÉPONSE ÉLECTROCHIMIQUE DES PYRITES 90

1. La pyrite K 90

2. La pyrite Es 95

CONCLUSION 100

Chapitre II

EVOLUTION DE L'INTERFACE AU COURS DU CYCLE DE BIOLIXIVIATION

I. APPROCHE GLOBALE : LES ASPECTS CINÉTIQUES 103

1. Influence de l'inoculum 104
a. Etat physiologique des bactéries 104

b. Variation de l'activité bactérienne avec la nature du substrat 104

2. Influence des facteurs minéralogiques 104
a. Les propriétés cristallochimiques 104
b. La granulométrie 106
c. L'état initial d'oxydation du minéral 108

II. DESCRIPTION PHYSICO-CHIMIQUE D'UN CYCLE DE BIOLIXIVIATION 110

1. Etude des paramètres en solution 110

2. Evolution de l'état de surface de la pyrite au cours de la biolixiviation 116
a. Etude par spectroscopie XPS 116
b. Analyse par spectroscopie Raman 121

III. LES PHASES SUPERFICIELLES SOLUBILISÉES : DE BONS SUBSTRATS BACTÉRIENS 127

IV. LES PHASES SUPERFICIELLES : FACTEURS LIMITANTS DE LA CINÉTIQUE DE BIOLIXIVIATION 131

1. Contribution du fer initial en solution 132

2. La biolixiviation en l'absence d'éléments initiaux oxydables en solution 137

V. LES PHASES SUPERFICIELLES : SEULS SUBSTRATS MÉTABOLISABLES 140

CONCLUSION 146

Chapitre III

GEOMETRIE DE L'INTERFACE PYRITES/THIOBACILLES/SOLUTION

I. EXPLOITATION DES IMAGES 147

1. Les images d'AFM et leurs artéfacts 150

2. Correction par modélisation 3D et partitionnement 152
a. Elimination des stries 153
b. Correction du plan porteur 156

II. APPROCHE GÉOSTATISTIQUE DES VARIOGRAMMES 156

III. DISTRIBUTION SPATIALE DES PHASES SUPERFICIELLES 162

1. Les pyrites à l'état naturel 162

2. Les pyrites biolixiviées 164

IV. QUANTIFICATIONS GEOMETRIQUES 166

1. Géométrie des phases superficielles 166

2. Quantification des phases superficielles par modélisation 3D 167

CONCLUSION 170

Chapitre IV

SYNTHESE ET MODÈLE

I. MODELE MORPHO-CHIMIQUE DE L'INTERFACE 171

1. Diversité chimique de l'interface 172

2. Organisation et distribution spatiale des phases oxydées à l'interface 173

II. DYNAMIQUE DES PROCESSUS LOCAUX DE LA BIOLIXIVIATION 176

1. Les phases superficielles : indicateurs d'oxydation et substrats bactériens 176

2. Les différentes étapes de la biolixiviation des pyrites par *T.ferrooxidans* 177

III. SYNERGIE DES PROCESSUS CHIMIQUES ET MICROBIENS 180

IV. CONSÉQUENCES SUR LES LIXIVIATIONS NATURELLES ET INDUSTRIELLES 182

1. Le contact bactérie/minéral 182

2. L'activité oxydatrice des bactéries 183

3. Etats de surface, granulométrie et propriétés électrochimiques 183

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 185

BIBLIOGRAPHIE 189

ANNEXE 197

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES
BIBLIOTHÈQUE

INTRODUCTION GENERALE

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Quand Van LEEUWENHOECK a découvert les micro-organismes à la fin du XVIIe siècle, sans doute ne soupçonnait-il pas la diversité, la complexité et le rôle considérable du monde microbien dans la biosphère. Quelques générations plus tard, les travaux de PASTEUR démontrent l'importance des bactéries et des virus pour les êtres vivants, et posent les bases de la théorie microbienne des maladies. Dès lors, les enjeux pour la médecine sont tels, qu'une véritable science se développe, afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces cellules organotrophes pour aboutir, aujourd'hui, à un essor considérable des biotechnologies médicales. Dans cet engouement, la production de principes actifs à l'échelle industrielle a fortement stimulé les recherches en biologie moléculaire et génétique sur quelques microorganismes particulièrement intéressants.

Cependant, de nombreux micro-organismes n'ont pas bénéficié de cet élan scientifique soit parce qu'ils échappent à un mode classique de fonctionnement cellulaire (organotrophie) ou parce qu'ils ont conquis des milieux naturels particuliers (sols, sédiments,..) ou longtemps ignorés (source chaude, roches profondes...). Pourtant, depuis plusieurs milliards d'années et bien avant l'apparition de l'Homme, les bactéries et les champignons interviennent dans les cycles biogéochimiques de notre planète et dans l'équilibre de l'environnement terrestre. En transformant l'environnement minéral soit directement par des réactions d'oxydo-réduction impliquant des substances organiques ou minérales soit en produisant des métabolites qui peuvent avoir des propriétés oxydantes, réductrices, alcalines, acides, complexantes ou agrégeantes, ils constituent aussi, un lien fondamental entre le monde minéral et le monde bio-organique.

Parmi ces micro-organismes, certaines bactéries du genre *Thiobacillus* ont la capacité de se développer sans aucune source de carbone organique et de se procurer l'energie nécessaire à leur

croissance dans le monde minéral. En oxydant principalement les composés réduits du soufre et parfois ceux du fer, les Thiobacilles présentent à la fois un grand intérêt fondamental pour le fonctionnement et le couplage des cycles biogéochimiques du soufre et du fer, mais aussi pour l'évaluation des risques d'acidification des eaux et des sols et l'amélioration de procédés industriels de lixiviation de minéraux sulfurés. En milieu naturel, ce phénomène d'oxydation est à l'origine de la libération de nombreuses espèces sulfatées et oxydées du fer mais aussi des métaux lourds et radionucléides contenus dans les minéraux. Dans de nombreux cas, l'activité oxydante et acidifiante de bactéries du genre *Thiobacillus* peut amplifier le processus en multipliant les cinétiques chimiques d'un facteur 1000 à 10000.

La découverte de ces bactéries "marginales" a conduit elle aussi à l'émergence de nouvelles perspectives biotechnologiques, économiques et environnementales visant une meilleure gestion des ressources naturelles. Ainsi, la biolixiviation des minéraux sulfurés, longtemps considérée comme un phénomène purement chimique, permet aujourd'hui de valoriser des minerais et d'améliorer la récupération de métaux à forte valeur ajoutée (Or, Cuivre, Cobalt..) en limitant les rejets toxiques dans l'air ou dans les eaux de surface. L'activité oxydante particulière des Thiobacilles peut aussi avoir des conséquences néfastes sur l'environnement (acidification des eaux, corrosion des bétons...), car, sans en avoir conscience, ces bactéries libèrent l'énergie contenue dans le monde minéral et la transforment en travail.

Aujourd'hui, les micro-organismes apparaissent donc comme des auxiliaires indispensables à l'Homme, à la fois dans la compréhension du fonctionnement des systèmes naturels et dans la préservation de l'intégrité de son environnement.

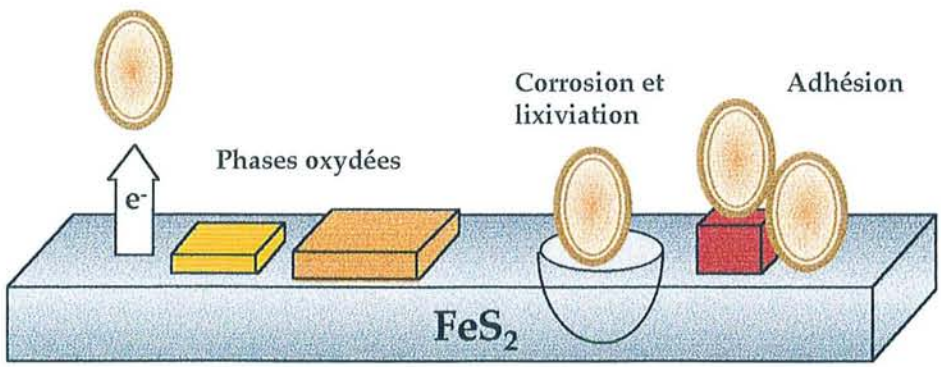
ORIENTATION DE L'ETUDE

ORIENTATION DE L'ÉTUDE

Les études récentes réalisées sur les systèmes *Thiobacillus ferrooxidans*/sulfures (pyrite, arsénopyrite et minerais pyriteux) ont mis en évidence à la fois l'existence de processus complexes aux interfaces, et l'influence des propriétés intrinsèques des deux acteurs (bactérie et minéral) sur le déroulement du cycle oxydatif (Thèses MUSTIN, 1992 ; MONROY, 1993 ; DZIURLA, 1995 et MÉLINE, 1995). En effet, la transformation thermodynamique, par les micro-organismes, de l'énergie contenue dans le monde minéral, a lieu à l'interface bactérie/minéral, véritable "théâtre d'opérations" où s'affrontent deux systèmes complexes et réactifs. Ainsi, l'étude du système Thiobacille/Pyrite impose la prise en compte de la complexité naturelle de chaque constituant et en particulier, de l'hétérogénéité minérale et de la réactivité particulière du sulfure, sans oublier les difficultés inhérentes à l'étude d'un matériel vivant capable d'évoluer et de s'adapter. L'existence de "liens flous" entre les deux protagonistes du système engendre des rapports de causalités difficilement formulables qui amènent souvent les expérimentateurs à aborder ces processus de manière globale. Toutefois, un tel système ne saurait être décrit par des mécanismes simples et généraux. L'étude de paramètres chimiques en solution (pH, potentiel d'équilibre, concentration des différentes espèces), ou l'analyse du minéral par des techniques qui moyennent l'information de surface, ne sont pas suffisantes pour cerner les processus complexes d'oxydation biologique de la phase minérale.

Même si dans la plupart des études réalisées sur le système *Thiobacillus ferrooxidans*/pyrite, des relations entre l'adhésion des bactéries, le développement des figures de corrosion, les propriétés du minéral (critallochimie, électrochimie) et les cinétiques de dissolution ont souvent été supposés, les liens précis entre ces différents événements n'ont jamais été clairement

démontrés. Ces lacunes traduisent en fait l'impossibilité d'expliquer à partir de paramètres globaux (croissance bactérienne, acidification, oxydation du fer et du soufre) des processus locaux comme la corrosion ou l'adhésion bactérienne. En revanche, l'étude précise des processus interfaciaux, et plus particulièrement du développement des phases oxydées à la surface du minéral, permettent d'affiner notre perception du système et d'en déterminer les paramètres clés. Puisqu'elles constituent le trait d'union entre la bactérie et le minéral au cours de son oxydation, ces phases oxydées sont à la fois le reflet de la réactivité du minéral, mais aussi des transformations microbiennes que subit celui-ci.



Ainsi, l'étude précise de l'interface minéral-solution et des composés oxydés de surface est fondamentale pour la description des mécanismes intimes de l'oxydation biologique du minéral. Il faut effectuer une prospection locale et détaillée, à l'échelle micrométrique, jusque dans la niche écologique de la bactérie. Ce n'est qu'après avoir appréhendé les interactions et les mécanismes locaux entre la cellule et son substrat énergétique, qu'il sera possible de proposer des mécanismes plus globaux pour la biolixiviation des sulfures et d'en préciser les facteurs limitants.
Le travail présenté dans ce mémoire est donc articulé autour de deux axes d'étude :

❶ Etablir l'organisation chimique des produits d'oxydation de surface afin de proposer un modèle morpho-chimique statique de l'interface avant et après biolixiviation :

Pour mieux saisir la complexité des processus à l'interface, il est indispensable d'obtenir une représentation réaliste de la surface de la pyrite oxydée à l'air, décapée ou biolixiviée. Cette étape préliminaire nécessite la mise en œuvre et le couplage de techniques variées afin de déterminer à la fois la nature chimique et la quantité des composés présents à la surface du minéral : spectroscopies XPS, Raman, voltamétrie cyclique, extraction sélective et dosage des composés superficiels oxydés par ICP-ES ou GC-MS. Bien que ces techniques ne donnent que des informations globales et statistiques, le recoupement des différents résultats permettra d'affiner les liens existants entre l'organisation de l'interface minéral-solution, la réactivité du minéral et l'activité microbienne. Cependant, pour parvenir à l'élaboration d'un véritable modèle morpho-chimique de la surface des pyrites, il est indispensable de pouvoir visualiser les phases oxydées àl'échelle micrométrique (du

nanomètre au micromètre) et de préciser leur organisation spatiale. Cette modélisation 3D de l'interface reposera sur l'utilisation de la Microscopie à Force Atomique et le développement d'outils mathématique et statistiques por l'analyse des images d'AFM.

❷ **Etudier la dynamique des processus locaux de la biooxydation ainsi que la biodisponibilité et l'utilisation des substrats par les bactéries :**

L'organisation particulière des phases oxydées à la surface des pyrites au cours de l'oxydation bactérienne témoigne sans doute des différentes réactions biophysicochimiques qui se déroulent à l'interface. Les différentes techniques développées dans la première étape permettront de corréler les cinétiques de dissolution à l'évolution physico-chimique de l'interface et à l'organisation (et par conséquent à la biodisponibilité) des substrats bactériens. Le but est de proposer un modèle phénoménologique de la biolixiviation à l'échelle locale, intégrant les informations morpho-chimiques de la surface minérale, et de déterminer les moteurs et les facteurs limitants (promoteurs ou inhibiteurs) de la biolixiviation.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA BACTÉRIE : *THIOBACILLUS FERROOXIDANS*

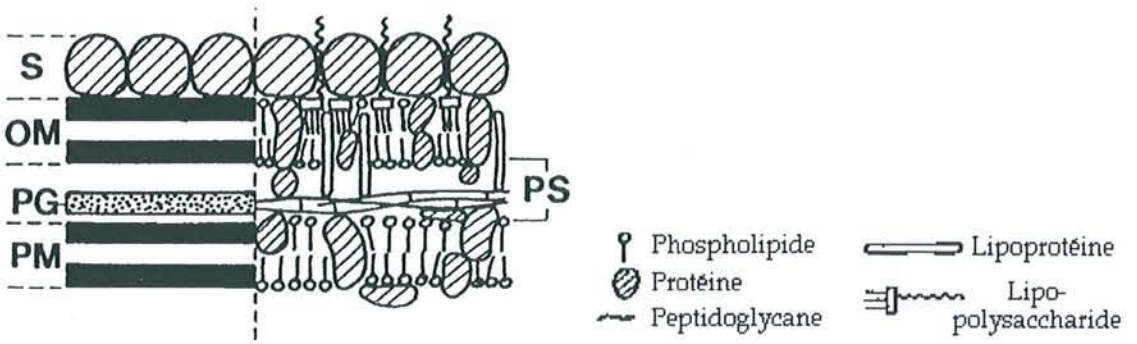
1. Particularités morphologiques et structurales

Découverte et isolée pour la première fois en 1947 par Colmer (COLMER *et al.*, 1947), *Thiobacillus ferrooxidans* est une bactérie oxydante appartenant au genre *Thiobacillus*.
Comme toutes les cellules Procaryotes, elle est constituée d'une enveloppe externe, la paroi, et d'un protoplasme contenant l'ensemble de l'information génétique.

Le Thiobacille est une bactérie de coloration Gram négative (REMSEN *et al.*,1966); sa paroi présente donc une structure double et particulièrement complexe :

- une membrane cytoplasmique, enveloppe interne semi-perméable, formée d'une double couche de phospholipides et contenant des polypeptides. Ils permettent non seulement l'accès à la cellule des éléments nutritifs, mais assurent aussi l'excrétion des déchets métaboliques.
- une membrane externe formée de nombreux liposaccharides (L.P.S) et séparée de la membrane interne par un espace périplasmique renfermant des protéines et un feuillet de peptidoglycanes.

Cette ensemble constitue une paroi relativement rigide qui confère à la bactérie une forme de batonnet de 0,5 à 1 µm de long et de 0,3 à 0,7 µm de diamètre, tout en conservant la souplesse nécessaire à la croissance cellulaire. Cette véritable barrière est également le seul moyen pour le Thiobacille de lutter contre les agressions du milieu extérieur, puisqu'il est asporulé.



PG = Peptidoglycane ; PM = membrane plasmique ; PS = espace périplasmique ; OM = membrane externe ; S = surface

Figure S.1 : Représentation schématique de la paroi

Thiobacillus ferrooxidans est une bactérie acidophile obligée dont le pH optimal de croissance se situe entre 1,6 et 2,8 (EWART et HUGHES, 1991). Elle est cependant particulièrement résistante et peut supporter des pH inférieur à 1 (COLBEYET *al.*, 1993). Comme la grande majorité des bactéries du genre *Thiobacillus*, elle est familière des environnements acides et riches en composés inorganiques soufrés et plus particulièrement des effluents de drainage des gisements sulfurés complexes contenant des pyrites (FeS2), des chalcopyrites (CuFeS2), de la galène (PbS) ou de la blende (ZnS).

2. Physiologie et énergétique cellulaire

Les microorganismes, comme tous les êtres vivants, ont la capacité de puiser dans leur environnement les éléments nécessaires à leur développement. Deux facteurs sont indispensables à leur croissance et à leur multiplication (Figure S.2) :

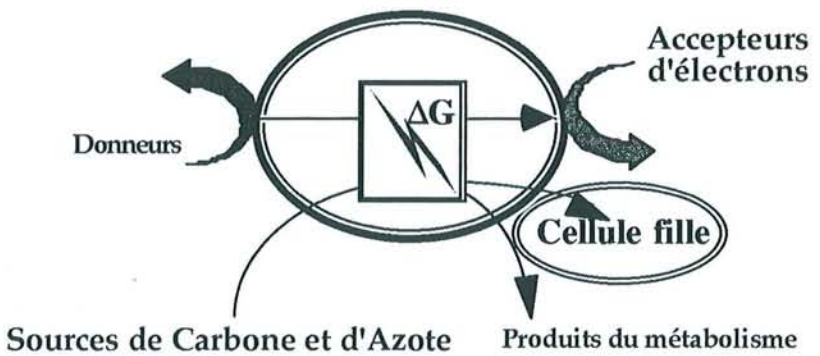


Figure S.2 : Schéma fonctionnel d'un microorganisme

- une source de carbone assimilable pour la synthèse des composés carbonés cellulaires. Si la

bactérie est capable de métaboliser le CO_2 atmosphérique par l'intermédiaire du cycle de Calvin (Kelly *et al.*, 1985), c'est un organisme autotrophe. Il est hétérotrophe si le carbone métabolisé provient de la dégradation de matières organiques.

• une source primaire d'énergie (substrat énergétique) nécesssaire au fonctionnement. Certains microorganismes puisent leur énergie primaire dans le rayonnement électromagnétique de la lumière (photons) : ce sont les organismes phototrophes. D'autres sont capables d'utiliser l'énergie électronique obtenue par oxydation de produits chimiques (organiques ou minéraux): ils sont chimiotrophes.

Il existe ainsi un couplage entre deux flux distincts : un flux d'électrons (source d'énergie) et un flux de carbone associés aux fonctions anaboliques et cataboliques cellulaires.

Pour tous les êtres vivants, l'électron est l'élément clé de tous les processus chimiques et physiques, ainsi que de toutes les transformations complexes de la matière : c'est le "carburant cellulaire". Toutes les réactions résultent d'un transfert d'électrons entre un composé donneur qui s'oxyde et un composé accepteur qui est réduit. Un bon donneur d'électrons est par conséquent un bon substrat énergétique : il est capable de céder aisément un ou plusieurs électrons à la cellule. Quand ce substrat est organique, le microorganisme (bactérie ou champignon) est dit organotrophe. Elle est qualifiée de lithotrophe si les électrons proviennent de l'oxydation d'une substance minérale.

Le tableau S.1 résume la classification des microorganismes en fonction des sources de carbone et d'énergie qu'ils utilisent pour vivre :

Tableau S.1 : Classification énergétique et nutritionnelle des microorganismes selon les sources de carbone et d'énergie (d'après BERTHELIN, 1988 et 1991).

	ENERGIE LUMINEUSE	ENERGIE CHIMIQUE
SOURCE MINERALE	- H_2O : donneur d'électrons - CO_2 $nCO_2 + (n+1)H_2O$ ---> $(CH_2O)_n + H2O + 2nO_2$ **Photolithotrophe**	- NH_4^+, S^{2-}, $S°$, Fe^{2+} - CO_2 **Chimiolithotrophe**
SOURCE ORGANIQUE	- $(CH_2O)_n$ **Photoorganotrophe**	- $(CH_2O)_n$ - $DH_2 + A$-> $D + AH_2$ (D: composé organique) **Chimioorganotrophe**

Dans cette classification, *Thiobacillus ferrooxidans* est une bactérie chimiolithotrophe

puisqu'elle utilise l'énergie provenant de l'oxydation de composés ferreux et sulfurés pour synthétiser ses composés carbonés à partir du gaz carbonique dissous. Aucune autre source de carbone n'est nécessaire et la seule source d'azote est l'azote minéral NH_4^+. Elle est, par conséquent, qualifiée d'autotrophe stricte.

Les bactéries appartenant au genre Thiobacille sont toutes chimiolithotrophes. L'un des critères dicriminants, outre le pH de croissance, est la nature des donneurs et des accepteurs d'électrons (Tableau S.2). Certains *Thiobacillus* peuvent utiliser de façon facultative, en plus du CO_2 atmosphérique dissous, une source de carbone organique.

Tableau S.2 : Caractéristiques physiologiques et énergétiques de quelques espèces de Thiobacilles.

	NOM D'ESPECE				
	T.ferrooxidans	*T. thiooxidans*	*T. thioparus*	*T. denitrificans*	*T. acidophilus*
pH croissance	1-4	2-5	6-8	6-8	2-4
Donneur d'électrons	$S°$, S_2^-, $S_2O_3^{2-}$, Fe^{2+}	$S°$, S_2^-, $S_2O_3^{2-}$	$S°$, S_2^-, $S_2O_3^{2-}$	$S°$, S_2^-, $S_2O_3^{2-}$	$S°$, S_2^-, Fe^{2+}
Accepteur d'électrons	O_2	O_2	O_2	O_2 NO_3^-	O_2
Source de carbone	CO_2	CO_2	CO_2	CO_2 et composés organiques	CO_2 et composés organiques
Source d'azote	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+
Produits d'oxydation	SO_4^{2-}, Fe^{3+}	SO_4^{2-}	SO_4^{2-}	SO_4^{2-}	SO_4^{2-}, Fe^{3+}

Les réactions intra-cellulaires telles que la biosynthèse de macromolécules, certaines réactions de transport ainsi que les travaux mécaniques ou osmotiques sont de grands consommateurs d'énergie. La bactérie doit donc disposer d'un réservoir d'énergie renouvelable afin de satisfaire à cette demande permanente. Cet accumulateur s'appelle ATP - Adénosine TriPhosphate.

La molécule d'ATP résulte de la phosporylation oxydative d'une molécule d'ADP (Adénosine DiPhosphate) liée à un flux d'électrons entre un donneur (D^-) et un accepteur (A^+). Le transfert d'éléctrons du donneur à l'accepteur ne s'effectue spontanément que si la variation d'énergie libre entre l'état de départ et l'état final est négative. L'énergie ainsi libérée est proportionnelle à la différence de potentiel ΔE entre les deux couples oxydo-réducteur (D^-/D^+) et (A^-/A^+). Tous les substrats ne sont donc pas équivalents. Ainsi, malgré la capacité de *Thiobacillus ferrooxidans* à utiliser tous les composés incomplètement oxydés du fer et du soufre, l'oxydation des composés soufrés

constitue un apport énergétique largement supérieur puisque l'oxydation d'une mole de soufre fournit 20 fois plus d'énergie que l'oxydation d'une mole de fer (ANDREWS *et al*, 1988) :

$Fe^{2+} + H^+ + 1/4O_2 \rightarrow Fe^{3+} + 1/2\ H_2O$ $\quad \Delta G° = -35\ kJ.mol^{-1}$

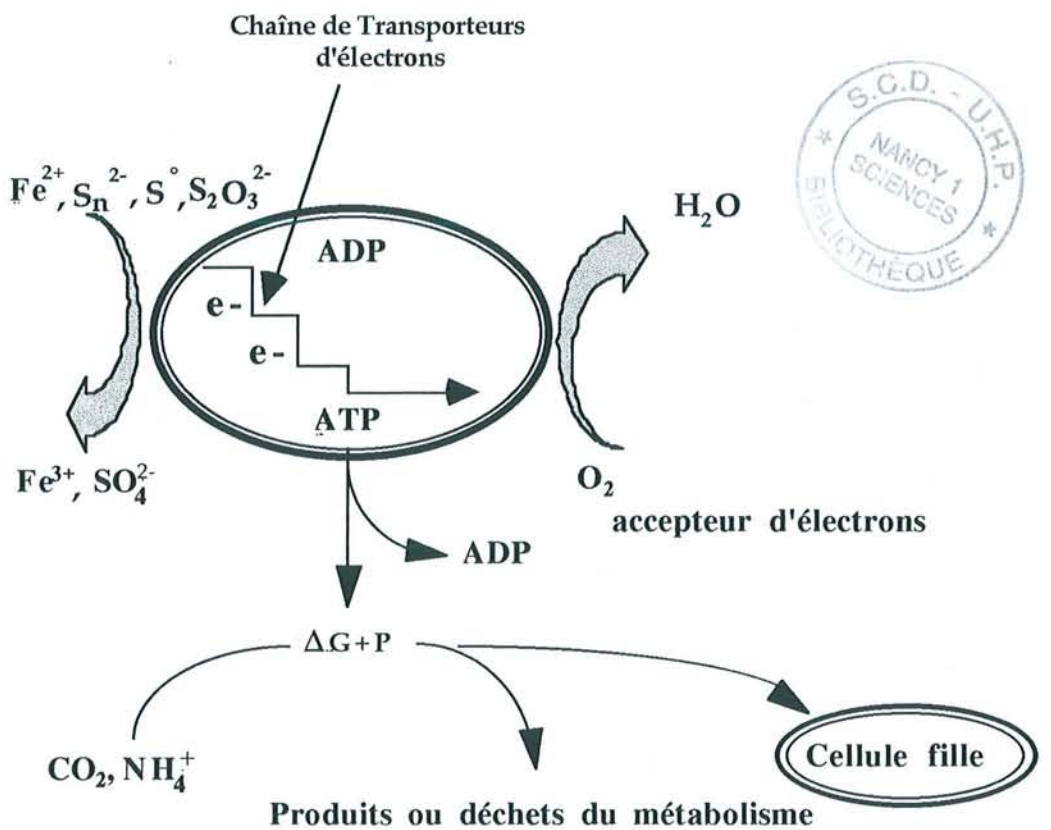
$S° + 3/2O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4$ $\quad \Delta G° = -786\ kJ.mol^{-1}$

Dans le cas de la phosphorylation de l'ADP, la différence de potentiel doit être supérieure à 300 mV. L'énergie libre emmagasinée au cours de la synthèse d'ATP est :

$$\Delta Gox = 59\ kJ.\ mol^{-1}$$

Ainsi, le microorganisme a la possibilité de puiser dans sa réserve d'énergie chaque fois que l'accomplissement d'un travail intra-cellulaire l'exige. L'hydrolyse d'une mole d'ATP ne restitue cependant pas 59 kJ, mais 52 kJ, dont 33 kJ sont directement utilisables.

Le flux d'électrons responsable de la synthèse d'ATP ne circule pas librement dans la cellule. Les électrons cédés par le donneur initial (S°, Fe^{2+}et Sn^{2-} par exemple pour *Thiobacillus ferrooxidans*), sont véhiculés par l'intermédiaire d'une chaîne de transporteurs successifs, qui oscillent entre un état réduit et un état oxydé, jusqu'à un accepteur final : c'est la chaîne respiratoire (Figure S.3).



S.G.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

Figure S.3: Activité respiratoire et chimiolithotrophique chez *Thiobacillus ferrooxidans*.

Chez *Thiobacillus ferrooxidans*, comme chez la plupart des organismes, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène : ce type de respiration est qualifiée d'aérobie (COLMER *et al.*, 1947 et 1949; SILVERMAN *et al.*, 1967). D'autres microorganismes sont capables de se développer en absence totale d'oxygène (respiration anaérobie). Dans ce cas, l'accepteur final peut varier :

- SO_4^{2-} pour les bactéries sulfato-réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans*)
- Fe^{3+} pour les bactéries ferriréductrices (*Bacillus, Clostridium*)
- NO_3^{2-} qui peut être réduit en nitrite NO_2, en azote N_2 ou en ammoniac NH_3 (*Bacillus, Clostridium, Thiobacillus denitrificans*)

Les protéines et les enzymes responsables du transport, au sein de la cellule, des électrons alimentant les unités de phosphorylation ont fait l'objet de nombreuses études de biologie moléculaire et de génétique. Malheureusement, *Thiobacillus ferrooxidans* est une bactérie atypique pour laquelle les méthodes classiques développées pour des bactéries chimioorganotrophes communes (*Escherichia Coli*) sont inapplicables. Par conséquent, les chaînes oxydatives du soufre (KELLY *et al.*, 1985; HUTCHINS *et al.*, 1986) et du fer (INGLEDEW *et al.*, 1982) sont aujourd'hui encore discutées par les spécialistes. Plusieurs points semblent cependant élucidés (SUGIO *et al.*, 1986, 1989, 1990, 1991, 1993; PRONK *et al.*, 1992; NUNZI et BRUSCHI, 1991; NUNZI, 1993). Les résultats indispensables à l'étude physico-chimique de l'interface Thiobacille/pyrite sont résumées ci-dessous :

La chaîne oxydative du soufre fait intervenir de nombreuses protéines et enzymes, responsables de l'apparition d'espèces intermédiaires plus ou moins oxydées : polysulfures, sulfites et polythionates. Le produit final du métabolisme est le sulfate (SO_4^{2-}) accompagné d'une production importante de protons. Cela se traduit par l'accumulation d'acide sulfurique dans le milieu de croissance dont le pH peut atteindre des valeur inférieures à l'unité. Ce gradient naturel de protons entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, où le pH est voisin de 6,5, est également utilisé pour la synthèse d'ATP : le flux de protons entrant est consommé au niveau de la cytochrome oxydase, enzyme responsable du transfert final des électrons sur l'oxygène :

$$1/2O_2 + 2H^+ + 2e^- \text{---> } H_2O \text{ (WOOD } et\ al.\text{, 1988).}$$

L'oxydation des ions ferreux met également en jeu une chaîne de transporteurs d'électrons périplasmiques. L'accepteur initial d'électrons est une métalloprotéine contenant un atome central de cuivre : la rusticyanine. Cette protéine fait office de navette entre la membrane externe et la membrane plasmique. Le détail de la chaîne oxydative, ainsi que les relations fonctionnelles entre les différentes protéines ne sont pas clairement établies. Ainsi, le schéma fonctionnel donné par Cavazza (CAVAZZA, 1996) diffère de celui initialement proposé par Blake (BLAKE, 1992).

S'il est indispensable de tout mettre en oeuvre pour mieux comprendre le fonctionnement cellulaire (génétique et énergétique) de *Thiobacillus ferrooxidans*, il ne faut pas négliger l'approche physico-chimique du phénomène d'oxydation bactérienne et considérer le sulfure comme un élément "actif" et déterminant du système.

Dans cette approche physico-chimique, la bactérie sera le plus souvent considérée comme une "pompe à électrons" transferrant les électrons de la phase minérale à l'oxygène dissous (Figure S.4). L'effort consistera principalement à localiser et à analyser le flux d'entrée des électrons. La nature du donneur initial constitue donc l'un des paramètres fondamentaux de l'étude. La connaissance des substrats privilégiés de *Thiobacillus ferrooxidans* ainsi que la détermination de leurs biodisponibilité passent donc par une étude approfondie du minéral et de son évolution au cours d'un cycle de biolixiviation.

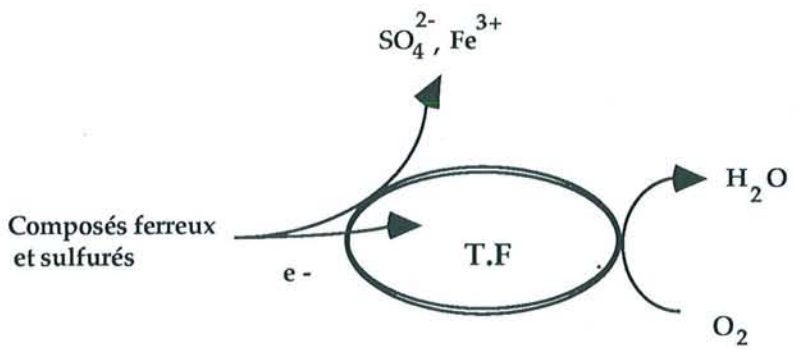


Figure S.4 : Transfert des électrons des composés minéraux vers l'oxygène.

II LA PYRITE

1. Généralités

Le fer et le soufre occupent respectivement les 4e et 5e rangs des éléments les plus abondants de la croûte terrestre. Au cours de l'histoire de la Terre, leurs cycles biogéochimiques se sont intimement mêlés pour donner naissance à différents minéraux de sulfure de fer. La pyrite (FeS_2) souvent localisée dans des filons hydrothermaux anciens (pegmatites) ou au sein de dépôts sédimentaires plus récents, est le plus courant de ces minéraux.

Source de "vitriol" et d'acide sulfurique au moyen-âge, son intérêt diminue au 19^e siècle avec le développement d'autres procédés de fabrication de l'acide sulfurique. Ce n'est qu'au début du 20^e siècle que les industriels prennent conscience de l'effet néfaste des productions d'acide ou de SO_2 des pyrites associées aux charbons ou aux minerais sous forme de gangue. Leur présence limite la récupération de minerais ou l'utilisation de minéraux industriels et oblige les valorisateurs à

déployer, pour leur élimination, des procédés coûteux et néfastes pour l'environnement (émission de dioxyde de soufre lors des opérations de grillage par exemple).

De nos jours, l'altération des pyrites est responsable de la dégradation de la qualité de l'eau des lacs et des rivières à proximité de stocks de résidus sulfurés laissés à l'abandon (anciennes mines de charbons ou scories métallifères). Si la dissolution des pyrites permet la récupération, à moindre coût et souvent par biolixiviation, de métaux précieux (or, argent...) ou à forte valeur ajoutée (cuivre, cobalt, uranium...), leur lixiviation conduit à une forte acidité (pH 1 à 4) et à des concentrations en métaux qui dépassent largement les normes européennes de qualité (>1g/l).

Les intérêts économiques ainsi que les règlementations de plus en plus drastiques sur l'environnement ont conduit les industriels à approfondir leur connaissance des pyrites et des sulfures associés. Cependant, ce système complexe pose encore de nombreux problèmes et nécessite une approche pluridisciplinaire faisant appel aux compétences de microbiologistes, chimistes et autres physiciens du solide.

2. Propriétés physiques (LOWSON 1982)

La pyrite est un sulfure de fer de formule moléculaire FeS_2. L'analyse d'un grand nombre d'échantillons provenant de sources différentes a montré que la pyrite pouvait, en réalité, avoir un déficit en soufre. La formule générale est donc intermédiaire entre FeS_2 et $FeS_{1,94}$.

Les cristaux de pyrite existent principalement sous deux formes géométriques : le cube et le dodécahèdre pentagonal (aussi appelé pyritohèdre). Les faces du cube ou du pyritohèdre présentent souvent des stries parallèles à une seule des arêtes de base, les stries des trois faces contigues étant perpendiculaires les unes aux autres. Ces stries sont dues à l'oscillation du minéral entre les deux formes cristallines lors de sa croissance : on dit que la pyrite est triglyphe.

La couleur du minéral varie selon son origine et sa forme : il peut être jaune laiton avec un vif éclat métallique, gris-vert, marron clair ou violet . Sa dureté varie de 6 à 6,5 sur l'échelle de Mohr et sa densité est comprise entre 4,6 et 5,2 g. cm^{-3}, la densité du minéral pur étant de 5,02 $g.cm^{-3}$.

La pyrite cristallise dans le système cubique et présente une hémiédrie centrée (Figure S.5). La maille élémentaire (de paramètre a_0 = 5,418 Å et de volume $v=159.10^{-24}$ cm^3) est formée de quatre molécules de FeS_2. Les atomes de fer occupent les sommets du cube et le centre des six faces (Cubique Faces Centrées). Les atomes de soufre sont associés en doublets disulfures (S_2^{2-}), la distance entre les deux atomes de soufre étant de 2,1 Å, et se trouvent au milieu des arêtes. La liaison S-S est une liaison covalente alors que la laison soufre-fer, beaucoup plus longue est une liaison ionique. Chaque atome de fer est aussi entouré de six atomes de soufre dans une configuration d'octaèdre déformé. Chaque atome de soufre possède donc trois atomes de fer et un atome de soufre comme plus proches voisins.

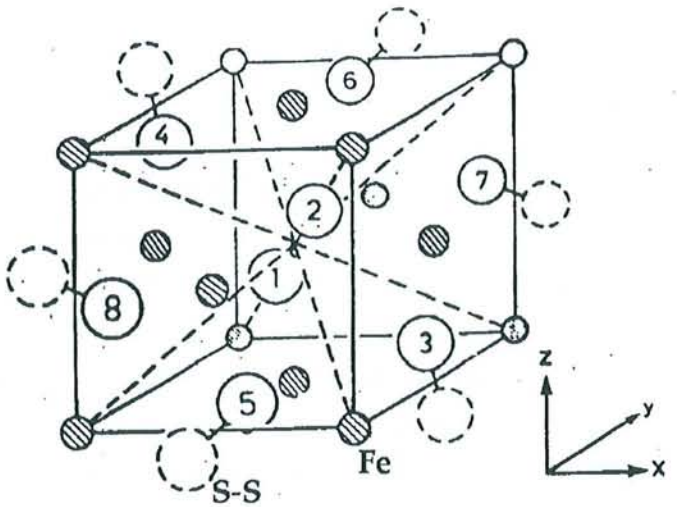


Figure S.5 : Maille élémentaire du réseau cubique de la pyrite

La pyrite ne se présente cependant pas toujours sous une forme critalline harmonieuse. Elle est parfois dispersée de façon hétérogène et sous forme de grains dans des gangues pyriteuses ou des charbons. Il arrive aussi que ces grains de 2 à 5 µm de diamètres s'associent et forment un agglomérat sphérique de petits cristaux hexagonaux qui donnent au minéral une forme de framboise : c'est la pyrite framboïde.

De nombreuses études montrent que la susceptibilité magnétique de la pyrite est très faiblement positive. Il est généralement admis qu'elle ne possède pas de moment magnétique mais une légère composante para-magnétique dépendant de la température.

Les propriétés semi-conductrices de la pyrite sont variables et dépendent de sa teneur en soufre et en impuretés telles que le plomb, le nickel, le cobalt et autres métaux lourds. Un excès de cations métalliques confère au minéral une semi-conductivité de type p, un excès d'anions sulfures une semi-conductivité de type n. Si l'anisotropie optique observée sur un grand nombre de pyrite ne peut être directement reliée aux propriétés semi-conductrice du minéral, certains auteurs mettent ces propriétés en relation directe avec l'origine géologique du gisement pyriteux : les pyrites sédimentaires seraient de type n et les pyrites hydrothermales plutôt de type p.

Des diagrammes potentiel-pH peuvent être effectués à partir des données thermodynamiques des réactifs et des produits de réactions. Cela permet de définir des domaines de stabilité pour les différentes espèces, aux frontières desquels le système est thermodynamiquement instable. Ces diagrammes sont utiles pour prévoir le comportement d'un système, à condition de prendre en compte les paramètres cinétiques des réactions ainsi que leurs énergies d'activation.

Un grand nombre de diagrammes Eh-pH ont été réalisés sur le système fer-soufre-eau à 25°C (Figure S.6). Le fer qui existe aux degrés d'oxydation (+2) ou (+3), le soufre qui peut prendre toutes les formes intermédiaires entre (-2) et (+6) et l'oxygène (0) ou (-2), s'associent pour former un nombre

considérable d'espèces solubles et de composés plus ou moins hydratés. La chimie du soufre à elle seule constitue un vaste domaine d'étude : en plus des espèces stables dans les conditions standard (sulfures, soufre élémentaire et sulfates), de nombreuses espèces métastables (polysulfures, sulfites, polythionates et thiosulfates) servent d'intermédiaires lors de l'oxydation des sulfures (BOULEGUE, 1975; SEVEQUE, 1986). La complexité réactionnelle du système soufre-eau laisse présager celle d'un système sulfure-eau. A température ambiante, par exemple, sept phases cristallines différentes de sulfate ferrique hydraté ont été recensées. Les variétés d'oxydes ferreux ou ferriques sont également très nombreuses (FeO, Fe_3O_4, Fe_2O_3, $Fe(OH)_2$, $Fe(OH)_3$, FeOOH). Par conséquent, l'élaboration d'un tel diagramme est très complexe et il convient en général de sélectionner les composés spécifiques correspondant aux conditions de température et de pression et à la problématique considérée. Dans cette étude, les espèces retenues sont les suivantes :

FeS_2 : pyrite	**FeS : trolite**
Fe_3O_4 : magnétite	**$Fe(OH)_2$, $Fe(OH)_3$, FeOOH : goethite**
$KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$: jarosite	**Fe^{3+}, Fe^{2+}, H_2S, HS^-, S^{2-}, SO_4^{2-}, K^+**

Le sulfate ferrique a tendance à s'hydrolyser et à s'hydrater pour former une gamme complexe de sels sulfatés. La jarosite est la forme fréquemment associée aux produits d'oxydation de la pyrite en milieu naturel. La formation de jarosite peut entraîner une augmentation de 115% du volume molaire du minerais. Ce phénomène a provoqué une élévation de près de 10 cm d'un immeuble canadien construit sur des shistes pyriteux!

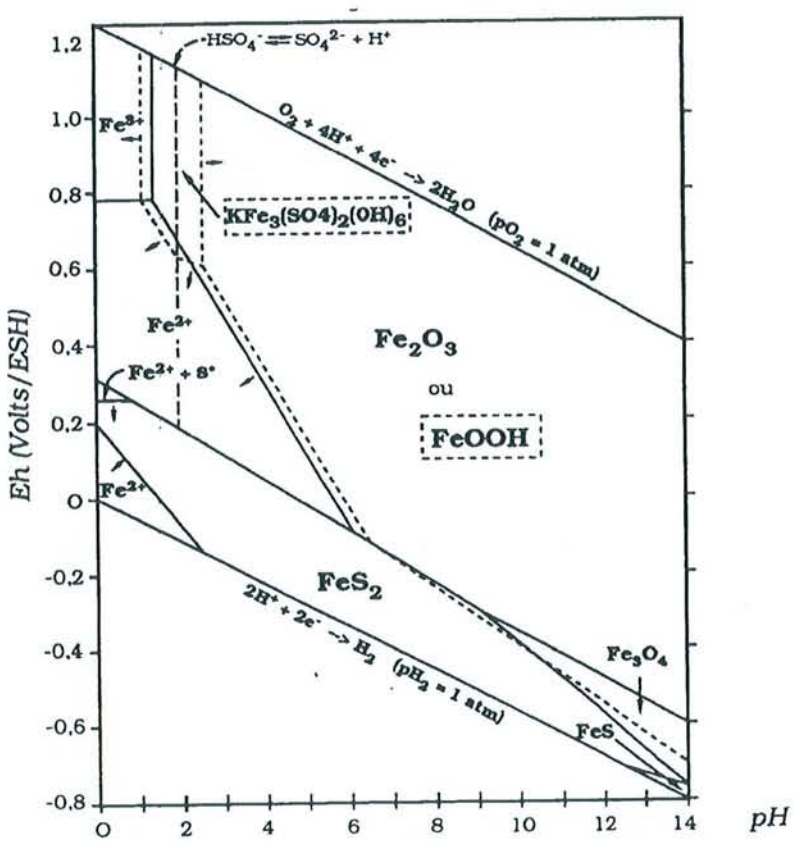


Figure S.6: diagramma Eh-pH du système Fe-S-O-H pour [Fe] = 10^{-6} et [S] = 10^{-3}

3. Oxydation

L'oxydation des pyrites est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses réactions d'oxydo-réduction, de complexation et d'hydrolyse. Trop souvent traitée comme un phénomène global, elle est en fait, selon Mc KIBBEN (Mc KIBBEN et BARNES, 1986), localisée sur les sites à très haute énergie de surface tels que les joints de grains, les clivages, les fractures et autres accidents liés à l'histoire de la croissance du minéral. Outre la nature des défauts cristallins, elle dépend également de la taille des particules, des conditions de température et de pression ou du pH.

Une réaction générale pour l'oxydation des pyrites a été proposée par HISKEY (HISKEY et SCHLITT, 1982) au cours de laquelle le fer passe du degré d'oxydation (+2) à (+3), le soufre de (-1) à (+6) et l'oxygène de (0) à (-2) :

$$2\ FeS_2 + 15/2\ O_2 + 4\ H_2O \text{ ---> } Fe_2O_3 + 4\ H_2SO_4$$

Cette réaction s'effectue vraisemblablement en plusieurs étapes et fait intervenir un certain nombre d'intermédiaires de stabilité variable.

Tous les auteurs ne s'accordent cependant pas sur les mécanismes spécifiques impliqués dans de telles réactions et de nombreux modèles sont proposés. La nature de l'oxydant est en particulier controversée. Si certains assurent que l'oxygène moléculaire dissout est le principal agent d'oxydation, d'autres mettent plus précisément en évidence le rôle de l'ion ferrique, ou de la molécule d'eau.

a. Oxydation aqueuse par l'oxygène dissout :

L'un des modèles les plus anciens est celui de Mc Kay (Mc KAY et HALPERN, 1959), qui suppose l'adsorption préalable des molécules d'oxygène à la surface de la pyrite. La séquence de réactions proposée est la suivante :

$$FeS_2 + 2\ O_2 \text{ --> } FeS_2, 2(O_2)ads \text{ ---> } Fe^{2+}_{aq} + SO_4^{2-}{}_{aq} + S^\circ$$

Cependant, ce modèle ne rend pas compte de l'apparition des ions Fe^{3+} effectivement observés en solution.

SINGER et STUMM (1968) proposent donc un modèle très proche du précédent mais en trois étapes de manière à faire intervenir les ions ferriques:

(i) oxydation de la pyrite par l'oxygène dissout. Au cours de cette étape, seul le soufre est oxydé en sulfate; le fer est solubilisé sous forme d'ions ferreux :

$$FeS_2 + 7/2\ O_2 + H_2O \text{ ---> } Fe^{2+} + SO_4^{2-} + H_2SO_4$$

Cette réaction est considérée comme étant la première étape de l'oxydation des pyrites dans

les eaux acides des sites miniers.

(ii) oxydation des ions ferreux en ions ferriques par l'oxygène dissout :

$$Fe^{2+} + 1/4\ O_2 + H^+ \text{---> } Fe^{3+} + 1/2\ H_2O$$

C'est la réaction limitante pour la cinétique globale de l'oxydation. Elle est particulièrement lente en milieu sulfurique pour des pH inférieurs à 2 en raison de la faible pression partielle en oxygène dissout.

(iii) enfin, oxydation de la pyrite par les ions ferriques précedemment formés.

L'oxydation du soufre contenu dans la pyrite exclusivement en sulfates n'est pas clairement établie et certains travaux mentionnent la formation possible de produits d'oxydation de degré intermédiaire : thiosulfates, sulfites. Ainsi, le mécanisme envisagé par Mc KIBBEN (Mc KIBBEN et BARNES, 1986) s'amorce classiquement par l'adsorption d'oxygène moléculaire à la surface du minéral, mais fait intervenir différents intermédiaires tels que le peroxyde d'hydrogène ou les ions thiosulfates :

(i) réduction de l'oxygène dissout adsorbé par les molécules d'eau :

$$H_2O + 1/2\ O_2 \text{---> } H_2O_2$$

(ii) le peroxyde d'hydrogène se comporte alors comme un conduit à électrons et transfert deux de ses électrons à la pyrite pour former de l'eau et une espèce intermédiaire métastable :

$$FeS_2 + H_2O_2 \text{---> } Fe\text{-}S\text{-}S\text{-}O{:}\ + H_2O$$

(iii) cet intermédiaire réagit à son tour avec le peroxyde d'hydrogène pour former des thiosulfates :

$$Fe\text{-}S\text{-}S\text{-}O{:}\ + H_2O_2\ + 5/2\ O_2 \text{---> } Fe^{3+} + S_2O_3^{2-} + OH^- + 2\ H_2O$$

Les ions thiosulfates ne sont pas stables et s'oxydent rapidement en sulfates.

Certains auteurs considèrent en revanche que l'oxydation directe de la pyrite par l'oxygène moléculaire est improbable en raison des propriétés magnétiques des deux composés (MOSES *et al.*, 1987). En effet, la molécule d'oxygène est paramagnétique alors que la pyrite est diamagnétique. C'est donc l'ion ferrique qui est alors l'agent principal d'oxydation.

b. Oxydation aqueuse par les ions ferriques :

La stoechiométrie suivante a été postulée par GARRELS et THOMPSON (1960) pour l'oxydation de la pyrite par les ions ferriques :

$$FeS_2 + 8\ H_2O + 14\ Fe^{3+} \text{---> } 15\ Fe^{2+} + 2\ SO_4^{2-} + 16\ H^+$$

Cette équation est généralement considérée comme correcte mais elle est globale et ne renseigne pas sur les mécanismes de dissolution.

Les expériences menées par Moses (MOSES *et al.*, 1987) en milieu acide saturé en fer (III), suggèrent que l'ion ferrique est le véritable oxydant direct de la pyrite en anaérobiose ou en aérobiose. Le mécanisme proposé, sans réfuter le modèle de SINGER et STUMM, en est une version étoffée. En effet, la première étape de l'oxydation est le transfert d'un radical hydroxyle provenant de la sphère d'hydratation du Fe^{3+}, vers un atome de soufre de la surface. Une série de déshydratations et de réactions de transferts d'hydroxyles affaiblit peu à peu la liaison Fe-S jusqu'à libérer un anion sulfoxyde, plus stable en solution qu'à la surface de la pyrite. Ce modèle considère donc que la liaison Fe-S faiblit et se rompt plus facilement que la liaison S-S.

Pour affiner le modèle précédent et préciser le rôle relatif de l'oxygène dissous et du Fe^{3+} dans l'oxydation de la pyrite, MOSES et HERMAN (1991) étudient le système à des pH proches de la neutralité, où la solubilité des ions ferriques est minimale. Ils montrent que même à ces très faibles concentrations, l'ion ferrique est l'agent oxydant principal, mais que les réactions d'oxydation ne peuvent s'effectuer en absence d'oxygène dissout. Le mécanisme proposé est le suivant (Figure S.7) :

La première étape est l'adsorption d'un ion Fe^{2+} à la surface de la pyrite (des études complémentaires ont montré que l'affinité des ions Fe^{2+} pour la surface est très supérieure à celle des ions Fe^{3+}). Cet ion ferreux transfert un électron à l'oxygène dissout et est oxydé en Fe^{3+} qui accepte alors rapidement un électron de la pyrite. Le fer adsorbé est donc alternativement oxydé et réduit et se comporte comme un conduit transférant les électrons de la pyrite à l'oxygène dissout. Les atomes d'oxygène sont également transférés de la sphère d'hydratation du fer adsorbé vers les atomes de soufre de la pyrite. Le cycle d'oxydation/réduction du fer adsorbé et d'addition de l'oxygène sur la pyrite se poursuit jusqu'à ce qu'un anion sulfoxyde stable se libère de la surface. Selon les conditions expérimentales, ces anions sont des sulfates ou des espèces oxydées intermédiaires (thiosulfates ou polythionates).

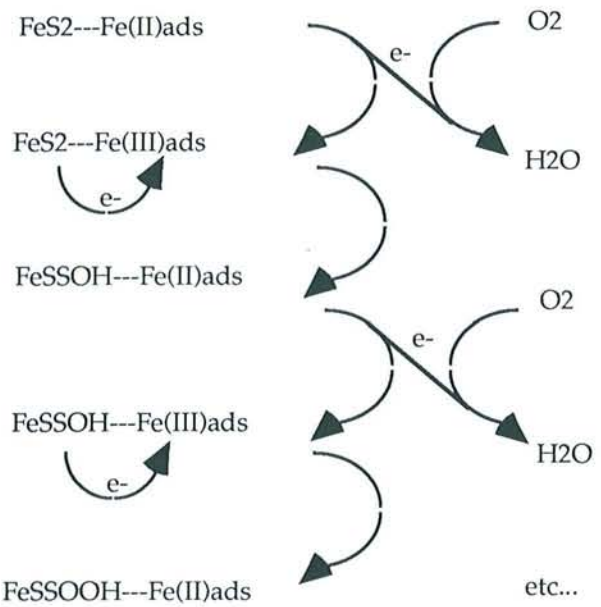


Figure S.7: Séquence schématique des réactions intervenant lors de l'oxydation de la pyrite par les ions ferriques .

LOWSON en revanche, (1982) propose un modèle où l'oxydation de la pyrite est la somme de réactions d'oxydo-réduction se produisant sur des sites anodiques et cathodiques à la surface du minéral. Le processus anodique est une suite complexe d'étapes d'oxydation au cours desquelles la pyrite réagit principalement avec l'eau pour produire des ions ferriques, des sulfates et des protons :

$$FeS_2 + 8\,H_2O \dashrightarrow Fe^{3+} + 2\,SO_4^{2-} + 16\,H^+ + 15\,e^-$$

BAILEY et PETERS (1976) assurent qu'une réaction anodique supplémentaire se produit aux faibles pH et favorise l'apparition de soufre élémentaire :

$$FeS_2 \dashrightarrow Fe^{2+} + 2\,S^\circ + 2\,e^-$$

Les électrons libérés sont alors transférés vers un site cathodique à la surface du minéral où s'opère la réduction de l'oxygène dissout :

$$1/2\,O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \dashrightarrow H_2O$$

c. Dissolution non-stoechiométrique de la pyrite et développement de phases superficielles oxydées

La plupart des modèles d'oxydation détaillés dans les deux paragraphes précédents montrent que la dissolution oxydative des pyrites est un processus non-stoechiométrique impliquant que l'une seulement des espèces (soufre ou fer) se désolidarise de la surface et passe en solution sous une forme oxydée. Cela se traduit, à la surface du minéral, par l'apparition de produits

intermédiaires enrichis en soufre ou en fer. Cependant, les avis sont partagés quant à la nature de ces couches superficielles. Deux types de mécanismes sont proposés pour expliquer la dissolution des pyrites :

- la solubilisation préférentielle des espèces oxydées du fer, laissant à la surface une couche enrichie en soufre plus ou moins bien structurée (CHANDERET et BRICENO, 1987).
- la solubilisation préférentielle d'espèces oxydées du soufre. La surface est alors recouverte d'une couche d'oxydes et d'hydroxydes de fer (Mc KIBBEN et BARNES, 1986; MOSES *et al.*, 1987; MOSES et HERMAN, 1991).

Dès 1980, et à partir de l'examen direct en XPS de la surface de la pyrite, des précision ont pu être apportées sur la nature des produits formés au cours de son oxydation dans l'air et dans l'eau (BRION, 1980). Sous l'effet d'un broyage à sec et d'un séjour de quelques minutes à l'air, les premières couches superficielles du minéral semblent très peu dégradées. Au cours du vieillissement, les altérations de la pyrite entraînent la formation d'hydroxydes ou d'oxyhydroxydes de fer dans un premier temps, puis la formation de sulfates basiques. Par contre, les analyses effectuées ne détectent ni sulfate ferrique, ni soufre élémentaire. Il semble en outre qu'un séjour prolongé dans de l'eau distillée ne provoque aucune dégradation superficielle du minéral.

Des études complémentaires effectuées en milieu aqueux montrent en revanche que la formation des produits d'oxydation dépend du pH du milieu (BRION *et al.*, 1980). En milieu basique, la pyrite est couverte d'une couche d'oxyhydroxyde de fer (goethite FeOOH), sans doute accompagnée d'hydroxydes ($Fe(OH)_2$ et $Fe(OH)_3$) et de soufre élémentaire (S°). En milieu acide, la pyrite semble effectivement exempte de toute trace d'oxydation superficielle.

D'autres auteurs ont également étudié la réactivité du minéral en fonction du pH. La réponse électrochimique d'une pyrite en milieu acide ou basique a été étudiée par HAMILTON et WOODS (1981). Les réactions d'oxydo-réduction sont les suivantes :

<u>pH = 4,6 :</u>

Oxydation : $FeS_2 \text{ ---> } Fe^{2+} + 2\ S° + 2\ e^-$

$FeS_2 + 8\ H_2O \text{ ---> } Fe^{2+} + 2\ SO_4^{2-} + 16\ H^+ + 14\ e^-$

$Fe^{2+} + 3\ H_2O \text{ ---> } Fe(OH)_3 + 3\ H^+ + e^-$ (E = 0,4 V / ENH)

Réduction : $S° + 2\ H^+ + 2\ e^- \text{ ---> } H_2S$ (E = -0,25 V / ENH)

$Fe(OH)_3 + 3\ H^+ + e^- \text{ ---> } Fe^{2+} + 3\ H_2O$ (E = +0,25 V / ENH)

<u>pH = 9,2 :</u>

Oxydation : $FeS_2 + 3\ H_2O \text{ ---> } Fe(OH)_3 + 2\ S° + 3\ H^+ + 3\ e^-$

$FeS_2 + 11\ H_2O \text{ ---> } Fe(OH)_3 + 2\ SO_4^{2-} + 19\ H^+ + 15\ e^-$

Réduction : $Fe(OH)_3 + S° + 3\ e^- \text{ ---> } FeS + 3\ OH^-$

$Fe(OH)_3 + H^+ + e- \text{ ---> } Fe(OH)_2 + H_2O$

Par la suite, ADRIAMANANA et LAMACHE (1982) ont précisé la nature des différentes réactions électrochimiques de la pyrite en milieu acide sulfurique 1M. La comparaison des

voltamogrammes effectués sur électrode à pâte de carbone aux courbes intensité-potentiel de différents composés soufrés (H_2S, $H_2S_2O_3$, H_2SO_3) indique que l'oxydation du minéral s'effectue en fait à 1V/ECS selon les deux réactions :

$$FeS_2 \text{ ---> } Fe^{3+} + 2\ S^\circ + 3\ e^-$$

$$FeS_2 + 8\ H_2O \text{ ---> } Fe^{3+} + 2\ SO_4^{2-} + 12\ H^+ + 15\ e^- \qquad \text{(réaction prépondérante)}$$

La réduction du soufre élémentaire électrochimiquement actif en H_2S s'opère à -0,27 V/ECS et la réduction de la pyrite en Fe^{2+} et H_2S à -0,5 V/ECS.

D'autres études ont également précisé les réactions électrochimiques du minéral en milieu basique entre 0,4 et 0,8 V/ECS (ZHU *et al.*, 1993). Les produits d'oxydation identifiés sont des oxydes de fer(III), des sulfates et des intermédiaires réactionnels soufrés partiellement oxydés. L'utilisation de la spectroscopie Raman a pu mettre en évidence, notamment du soufre élémentaire et des polysulfures. Si un potentiel supérieur à 0,8 V est appliqué à la pyrite, ces intermédiaires sont rapidement oxydés en sulfates. Il semble également que la quantité et la nature de ces composés influencent très fortement l'oxydation ultérieure du minéral à des potentiels inférieurs à 0,4 V, et en particulier l'importance des pics d'oxydation des espèces $Fe(OH)_2$ et FeS.

L'existence de cette couche superficielle enrichie en soufre a été observée par de nombreux auteurs mais son identification reste incertaine. Dès 1987, BUCKLEY et WOODS utilisent la spectroscopie XPS et semblent identifier du soufre élémentaire. Cependant, la détection de ce composé à l'aide de l'XPS est délicate car il a tendance à se volatiliser dans la chambre de mesure. D'autres auteurs, ayant recours à la même technique, affirment que ce composé est constitué de polysulfures (HYLAND and BANCROFT, 1989, MYCROFT et al;, 1990, NESBITT and MUIR, 1994). Une étude plus récente, couplant la spectroscopie Raman, la voltamétrie cyclique et des mesures potentiostatiques, indique que la phase enrichie en soufre est constituée initialement de polysulfures (FeS_x, x variable), intermédiaires réactionnels qui s'oxydent finalement en soufre élémentaire S) actif et réductible. SASAKI *et al.*, (1995) confirment l'existence de soufre élémentaire comme produit final d'oxydation de la pyrite en milieu acide.

La nature des composés de surface est primordiale puisqu'ils sont en partie responsables des propriétés du minéral. Un film d'oxydes, d'hydroxydes de fer ou de polysulfures confère à la pyrite un caractère hydrophile alors qu'une couche de soufre élémentaire rend la surface hydrophobe.
Leur présence à la surface du minéral et leur distribution semble primordiale pour la réactivité de l'interface. KONGOLO (1991) souligne notamment l'influence des conditions de broyage sur la flottabilité des minéraux sulfurés en raison de la variabilité des phases superficielles développées. Par ailleurs MUSTIN *et al.*, (1993a ; 1993b ; 1993c), de DONATO et al., (1991), et DZIURLA (Thèse, 1995) mettent également en évidence l'importance et l'évolution de ces phases oxydées de surface au cours de l'oxydation bactérienne de la pyrite.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

III. L'INTERFACE BACTERIE/MINERAL : LE PROCESSUS DE BIOLIXIVIATION

1. Généralités

Thiobacillus ferrooxidans occupe une place essentielle dans les processus de biolixiviation et ses propriétés oxydantes ont été mises à profit pour l'extraction des métaux à partir des minerais à faible teneur, ou de minerais très riches dans de petits gisements. Les lixiviations du cuivre, de l'uranium et la biorevalorisation des minerais d'or réfractaires, ont atteint une échelle industrielle dans différents pays : Afrique du Sud, Australie, Canada, Etats-Unis, Chili, Japon, Mexique, Bulgarie et Yougoslavie. Les prix de revient des lixiviations bactériennes sont inférieurs ou comparables à ceux des techniques traditionnelles d'extraction, mais les vitesses d'oxydations peuvent être multipliées par un facteur allant de 20 à 1000 (BERTHELIN, 1987). En effet ces processus complexes font intervenir, de façon simultanée, l'oxydation bactérienne et l'oxydation chimique du minéral. L'étude de l'interface nécessite donc une approche pluridisciplinaire faisant appel à la microbiologie, la biologie moléculaire, la chimie de solution et la physico-chimie du solide.

Cependant, l'approche physico-chimique du processus de biooxydation est souvent négligée et peu de mécanismes ont été proposés pour modéliser l'attaque bactérienne et l'évolution du système bactérie/minéral au cours d'un cycle de biolixiviation. La majorité des auteurs considère d'ailleurs la pyrite comme un minéral uniforme et donnent des équations globales qui ne prennent en compte ni les phases superficielles ni l'hétérogénéité de l'interface.

Il est généralement admis que *Thiobacillus ferrooxidans* a la capacité d'oxyder les ions ferreux présents en solution :

$$4Fe^{2+} + O_2 + 4H^+ \xrightarrow{bact} 4\,Fe^{3+} + 2\,H_2O$$

Le fer ferrique produit participe alors à l'oxydation chimique du minéral. La bactérie, en régénérant le fer ferreux sous sa forme ferrique, permet la création d'un cycle oxydatif qui amplifie progressivement la dissolution de la pyrite.

Cependant, des concentrations importantes en sulfates et en fer(III) dans le milieu de croissance acide des thiobacilles, entrainent la précipitation de jarosites ($XFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ avec $X = Na^+, K^+, NH_4^+, H^+$)(GRISHIN *et al*, 1988). Ces phases précipitées complexes peuvent former une barrière diffusionnelle à la surface des grains et emprisonner les éléménts nutritifs indispensables à la croissance bactérienne.

Certains auteurs affirment que la bactérie est également capable d'oxyder directement le fer de la pyrite (PANIN *et al.*, 1985) :

$$2FeS_2 + 7{,}5O_2 + H_2O \xrightarrow{bact} 2Fe^{3+} + 4SO_4^{2-} + 2H^+$$

$$FeS_2 + Fe_2(SO_4)_3 \xrightarrow{bact} 3FeSO_4 + 2S^\circ$$

Le soufre élémentaire qui résulte de cette oxydation peut être oxydé à son tour par la bactérie :

$$2S^\circ + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{bact} 2H_2SO_4$$

2. Adhésion et mécanismes d'oxydation (in)directs

Les mécanismes de biolixiviation sont aujourd'hui encore mal connus. Depuis la découverte de la lixiviation bactérienne en 1950, les doutes subsistent quant aux processus de dissolution des sulfures par les microorganismes et les deux théories défendues alors s'affrontent toujours :

- la première est en faveur d'un mécanisme d'oxydation indirect par des agents chimiques ou minéraux (oxygène moléculaire dissout ou ions ferriques). Dans ce cas, le rôle de la bactérie se limite à régénérer l'oxydant et à entretenir le cycle oxydatif : le contact direct entre la bactérie et le minéral n'est pas nécessaire ;
- la seconde met en évidence une attaque directe du minéral impliquant un contact entre le micro-organisme et la surface (BOON *et al.*, 1993).

Une grande majorité de micro-organismes ont en effet la capacité d'adhérer à des surfaces de différentes natures. Leur structure moléculaire complexe, notamment au niveau pariétal, leur permet de synthétiser des protéines qui peuvent modifier la réactivité membranaire de la cellule, sa charge de surface et son affinité pour ces différents supports. Deux approches physico-chimiques permettent d'expliciter le phénomène d'adhésion. L'une est thermodynamique et décrit l'adhésion en termes d'affinité et d'énergies interfaciales. L'autre assimile les bactéries à des particules colloïdales dont le comportement est gouverné par les lois physiques de la double couche électronique ou de la couche diffuse.

Cependant, l'adhésion est plus qu'un simple phénomène d'adhérence lié à des interactions électrostatiques fortuites. C'est un processus actif qui met en jeu des protéines spécifiques capables de reconnaître des motifs déterminés exprimés par le support. Elle peut être décrite comme une succession de trois phases :

- l'adhésion, phase "passive", au cours de laquelle les phénomènes physico-chimiques sont prédominants.
- l'adhésion, "phase active", qui consolide la liaison par production biologique de molécules organiques.

• la colonisation, "phase dynamique", au cours de laquelle les cellules croissent et se divisent.

Des observations en microscopie électronique à balayage ont montré que *Thiobacillus ferrooxidans* pouvait se fixer à la surface de certains sulfures (BERRY *et al.*, 1978; DZIURLA, 1995).

Le développement des pièges à force optiques a permis à Blake de manipuler du matériel biologique de façon individuelle à l'aide d'un simple faisceau de lumière laser cohérente (BLAKE *et al.*, 1995). Il a pu observer une adhésion immédiate de *Thiobacillus* à la surface de la pyrite avec une force supérieure à 2.10^{-7} dynes (force exercée par le piège optique), et constater que le point de contact permanent est toujours l'une des extrémités arrondies de la bactérie.

La méthode d'évaluation du nombre de bactéries fixées mise au point par DZIURLA permet en fait de déterminer deux classes de micro-organismes. Des bactéries faiblement fixées au minéral qui sont désorbées par un simple lavage, et des bactéries fortement fixées dont le nombre, estimé à $3,5.10^5$ cellules par mg, est constant au cours d'un cycle de biolixiviation (Dziurla *et al.*, 1992). Une méthode immunologique directe (ELIFA) a permis d'évaluer l'adhésion moyenne à 5.10^5 bactéries par mg de pyrite, soit un taux de recouvrement statistique de la surface voisin de 10% (DZIURLA, 1995).

KARAVAIKO, en étudiant la mobilité électrophorétique des Thiobacilles au cours de leur croissance sur différents substrats (Fer(II), soufre élémentaire ou pyrite) montre que de nombreux facteurs influencent l'interaction initiale entre la bactérie et le support (KARAVAIKO *et al.*, 1995). Le plus important est la charge de surface des cellules. Elle varie en fonction de la phase de croissance, de l'état physiologique, du type de substrat et des propriétés du milieu (conductivité, force ionique et pH) (DZIURLA, 1995). Mais ces travaux, comme ceux de BLAKE, considèrent le sulfure comme un support homogène. Dans leurs modèles, la bactérie est seule responsable de son adhésion, puisqu'elle régule sa charge nette de surface pour minimiser les forces répulsives de sa double couche avec la surface chargée du support.

MELINE (1996) complète cette approche en montrant l'influence des caractéristiques physico-chimiques de la phase minérale sur l'adhésion. La réalisation d'isothermes d'adsorption dynamiques lui ont permis d'obtenir avec précision les quantités maximales de bactéries fixées ainsi que leur affinité pour différents supports (la quantité de bactéries fixées n'étant pas révélatrice de l'affinité d'un micro-organisme pour un support, mais du nombre de sites d'adhésion disponibles). Deux pyrites pures d'origine différente ont été employées ainsi que des supports minéraux hydrophiles (le quartz) ou hydrophobes (le Porapak). La conclusion de ces travaux est que les mécanismes d'adhésion ne se résument pas à un simple jeu d'interactions hydrophiles ou hydrophobes, puisque l'affinité des bactéries ainsi que les quantités fixées aux deux pyrites sont très largement supérieures à celles du quartz ou du Porapak. Ils laissent aussi présager de l'importance des états de surface du support puisque *Thiobacillus ferrooxidans* se comporte très différemment avec

ces deux sulfures de pureté et de caractéristiques chimiques globales, par ailleurs très voisines. En effet, comme le souligne aussi BARTELS (BARTELS *et al.*, 1995), les sites d'attaque privilégiés sont les régions imparfaites du point de vue cristallographique (fractures, défauts, marches) en raison de la présence de nombreuses liaisons brisées ou affaiblies qui diminue l'énergie libre pour le processus de corrosion. Mais il semble également que la nature et l'organisation tridimensionnelle des phases superficielles oxydées conditionnent très fortement l'adsorption des bactéries à la surface des pyrites et la corrosion du minéral.

Malgré la mise en évidence de l'adhésion de *Thiobacillus ferrooxidans* à la surface des sulfures et la conviction de certains auteurs que celle-ci est une étape préliminaire à toute oxydation bactérienne (BRIERLEY *et al.*, 1982), des interrogations subsistent quant à la contribution effective du mécanisme direct d'oxydation dans la lixiviation. Parfois, son existence même est controversée. Les premiers doutes sont apparus en 1978 avec les travaux de MACKINTOSH, qui montrent que des Thiobacilles ne sont capables de dégrader aucun substrat si le milieu est exempt de fer directement accessible.

De récentes études semblent, en effet, confirmer le caractère indirect de l'oxydation. BOON étudie la vitesse spécifique d'utilisation de l'oxygène par les bactéries et la balance Fe^{2+}/Fe^{3+} en solution pour décrire la cinétique d'oxydation de la pyrite par une culture mixte de Thiobacilles (BOON *et al.*, 1995). Il constate que la vitesse de disparition de l'oxygène est indépendante de la présence de sulfure. Il en conclut que la dégradation de la pyrite s'opère par un mécanisme indirect puisque la présence de pyrite n'entraîne pas l'augmentation d'activité métabolique des micro-organismes. La pyrite est donc oxydée chimiquement par les ions ferriques présents en solution, le rôle des Thiobacilles se limitant à régénérer le stock d'ions ferriques et de maintenir un potentiel d'oxydo-réduction élevé en solution.

NYAVOR parvient aux mêmes conclusions après une étude de l'oxydation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* à des pH voisins de 4 où les bactéries sont viables et les concentrations en Fe^{3+} soluble sont négligeables de façon à s'affranchir de l'oxydation chimique (NYAVOR *et al.*, 1996). Il montre que dans ces conditions, il n'y a pas d'oxydation de la pyrite et conclue que les micro-organismes fixés au sulfure sont incapables de réaliser une oxydation directe de FeS_2. Les piqûres observées à la surface seraient uniquement dues à la forte concentration d'ions ferriques dans les zones d'adsorption des Thiobacilles, en raison de l'oxydation rapide par les bactéries du Fe^{2+} résultant de l'oxydation chimique du minéral par les ions Fe^{3+}.

Malgré toutes ces études, l'existence des deux mécanismes semble admise et différents travaux ont été réalisés à l'aide de dispositifs spécifiques (lits fluidisés (BAILEY *et al.*, 1993), réacteurs à double membrane (SHRIHARI *et al.*, 1992) ou à double compartiment (DZIURLA, 1995) afin d'évaluer le rôle respectif des bactéries fixées et des bactéries en solution.

Bailey utilise un réacteur à lit fluidisé lui permettant de filtrer ponctuellement les bactéries en solution. Il observe alors que ces bactéries sont très rapidement remplacées par des micro-organismes initialement fixés au minéral qui s'en détachent pour maintenir un certain équilibre entre les bactéries adhérentes et les bactéries libres. D'autre part, le taux de biooxydation ne semble pas affecté par cette soudaine diminution de la population bactérienne en solution. Cette constatation pourrait indiquer que la contribution des bactéries libres au processus de dissolution oxydative des sulfures est limitée ou inexistante.

Ces résultats semblent conforter ceux de SHRIHARI obtenus grâce à la mise au point d'un réacteur compartimenté. Une membrane microporeuse (imperméable aux bactéries) sépare un compartiment contenant un minéral sulfuré d'un compartiment contenant un milieu nutritif sans source d'énergie. Les deux compartiments sont ensemencés par *Thiobacillus ferrooxidans* et l'expérience montre que la population bactérienne en solution augmente grâce à la solubilisation d'éléments nutritifs par les bactéries fixées au minéral dans l'autre compartiment. Le rôle primordial du mécanisme direct d'oxydation par les bactéries fixées est une nouvelle fois souligné.

Afin de moduler ces affirmations et de montrer que le mécanisme d'oxydation indirect n'est pas négligeable, DZIURLA renouvelle l'expérience de SHRIHARI sans ensemencer le compartiment contenant la pyrite. Aucune population bactérienne n'est donc en contact avec le minéral. Au terme de cette étude, il apparaît que la biooxydation peut effectivement avoir lieu par voie indirecte uniquement. Le contact n'est pas obligatoire mais son rôle est cependant indéniable : il accélère de façon sensible l'initiation du processus. En effet, la phase de latence est ainsi six fois plus longue en absence de contact et les vitesses initiales et optimales d'oxydation trois fois plus faibles.

L'existence simultanée des deux mécanismes d'oxydation (direct et indirect) et la synergie des processus chimiques et biologiques semblent donc évidentes. SAND propose un modèle (Figure S.8) qui tient compte de toutes ces observations (SAND *et al.*, 1995).

La couche externe d'exopolymère du micro-organisme ayant fixé des cations ferriques, la charge nette de surface de la cellule devient positive et permet ainsi une attraction électrostatique puis une adhésion au sulfure chargé négativement. C'est au sein de cette couche d'exopolymères qu'a lieu l'attaque chimique de la pyrite par les ion Fe^{3+} fixés. Ceux-ci, alors réduits en Fe^{2+}, deviennent un substrat directement disponible pour la croissance cellulaire. Le cycle oxydatif est amorcé et la corrosion du minéral se poursuit donc sur des zones très localisées. SAND met en évidence des thiosulfates ($S_2O_3^{2-}$) comme produit intermédiaire d'oxydation. Ces composés sont directement utilisés comme substrat et oxydés en sulfates par la bactérie, ou incorporés dans les granules plasmiques de polythionates.

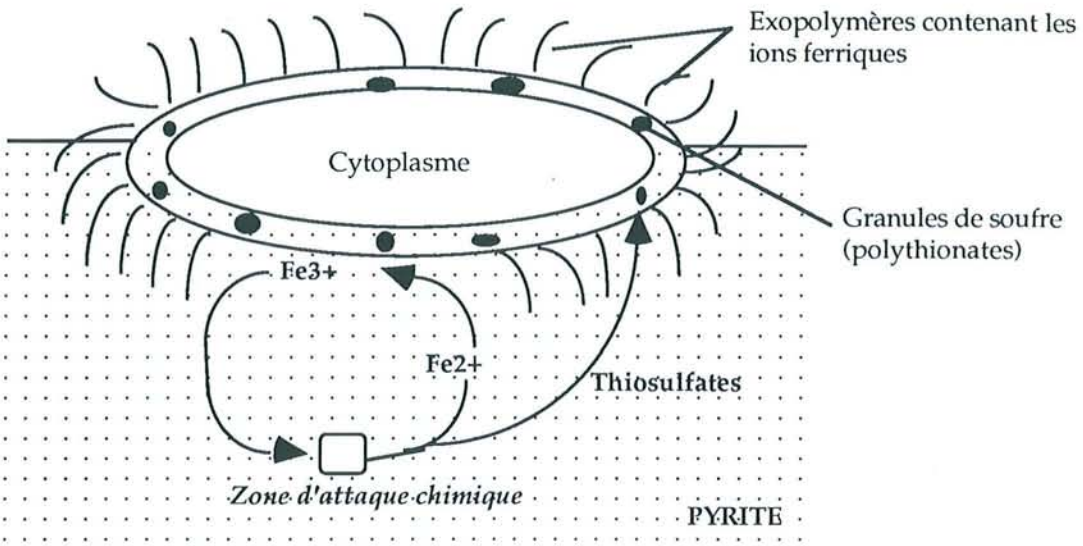


Figure S.8 : Modèle du mécanisme indirect de biolixiviation de la pyrite catalysée par une cellule de *Thiobacillus ferrooxidans* fixée au minéral.

Ce modèle pourrait notamment expliquer la formation des figures de corrosion observées par MUSTIN sur deux pyrites d'origine différente où les pores se développent par dissolution apicale orientée du sulfure (MUSTIN *et al.*, 1992). Cependant, la répartition spécifique des piqûres sur la surface n'est toujours pas élucidée et les mécanismes de reconnaissance des sites d'encrage des bactéries sont encore inconnus. Les travaux de MELINE (1996) montrent notammant que le processus d'adsorption n'est pas le résultat du hasard. Les bactéries "perçoivent" l'hétérogénéité de la surface minérale soit passivement par le jeu des interactions phisico-chimiques s'établissant entre la paroi du Thiobacille et la surface minérale, soit activement par chimio-tactisme pour leurs substrats énergétiques.

L 'hypothèse défendue par MUSTIN (Thèse, 1992) est que les sites d'adsorption des bactéries ainsi que la répartition des figures de corrosion dépendent non seulement des propriétés cristallochimiques du minéral mais aussi de la nature et de la distribution spatiale des phases superficielles oxydées. Ces composés de surface pourraient être la clé du processus de biolixiviation.

3. La biolixiviation et les phases superficielles de la pyrite

De nombreux travaux soulignent le rôle primordial de l'interface minéral-solution dans les processus d'altération chimique ou biologique des minéraux, des roches ou du sol (TORMA *et al*, 1988, 1989 ; BERTHELIN *et al*, 1988 ; JEANROY *et al*, 1991). Cependant, cet aspect de l'oxydation bactérienne est trop souvent négligé par les microbiologistes qui considèrent la bactérie comme "souveraine". MUSTIN (1992) et MONROY (1993) ont montré que les figures de corrosion et les phases superficielles oxydées, qui sont le reflet des propriétés cristallochimiques et électrochimiques du minéral, sont des paramètres très sensibles de l'oxydation bactérienne d'une pyrite. L'utilisation conjointe de techniques microbiologiques, électrochimiques et physico-chimiques a permis à MUSTIN (1992) de caractériser localement les états de surface des pyrites, d'évaluer leurs incidences sur l'oxydabilité biologique du minéral (de DONATO *et al*, 1991 ; MUSTIN*et al*, 1993b) et de proposer un modèle réactionnel discret de l'oxydation de la pyrite par Thiobacillus ferrooxidans .

L'abondance relative des phases superficielles du fer et du soufre présentes à la surface des pyrites Es et K est résumée ci-dessous (Tableau S.3) :

Tableau S.3.: Rappel des différentes phases superficielles oxydées identifiées à la surface des pyrites K et Es (MUSTIN, 1992).

	Composés identifiés	Pyrite K	Pyrite Es
Spectroscopie IR	$FeCO_3$	(+)	(-)
associée à la RD	----------	----------	----------
+Spectroscopie	$FeSO_4$	(ε)	(-)
XPS	$Fe_2(SO_4)_3$	(+++)	(ε)
	----------	----------	----------
	$Fe(OH)_3$	(+)	(ε)
	FeOOH	(ε)	(ε)
	FeS_2	(++)	(++)
Spectroscopie UV	S_5S^{2-}	(+)	(ε)
+ Désorption	----------	----------	----------
HPLC	S_8	(++)	(+)

(ε), (+), (++), (+++) = Abondance relative des différentes phases

Les analyses réalisées précédemment démontrent donc que les pyrites utilisées présentent des états de surface "naturels" totalement différents :

- la pyrite K présente une surface particulièrement oxydée, composée majoritairement de sulfates ferriques, d'hydroxydes de fer, de soufre élémentaire (S_8) et de sulfates ferreux. Ces différentes espèces ont été à la fois observées par spectroscopie infrarouge et par spectroscopie de

photons X. La présence de polysulfures est significative de la présence de soufre en surface du minéral et correspond à la remise à l'équilibre du système S_2^{2-}/S_8 (BOULEGUE, 1975).

• la pyrite Es, en revanche, présente un état de surface peu oxydé. Contrairement au spectre infrarouge qui ne montre aucune bande caractéristique, le spectre ESCA révèle la présence d'espèces oxydées superficielles, identiques à celles de la pyrite K. Pour expliquer ce paradoxe, il faut considérer la répartition tridimensionnelle des phases oxydées et admettre que la pyrite K développe des piliers d'extension verticale importante alors que la pyrite Es est oxydée beaucoup plus superficiellement.

Le suivi de différents paramètres en solution (pH, croissance bactérienne, solubilisation du fer et des sulfates) indique que les cinétiques de biolixiviations sont très différentes pour les deux pyrites, malgré une pureté et des caractéristiques physiques très voisines. La phase de latence, en particulier, est plus longue pour la pyrite K. Les produits oxydés de surface influencent donc de façon sensible les cinétiques d'oxydation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans*.. Au cours du cycle de biooxydation, les phases superficielles sur les deux pyrites évoluent d'ailleurs de façon très différente (Tableau S.4) :

Tableau S.4 : Comparaison des phases superficielles des pyrites K et Es à l'état naturel et au cours du cycle de biooxydation

	Pyrite K	Pyrite Es
Etat de surface "naturel"	**Surface très oxydée** - Sulfate ferrique - Soufre élémentaire - Sulfate ferreux	**Surface peu oxydée** - faibles quantités de polysulfures - faibles quantités de soufre
Etat de surface au cours du cycle de biooxydation	- Apparition d'un **massif de sulfate ferreux** en début d'oxydation (?) - Enrichissement en fer ferrique - Apparition de soufre après la disparition du sulfate ferreux	- Peu de phases sulfatées en début d'oxydation - La quantité de **soufre élémentaire** de surface augmente au cours du cycle

Les composés superficiels très oxydés du fer et du soufre ($Fe_2(SO_4)_3$ et FeOOH) présents initialement en quantité importante à la surface de la pyrite K semblent ralentir l'oxydation minérale.

En revanche, le soufre élémentaire de surface (S_8), développé en quantité plus importante sur la pyrite Es, favorise l'oxydation bactérienne en assurant un flux anodique d'électrons plus important et en fournissant aux bactéries un substrat plus énergétique que le Fe(II) (MUSTIN *et al*, 1993b ; CHANDER *et al*, 1987).

Ce flux d'éléctrons, dont l'importance a déjà été mentionnée pour les mécanismes de croissance cellulaire, semble être également le facteur déterminant des processus d'oxydation et de corrosion à l'interface Thiobacille/pyrite. La bactérie, en tant que consommateur d'électrons, sollicite fortement les capacités semi-conductrices du minéral.

MUSTIN (1992) propose une représentation schématique de l'attaque électrochimique d'une pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* (Figure S.9). Les electrons, extraits des sites anodiques de surface par oxydation bactérienne, sont remplacés par des éléctrons provenant des sites cathodiques en circulant au travers de la structure cristalline. La propagation des figures de corrosion (perforation de tunnels de 2 µm de diamètre) correspondrait alors à des tubes de champ ou à des tubes d'écoulement préférentiels d'électrons.

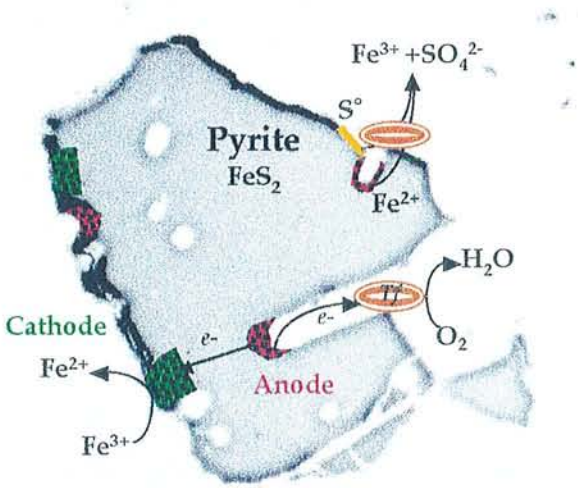


Figure S.9: Représentation schématique du processus d'oxydation bactérienne

Des études récentes (MELINE *et al.*, 1996) montrent à quel point les transferts d'électrons entre la surface minérale et la bactérie sont cruciaux pour permettre le déroulement de la biooxydation. Il semble en effet, que l'adsorption localisée d'une faible quantité (inférieure à la concentration minimale inibitrice sur Fe^{2+}) d'un agent bactériostatique tel que le thymol ($C_{10}H_{14}O$) soit suffisante pour inhiber de façon réversible l'oxydation de la pyrite. L'inhibition correspondrait à une dépression électrochimique du sulfure (limitation des échanges électroniques) ou à une limitation de la biodisponibilité des substrats de surface (adsorption du thymol sur des sites spécifiques occupés par des composés assimilables tels que le soufre élémentaire).

CONCLUSION :

La biolixiviation reste aujourd'hui un enjeu économique et environnemental dans de nombreux pays. *Thiobacillus ferrooxidans* est capable d'oxyder différents sufures (Chalcopyrite $CuFeS_2$, arsénopyrite FeAsS, blende ZnS, galène PbS ou molybdénite MoS_2) avec des prix de revient

inférieurs ou comparables à ceux des techniques traditionnelles d'extraction. Dans la lixiviation de l'or réfractaire, par exemple, le coût d'un prétraitement biologique est largement compensé par l'amélioration du rendement d'extraction de 10 à 90%. Cette biolixiviation préalable altère la gangue sulfurée et évite la pollution atmosphérique par le dioxyde de soufre et les composés arsénieux volatils. L'utilisation de la lixiviation bactérienne a également été envisagée pour l'élimination des métaux lourds dans les boues d'épuration, afin de permettre l'épandage de ces matières fertiles dans les champs cultivés.

Que ce soit pour améliorer les procédés d'extraction ou pour lutter plus efficacement contre les rejets nuisibles à l'environnement, il convient de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le processus de biolixiviation, et notamment les réactions primordiales se produisant aux interfaces des systèmes bactérie/minéral/solution.

MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'hétérogénéité de l'interface et l'influence des phases superficielles sur les caractéristiques physico-chimiques et la réactivité des sulfures ont été largement mises en évidence au cours des travaux de KONGOLO (Thèse, 1991) et Mustin (Thèse, 1992). Les techniques utilisées ou développées pour cette étude ont pour but de mieux définir cette hétérogénéité et d'aboutir à une connaissance affinée du minéral, de ses phases oxydées de surface et de leur évolution. Le but fixé est double; il s'agit en effet :

- de visualiser et de quantifier l'hétérogénéité de l'interface. Le couplage d'analyses quantitatives des phases de surface avec différentes techniques spectroscopiques (XPS, RAMAN) et microscopiques (MEB, AFM associée à l'analyse d'image) s'avère alors indispensable pour aboutir a un véritable modèle morphochimique de l'interface.
- de comprendre la réactivité de cette interface complexe et l'influence de l'hétérogénéité sur les mécanismes de biooxydation. Pour cela, et paralèllement aux méthodes courantes d'analyses élémentaires en solution, une Electrode à Grains Fixés (EGF) a été élaborée pour étudier la réactivité éléctrochimique du minéral au cours d'un cycle complet de biolixiviation.

I. MATERIEL

1. La bactérie

a. Origine et conditions de culture

Une souche pure de *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 583, fournie par la collection allemande de micro-organismes "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen", a été utilisée pour cette étude. Un repiquage mensuel sur un milieu liquide au sulfate ferreux (Tableau M.1) est nécessaire pour conserver la souche, assurer sa pureté et une bonne reproductibilité des expériences.

Dans ce travail, *Thiobacillus ferrooxidans* sera toujours cultivé en milieu liquide. Les éléments nutritionnels indispensables à sa croissance sont de deux types:

- des substances élémentaires permettant l'élaboration des constituants cellulaires (carbone, azote et phosphore),
- des substrats énergétiques (sources d'électrons) permettant a la cellule de disposer de l'énergie nécessaire à la synthèse.

Excepté le carbone, qui est métabolisé par ces bactéries lithotrophes à partir du gaz carbonique dissout en phase aqueuse en quantité importante, les autres substances élémentaires sont fournies sous forme de sels minéraux (milieu M2, Tableau M.1). La source énergétique ajoutée a ce milieu nutritionnel de base peut être constituée de sulfate ferreux ou de sulfure (pyrite). Le pH est ajusté à 1,8 à l'aide d'acide sulfurique normal afin d'obtenir une bonne croissance bactérienne tout en évitant la précipitation précoce de sulfates ferriques ou d'hydroxydes ferriques au cours de la lixiviation du sulfure.

Les cultures bactériennes sont incubées à 30°C sous une agitation de 120 rpm.

Tableau M.1 : Composition des milieux de culture pour un litre.

	$(NH_4)_2SO_4$	KH_2PO_4	$MgSO_4, 7H_2O$	$FeSO_4, 7H_2O$	Pyrite	pH
Milieu M2	1	0,4	0,4	/	/	1,8
Milieu au $FeSO_4$	1	0,4	0,4	20	/	1,8
Milieu pyrite	1	0,4	0,4	/	20	1,8

La récupération du culot bactérien après culture s'effectue par centrifugation haute vitesse (20 000 rpm pendant 15 minutes) de la suspension bactérienne débarrassée au préalable des précipités de sels ferriques par filtration sur préfiltre en fibres de verre (porosité : 1 µm).

b. Numération

L'expérimentateur dispose de plusieurs méthodes pour évaluer le nombre de microorganismes présents en solution.

La plus précise en milieu liquide est la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) (Rouas, 1988). Cette méthode permet de déterminer le nombre de cellules viables avec une précision $\Delta x/x$ de (+/-)15 % et une limite inférieure de détection de 10^3 bactéries par ml. Elle consiste à ensemencer des microplaques à l'aide de dilutions de la suspension bactérienne mère et d'observer un éventuel développement bactérien après une période d'incubation de 15 à 30 jours à 30°C en atmosphère humide. Le nombre de bactéries présentes dans la suspension est déduit, après comptage pour chaque dilution, du nombre de cupules positives et négatives. L'inconvénient majeur de cette méthode longue est qu'elle ne permet pas de suivre la population bactérienne au jour le jour ni d'étudier des processus rapides comme l'adhésion des *Thiobacilles* à la surface de la pyrite.

La méthode immunologique ELIFA (Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay) mise au point par DZIURLA (Thèse, 1995) a une limite inférieure de détection de 5.10^4 bactéries par ml et une précision $\Delta x/x$ de (+/-)15 % avec un temps de lecture réduit à une journée. Malgré cet avantage par rapport à la technique du NPP, cette méthode reste lourde à mettre en oeuvre.

La méthode la plus simple est le comptage direct en cellule de Thoma, au microscope optique (grossissement: x 400). Le volume élémentaire de la cellule utilisée est de $2,5.10^{-4}$ mm^3 (0,1 mm x 0,0025 mm^2), ce qui impose une limite de détection de 4.10^6 bactéries par ml, correspondant à une bactérie par champ élémentaire. Bien que la pécision de cette méthode soit moins bonne que celle des NPP, elle est néanmoins suffisante pour suivre correctement la croissance des bactéries au cours d'un cycle de biolixiviation.

2. Les pyrites

a. Origine et nature

Deux pyrites partculièrement pures, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau M.2, ont été utilisées pour l'ensemble des expérimentations.

La pyrite K4 , d'origine hydrothermale, provient d'un gisement sulfuré pegmatique du Pérou. Elle possède un éclat métallique particulièrement prononcé et des cannelures très marquées sur l'ensemble de ses faces cristallines (minéral triglyphe).

La pyrite Es a une origine volcano-sédimentaire et provient d'un gisement carbonaté situé en Espagne. Son éclat est plus terne et elle contient un pourcentage non négligeable d'arsenic (0,3%) réparti de façon homogène dans la matrice cristalline.

Tableau M.2: Composition chimique des pyrites utilisées.

	Pyrite K4	Pyrite Es
Origine	Hydrothermale	Sédimentaire
Analyse chimique quantitative (%)	Fe: 45,88 S: 53,65 As: 0,0089	Fe: 45,36 S: 52,97 As: 0,34
Pureté minéralogique (%)	99,5	98,3
Impuretés (ppm)	Mo (100), Cu (160)	Ti (550), Ni (550)

b. Broyage et tamisage

Les conditions de broyage sont des paramètres importants qui conditionnent la réactivité chimique et les états de surface des minéraux (KONGOLO *et al*, 1991 ; De DONATO *et al*, 1990 ; CASES *et al*, 1989). Il est donc primordial de respecter ces paramètres afin d'obtenir des échantillons présentant des caractéristiques physico-chimiques comparables.

Pour cette étude, les minéraux ont été broyés par voie sèche dans un broyeur à anneaux concentriques (Fabiola) en carbure de tungstène, chargé de 150 g de matière brute concassée à 2 mm. Le temps de broyage est fixé à 20 secondes. La poudre est ensuite tamisée par voie humide, à l'aide d'une série de tamis AFNOR : 32-53-80-125-160-200-500 µm. Après un étuvage à 50°C, les échantillons sont disposés dans des pilluliers en polycarbonates et placés dans un dessicateur.

3. Dispositifs de culture

a. Les flacons sérums

Des flacons sérums de 250 ml et 500 ml ont été utilisés pour les cultures simples. Ces flacons permettent de préparer des inoculum stériles sur différents substrats (sulfate ferreux, pyrite). Ils sont incubés sur table d'agitation à mouvement circulaire (120 rpm) dans des chambres thermorégulées (30°C).

b. Les mini-réacteurs

Afin de disposer d'un appareillage simple et souple à l'emploi pour les études répétées en réacteurs thermostatés, une unité de mini-réacteurs a été mise au point au laboratoire par MUSTIN (1992). Chaque réacteur se compose (Figure M.1):

- d'un flacon sérum autoclavable de 250 ml ou 500 ml
- d'une turbine à double flux assurant à la fois l'agitation et l'oxygénation de la solution ou de la pulpe.

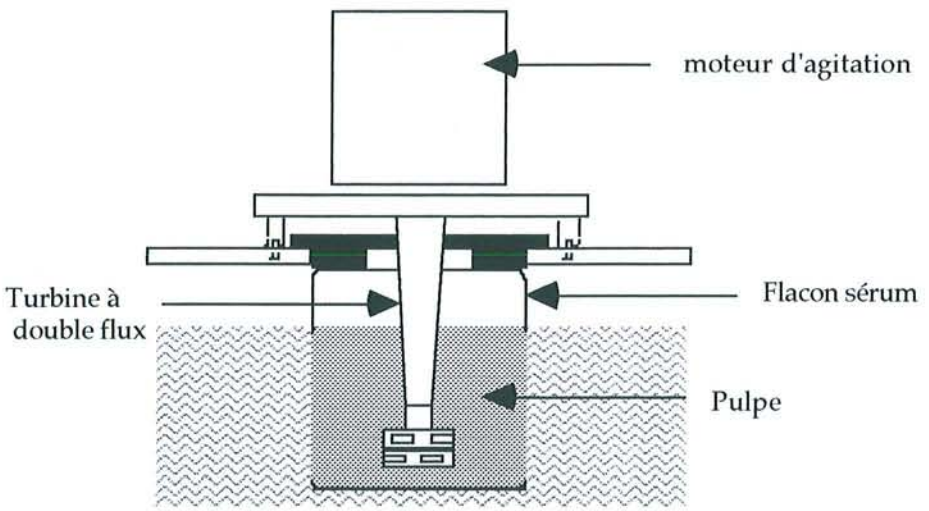


Figure M.1 : Schéma du dispositif des mini-réacteurs

Les réacteurs sont à l'abri de la lumière dans un bain thermostaté (30°C). En raison de leurs conditions particulières de croissance (chimiolithotrophie et acidophilie), cette semi stérilité n'affecte pas la croissance de *Thiobacillus ferrooxidans* et permet une gestion simplifiée et un contrôle aisé des différents paramètres physiques dans l'ensemble des réacteurs (prélèvements et analyses de pulpe ou suivi in situ du pH et du potentiel de la solution).

Avant inoculation par une population de *Thiobacillus ferrooxidans*, le réacteur contenant la pulpe de pyrite est autoclavé (120°C pendant 20 minutes) de façon à s'affranchir de toute contamination bactérienne.

II. METHODES D'ETUDE DE L'INTERFACE *THIOBACILLUS FERROOXIDANS* / PYRITE

1. Description des états de surface de la pyrite

a. Elution sélective et dosage des phases superficielles

Les phases superficielles oxydées des pyrite on été identifiées lors d'études récentes par des techniques telles que la spectroscopie infrarouge en réflexion diffuse ou la spectroscopie de photoélectrons X (MUSTIN *et al.*, 1993a ; 1993b et 1993c ; De DONATO *et al.*, 1991 et 1993). La nature et la quantité des différents oxydes de fer et de soufre (sulfates ferreux et ferriques, oxyhydroxydes de fer, polysulfures, soufre élémentaire) semblent varier non seulement en fonction des propriétés physiques, cristallochimiques ou granulométriques d'une pyrite "naturelle", mais aussi, au cours d'un cycle de biolixiviation, en fonction du temps et de l'importance du contact entre les bactéries et le minéral (DZIURLA, thèse 1995). Il est possible de classer ces phases de surface en fonction de leur affinité pour différents solvants de polarité ou d'hydrophilie variable, et donc de procéder à des élutions et des dosages sélectifs.

Protocole général :

Les sulfures concernés par cette étude sont des pyrites K4 ou Es de granulométrie comprise entre 32 et 53 µm stockées pendant plusieurs mois dans des pilluliers en polycarbonates exposés à l'atmosphère du laboratoire.

Un échantillon de 10 à 200 mg de pyrite (selon besoin) est mis en contact plusieurs heures avec 10 ml de solvant dans un tube en verre borosilicaté à fond cônique (bouchon inerte en tygon téflonné) placé sur agitateur rotatif à basculement. Le surnageant est prélevé, filtré et analysé. La pulpe, cryogénisée par l'azote liquide dans des tubes Nunc, est conservée à -80°C dans un cryocongélateur afin de bloquer les états de surface en prévision de futures analyses de surface par spectroscopies, microscopies ou électrochimie.

Phases superficielles hydrophiles :

Bien que comportant un caractère hydrophile marqué, ces composés peuvent être solubles ou insolubles en milieu aqueux.

Phases solubles en milieu aqueux : Ce sont principalement des sulfates ferreux ou ferriques ($FeSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$) ou des polysulfures (S_nS^{2-}).

Les extractions sont réalisées par agitation pendant plusieurs heures ou par autoclavage (à 110°C pendant 20 minutes) dans de l'eau osmosée. Elles peuvent être répétées sur une même pulpe avec du solvant neuf jusqu'à solubilisation de la totalité des phases de surface (dosage de traces dans le surnageant)

Phases insolubles en milieu aqueux :

Il s'agit principalement des oxydes et des oxyhydroxydes de fer (FeOOH, Fe_2O_3...). Les composés amorphes sont complexés puis extraits par une solution de CB (Citrate-Bicarbonate de sodium. Les phases cristallisées sont extraites par élution au CBD (Citrate-Bicarbonate-Dithionite de sodium (GASSER *et al.*, 1996).

Dosages :

Les concentrations en fer total et en sulfates solubilisés sont déterminées au Centre de Pédologie Biologique-CNRS à Nancy par analyses en spectrométrie d'émission ICP (Inductively Coupled Plasma, Jobin Yvon, en mode séquentiel (JY 38 et Ultrace 238) ou simultané (JY 32S) en présence d'un standard interne au strontium ou à l'Ytrium (pour l'analyse simultanée). Le surnageant est dilué au 1/20ème dans de l'acide chlorhydrique normal (HCl 1N). Cette préparation permet de dissocier les éléments métalliques éventuellement complexés, et d'améliorer la précision du dosage dans des matrices fer-soufre très déséquilibrées. Les précisions du dosage sont d'environ 0,5% pour le fer et 1% pour les sulfates.

Le fer (II) solubilisé est dosé par photométrie à 522 nm (Test Fer Merck : AquaMerck 8023/11 136). La bipyridine-2, 2' forme avec les ions ferreux un complexe très stable de coloration rouge foncé. La variation de la densité optique à 522 nm en fonction de la concentration en ions ferreux est réalisée à l'aide d'une gamme étalon obtenue à partir de dilutions successives dans l'eau d'une solution mère de sel de Mohr. La construction de la droite de Beer-Lambert permet d'établir la proportionnalité entre l'absorbance à 522 nm et la concentration en ion Fe^{2+} pour une cuve de 1cm de trajet optique.

$$DO = \varepsilon.l.[Fe^{2+}]$$

A partir de la pente, on détermine le coefficient d'extraction molaire ε du complexe formé :

$$\varepsilon = 7645\ mol^{-1}.cm^{-1}.l$$

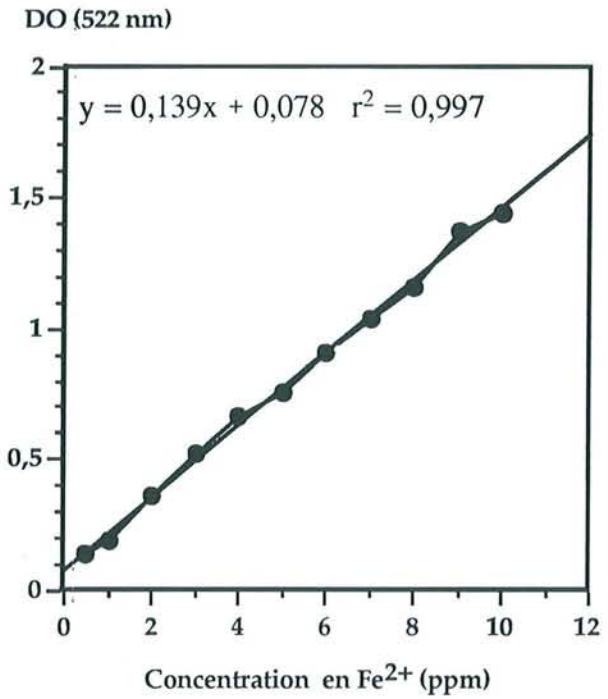


Figure M.2 : Courbe d'étalonnage des ions ferreux dans l'eau. La densité optique est mesurée à 522 nm.

• les droites d'étalonnage réalisées dans le milieu M2 ou dans une solution d'acide chlorhydrique normale sont superposables à la droite étalon réalisée dans l'eau osmosée.

• le dosage du fer divalent dans des solutions de citrate-bicarbonate ou de citrate-bicarbonate-dithionite est irréalisable par ce procédé. En effet, les complexes formés entre le fer ferreux et les solutions de CB ou CBD lors de l'extraction sont plus stables que le complexe Fe(II)-bipyridyl. Pour les extractions des phases superficielles insolubles en milieu aqueux, seules les concentrations en sulfates et en fer total pourront donc être déterminées.

Phases superficelles hydrophobes :

Le seul composé de surface hydrophobe détecté sur les pyrites par les études antérieures est le soufre élémentaire S_8. Son extraction s'effectue de façon sélective à l'aide d'hexane ou de cyclohexane.

Dans un article récent, SASAKI utilise le cyclohexane pour désorber le soufre élémentaire de la surface oxydée d'une pyrite (SASAKI *et al*, 1995). Il fait référence à l'étude menée par BUCKLEY et WOOD (1987) et précise que ce composé est soluble dans le cyclohexane alors que les sulfates ou les polysulfures ne le sont pas.

L'extraction du soufre est effectuée dans différents solvants organiques plus ou moins polaires (Hexane, chloroforme, dichlorométhane, méthanol). Les extraits peuvent être condensés par évapo-condensation (extraction type Soxhley). Les principaux solvants retenus pour l'analyse de routine sont l'hexane et le méthanol. L'hexane (très peu polaire) est le meilleur solvant pour le soufre. La cinétique de dissolution est très rapide et totale. Le méthanol est plus délicat à utiliser en raison de son caractère polaire et de son hydrophilie.

Dosage :

Le dosage du soufre élémentaire extrait dans l'hexane est réalisée en GC-MS (Chromatographie gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse) sur un système Varian Saturn 3' couplant une CPG (3400 cxi) à un détecteur par spectrométrie de masse utilisant une trappe à ions (iontrap : prix Nobel 1989). Tous les composés élués par le solvant sont séparés au préalable par chromatographie gazeuse (Figure M.3).

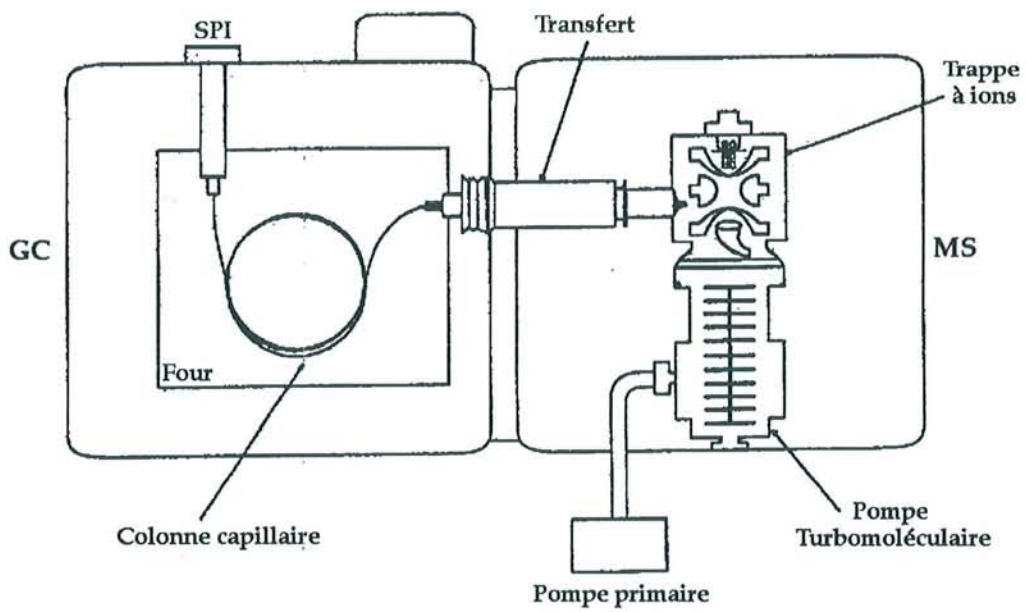


Figure M.3: Système Saturn

La colonne utilisée est une colonne capillaire DB5 (30 m x 0,25 mm de diamètre intérieur ; épaisseur de la phase : 250 nm), qui possède 5% de groupements hydrophiles (phényl) et 95% de groupements hydrophobes (méthyl). L'injection froide (25°C), effectuée au moyen d'un injecteur programmable SPI (Sample Programmable Injector), a pour fonction d'éviter la décomposition thermique de composés instables avant leur passage dans la colonne, et en particulier la sublimation du soufre en SO_2. Une programmation en température spécifique du SPI et de la CPG permet de séparer correctement les composés soufrés extraits dans le solvant. Après cette séparation chromatographique, chaque pic d'élution est analysé en Spectrométrie de Masse (SM). La trappe

permet de fragmenter les composés et d'associer à chaque pic de sortie un spectre de fragmentation destiné à identifier le composé (Figure M.4).

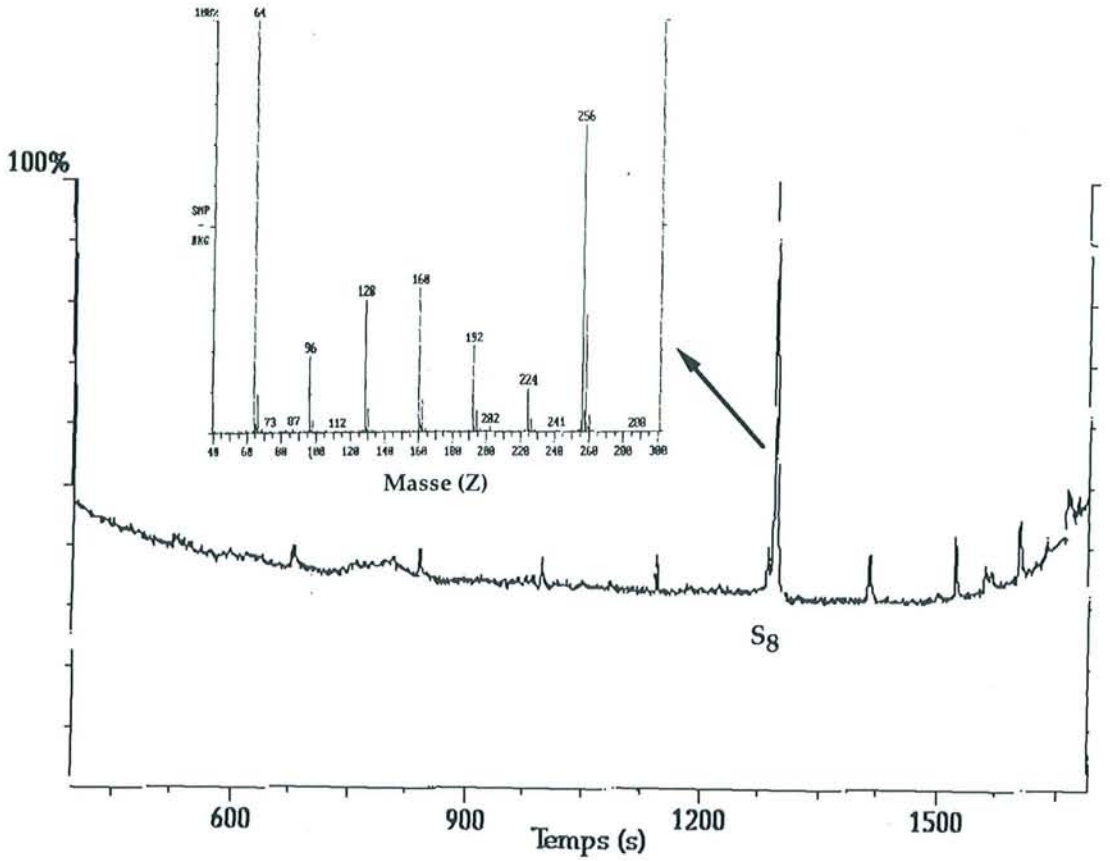


Figure M.4: Chromatogramme GC et spectre de masse du soufre S_8

b. Spectroscopie de Photoéletrons X (XPS)

La spectroscopie de photoélectrons (XPS ou ESCA) permet une caractérisation directe et non destructive des espèces chimiques présentes à la surface des pyrites et une approche semi-quantitative de la composition des quelques monocouches atomiques les plus externes. Sa forte sensibilité pour les degrés de recouvrement faibles permet d'observer des phases superficielles non détectables par d'autres techniques spectroscopiques.

L'origine de cette technique est la découverte en 1887 par Hertz de l'effet photoélectrique : une substance solide irradiée par un rayonnement monochromatique (photons d'énergie hν) émet des électrons.

$$\text{Métal} + h\nu \longrightarrow \text{Métal}^+ + e^-$$

La spectroscopie de photoélectrons consiste donc à analyser les électrons émis d'une substance irradiée par un rayonnement électromagnétique X. Ces électrons sont collectés puis triés en fonction

de leur énergie cinétique de sortie. Cela permet d'accéder directement à l'énergie de liaison des niveaux électroniques des couches profondes et de valence puisque l'énergie cinétique des électrons est liée à l'énergie de liaison selon la formule :

$$Ec = h\nu - Eb - \Phi_{sp} - C$$

Ec : Energie cinétique
Eb : Energie de liaison
Φ_{sp} : fonction de travail du potentiel de sortie du spectromètre
C : effet de charge électrostatique

La distribution en énergie des électrons de valence donne des informations sur la nature et l'environnement chimique des éléments à la surface de l'échantillon. Des programmes de déconvolution performants permettent, à partir des spectres bruts, d'aboutir à une quantification du taux de recouvrement statistique des phases superficielles présentes.

Les spectres sont réalisés au Centre de Recherche sur la Matière Divisée (CRMD-CNRS-Orléans) à l'aide d'un spectromètre VG ESCALAB MK II en utilisant les radiations de la raie ALK$\alpha_{1/2}$ (1486,6 eV) comme source de rayonnement. La pression dans la chambre d'analyse est de 10^{-7} Pa. Un refroidissement à l'azote liquide est nécessaire (T<200K) pour éviter la perte du soufre élémentaire de surface en passant dans l'ultra vide de la chambre de mesure (BUCKLEY and WOODS, 1987).

Les échantillons analysés sont des poudres de pyrite K4 et Es (de granulométrie 32-53 µm) à l'état naturel ou après autoclavage dans le milieu M2. Des analyses sont également réalisées sur la pyrite K4 (32-53 µm) en cours d'oxydation bactérienne par *Thiobacillus ferrooxidans* . Les pulpes prélevées dans le réacteur de biolixiviation sont séchées sous azote liquide avant d'être introduites dans la chambre d'analyse. Les poudres sont placées dans des creusets.

Les pics étudiés correspondent aux niveaux d'énergie Fe(2p)$_{3/2}$, S(2p), O(1s) et N(1s) (Tableau M.3). La raie Fe(2p) du fer, plus sensible aux effets de l'environnement chimique que la raie Fe(3p), permet une meilleure détermination des produits de dégradation de surface. Les énergies de liaison sont calibrées en prenant comme référence la raie C(1s) des hydrocarbures de contamination à 284,6 eV. La précision est de ± 0,2 eV sur les énergies et de ± 0,6% sur la détermination de l'aire des pics après déconvolution.

Un canon à ions Ar^+ est utilisé pour le décapage par bombardement ionique de certains éclats de pyrite. Une intensité de 2,1 µA permet le décapage de 0,1 Å par seconde de bombardement. L'objectif est de déterminer l'épaisseur et l'évolution en profondeur de la composition des différentes couches d'oxydation. Cependant, l'interprétation des résultats est délicate puisque les surfaces minérales sont très hétérogènes et ne sont pas planes (la pyrite ne présente pas de plan de clivage).

Tableau M.3 : Energies de liaison de la pyrite et d'échantillons de référence selon la littérature.

Niveaux d'énergie	Energie de liaison (eV)	Attribution	Référence
C(1s)	284,6	C-C, C-H pollution	Perkin Elmer 1980
	286,5	CS_2	Gelins *et al.*, 1970
	287,3	CS_2	Gelins *et al.*, 1970
	288,6	CO_3^{2-}	Perkin Elmer 1980
O(1s)	531,9	OH, Fe(OH)3, FeOOH	Brion, 1980
	533,7	SO_4^{2-}	Lindberg *et al.*, 1970
	535,5		
	536,7	Satellites	Erre *et al.*, 1988
	537,2		
Fe(2p)3/2	706,9	FeS_2	Binder, 1973
	707,1	FeS_2	Eggleston, 1996
	707,4	FeS_2	Brion, 1980
	708,3	Fe_3O_4	Fe^{2+}-Mc Intyre and Zetaruk, 1977
	709,5	FeO, (FeS?)	Cawer et al, 1972
	710,6	$Fe(OH)_3$	Brion, 1980
	710,8	Fe_3O_4	Fe^{3+}-Mc Intyre and Zetaruk, 1977
	711	α-Fe_2O_3	Brion, 1980
	711,3	$FeSO_4$, $7H_2O$	Brion, 1980
	711,5	FeOOH	Brion, 1980
	712,1	$Fe_2(SO_4)_3$	Asami et Hashimoto, 1977
	712,2	$KFe_3(OH)_6(SO_4)_2$	Brion, 1980
	713,5	$Fe_2(SO_4)_3$	Brion, 1980
	714	Satellite	Erre *et al.*, 1988
S(2p)3/2	161,2	S^{2-} (FeS)	Pratt *et al.*, 1994
	162,4	FeS2	Scaini, 1996
	162,7	FeS_2	Brion, 1980
	163,2	S_n^{2-}	Pratt *et al.*, 1994
	163,3	S-S	Scaini, 1996
	163,8	S_n, S_8	Holm
	164	S_8	Pratt *et al.*, 1994
	164,3	$S_4O_6^{2-}$	Holm
	165,3	Sn	Wagner *et al.*, 1979
	166,7	SO_3^{2-}	Holm
	167,4	$S_2O_3^{2-}$	Wagner, 1989
	168,7	SO_4^{2-}	Lindberg *et al*, 1970
	168,8	$KFe_3(OH)_6(SO_4)_2$	Brion, 1980
	169,1	SO_4^{2-}	Brion, 1980
	169,4	$FeSO_4$, $7H_2O$	Brion, 1980
	169,5	$Fe_2(SO_4)_3$	Brion, 1980
	170,3	Satellite	Erre *et al.*, 1988
N(1s)	401,5-402	Complexe amine/sulfate	Perkin Elmer, 1980

c. Spectrométrie RAMAN

Principe et appareillage

La spectrométrie de diffusion RAMAN, à l'instar de l'absorption infrarouge, est une technique permettant l'observation des états vibrationnels d'une molécule. La spectroscopie Infra-Rouge concerne la partie des photons absorbés par la matière lorsque celle-ci est soumise a un rayonnement dont les longueurs d'onde se situent dans le proche, le moyen ou le lointain infra-rouge (Figure M.5).

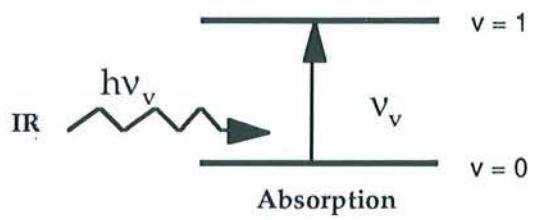


Figure M.5 : Interaction entre un photon et la matière caractérisée par des niveaux d'énergie vibrationnels : absorption infra-rouge

Pour observer l'effet Raman, on éclaire un milieu matériel par une radiation monochromatique provenant d'une source laser. Une fraction des photons constituant cette radiation excitatrice est réfléchie ou absorbée et une fraction bien plus faible est diffusée dans toutes les directions de l'espace.

Parmi les photons diffusés, la plupart ont la même fréquence ν_0 que le rayonnement excitateur. Ce phénomène de diffusion sans changement de fréquence est la diffusion **Rayleigh** (Figure M.6).

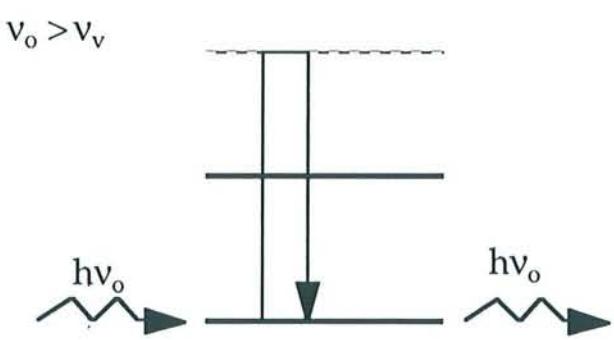


Figure M.6 : Diffusion Rayleigh

Pour moins d'un millième des photons diffusés, un changement de fréquence est observé : cela correspond à l'effet Raman (Figure M.7). Soit ν_d la fréquence des photons ainsi diffusés, deux cas peuvent se présenter :

$\nu_d < \nu_0$: c'est la diffusion Raman **Stokes**

$\nu_d > \nu_0$: c'est la diffusion Raman **anti-Stokes**

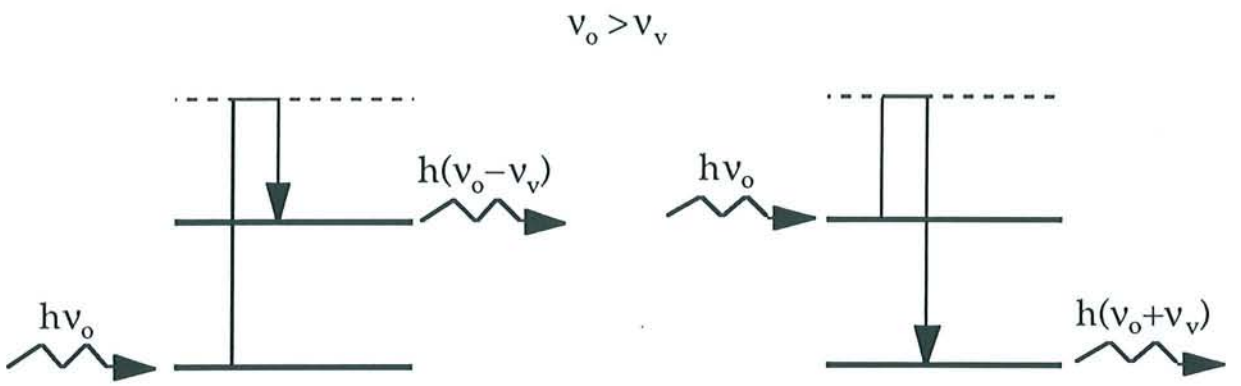


Figure M.7,: Interaction entre un photon et la matière caractérisée par des niveaux d'énergie vibrationnels : Effet Raman.

Dans les deux cas, les écarts de fréquence entre les photons diffusés et la source excitatrice sont égaux aux fréquences de vibration, actives en Raman, de la molécule considérée.

Chaque bande du spectre Raman peut être caractérisée par :

- sa position dans le spectre que l'on peut relier à la fréquence d'un mode de vibration
- son intensité, liée aux nombre de molécules diffusantes ainsi qu'au mode de vibration considéré
- son état de polarisation qui renseigne sur la symétrie du mode correspondant.

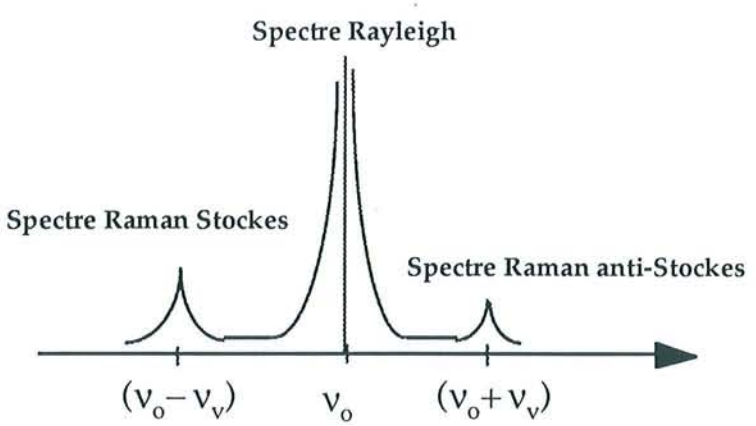


Figure M.8 : Allure du spectre de diffusion.

Les spectres Raman sont réalisés sur un spectromètre Jobin Yvon T64000. Les échantillons sont placés sur une platine motorisée XY (pas de 80 nm), sous un microscope optique confocal couplé au spectromètre Raman. Ce dispositif permet de visualiser la zone du grain de pyrite analysée. La collection de la diffusion inélastique Raman Stockes se fait donc en mode rétro-diffusion. Selon les objectifs utilisés (x10, x50 ou x100), les résolutions spatiales sont respectivement de 5 µm, 2 µm et inférieure au micromètre.

Pour les échantillons analysés, les plages spectrales considérées sont relativement étendues et vont de 50 cm^{-1} à 1700 cm^{-1}. Par conséquent, le spectromètre est configuré en mode triple additif avec réseaux à 1800 traits/nm, permettant l'acquisition du spectre avec une résolution de 3 cm^{-1} de 14 cm^{-1} à 4000 cm^{-1}.

La raie excitatrice choisie est la raie située à 514,5 nm délivrée par un laser à Argon (type Stabilité 2017 Spectra Physics). Les puissances délivrées à l'échantillon sont comprises entre 0,1 et 20 mW.

Echantillons analysés :

La caractérsation des états de surfaces des pyrites à l'état naturel est effectuée sur poudre sèche (pyrites Es et K de fraction granulométrique 32-53 µm).

Contrairement à l'XPS, la spectroscopie Raman est une technique qui ne nécessite pas la mise sous vide des échantillons. Il est donc possible de réaliser des mesures en milieu liquide. Cette procédure est particulièrement avantageuse pour suivre l'évolution du minéral au cours d'un cycle de biolixiviation en s'affranchissant des perturbations que pourrait engendrer l'étape de séchage sur l'organisation de l'interface.

Les pulpes prélévées à intervalles de temps réguliers dans un réacteur de biolixiviation sont cryogénisées afin de bloquer leurs états de surface. Les spectres Raman sont effectués en milieu liquide, après décongélation de la suspension, de façon à ne pas perturber l'équilibre entre les phases oxydées du minéral et la solution de lixiviation.

Les pyrites autoclavées dans le milieu de culture des Thiobacilles sont également analysées en milieu liquide pour déterminer l'état de surface du minéral à l'instant initial du cycle de biolixiviation, avant tout contact avec les bactéries.

De nombreux spectres sont effectués pour chaque échantillon en focalisant le faisceau sur des grains différents ou en multipliant les zones analysées sur un même grain. Les surfaces sont en effet très hétérogènes et la nature des composés superficiels mis en évidence sur un échantillon varie en fonction de la zone étudiée.

e. Microscopies

Deux types de microscopies sont utilisées de façon à multiplier les échelles d'observation : la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) permet de visualiser des structures allant du millimètre au micron, tandis que la mise en oeuvre d'une technique de champ proche telle que la Microscopie à Force Atomique (AFM) permet une résolution de l'ordre du nanomètre.

La Microscopie Electronique à Balayage

Cette technique permet de visualiser des grains ou des éclats de pyrite à l'état naturel ou après différents traitements de surface : autoclavage dans le milieu M2, élution sélective des phases oxydées dans différents solvants (HCl 1N, Citrate-Bicarbonate de sodium, Citrate-Bicarbonate-Dithionite, Hexane...), biolixiviation par *Thiobacillus ferrooxidans*....

Les clichés sont réalisés à l'aide d'un microscope Hitachi équipé d'un détecteur Si-Li (Princeton). Les échantillon sont métallisés à l'or ou au carbone afin de déterminer la composition chimique spatiale en fer, soufre et oxygène. L'un des enjeux de ces observations est d'établir un lien entre les structures développées à la surface des minéraux et la présence de phases oxydées.

Par ailleurs, les électrons rétrodiffusés, qui mettent en évidence les différences de numéro atomique faibles (Z±0,1) permettent également de révéler des zonations chimiques, de mettre en évidence l'hétérogénéité de composition ou de repérer des structures plus riches en carbone (matières organiques d'origine bactérienne ou pollutions diverses).

Microscopie à Force Atomique (AFM) :

Depuis le prix Nobel de Physique de BINNIG et ROHRER en 1986 pour l'invention du microscope à effet tunnel (STM : Scanning Tunneling Microscope), les techniques d'analyses en champ proche ont connu un développement important. Binnig et son équipe mettent au point, dès 1986 le premier Microscope à Force Atomique. Plus facile d'utilisation que le précédent, il permet l'analyse de composés isolants et peut fonctionner à l'air ambiant ou en milieu liquide.

Principe et appareillage :

Une micro-pointe (idéalement terminée par un seul atome) est solidaire d'un bras de levier flexible (cantilever) actionné par un trièdre de céramiques piézo-électriques (x, y, z). La céramique z contrôle la distance de la pointe à la surface à analyser tandis que les céramiques x et y permettent le balayage de la surface. Des forces de Van der Waals apparaissent dès que les distances entre la

pointe et l'échantillon sont de l'ordre des distances interatomiques. La déformation du cantilever selon z est proportionnelle à la force F d'interaction d'après la loi de Hooke :

$$F = -k\,z \qquad \text{avec k : constante de raideur du cantilever}$$

Lors du balayage de la surface, une boucle d'asservissement permet de maintenir constante la distance entre la pointe et l'échantillon. Les déflexions du cantilever occasionnées par le suivi du "relief" de l'échantillon sont transformées en variations lumineuses par réflexion d'un rayon laser sur le bras de levier (Figure M.9). L'image ainsi obtenue donne la topographie de la surface à l'échelle atomique.

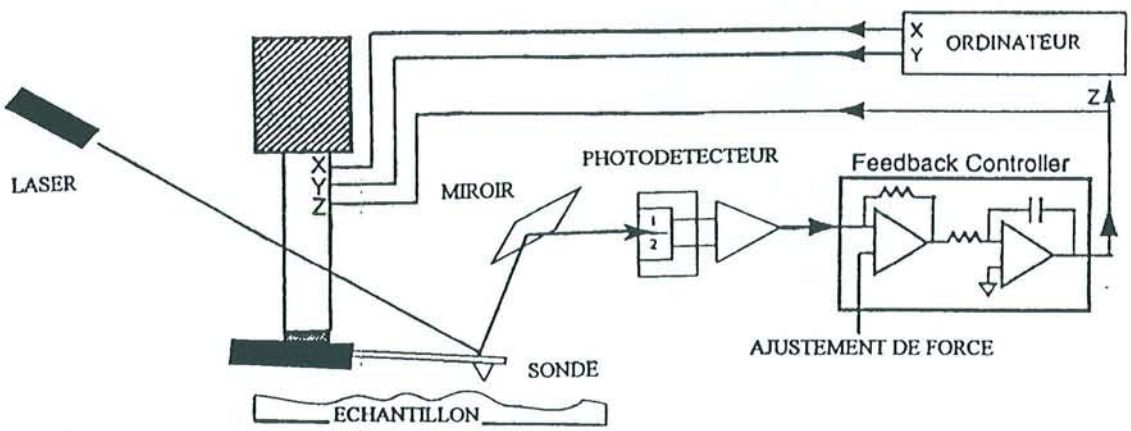


Figure M.9: Schéma de fonctionnement du Microscope à Force Atomique

La pointe est une pyramide en nitrure de silicium Si_3N_4 (base = hauteur = 4 μm) de rayon de courbure à l'extrémité inférieur à 50 nm.

Les images sont réalisées en mode répulsif (Figure M.10). La pointe est en contact avec l'échantillon, c'est à dire que les nuages électroniques de la pointe et du support s'interpénètrent. Bien que les forces appliquées pour maintenir le contact soient faibles (10^{-9} à 10^{-7} N), le balayage peut parfois endommager la surface.

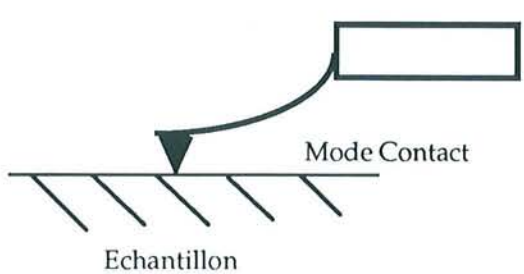


Figure M.10 : Schéma du mode répulsif : la pointe est en contact avec la surface.

la correspondance entre les niveaux de gris et les altitudes réelles des structures décrites (Figure M.11).

L'image AFM, réalisée en 128 pixels x 128 pixels, représente une zone de l'échantillon de 5 μm x 5 μm. La distance entre deux pixels successifs sur une même ligne horizontale ou verticale peut être déterminé (5/127 = 0,03937 μm).

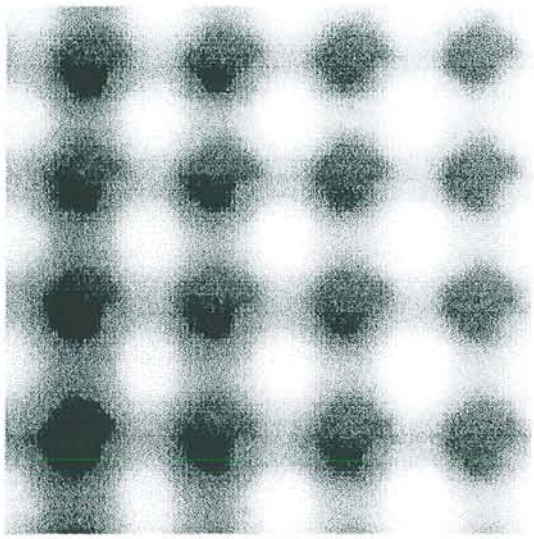


Figure M.11 : Images AFM (5 µm x 5 µm) d'une grille régulière.

L'utilisation de l'AFM en mode prospectif rend insuffisante la simple observation des images et nécessite le développement de divers outils informatiques permettant d'exploiter au mieux toutes les informations contenues dans les clichés. Les outils développés dans cette étude reposent essentiellement sur ceux de l'analyse géostatistique et de la modélisation 3D de surfaces. Ces techniques permettent de corriger localement les artéfacts et d'effectuer une "vraie" reconstruction 3D de la surface.

Analyse géostatistique : étude des variogrammes.

Une image AFM en niveaux de gris peut être considérée comme une juxtaposition de pixels ou un ensemble de points α_i (xi, yi, zi) pour lesquels une variable aléatoire Z correspondant à la hauteur z (en μm) est définie. Si l'on choisit une direction θ et un pas h, on peut calculer la variance γ_Z de la variable aléatoire en tout point α_j (xj, yj, zj) (aussi noté "α_i+h") situé à une distance h de α_i dans la direction θ (Figure M.12) :

$$2\gamma_Z(\alpha_i, h, \theta) = E[(z(\alpha_j) - z(\alpha_i))^2]$$

Avec : $z(\alpha_i)$: valeur de Z au point α_i

$z(\alpha_j)$: valeur de Z au point "$\alpha_i + h$"

E : Espérance mathématique, moment d'ordre 1 de la variable aléatoire Z

Le variogramme correspond au tracé de $\gamma_Z(h, \theta)$ en fonction de h avec :

$$\gamma_Z(h, \theta) = \frac{1}{N(h)} \cdot \sum_{i=1}^{N(h)} \gamma_Z(\alpha_i, h, \theta)$$ où N(h) est le nombre total de points α_i considérés

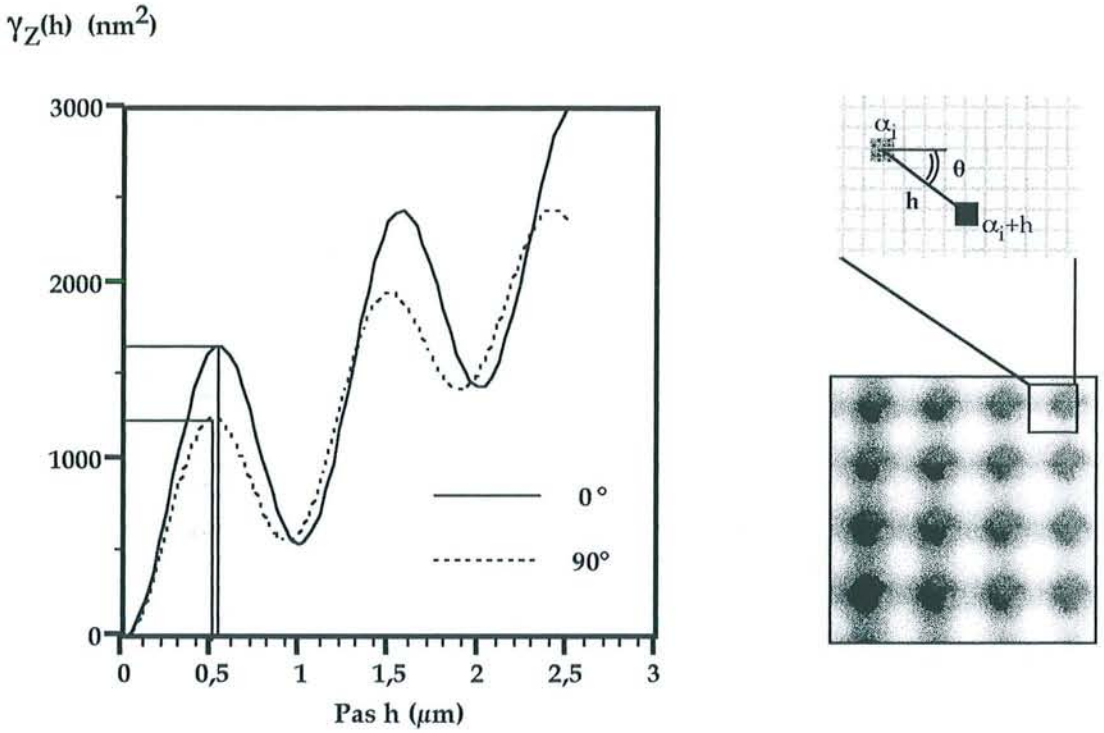


Figure M.12 : Image AFM d'une grille régulière et ses variogrammes dans 2 directions orthogonales

Sur cette grille régulière constituée de plots identiques, il est aisé de constater que la portée, distance à partir de laquelle les points ne sont plus corrélés (souvent notée "a"), correspond à l'extension horizontale des plots dans les deux directions d'analyse. On peut considérer d'autre part, que la variance maximale, proportionnelle aux dénivellations enregistrées selon z, est révélatrice de l'hétérogénéité selon z de la grille.

L'allure sinusoïdale des paliers dans les quatres variogrammes calculés représente la périodicité des plots sur la grille. Il est possible de déterminer leur période d'apparition dans chaque direction.

Limites de la méthode

L'un des inconvénients majeurs de la méthode concerne la déformation de l'image engendrée par le passage de la pointe. Le risque de modification de l'échantillon au cours du balayage et l'influence de la taille et de la forme de la pointe sur les images obtenues (Figure M.13) a fait l'objet d'études spécifiques (KAUPP *et al.*, 1995 ; GODOWSKY *et al.*, 1995).

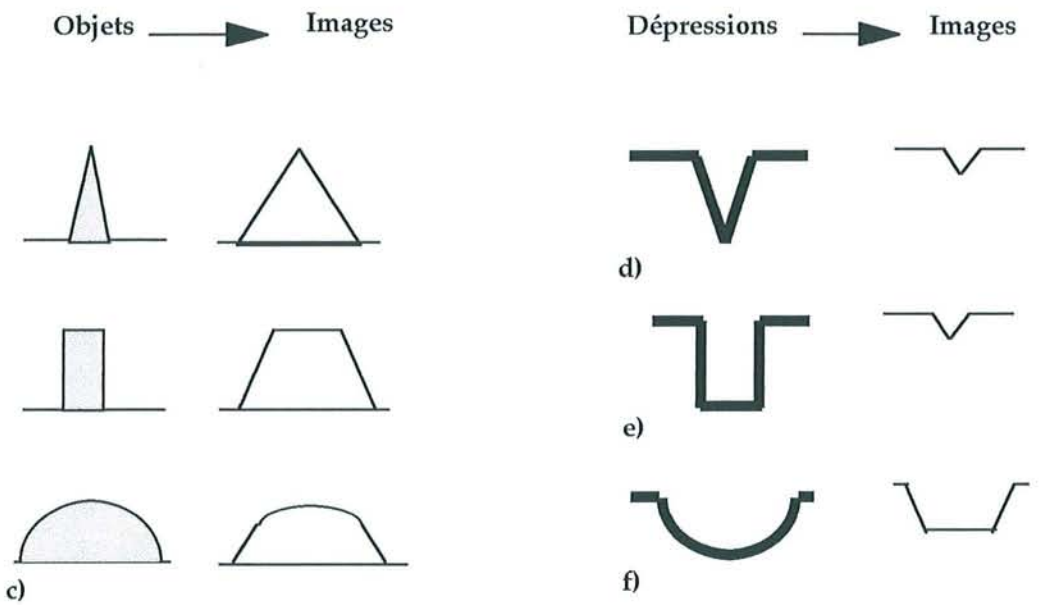


Figure M.13 : Influence de la forme d'une pointe pyramidale sur l'image d'objets ou de dépressions à la surface d'un échantillon. a) et d) triangle ; b) et e) rectangle ; c) et f) demi-cercle.

Dans le sens de balayage en particulier, le trajet de la pointe augmente l'asymétrie des bosses de façon artéfactuelle si bien que la valeur de la portée est anormalement élévée. Sur la figure 10, la portée mesurée dans le sens de balayage (variogramme calculé dans la direction 0°) est de 0,53 μm alors qu'elle vaut 0,50 μm dans la direction perpendiculaire. Ce phénomène est amplifié aux périodes suivantes.

Par ailleurs, il est aisé de constater, en observant l'image AFM de la grille, que celle-ci n'est pas horizontale. La dérive des niveaux de gris est parfaitement perceptible. L'impact sur les variogrammes est significatif puisqu'il induit une dérive importante dans le tracé de la variance et l'absence de véritable palier.

Utilisation d'un modeleur de surface : GOCAD

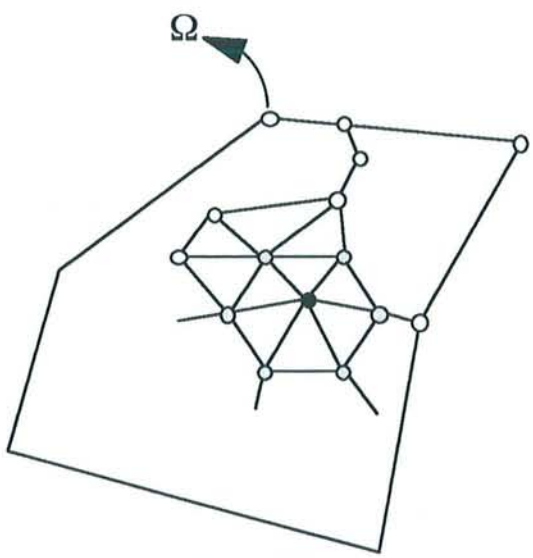
Le principal défaut des imageries traditionnelles est qu'elles permettent à l'oeil d'avoir l'illusion d'un objet continu quand l'image n'est en fait, qu'une juxtaposition de pixels (un ensemble

de fréquences) sans aucun lien entre eux. Le logiciel GOCAD, développé par le Laboratoire d'Informatique et d'Analyse des Données (LIAD) de l'Ecole Nationale Supérieure de Géologie de Nancy, est un puissant outil interactif de modélisation 3D. Il permettra, après conversion des niveaux de gris (pixels) en altitude (cote z), de transformer l'image discontinue en une véritable surface mathématique continue Ω, sur laquelle il sera aisé d'effectuer un grand nombre de calculs géométriques (surfaces et volumes développés, courbures...).

Le modeleur GOCAD : approche et principes de la méthode DSI (MALLET 1992 et COGNOT1996)

Les méthodes classiques de modélisation d'objets sont basées sur l'utilisation de grilles régulières. Elles permettent de représenter facilement un certain nombre d'objets géométriques, en particulier des surfaces dans un espace à trois dimensions. Cependant, elles sont mal adaptées à la modélisation interactive des objets naturels car elles sont incapables de gérer les discontiuités et de modéliser des surfaces non univoques.

L'une des grandes originalités du projet GOCAD est d'utiliser des réseaux irréguliers pour l a modélisation des objets. Par exemple, une ligne (1D) sera modélisée par un ensemble de segments de droites, une surface (2D) par un ensemble de facettes triangulaires planes (Figure M.14), un volume (3D) par un ensemble de tétraèdres. Ces représentations sont suffisamment flexibles pour permettre la modélisation de tout type de géométrie :



$$\forall \alpha, \beta \in \Omega$$
$$\alpha \in \Lambda(\beta) \Rightarrow \beta \in \Lambda(\alpha)$$
$$N(\alpha) = \Lambda(\alpha) \cup \{\alpha\}$$

Figure M.14 : Surface triangulée : un exemple de maillage irrégulier .

Deux niveaux de connectivité peuvent être définis :

• Les connectivités entre noeuds. On définit ici un modèle atomique : un noeud ou atome α est connecté directement à l'ensemble des noeuds qui lui sont voisins, ses satellites Λ(α). Ce type de connectivité est absolument indépendant du type d'objet étudié (ligne, surface ou volume), et l'on supposera toujours que cette relation de voisinage est symétrique :

$$\forall \beta \in \Lambda(\alpha), \alpha \in \Lambda(\beta)$$

On appelera voisinage du noeud α, l'ensemble N(α) tel que :

$$N(\alpha) = \Lambda(\alpha) \cup \{\alpha\}$$

• Les connectivités entre simplexes : un objet géométrique complexe sera constitué d'un certain nombre de simplexes ou objets élémentaires. Ces simplexes sont : les segments d'une ligne, connectés par leurs sommets; les triangles d'une surface, connectés par leurs arêtes; les tétraèdres d'un volume, connectés par leurs faces...

La relation entre voisinages atomiques et simplexiques est spécifiée par la condition suivante :

$$\alpha \in \Lambda(k) \Leftrightarrow (\alpha, k) \text{ est un segment d'un simplexe du graphe}$$

Si toute géométrie peut être représentée par cette double connectivité, le problème est reporté au niveau de l'interpolation. En effet, si l'on se donne un réseau Ω et que l'on veut estimer sur ce réseau une fonction φ (position de chaque noeud, paramètre physique attaché en chaque noeud...), il faut définir une méthode d'interpolation prenant en compte les connectivités des noeuds et des contraintes extérieures. Ces contraintes doivent être souples d'utilisation, afin de refléter la grande diversité des données.

Principe de la méthode DSI : Discrete Smooth Interpolation

Supposons que l'on dispose d'un réseau Ω composé de M noeuds numérotés de 1 à M. Le noeud numéro k est appelé "noeud k" : $\Omega = \{1, 2, \ldots, M\}$.

Soit $N_p(k)$ le voisinage du noeud k, $N_p(k)$ étant défini comme le sous-ensemble de Ω qui peut être atteint en p pas au plus. Si p=1, ce voisinage est identique à celui proposé précédemment. Bien que la méthode puisse être définie pour p≠1, on considèrera que p=1 dans toute la suite, afin de

ne pas alourdir les calculs. Dans ce cas, il est possible de définir l'orbite $\Lambda(k)$ du noeud k, c'est à dire l'ensemble des noeuds de Ω directement voisins de k (Figure M.15) :

$$\Lambda(k) = N_1(k)\backslash\{k\} = N(k)\backslash\{k\}$$

Soit φ une fonction scalaire définie sur Ω et représentée par sa matrice colonne :

$$\varphi = [\varphi(1),\ldots,\varphi(M)]^t$$

L'ensemble des n fonctions (ou propriétés) φ^v définies sur Ω est noté Φ : $\Phi = \{\varphi^1, \ldots, \varphi^v, \ldots, \varphi^n\}$

Les noeuds de Ω peuvent se répartir en deux ensembles :

- L'ensemble L des noeuds où φ est connue
- L'ensemble I des noeuds où φ est inconnue

On a donc : $\Omega = I \cup L$

et $\varphi = \begin{bmatrix} \varphi L \\ \varphi I \end{bmatrix}$

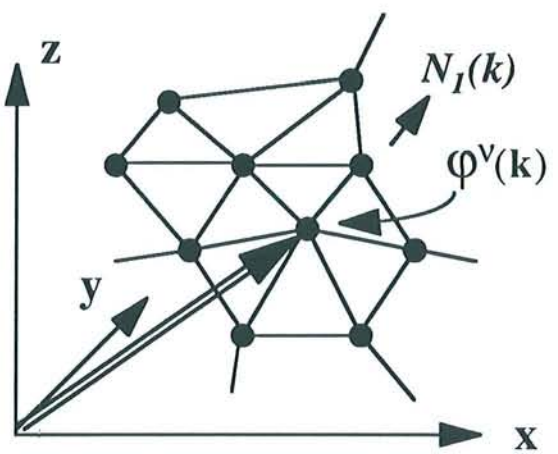


Figure M.15 : Représentation d'un noeud et de son voisinage.

Définition d'un critère de rugosité :

La méthode DSI repose sur la définition, en chaque noeud $k \in \Omega$, d'un critère de rugosité local $R(\varphi|k)$ tel que :

$$R\langle\varphi|k\rangle = \left| \sum_{\alpha \in N(k)} \nu^{\alpha}(k).\varphi(\alpha) \right|^2$$

où les coefficients $v^{\alpha}(k)$ sont choisis tels que :

$$\begin{cases} \forall \alpha \in \Lambda(k), \nu^{\alpha}(k) \rangle 0 \\ \nu^{k}(k) = - \sum_{\alpha \in \Lambda(k)} \nu^{\alpha}(k) \end{cases}$$

afin de s'asurer de la convergence de la méthode vers une solution unique.

A partir de ces rugosités locales, on peut définir une rugosité globale R(φ) telle que :

$$R(\varphi) = \sum_{k \in \Omega} \mu(k). R\langle \varphi | k \rangle$$

où les pondérateurs μ(k), appelés *rigidité*, sont pris strictement positifs pour s'assurer de la convergence de la méthode.

La solution de l'interpolation par la méthode DSI sera celle qui minimisera le caractère de rugosité R(φ). Ce minimum pour R(φ) est atteint lorsque :

$$\forall \alpha \in \Omega, \frac{\delta R(\varphi)}{\delta \varphi(\alpha)} = 0$$

La méthode employée est une méthode itérative de type Gauss-Seidel, c'est à dire pour laquelle chaque valeur recalculée en un noeud α remplace immédiatement la valeur précédente. MALLET démontre la convergence de la méthode, l'unicité de la solution et le fait que cette solution ne dépend pas de la solution initiale (MALLET, 1992).

Introduction de contraintes dans DSI

Il est possible d'introduire dans l'interpolation un ensemble de contraintes ρ(φ). Ce sont des propriétés particulières (contraintes linéaires ou non linéaires, contraintes d'inégalité) définies en chaque noeud α. Le degré de violation des contraintes en chaque noeud est pondéré par des coefficients strictement positifs appelés *facteurs de certitude*. Ces facteurs servent à moduler l'importance de chaque contrainte en fonction de la précision avec laquelle sont connues les données qui les engendrent.

Il est alors possible de définir un critère de rugosité modifié R*(φ) tel que :

$$R^*(\varphi) = R(\varphi) + \rho(\varphi).$$

La minimisation de ce critère de rugosité modifié conduit à la solution de l'interpolation DSI sous contraintes.

Utilisation de GOCAD couplé à l'AFM dans le cadre de l'étude des surfaces de pyrites :

Après conversion des niveaux de gris (pixels) en altitude, l'image d'AFM devient une surface mathématique manipulable par le modeleur de surface. La méthode d'interpolation DSI s'applique alors au cas particulier d'une grille régulière de 128 x 128 pixels.

Dans le cas des images d'AFM, La surface est un objet défini en tout point (α_i) par des coordonnées (x_i, y_i, z_i) et un ensemble Φ de propriétés notées φ^v.

Les trois fonctions particulières φ^x, φ^y et φ^z représentent les coordonnées x_i, y_i et z_i des points α_i de la surface Ω.

Il est possible, à partir de ces trois propriétés , de calculer en chaque noeud $\alpha \in \Omega$, les courbures de la surface selon les axes du repère orthonormé.Dans la suite du texte, les notations suivantes seront adoptées :

$\forall \alpha \in \Omega$, $h_Y(\alpha)$ est la courbure selon l'axe Y calculée en tout point
$h_X(\alpha)$ est la courbure selon l'axe X calculée en tout point
$H(\alpha) = (h_{min} + h_{max})/2$ est la courbure moyenne en tout point

La contrainte la plus couramment utilisée dans l'étude des surfaces de pyrite est la contrainte *control node*. Cette contrainte influence directement la position d'un noeud de manière absolue et permet de fixer une fois pour toutes la position d'un point α de coordonnées (x, y, z) dans le repère orthonormé (X, Y, Z). Le *control node* peut s'appliquer à deux coordonnées seulement (par exemple x et y) et laisser la troisième libre. L'interpolation DSI s'effectuera alors sur la coordonnée z de manière à redonner aux points concernés la position la plus en adéquation avec leur voisinage (convergence vers une solution unique correspondant à la position la plus "naturelle" ou la moins contrainte de chaque point). Cette technique sera particulièrement importante pour la correction locale des défauts d'acquisition de l'image d'AFM tels que les stries.

Conclusion :

Contrairement aux autres techniques employées, l'AFM, couplée au modeleur GOCAD et aux méthodes géostatistiques d'analyse d'images, donne une représentation locale de la topographie de l'échantillon et constitue une base de raisonnement pour la réalisation d'un modèle morpho-chimique de l'interface *Thiobacille* /pyrite (Planche M.1).

Transformation et Interprétation des Images de Microscopie à Force Atomique

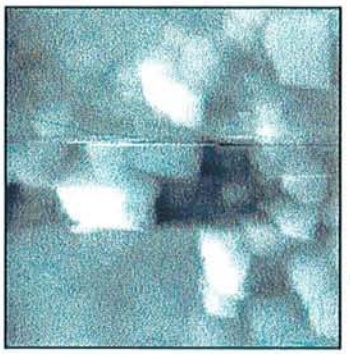
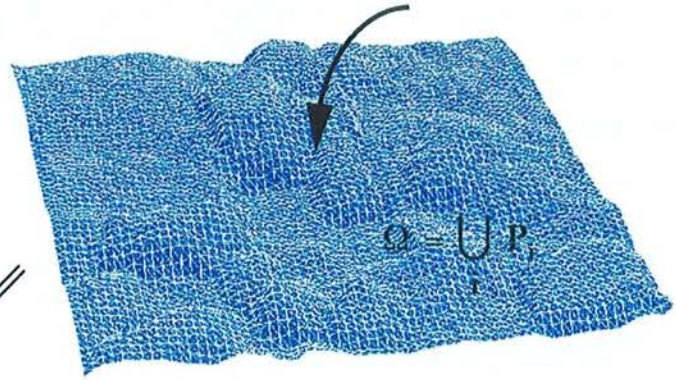


Image AFM initiale en niveaux de gris

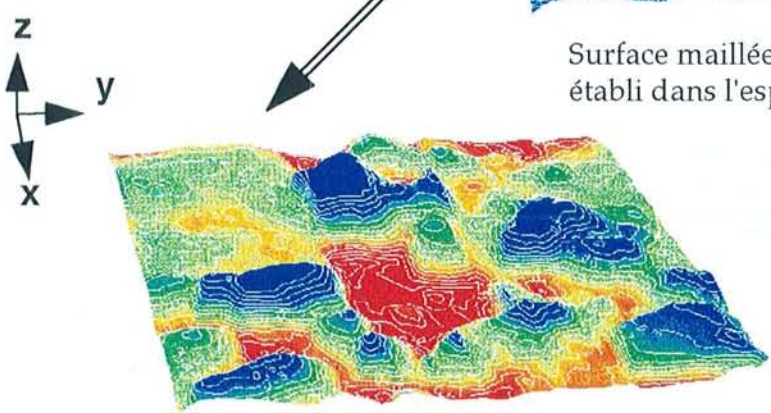
Filtrage & Conversion

$\forall \alpha \in \Omega \Rightarrow \{\varphi^{v}(\alpha)\}$



Surface maillée = objet mathématique établi dans l'espace (x,y,z)

Calcul & Interpolation



Cartographie de propriétés : hauteur, courbure, composition

Traitement mathématique des surfaces

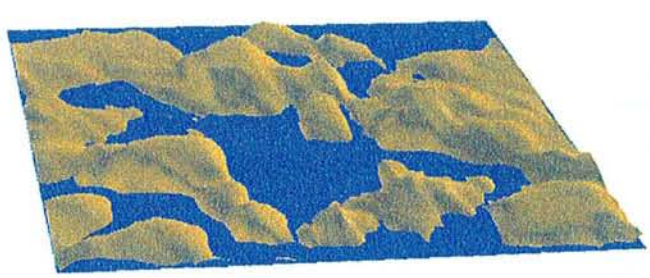


Planche M1 : Transformation et interprétation des images en GOCAD

2. Dynamique et réactivité de l'interface

a. Electrochimie :

Description de l'Electrode à Grains Fixés (E.G.F) :

Les études précédentes des processus chimiques et biologiques aux interfaces dans le système Thiobacilles-pyrite démontrent l'importance des états de surface transitoires ou permanents et du contact bactérie-minéral. Ces propriétés de surface dépendent notamment des caractéristiques cristallochimiques et électrochimiques du minéral. Par conséquent, les méthodes électrochimiques constituent des outils privilégiés pour l'étude des minéraux sulfurés (AMMOU-CHOKROUM *et al.*, 1978).

De nombreuses études ont été menées à l'aide d'électrodes massives inclues dans des résines époxy, sur des minéraux clivés et des surfaces parfaitement polies et nettoyées, en milieu alcalin (ZHU *et al.*, 1993) ou en milieu acide en présence ou non de bactéries (BRIEGLER ET SWIFT, 1979 ; PALANCIA *et al.*, 1990). Cependant, les propriétés physico-chimiques de ce type d'électrodes sont très différentes des propriétés des pyrites à l'état naturel. Ces surfaces polies idéales ne permettent pas d'étudier des phénomènes tels que la biolixiviation qui s'opère sur des surfaces hétérogènes couvertes de phases superficielles. Il était donc indispensable d'imaginer des électrodes pouvant être constituées de grains de sulfures à l'état naturel.

Parmi les techniques électrochimiques mises en oeuvre pour l'études de poudres, on peut citer l'électrode à pâte de carbone à composés éléctroactifs incorporés, utilisée pour étudier le comportement électrochimique de différents oxydes ou sulfures métalliques (LECUIRE, 1975 ; LAMACHE, 1977, ADRIAMANANA et LAMACHE, 1982). Malheureusement, cette méthode très performante pour l'étude du minéral seul, suppose le mélange des grains de sulfure à une pâte constituée de carbone et de silicone. Cela exclut toute étude en présence de Thiobacilles puisque les grains sont emprisonnés dans la pâte et donc inaccessibles aux micro-organismes.

Afin d'étudier le comportement électrochimique de la phase minérale au cours du cycle de biolixiviation, d'autres tentatives de construction d'électrodes particulières (électrodes en sachet) ont été entreprises dès 1991 (Mustin *et al.*, 1991). Le corps de l'électrode était constituée d'un fil de platine entouré d'un sac de toile en polyamide thermoscellé contenant des grains de pyrites broyés. Toutefois, cette électrode qui donnait entière satisfaction pour des suivis de potentiel libre en circuit ouvert au cours d'un cycle de biolixiviation, n'était pas suffisament sensible pour l'étude du comportement électrochimique, par voltamétrie cyclique, de l'interface sulfure-solution-bactérie.

La prise en compte de toutes ces remarques a permis de concevoir une Electrode à Grains Fixés (EGF) :

• constituée de grains de pyrites (environ 10 mg), représentatifs de la variabilité cristallographique et des états de surface du minéral à la granulométrie employée.

• possédant une surface de contact suffisament importante et une réactivité homogène afin de garantir une reproductibilité de fabrication et une sensibilité dans une large gamme de courant (du mA au nA/cm^2).

• permettant de contrôler le contact entre les grains de pyrite et les bactéries en solution.

L'électrode à Grains Fixés (Figure M.16) est donc composée d'un disque de platine sur lequel est disposée une couche de 1 à 2 mm d'une pâte constituée de graphite et d'huile de silicone (Lazaro *et al.*, 1995). Une couche de grains de pyrite est déposée sur cette pâte parfaitement conductrice dont le rôle est d'établir un contact quasi parfait entre les grains à analyser et le platine. Une première membrane de porosité choisie permet non seulement d'éviter le passage des grains en solution mais aussi de contrôler l'accès de la suspension bactérienne au minéral (une membrane de porosité 20 µm est perméable aux micro-organismes alors qu'une membrane de 0,22 µm ne l'est pas). Une seconde membrane, plus rigide et de porosité importante (> 100 µm) est appliquée contre la première afin de maintenir le tout en position.

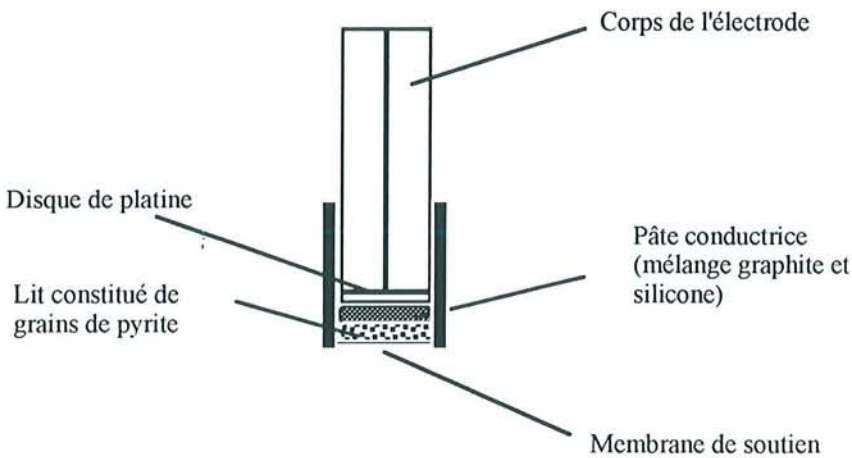


Figure M.16: Schéma de l'électrode à grains fixés (EGF)

Cette architecture permet de fabriquer très facilement des électrodes à partir de pyrites de différentes granulométries à l'état naturel ou après divers traitements de surface. Elle facilite aussi le suivi des propriétés électrochimiques d'une pulpe minérale au cours d'un cycle de biolixiviation : il suffit, en effet, de prélever une faible fraction de pulpe (quelques milligrammes) d'un réacteur en fonctionnement, de la sécher sous azote et de constituer l'électrode.

Conditions opératoires :

Le dispositif utilisé pour les études électrochimiques est constitué de (Figure M.17) :

• une électrode de travail composée de grains de pyrite (EGF), une électrode auxilliaire (fil de platine Ingold) et une électrode de référence au calomel saturé (E°/ENH = 245 mV à 25°C), plongeant dans un électrolyte faiblement agité (milieu M2 de culture des Thiobacilles à pH 1,8).

• un potentiostat/Galvanostat 20V/1A avec générateur de signaux incorporé PGP20 (système VoltalabTM)

• un ordinateur muni du logiciel pour l'électrochimie Voltamaster 1.

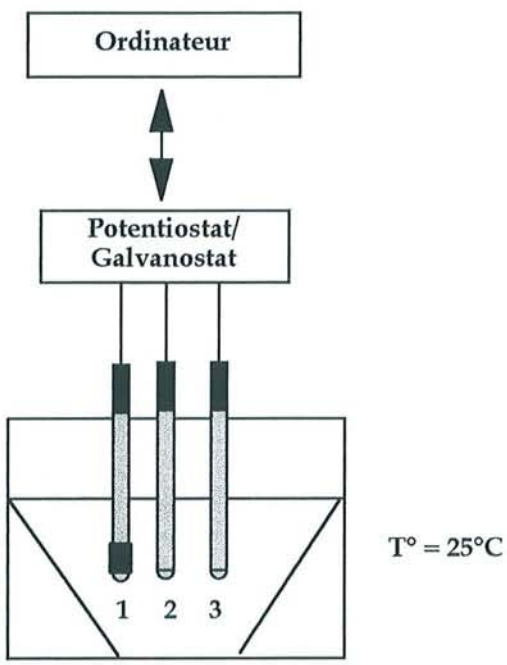


Figure M.17: Schéma général du dispositif d'électrochimie
(1) : électrode de travail ; (2) : électrode de référence ; (3) électrode auxiliaire

La surface de l'électrode de travail est calculée par pesée de la pyrite en considérant que les grains sont sphériques et de surface géométrique S :

$$S = \frac{6}{\rho \cdot d}$$

d : diamètre moyen (d = 40 μm pour la fraction 32-53 μm)

ρ : masse volumique de la pyrite sachant que :

ρ (Es 32-53 μm) = 4,5 g.cm^{-3} ρ (K4 32-53 μm) = 5,0 g.cm^{-3}

Les études préliminaires réalisées sur des électrodes à pâte de carbone en milieu acide montrent qu'en absence de minéral, le domaine d'électroactivité est relativement étendu (de -750 à 1250 mV/ECS) et que le courant résiduel est faible (ADRIAMANANA et LAMACHE,1982).

Les mesures en voltamétrie cyclique sont effectuées entre -500 mV/ECS et +700 mV/ECS avec une vitesse de balayage de 500 mV. mn^{-1}. Le balayage est initié du côté des potentiels décroissants (branche cathodique jusqu'à -500 mV) avant de décrire la branche anodique. Les principales réactions d'oxydoréduction rencontrées lors de l'étude électrochimique des pyrites sont les réactions faisant intervenir le couple Fe^{2+}/Fe^{3+} et les composés du soufre.

Le soufre peut présenter de nombreux états d'oxydation depuis l'état (-II) à l'état (+VI). Dans les conditions standart et en milieu acide, les seules espèces stables du soufre sont les sulfures, le soufre élémentaire et les sulfates. De nombreuses espèces métastables servent cependant d'intermédiaires lors de l'oxydation des sulfures (BOULEGUE, 1975 ; SEVEQUE, 1986) : les polysulfures, les sulfites, les polythionates et les thiosulfates. La présence de ces nombreuses espèces peut expliquer la complexité réactionnelle du système soufre-eau. Les réactions cathodiques faisant intervenir les composés soufrés entre -100 et -500 mV/ECS sont donc très difficiles à déterminer. La tendance des atomes de soufre à s'associer par liaisons covalentes pour former des chaînes ou des anneaux (S_8), ainsi que l'existence de différentes variétés allotropiques des composés soufrés peuvent expliquer les déplacements observés sur certains pics dans les voltamogrammes.

b. Suivi d'un réacteur de biolixiviation

Il est indispensable de pouvoir corréler la variation des paramètres en solution et l'évolution de l'état de surface du minéral pour appréhender les mécanismes de biolixiviation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans*. Cet exercice suppose l'utilisation d'une grande partie des techniques développées dans les paragraphes précédents.

Analyses en solution :

Le témoin majeur du bon déroulement de la biooxydation est le développement de la population bactérienne. Son évolution est déterminée par mesure de la concentration des cellules en suspension. Un comptage direct est effectué au microscope optique en cellule de Thoma. La solution prélevée est filtrée sur un préfiltre en fibres de verre (de porosié 1 µm) afin de la débarasser des précipités de sulfates ferriques qui pourraient gêner la mesure, puis diluée de façon à obtenir environ 2 à 8 bactéries par champ élémentaire.

L'évolution des quantités de fer total et de sulfates en solution permet de suivre la cinétique de dissolution du sulfure. Les dosages sont effectués sur des prélèvements de 0,5 ml, filtrés sur

préfiltres en silice puis dilués dans de l'acide chlorhydrique normal avant d'être analysés en spectrométrie d'émission ICP (paragraphe II-1-a).

L'acidification du milieu engendrée par l'activité bactérienne est suivie par des mesures régulières du pH en solution.

L'équilibre entre les ions ferreux et ferriques est estimées par des mesures du potentiel redox de la solution lixiviante ainsi que par détermination de la concentration en ions ferreux, dosés par colorimétrie au 2-2'bipyridyl (se reporter au paragraphe II-1-a pour la description de la méthode).

Analyses sur le minéral :

Des prélèvements de pulpes sont effectués à intervalles de temps réguliers au cours de la biolixiviation. Les échantillons extraits du réacteur sont soigneusement séchés sous atmosphère inerte (azote U) en vue d'analyses immédiates ou cryogénisés par trempe dans l'azote liquide afin de stabiliser les états de surface en vue d'analyses complémentaires ultérieures.

Les principales analyses réalisées sur le minéral sont les suivantes :

- extraction à l'eau ultrapure puis dosage du fer total de surface soluble (souvent associé à des sulfates)
- extraction dans l'hexane ou le méthanol puis dosage en GC-MS du soufre élémentaire de surface.
- réalisation d'une Electrode à Grains de pyrite Fixés et analyse de la réponse électrochimique du minéral en voltamétrie cyclique.
- réalisation de spectres en spectroscopies XPS et Raman.

CONCLUSION :

Les travaux antérieurs réalisés sur le système Thiobacille/Pyrite ont démontré l'importance de la réactivité de l'interface minéral-bactérie-solution dans le contrôle des cinétiques d'oxydation bactérienne. La complexité et l'hétérogénéité de cet interface et de son évolution au cours du cycle de biolixiviation nécessite l'utilisation conjointe de nombreuses techniques d'analyse de surface (spectroscopies Raman et XPS, dosages du fer et du soufre de surface, dosages en solution...). Malheureusement, le degré informatif souvent insuffisant de ces techniques globales et "aveugles" ne permet pas d'aboutir aisément à un modèle physico-chimique réaliste du système. Le recours à la Microscopie à Force Atomique (AFM) semble alors judicieux pour la visualisation et l'analyse locale des états de surface. Cette technique constitue une base de raisonnement qui, couplée à toutes les méthodes classiques d'analyse des surface et des solutions, permettra de proposer un véritable modèle morpho-chimique de l'interface.

Chapitre I

CARACTERISATION CHIMIQUE DE LA SURFACE DES PYRITES

Chapitre I

CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SURFACE DES PYRITES

Les études précédentes réalisées sur le système *Thiobacillus*/Pyrite ont mis en évidence l'importance des processus aux interfaces dans les cinétiques d'oxydation bactérienne des sulfures. Certains composés de surface, comme le soufre élémentaire semblent avoir un effet catalytique sur la biolixiviation (MUSTIN *et al.*, 1993b). Cependant, si une relation causale entre l'adhésion des bactéries, le développement des figures de corrosion et l'apparition de phases oxydées en surface est souvent supposée, les liens précis entre ces différents événements ne sont jamais démontrés. Pour mieux saisir la complexité des processus à l'interface, il est indispensable d'obtenir dans un premier temps une représentation réaliste de la surface de la pyrite à l'état naturel. Cette étape préliminaire nécessite la mise en œuvre et le couplage de techniques variées, afin de déterminer à la fois la nature chimique et la quantité des composés présents à la surface du minéral.

L'analyse qualitative de la surface est réalisée à l'aide de techniques spectroscopiques (XPS, RAMAN) ou électrochimiques (voltamétrie cyclique). Employées directement sur des poudres, ces techniques moyennent, en général, le signal de surface provenant d'un ensemble de grains minéraux et renseignent difficilement sur les quantités des composés de surface présentes. La difficulté d'une approche quantitative croit d'autant plus que les composés de surface ne sont plus organisés en couches ou structures régulières ou qu'ils se distribuent de façon hétérogène.

Ainsi, dans cette étude, l'analyse quantitative précise des composés de surfaces s'appuiera sur le couplage de méthodes d'extraction sélective dans différents éluants aqueux ou solvants organiques avec des techniques d'analyse minérale (ICP-ES) ou organiques (GC-MS).

Les pyrites Es et K (fraction 32-53µm) ont déjà été caractérisées par différentes techniques spectroscopiques dans des travaux antérieurs (MUSTIN, 1992) et des phases superficielles oxydées du fer et du soufre (oxydes et oxyhydroxydes de fer, sulfates ferriques et soufre élémentaire) ont pu être

mises en évidence sur ces deux pyrites à l'état naturel. Cependant, au contact ou non avec une atmosphère non inerte, la surface très réactive des sulfures peut rapidement évoluer et il convient de caractériser leurs nouveaux états de surface.

Deux états d'oxydation différents seront considérés :

(i) l'état naturel du minéral, résultant de son oxydation progressive à l'air après broyage. Cette caractérisation initiale permet d'avoir une représentation des stades avancés d'oxydation chimique de deux pyrites différentes dans des conditions d'oxydation non contraintes et abiotiques.

(ii) l'état autoclavé, correspondant à l'état initial des surfaces des grains de pyrite en début de biolixiviation avant l'inoculation du réacteur par *Thiobacillus ferrooxidans*. Par l'apport d'une quantité de chaleur (120°C, 2 bars), l'autoclavage peut modifier de façon importante les caractéristiques superficielles du sulfure et donc du premier "interlocuteur" de la bactérie dans l'initiation du cycle de biolixiviation.

I. ETUDE DES PYRITES PAR SPECTROSCOPIE DE PHOTO-ELECTRONS X :

Les orbitales atomiques considérées dans cette étude sont celles du carbone, de l'oxygène, du soufre et du fer : C(1s), O(1s), $Fe(2p)_{3/2}$ et S(2p). Chaque orbitale est décomposée de façon à déterminer l'environnement chimique des espèces atomiques étudiées. La méthode de décomposition appliquée pour les orbitales C(1s), O(1s) et S(2p) est une méthode non linéaire au sens des moindres carrés. L'orbitale atomique du soufre S(2p) est décomposée à l'aide d'un doublet représentant le couplage spin-orbite des orbitales $S(2p)_{3/2}$ et $S(2p)_{1/2}$. Seule la position du pic $S(2p)_{3/2}$ est décrite, puisque le pic $S(2p)_{1/2}$ est toujours distant du premier de 1,2 eV (vers les energies croissantes), et que son aire représente précisément la moitié de l'aire de $S(2p)_{3/2}$.

Une technique de décomposition particulière est utilisée pour l'orbitale du fer. En effet, le pic représentant l'orbitale atomique $Fe(2p)_{3/2}$ est asymétrique. Il résulte du produit de convolution d'une fonction gaussienne (G) et une fonction lorentzienne (L) avec une fonction d'asymétrie (A) :

$$\mathbf{Pic = G \circ L \circ A}$$

où $A \approx \frac{1}{e^{1-\alpha}}$ et α est un paramètre ajustable

Le modèle utilisé pour sa décomposition est celui de DONIACH et SUNJIC. Il permet de tenir compte de la densité d'états au niveau de Fermi ainsi que d'un couplage spin-orbite relativement important pour les métaux de transition à caractère para-magnétique comme le fer.

Après déconvolution de chaque orbitale atomique, la contribution des espèce chimiques mises en évidence est donnée par rapport au pic total de l'orbitale considérée (% du Pic). La contribution de

chaque espèce au signal XPS global peut également être estimée (% Total) en utilisant l'aire du pic, corrigée d'un facteur de sensibilité (Scofield, 1976) afin de tenir compte de la section efficace de chaque espèce atomique. Les facteurs de sensibilité utilisés pour chaque type d'atome sont les suivants :

Elément	Facteur de sensibilité
C(1s)	1
$Fe(2p)_{3/2}$	0,17
$S(2p)_{3/2}$	0,98
O (1s)	0,38

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

1. Les pyrites autoclavées

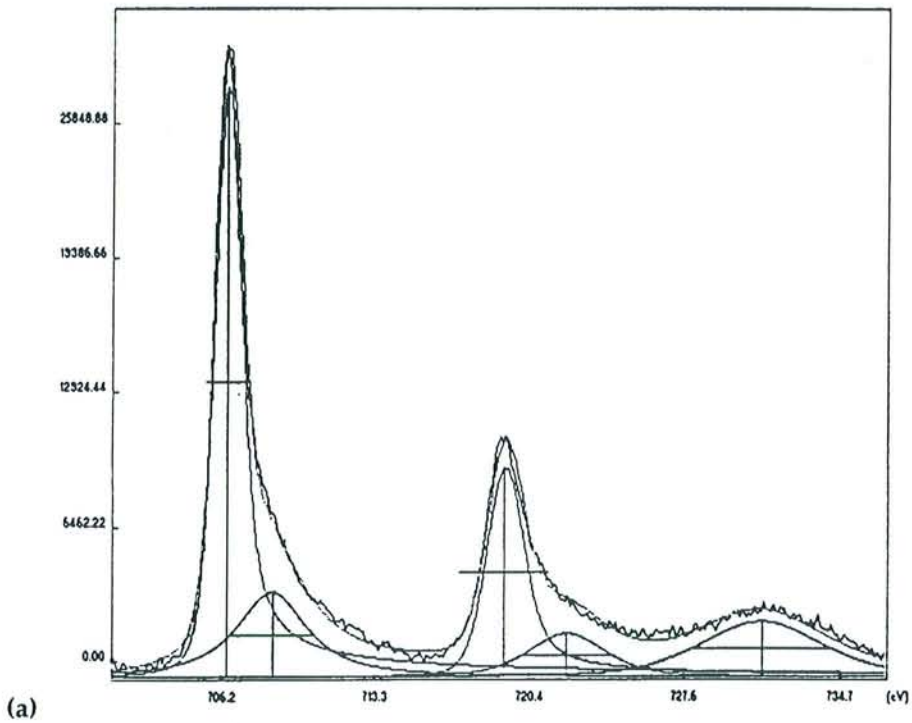
Après une étape de séchage sous azote, les pyrites Es et K autoclavées dans le milieu de culture M2 sont analysées en XPS. Bien que le contact des poudres avec l'atmosphère du laboratoire ne puisse être totalement évité (transfert et fixation des échantillons), la réooxydation est sans doute limitée. Les résultats des analyses sont résumés dans le Tableau I.1.

Tableau I.1 : Analyse XPS des pyrites K et Es autoclavées (fraction granulométrique 32-53µm) .

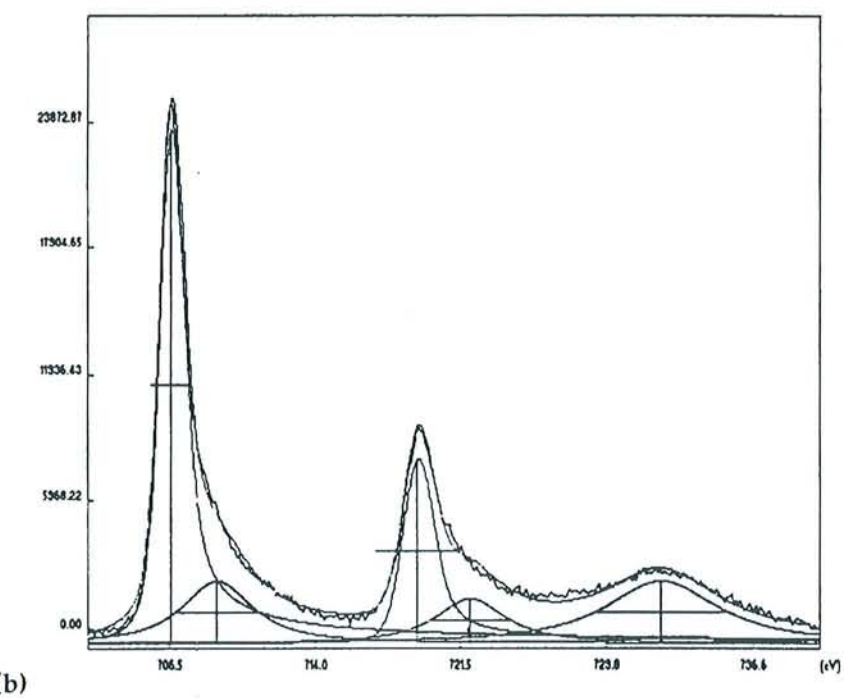
Orbitale	Energie de Liaison (eV)		% Pic		%Total		Attribution
	K	Es	K	Es	K	Es	
C(1s)	284,6	284,6	74,2	71	21,1	21,9	C-C, C-H
	286,1	286,0	18,1	19,8	5,2	6,1	C-O
	287,8	287,1	7,7	9,2	2,2	2,8	C=O
Σ C(1s)			***100***	***100***	***28,5***	***30,9***	
O(1s)	532,3	532,6	100	78,4	15,7	13,6	C-O, C=O
		534,7		21,6		3,8	C=O
Σ O(1s)			***100***	***100***	***15,7***	***17,4***	
$Fe(2p)_{3/2}$	707,3	707,3	100	100	15,6	13,8	FeS_2
Σ $Fe(2p)_{3/2}$			***100***	***100***	***15,6***	***13,8***	
$S(2p)_{3/2}$	162,5	162,5	83,5	83,1	33,5	31,4	FeS_2
	164	164,1	16,5	16,9	6,5	6,4	Polysulfures ou S°
Σ$S(2p)_{3/2}$			***100***	***100***	***40***	***38***	

La décomposition des orbitales $Fe(2p)_{3/2}$ pour les deux pyrites autoclavées met en évidence une seule espèce du fer (Figure I.1). Le pic est centré sur 707,3 eV : il s'agit du disulfure de fer FeS_2. Comme aucun pic n'est détecté aux énergies de liaisons supérieures, les deux échantillons de pyrite autoclavée ne présentent pas d'espèce oxydée du fer. D'autre part, la décomposition de

l'orbitale S(2p) ne met en évidence aucune espèce oxydée du soufre dont les pics se situeraient entre 166 et 169 eV.



(a)



(b)

Figure I.1 : Déconmposition de l'orbitale Fe(2p)du fer selon le modèle de DONIACH et SUNJIC.
(a) : Pyrite Es (32-53µm) autoclavée dans le milieu M2. Le déplacement est de -1,1 eV par rapport à l'orbitale C1s du carbone (284,6).
(b) : Pyrite K (32-53µm) autoclavée dans le milieu M2. Le déplacement est de -0,8 eV par rapport à l'orbitale C1s du carbone (284,6).

Par conséquent, les pyrites autoclavées ne présentent pas de phases superficielles oxydées. L'autoclavage agit sur la surface comme un décapage efficace.

Cependant, le pic représentant l'orbitale S(2p) du soufre est relativement large et sa décomposition ne peut être satisfaisante sans la faible contribution d'un doublet supplémentaire dont le pic $S(2p)_{3/2}$ se situerait vers 164 eV (Figure I.2).

PRATT (1994) attribue ce signal à du soufre élémentaire présent à la surface sous sa forme cyclique S_8. BUCKLEY et WOODS (1985) précisent pourtant que la détection en XPS du soufre élémentaire est délicate en raison du vide poussé qui règne dans la chambre de mesure et qui pourrait entrainer sa sublimation. L'existence de soufre élémentaire sur les échantillons étudiés est cependant envisageable puisque la platine porte-échantillons a été refroidie à -100°C de façon à éviter ce phénomène.

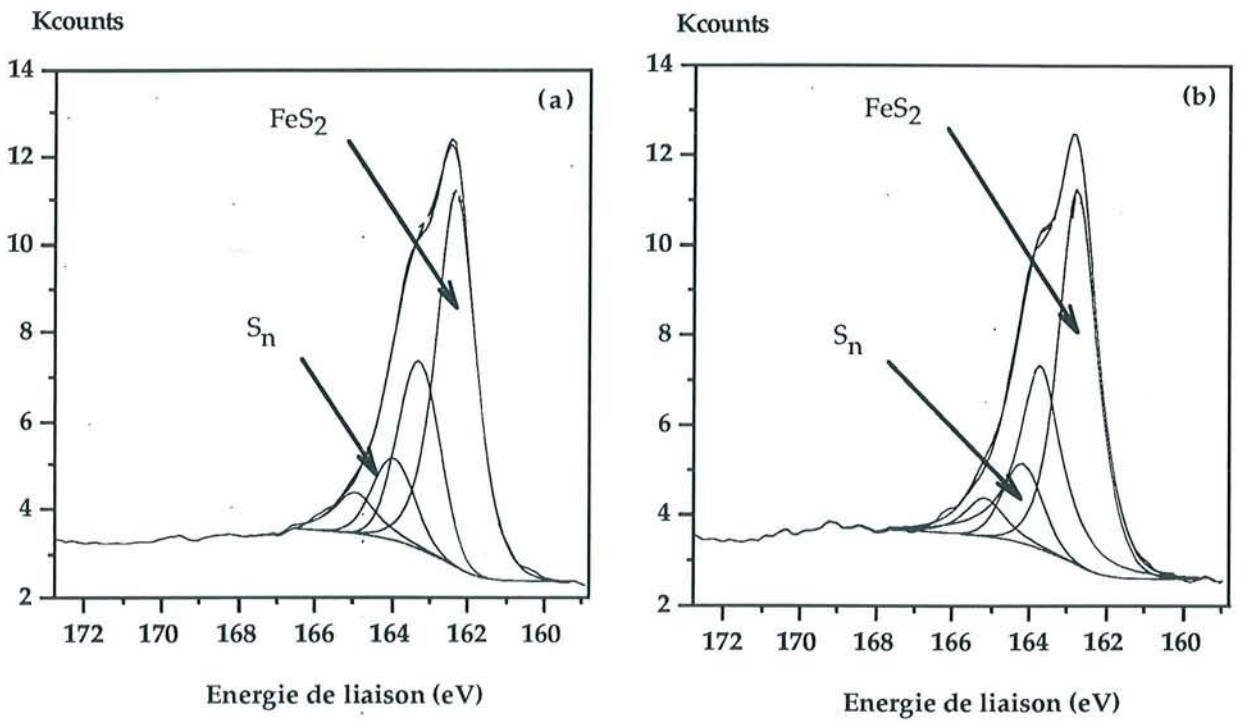


Figure I.2 : Décomposition de l'orbitale S(2p) du soufre
(a) Pyrite Es autoclavée (b) Pyrite K autoclavée

Le soufre élémentaire avait d'ailleurs été mis en évidence par de DONATO *et al.* (1993) sur les pyrites Es et K à l'état naturel, par une méthode chromatographique d'extraction au méthanol.

La Spectroscopie de Photoélectrons X analysant les 2 à 3 premières couches atomiques d'une surface, peut, en outre, apporter des renseignements sur le pourcentage de surface recouvert par des phases oxydées. Dans le cas des pyrites autoclavées, la fraction de signal attribuée aux molécules de soufre élémentaire peut être estimée à partir de la contribution de l'aire du pic à 164 eV au signal total

enregistré, après correction par le facteur de Scofield et en considérant le soufre sous sa forme octaédrique S_8.

La contribution du soufre élémentaire au signal total XPS est identique pour les deux pyrites, et représente **5%** des molécules analysées.

Les échantillons analysés présentent un pourcentage important de carbone et d'oxygène. Cependant, la déconvolution des orbitales $Fe(2p)_{3/2}$ et S(2p) montre que l'oxygène détecté n'est pas associé au fer ou au soufre. Il est lié au carbone par des liaisons covalentes simples ou doubles. Il est possible de calculer le rapport C/O à partir du rapport des aires totales des deux pics, corrigées du facteur de Scofield (Tableau I.2) :

Tableau I.2 : Rapport des aires totales corrigées (par le facteur de Scofield) des pics C1s et O1s pour les pyrites autoclavées.

	K (32-53 µm)	Es (32-53 µm)
Rapport C/O	1,81	1,77

Ce rapport est constant (proche de 1,8) pour les échantillons de pyrites autoclavées. L'origine exacte de ces molécules riches en carbone et en oxygène reste à déterminer. Une analyse CHN réalisée sur la pyrite K à l'état naturel met en évidence un pourcentage de carbone non négligeable (0,07%). Pour préciser la nature de cette pollution, une extraction (type SOXHLEY) dans un solvant non polaire (hexane ou chloroforme) a été effectuée. Après concentration, l'extrait a été analysé en Chromatographie Gazeuse associée à la Spectroscopie de Masse (GC-MS). Le chromatogramme obtenu comporte de nombreux pics (Figure I.3) dont la décomposition, à l'aide des spectres de masse, met en évidence la présence de très nombreuses espèces organiques, aromatiques et polyaromatiques (type hydrocarbures), et de résidus biologiques divers (vitamine E, acides gras). Cette pollution peut avoir diverses origines : le matériel de départ (minéral avant broyage), les corps broyants, les composés présents dans l'atmosphère du laboratoire. Il est très difficile, en effet, de prémunir les surfaces fraîchement broyées de toute pollution organique.

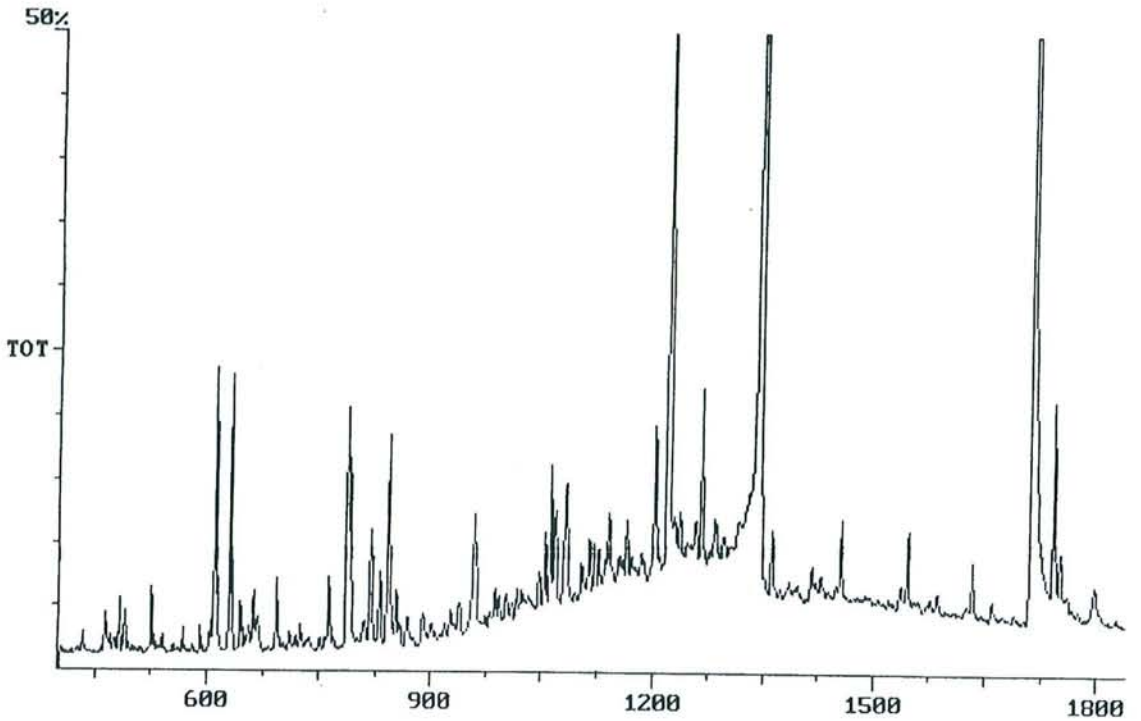


Figure I.3 : Chromatogramme de désorption des pyrites Es et K dans le chloroforme.

2. Les pyrites à l'état naturel :

Comme pour les pyrites autoclavées, les analyses XPS, CHN et GC-MS mettent en évidence une quantité importante de carbone de pollution. Or, seulement une fraction de l'oxygène détecté provient de cette contamination. En se basant sur les résultats obtenus pour les pyrites autoclavées où la totalité de l'oxygène est associé au carbone dans des molécules de pollution diverses, on considère que le rapport entre le carbone et l'oxygène de pollution C/O_{pol} pour les pyrites à l'état naturel est constant et égal à 1,8 (Tableau I.2):

$$C/O_{pol} = 1,8$$

Par conséquent, pour évaluer la proportion d'oxygène de pollution dans les pyrites à l'état initial, on divise la contribution totale du carbone par 1,8. Le reste de l'oxygène entre dans la composition des produits oxydés du fer et du soufre.

Pour les pyrites à l'état naturel, seules les orbitales $Fe(2p)_{3/2}$ du fer et $S(2p)_{3/2}$ du soufre sont détaillées.

a. Pyrite K (32-53 µm) :

La décomposition de l'orbitale S(2p) du soufre met en évidence trois espèces (Tableau I.3) : Le disulfure à 162 eV, le soufre élémentaire à 163,9 eV et les sulfates à 168,2 eV.

L'orbitale $Fe(2p)_{3/2}$ du fer est le résultat de la composition de trois pics : le pic caractéristique de FeS_2 à 707,7 eV, un pic à 710,6 eV qui correspond à du fer ferrique lié à de l'oxygène (il peut s'agir d'oxydes, d'hydroxydes ou d'oxyhydroxydes) et un pic plus large centré sur 713,2 eV correspondant à des sulfates ferriques $Fe_2(SO_4)_3$.

Tableau I.3 : Décomposition des orbitales Fe2p(3/2) du fer et S2p du soufre pour la fraction granulométriques 32-53 µm de la pyrites K à l'état naturel.

Orbitales	Energie de Liaison (eV)	% Pic	% Total	Attribution
	707,7	39,9	5,6	FeS_2
$Fe(2p)_{3/2}$	710,6	24,9	3,5	Fe(III)-O, Fe(III)-OH ou Fe(III)-OOH
	713,2	35,2	5	$Fe_2(SO_4)_3$
$\Sigma Fe(2p)_{3/2}$		***100***	***14,1***	
	162	42,5	14,6	FeS_2
$S(2p)_{3/2}$	163,9	6,7	2,3	Polysulfures ou S°
	168,2	50,8	17,4	$Fe_2(SO_4)_3$
$\Sigma S(2p)_{3/2}$		***100***	***34,3***	

Il est possible, à partir de ces résultats, d'estimer le taux de recouvrement des différents composés oxydés du fer et du soufre. En déterminant la contribution du minéral FeS_2 au signal XPS total (43 %), il apparait que les phases superficielles représentent environ 57 % des molécules analysées. La proportion de soufre élémentaire est très faible puisqu'il ne représente que 3 % des molécules détectées (si on considère qu'une molécule est formée de 8 atomes de soufre).

b. Pyrite Es (32-53 µm) :

La décomposition de l'orbitale S(2p) du soufre met en évidence les mêmes espèces que sur la pyrite K (Tableau I.4) : le disulfure FeS_2 à 162,2 eV, du soufre élémentaire ou des polysulfures à 163,6 eV et les sulfates à 168,6 eV. L'étude de l'orbitale $Fe(2p)_{3/2}$ du fer est cependant très différente. Il est impossible de décomposer cette orbitale avec un pic à 710,6 et un pic à 713,2, comme pour la pyrite K. Le seul pic d'espèce oxydées du fer qui peut être envisagé est centré sur 711,2 eV. Il est attribué à des sulfates ferreux hydratés (BRION, 1980). La composante à 714,4 eV est un satellite, mis en évidence sur des pyrites de même origine (ERRE *et al.*, 1988 ; De DONATO *et al.*, 1993). Aucune phase de type oxyde ou hydroxyde de fer n'a pu être précisément mise en évidence.

Tableau I.4 : Décomposition des orbitales $Fe(2p)_{3/2}$ du fer et S(2p) du soufre pour la fraction granulométriques 32-53 µm de la pyrites Es à l'état naturel.

Orbitales	Energie de Liaison (eV)	% Pic	% Total	Attribution
	707,9	24,7	4,2	FeS_2
$Fe(2p)_{3/2}$	711,2	51,6	8,6	$FeSO_4$ majoritaire (+ Fe-O ?)
	714,4	23,7	4	Satellite (Erre *et al.*, 1988)
$\Sigma\, Fe(2p)_{3/2}$		*100*	*16,8*	
	162,2	26,8	8,6	FeS_2
$S(2p)_{3/2}$	163,6	18,1	5,8	Polysulfures ou S°
	168,6	55,1	17,8	Sulfates
$\Sigma\, S(2p)_{3/2}$		*100*	*32,2*	

Une estimation du pourcentage de signal attribué à l'ensemble des phases oxydées du fer et du soufre montre que la pyrite Es (32-53 µm) est plus couverte de produits d'oxydation que la pyrite K (Tableau I.5). En effet, la fraction du signal attribué au minéral pur FeS_2 n'est que de 25 % (contre 43 % pour la pyrite K).

Tableau I.5 : Estimation du pourcentage de signal attribué aux différentes formes oxydées du fer et du soufre pour les pyrites Es et K (32-53 µm) à l'état naturel. Les pourcentages sont calculés à partir de l'aire des pics corrigée par les facteurs de Scofield correspondants.

	FeS_2 (%)	Composés oxydés du fer + sulfates (%)	S_8 (%)
Pyrite K (32-53 µm) état naturel	43	54	3
Pyrite Es (32-53 µm) état naturel	25	71	4

Conclusion

La spectroscopie XPS est une technique d'analyse des couches les plus superficielles de la surface. La détermination précise de la nature des espèces oxydées présentes à la surface des sulfures est difficile puisqu'elle est conditionnée par la déconvolution des orbitales atomiques en différents pics unitaires. Cet exercice est délicat et ne garantit pas l'unicité de la décomposition.

Si la position des pics peut généralement être effectuée de façon assez précise, leur attribution à des espèces chimiques bien déterminées peut poser des problèmes. En effet, la correspondance, dans les différentes orbitales, entre les aires des pics des différents atomes associés dans des structures covalentes (respect de la stoechiométrie) est parfois peu satisfaisante. Il est possible cependant de considérer les composés oxydés dans leur ensemble et d'estimer le pourcentage du signal total qu'ils représentent. Ce résultat est essentiel pour parvenir à l'élaboration d'un modèle de distribution

spatiale des produits d'oxydation à la surface des pyrites. Les principaux résultats concernant cete étude sont résumés ci-dessous :

(i) A l'état naturel, la pyrite Es est plus couverte de phases superficielles que la pyrite K. Le signal XPS dû au minéral pur FeS_2 représente 43% du signal total pour la pyrite K alors que sa contribution n'est que de 25% pour la pyrite Es.

(ii) La fraction de soufre élémentaire S_8 "visible" en XPS est équivalente sur les deux pyrites à l'état naturel ou autoclavé (3% des molécules analysées pour le minéral à l'état naturel et 5% pour le minéral autoclavé).

(iii) L'autoclavage a pour effet de débarasser la pyrite de la plupart des espèces oxydées du fer et du soufre. Même les oxyhydroxydes de fer, peu solubles en milieu aqueux dans les conditions standard de température et de pression sont "décrochés" de la surface du minéral. Seule une fraction du soufre élémentaire reste en surface (5% des molécules analysées).

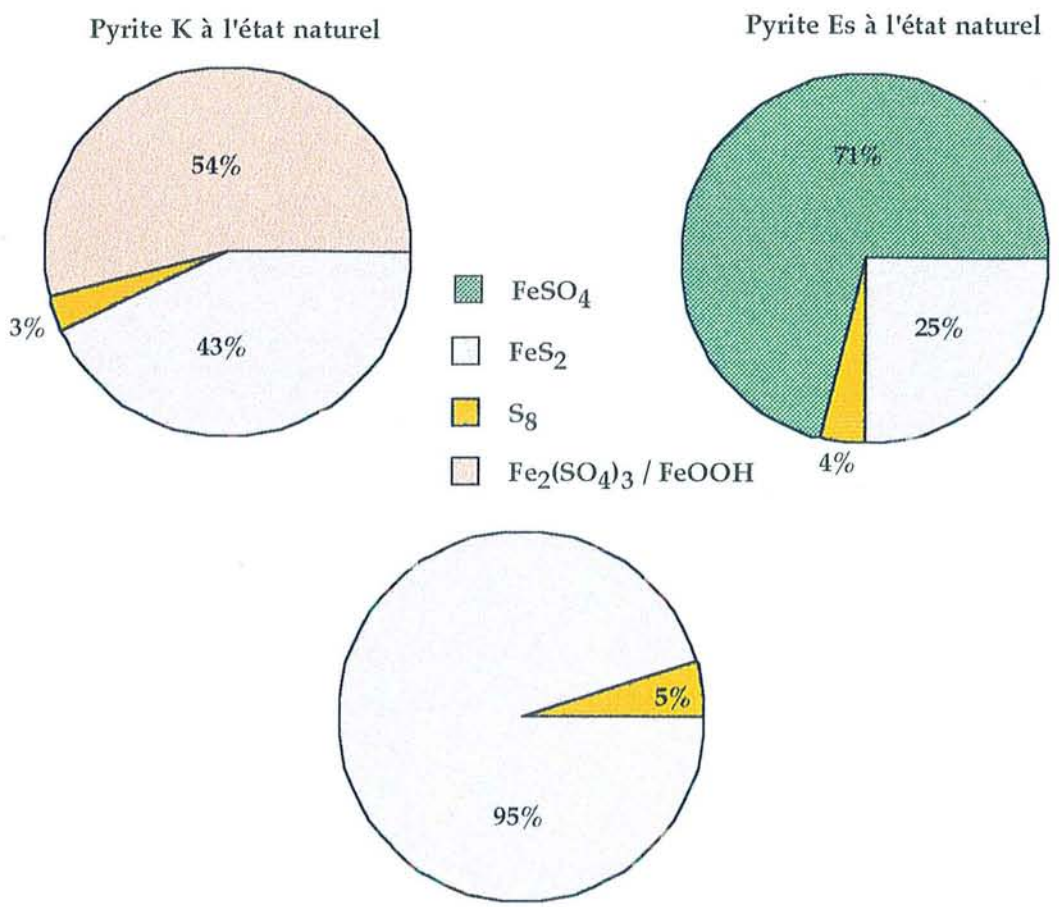


Figure I.4 : Contribution des différentes espèces chimiques au signal XPS total.

II. ETUDE DES PYRITES PAR SPECTROSCOPIE RAMAN :

La spectroscopie XPS a permis de réaliser l'analyse des dix premiers angstrÖms de la surface des pyrites. Cette analyse peut être considérée comme une projection ou une représentation 2D de la surface de l'échantillon. Elle apporte donc des informations sur la nature des phases superficielles "apparentes" ainsi que sur le pourcentage global et statistique de surface minérale qu'elles recouvrent.
La spectroscopie Raman est destinée à compléter cette approche puisque la profondeur d'analyse de l'échantillon est cent fois plus importante. Le microscope optique confocal couplé au spectromètre Raman permet de visualiser et de choisir les zones des grains à analyser et d'y focaliser le faisceau laser (1 µm ø).

1. Les Pyrites autoclavées :

La symétrie du cristal de pyrite est décrite par le groupe d'espace T_h. Les 36 représentations dimensionnelles du groupe T_h, générées par le déplacement des atomes dans la maille élémentaire, peuvent être décomposées en représentations irréductibles (tenseurs):

$$\Gamma = A_g \oplus E_g \oplus 3\,T_g \oplus 2\,A_u \oplus 2\,E_u \oplus 6\,T_u$$

L'un des modes T_u correspond aux translations du réseau. La décomposition en représentations irréductibles pour les mouvements de vibration est donc la suivante :

$$\Gamma_{vib} = A_g \oplus E_g \oplus 3\,T_g \oplus 2\,A_u \oplus 2\,E_u \oplus 5\,T_u$$

Les modes de vibration actifs en Raman sont A_g (totalement symétrique), E_g (doublement dégénéré) et les trois modes T_g (triplement dégénérés).
Les fréquences de ces cinq phonons sont les suivantes :

Tableau I.6 : Fréquences des cinq phonons du disulfure FeS_2 actifs en Raman.

Mode de symétrie	Fréquences (cm^{-1})
Ag	379
Tg	377
Eg	343
Tg	350
Tg	430

L'observation préalable des grains de pyrites autoclavés au microscope optique permet de constater que tous les grains de pyrite K ont un aspect brillant et lisse. En revanche, la pyrite Es a un éclat moins prononcé.

Les nombreux spectres réalisés sur la pyrite Es permettent de mettre en évidence trois composés seulement (Figure I.5) :

- Le disulfure FeS_2 dont les modes Ag et Eg (pics situés respectivement à 379 cm^{-1} et 343 cm^{-1}) sont particulièrement intenses.
- Le soufre élémentaire S_8 dont les vibrations d'élongation (474 cm^{-1}) ainsi que les vibrations de déformation sont bien marquées à 152 et 215 cm^{-1}.
- Les polysulfures S_n^{2-} dont le pic caractéristique est peu intense et situé à 466 cm^{-1}. La quantité de polysulfures détectés semble donc très faible.

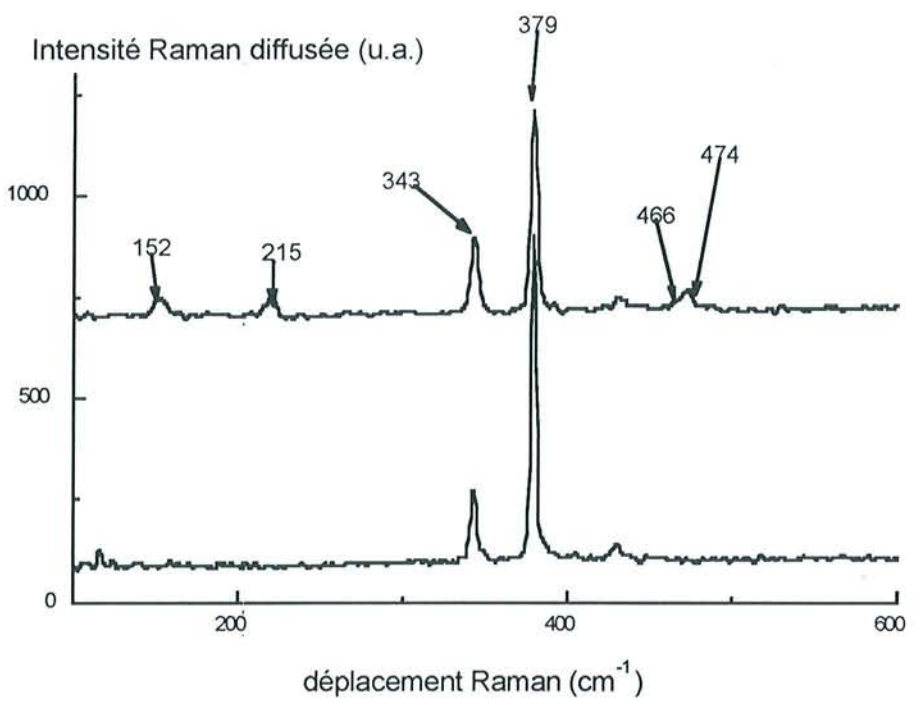


Figure I.5 : Spectre Raman de la pyrite Es autoclavée.

En revanche, sur la pyrite K, malgré l'investigation de nombreuses zones pour trouver des composés soufrés (S_8 et S_n^{2-}), la seule signature spectrale détectée est celle du disulfure FeS_2 (pics situés à 379 et 343 cm^{-1}) (Figure I.6).

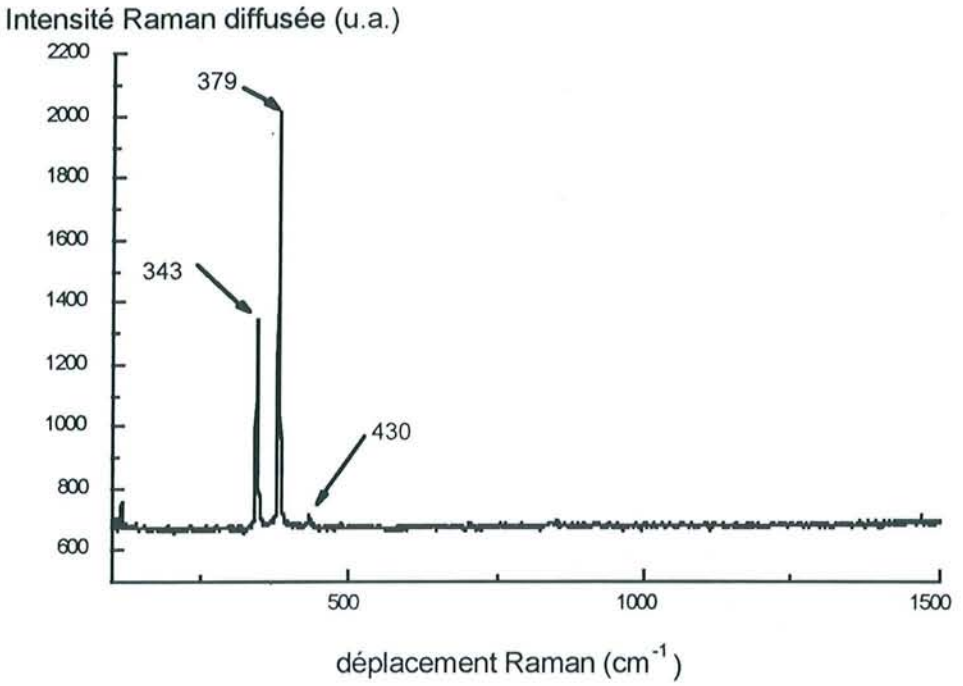


Figure I.6 : Spectre Raman de la pyrite K autoclavée.

La non-adéquation de ce résultat avec les analyses effectuées en spectroscopie XPS sur les pyrites autoclavées suppose une organisation différente du soufre à la surface des deux pyrites. En effet, l'XPS avait mis en évidence le même pourcentage de molécules de soufre élémentaire S_8 sur les deux minéraux autoclavés. Si l'on admet que la répartition des molécules S_8 sur la surface de Es est régulière, la probabilité pour le faisceau laser de rencontrer ce composé est élévée. En revanche, si une même quantité de molécules est regroupée sur une même zone du grain, la probabilité d'y focaliser le faisceau laser devient très faible. Cette configuration pourrait expliquer la non adéquation des deux résultats spectroscopiques.

2. Les pyrites à l'état naturel :

a. La pyrite K :

L'observation préalable et générale de l'échantillon au microscope met en évidence des zones d'aspect très différent sur un même grain de pyrite. Certaines parties des grains sont brillantes et lisses, alors que d'autres semblent recouvertes d'amas opaques et non réfléchissants de forme assez régulière et de base presque géométrique. La focalisation du faisceau laser sur ces deux types de surface en donne une signature spectrale totalement différente (Figure I.7a et I.7b). L'analyse statistique d'un grand nombre de grains confirme l'existence exclusive de ces deux allures spectrales.

Le premier type de spectre est obtenu en focalisant le laser sur une partie brillante du grain. Il comporte les pics fins et intenses du disulfure FeS_2 : le mode Ag centré sur 379 cm^{-1}, le mode Eg à 343 cm^{-1} et le mode Tg très atténué vers 430 cm^{-1}. Un seul autre pic, peu intense, situé à 1020 cm^{-1} atteste de la présence d'une faible quantité de sulfates de fer dans un environnement chimique bien déterminé.

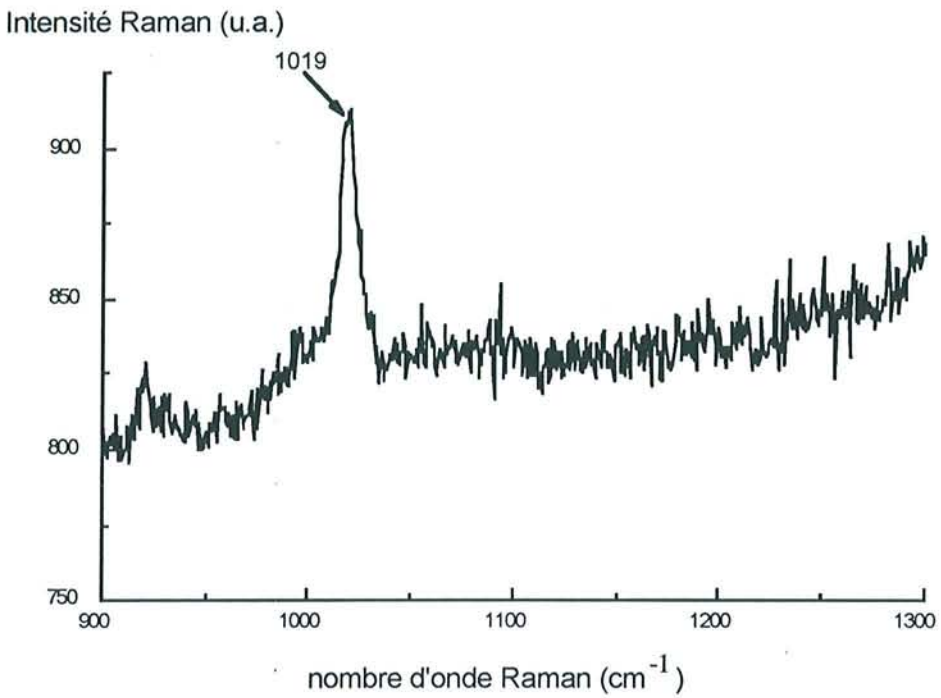


Figure I.7a : Premier type de spectre Raman enregistré sur la pyrite K.

Le deuxième type de spectre résulte de l'analyse de l'un des amas opaques repérés de façon systématique sur l'ensemble des grains. Le nombre de pics est beaucoup plus important. Outre ceux du disulfures à 380 et 340 cm-1, il comporte la signature de nombreuses espèces chimiques :

- Les sulfates sont abondants et leur environnement est complexe. Les deux bandes totalement symétriques (très prononcée à 1020 et beaucoup plus faible à 995 cm^{-1}) attestent de la présence de deux sulfates différents dont l'un possède une forte levée de dégénérescence marquée par la présence de pics à 1080, 1100 et 1125 cm^{-1}. Cette perte de la symétrie tétraédrique est confirmée par la présence d'un doublet à 602 et 622 cm^{-1}.
- Les deux pics centrés sur 230 et 290 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration des molécules d'oxyhydroxydes de fer FeOOH (ou Fe_2O_3).
- La bande située entre 460 et 480 cm^{-1} est formée de deux composantes : les vibrations d'élongation des molécules de soufre élémentaire octaédrique S_8 (pics à 150, 210 et 475 cm^{-1}) et une contribution plus importante, à 466 cm^{-1}, des modes de vibration des polysulfure S_n^{2-} (n variable).

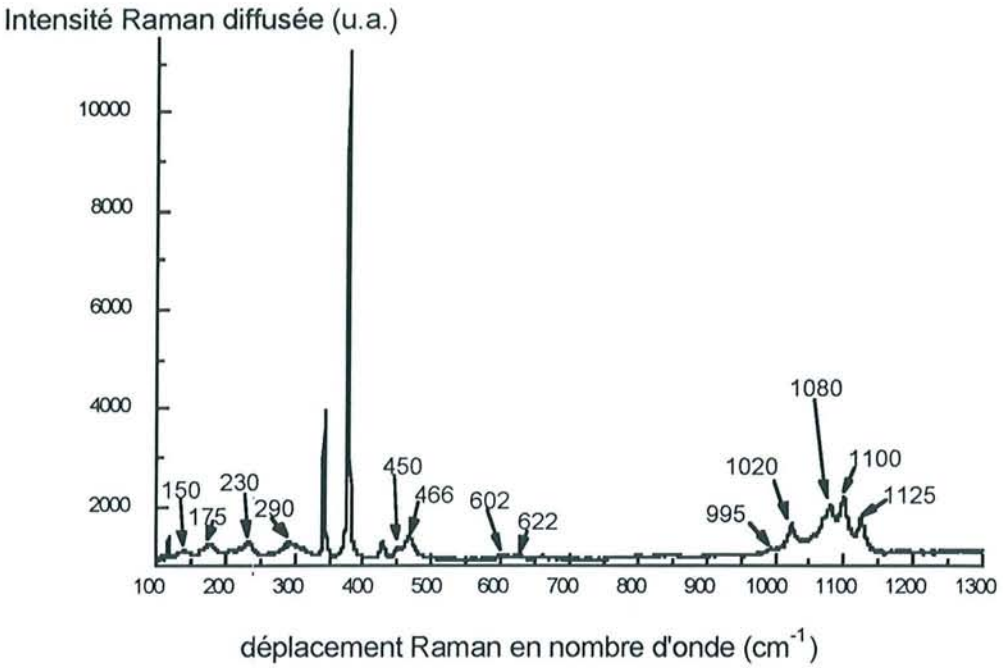


Figure I.7b : Spectre Raman des amas opaques présents sur la pyrite K à l'état naturel.

Ces résultats confirment la nature des produits superficiels d'oxydation mis en évidence par spectroscopie XPS. Cependant, ils montrent que les phases superficielles oxydées du fer et du soufre ne se trouvent pas à la surface de la pyrite K de façon individualisée (à l'exception d'un type particulier de sulfates de fer dont le mode de vibration totalement symétrique se situe à 1020 cm^{-1}). Ils forment des structures polyphasiques (mélanges de sulfates de fer, d'oxyhydroxydes de fer et de soufre élémentaire) ayant l'aspect d'amas opaques et non réfléchissants au microscope optique.

b. La pyrite Es :

Contrairement aux grains autoclavés, les grains oxydés de pyrite Es ont un aspect terne. Ils ne présentent aucune zone brillante et toute la surface des grains apparaît sombre et très perturbée. Des amas comparables à ceux observés sur K sont visibles. Ils semblent plus nombreux et moins bien structurés. Leurs formes sont plus rondes et plus irrégulières.

L'analyse d'un grand nombre de grains permet de dégager trois profils de spectres.
Le premier est comparable à l'un des types mentionnés pour la pyrite K. Il comporte les bandes intenses et fines du minéral FeS_2 à 378 et 343 cm^{-1} accompagnées du pic d'un sulfate de fer particulier à 1020 cm^{-1} (Figure I.8a). Cette signature spectrale est représentative des zones peu perturbées de l'échantillon et ne concerne qu'un faible pourcentage de la surface.

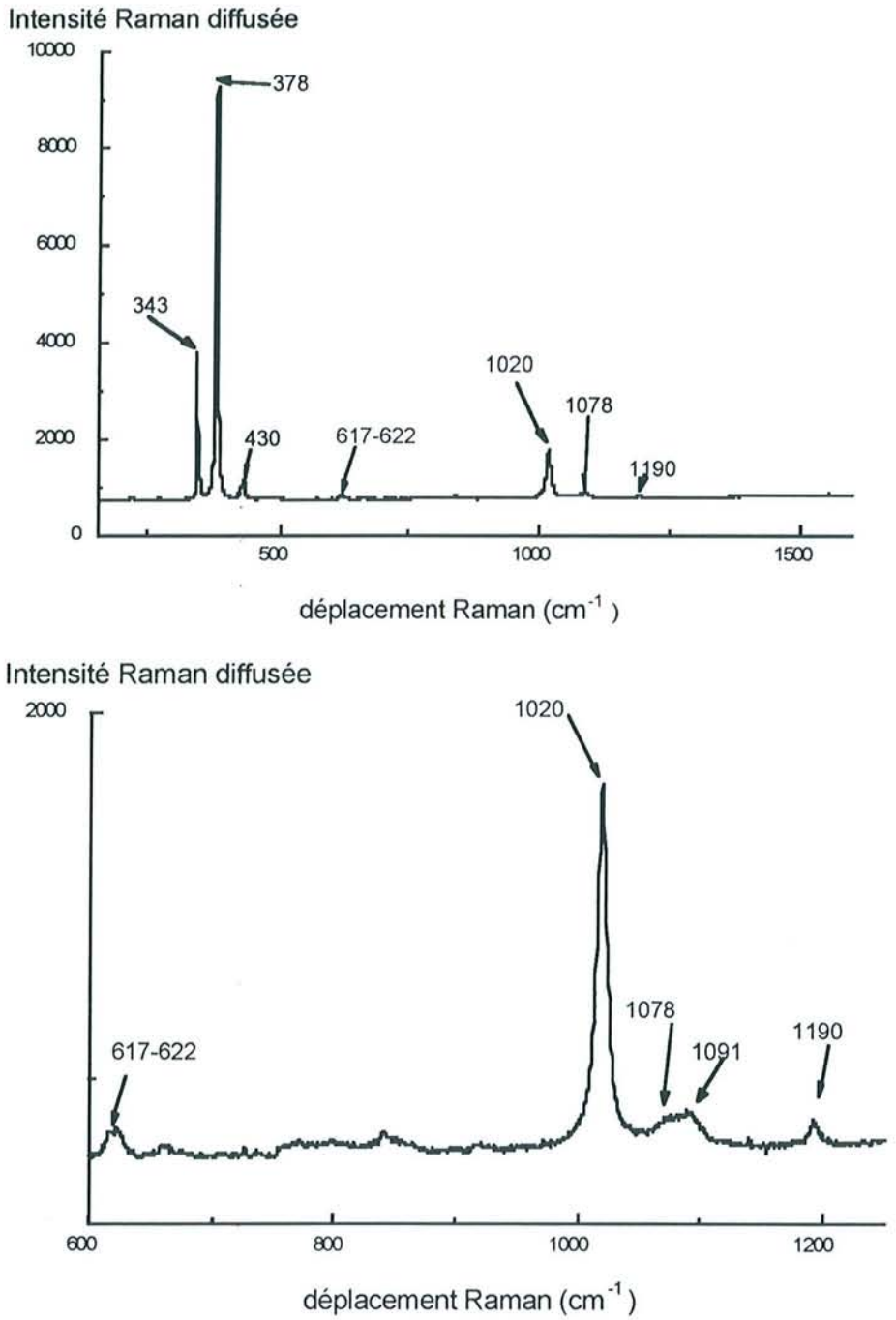


Figure I.8a: Premier type de spectre enregistré sur la pyrite Es à l'état naturel (spectre global et région des sulfates).

Un deuxième type de spectre plus fréquent est marqué par la signature intense du disulfure à 380 et 343 cm^{-1}, et d'un pic à 995 cm^{-1} attribuable à un sulfate de fer dans une configuration différente de la précédente située à 1020 cm^{-1} (Figure 1.8b).

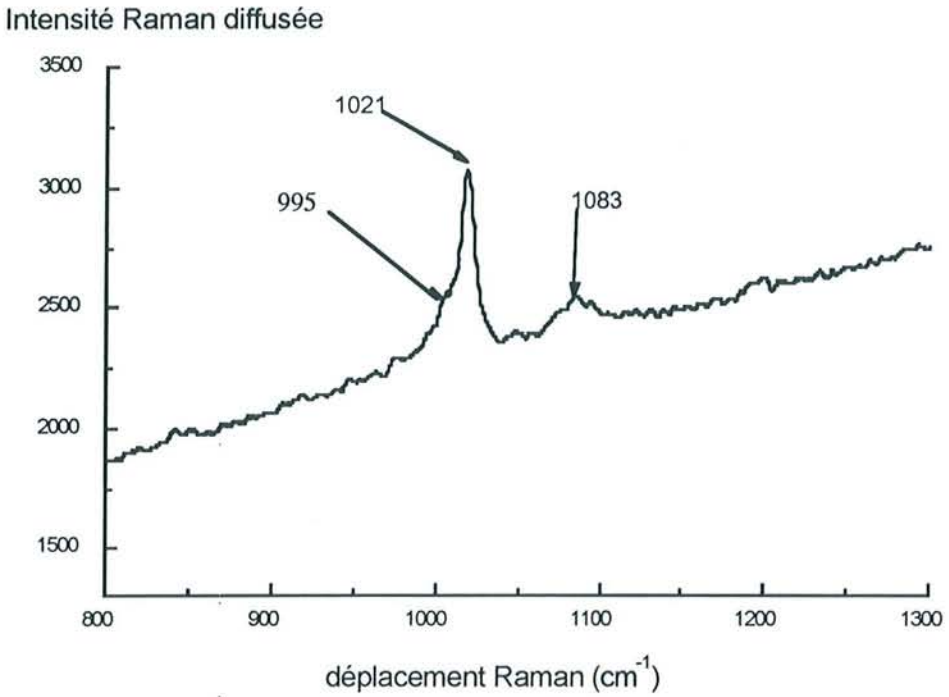


Figure I.8b: Deuxième type de spectre enregistré sur la pyrite Es à l'état naturel (région des sulfates).

Le dernier type de spectre est bien plus complexe. Comme pour la pyrite K (Figure I.7b), il concerne les amas opaques qui occupent une grande partie de la surface du minéral. Les nombeuses bandes qui y figurent, outre celles du minéral pur qui s'y trouvent d'ailleurs atténuées, témoignent de la coexistence d'espèces chimiques diverses au sein d'un même amas :

- Le massif des sulfates entre 990 et 1125 cm-1 est très intense. Il comporte deux vibrateurs totalement symétriques (1020 et 996 cm^{-1}) qui confirment la présence de deux types de sulfates.

- Les vibrateurs des molécules d'oxyhydroxydes de fer FeOOH sont bien marqués à 219 et 277 cm^{-1}.

- Une bande assez mal résolue entre 460 et 480 cm^{-1} indique la présence simultanée de soufre élémentaire S_8 et de polysulfures S_n^{2-}. Le pic situé à 463 cm^{-1} est attribué aux vibrations d'élongation des polysulfures. Celui centré sur 474 cm^{-1} est plus intense et concerne les vibrations d'élongation des molécules de soufre. Les vibrations de déformation de S_8 sont également mises en évidence à 150 cm^{-1}.

Conclusion :

Les analyses Raman confirment la nature chimique des composés de surface mis en évidence par spectroscopie XPS (sulfates et oxyhydroxydes de fer). Cette technique affirme en outre, la présence de polysulfures de soufre élémentaire sous forme S_8.

Le couplage du spectromètre avec un microscope optique permettant de sélectionner et de visualiser la zone du grain analysée, montre que les surfaces sont très hétérogènes. La signature spectrale est très différente selon la partie du grain où est focalisé le faisceau laser. L'un des principaux résultats est l'existence, sur les deux pyrites à l'état naturel, de composés polyphasiques en forme d'amas opaques et non réfléchissants. Ces amas sont constitués d'un mélange de sulfate, d'oxyhydroxydes de fer, de soufre élémentaire et de polysulfures.
Les vibrations totalement symétriques des sulfates traduisent l'existence de deux sulfates différents sur Es (pic à 995 cm^{-1} majoritaire et contribution minoritaire à 1020 cm^{-1}), alors qu'un seul type de sulfate est présent sur la pyrite K (caractérisé par le pic à 1020 cm^{-1}). Une analyse spectroscopique plus fine est envisagée afin de préciser la symétrie locale du groupement et son environnement chimique ($\alpha FeSO_4$; $\beta FeSO_4$; $Fe_2(SO_4)_3$, xH_2O...).
Toutefois, bien qu'on ne puisse pas attribuer ces deux signatures de façon formelle à une balance fer (II)/fer (III), il est intéressant de constater que d'une manière générale, les sulfates ferreux ont une vibration d'élongation ν_1 (995 à 1000 cm^{-1}) inférieure à celle des sulfates ferriques (>1010 cm^{-1})(Pannatier et Bregault, 1965).

Tableau I.7: Tableau récapitulatif des abondances relatives des différents composés de surface détectés en spectroscopie Raman sur les pyrites.

	$FeOOH/Fe_2O_3$ 230-290 cm^{-1}	S_n^{2-} 463-466 cm^{-1}	S_8 474 cm^{-1}	SO_4^{2-} type I 1020 cm^{-1}	SO_4^{2-} type II 995 cm^{-1}
K autoclavée	-	-	-	-	-
Es autoclavée	-	ε	+	-	-
K oxydée	+	++	++	+++	ε
Es oxydée	+	+	+	++	+++

-, ε, +, ++, +++ : abondance relative des différents produits d'oxydation

L'analyse réalisée sur les pyrites autoclavées montre (comme l'XPS) que les surfaces des pyrites Es et K sont dépourvues de produits d'oxydation. Les modes Ag, Eg, et Tg du disulfure y sont particulièrement bien résolus (pics fins et intenses). Des mesures de polarisation en diffusion Raman sur ces surfaces parfaitement décapées ont montré que le rapport des aires des pics Ag et Eg varie en fonction de l'orientation relative du polariseur et de l'analyseur pour une même direction du champ électrique incident. Il est probable que ce rapport soit indicateur du type de face cristalline rencontrée.
Une analyse statistique des nombreux spectres réalisés sur un même échantillon de pyrite oxydée permet d'entrevoir un lien entre le rapport de ces deux pics et le type de composé oxydé exprimé. Il pourrait donc exister un certain déterminisme, dicté par les propriétés cristallines, quant à la nature des phases superficielles développées à la surface du minéral. Une étude plus approfondie est cependant nécessaire pour préciser ce résultat.

III. QUANTIFICATION DES PHASES SUPERFICIELLES OXYDÉES.

Les deux techniques spectroscopiques d'analyse qualitative (XPS et Raman) ont permis de déterminer la nature des phases oxydées présentes à la surface du minéral à l'état naturel ou après autoclavage. De plus, l'XPS donne une estimation du taux de recouvrement statistique des composés superficiels et la spectroscopie Raman a mis en évidence l'organisation des produits d'oxydation sous forme d'amalgames. Pour compléter cette approche qualitative et connaître précisément les quantités de sulfates, d'oxyhydroxydes de fer ou de soufre élémentaire développées à la surface des deux pyrites, des méthodes d'élution sélective ont été développées. La méthode de quantification du soufre S_8 par chromatographie liquide suggérée par MUSTIN, *et al.* (1993a et 1993b) et De Donato et al. (1993), s'avère inutilisable dès que des amalgames sont présents. Basée sur des élutions successives du minéral à l'eau puis au méthanol, elle suppose implicitement que le soufre élémentaire n'est pas soluble dans l'eau et qu'il est indépendant des phases hydrosolubles. De plus, la méthode de détection par spectrométrie UV-Visible ne permet pas de doser les fractions du fer et du soufre éluées à l'eau. Afin de mieux définir la spéciation et l'association des phases entre elles, de nouvelles méthodes d'extraction et de quantification du fer et du soufre ont été développées. Elles sont basées sur le couplage des extractions dans différents solvants aqueux et organiques, et de techniques de dosage très sensibles (ICP.ES ou GC-MS) qui permettent d'abaisser le seuil de détection à 10 ppb pour le fer total et le soufre S_8, et à 100 ppb pour le soufre total.

1. Le soufre élémentaire de surface S_8 :

Les études spectroscopiques indiquent l'existence d'un soufre individualisé et indépendant des autres phases et d'un soufre emprisonné dans des phases sulfatées hydrosolubles (appelé soufre associé). La fraction directement accessible est éluée à l'hexane, solvant hydrophobe, non-polaire et par conséquent très sélectif vis à vis du soufre élémentaire S_8. Les extractions à l'hexane seront comparées à celles réalisées au méthanol. Ce solvant, plus hydrophile et plus polaire solubilise l'ensemble des espèces hydropliles ou hydrophobes du soufre (sulfates, S_8 et polysulfures). Cette extraction permet d'accéder au soufre élémentaire associé aux sulfates.

a. La pyrite K :

L'analyse en GC-MS des solutions d'extraction à l'hexane ou au méthanol confirme définitivement l'existence d'un soufre de type S_8 (masse 256) à la surface des pyrites (Figure I.9). Ce soufre octaédrique est dominant mais il peut être accompagné de soufre élémentaire cyclique S_6 ou de polysulfures S_6^{2-} (masse 192) et d'autres formes type S_9 ou S_{10} très minoritaires (visibles à condition de concentrer le surnageant). Pour l'instant, seul le soufre S_8 peut être dosé puisqu'il est le seul à disposer d'une gamme étalon dans le méthanol et dans l'hexane.

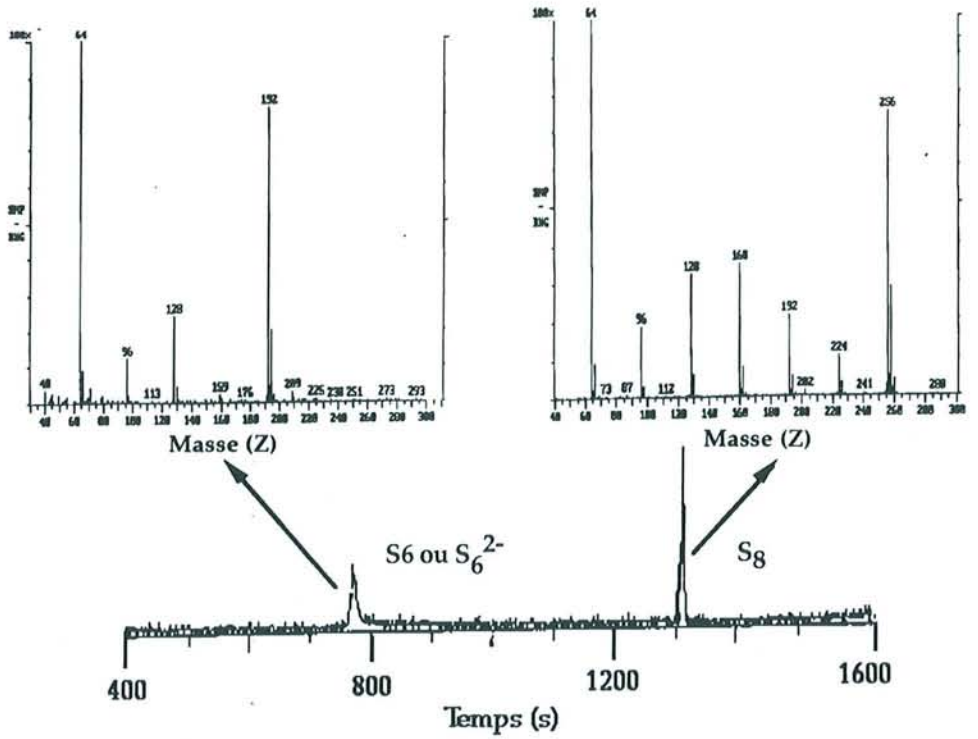


Figure I.9: Chromatogramme en ions spécifiques (masse 192) et spectres de masse correspondant.

Une série d'extractions a été réalisée dans l'hexane et dans le méthanol sur la pyrite K oxydée ou autoclavée (Tableau I.8) :

Tableau I.8 : Quantité de soufre S_8 (en µg de S_8 par gramme de pyrite) extraites dans l'hexane et le méthanol sur la pyrite K oxydée ou autoclavée et dosée en GC-MS (5 à 10 répétitions).

	Hexane (µg/g)	Méthanol (µg/g)	S_8 associé (µg/g)
Pyrite K oxydée	253 (±10)	355 (±15)	~ 100
Pyrite K autoclavée	132 (±15)	146 (±15)	ε

La quantité de soufre S_8 désorbée par l'hexane sur la pyrite oxydée est très inférieure à celle éluée par le méthanol. Si l'on considère que l'hexane est un solvant parfaitement sélectif du soufre S_8, et que le méthanol solubilise sans distinction toutes les phases soufrées, la différence des quantités de S_8 mesurées en GC-MS correspondrait aux molécules de soufre contenues dans les composés polyphasiques (sulfates et oxyhydroxydes de fer) détectés en Raman. La fraction de soufre éluée par l'hexane correspond au soufre "visible" et non associé.

La pyrite autoclavée comporte une quantité de soufre inférieure à celle mesurée sur la pyrite à l'état naturel (moins de 50% du soufre initial). L'autoclavage provoque donc la mise en solution, probablement sous forme de petites particules colloïdales, d'une fraction importante du soufre de surface hydrophobe.

Après autoclavage, les quantités de S_8 extraites à l'hexane et au méthanol sont comparables et

concernent le soufre directement accessible. Il reste peu ou pas de soufre associé. Ce résultat vient corroborer les conclusions des analyses spectroscopiques selon lesquelles la surface des pyrites autoclavées est débarrassée de toutes les phases oxydées du fer et du soufre (sulfates, oxyhydroxydes et composés polyphasiques).

b. La pyrite Es :

Des dosages équivalents ont été réalisés sur la pyrite Es à l'état naturel et après autoclavage. Les résultats sont résumés dans le tableau I.9.

Tableau I.9 : Quantité de soufre S_8 (en µg de S_8 par gramme de pyrite) extraites dans l'hexane et le méthanol sur la pyrite Es oxydée ou autoclavée.

	Hexane (µg/g)	Méthanol (µg/g)	S_8 associé (µg/g)
Pyrite Es oxydée	4 (±1)	50 (±5)	~ 45
Pyrite Es autoclavée	6 (±2)	7 (±2)	ε

Le soufre "visible" est peu abondant (4 µg/g) et directement extractible dans l'hexane. La majorité du soufre (92%) se trouve associée aux sulfates et est extraite au méthanol.
Comme pour la pyrite K, les quantités extraites au méthanol et à l'hexane sur le minéral autoclavé sont comparables, ce qui indique qu'il n'existe plus de soufre associé. Tout le soufre est donc accessible à l'hexane. L'approche spectroscopique avaient également montré que la surface de la pyrite Es autoclavée ne comportait plus de composés sulfatés ou oxydés du fer.

La quantité de soufre accessible sur la pyrite autoclavée est légèrement supérieure à celle de la pyrite oxydée, et pourrait signifier que la solubilisation des phases de surface (sulfates, FeOOH et S_8 associés) par autoclavage a démasqué une partie du soufre. Ce soufre n'est pas emprisonné au sein des amas polyphasiques, mais est en contact avec le minéral tout en étant recouvert par ces amas.

Les quantités de soufre présentes à la surface des pyrite Es et K sont très différentes. A l'état naturel oxydé, la pyrite K comporte 7 fois plus de soufre (dont 30% est associé) que la pyrite Es (dont 90% est associé). Après autoclavage, la quantité de soufre S_8 autoclavée est 20 fois plus importante sur la pyrite K que sur la pyrite Es. Cependant, la contribution du soufre S_8 au signal XPS total est comparable sur les deux minéraux autoclavés et représente environ 5% des molécules analysées. Si le taux de recouvrement des deux sulfures par les molécules de soufre est comparable, c'est au niveau de leur extension verticale que se situe alors la différence. Pour une surface spécifique de 0,1 m^2/g (donnée BET) et un encombrement moléculaire pour le S_8 de 40 $Å^2$, un calcul simple fait correspondre le taux de recouvrement XPS de 5% à une seule monocouche de S_8 pour la pyrite Es autoclavée et 20 couches superposées pour la pyrite K autoclavée.

Conclusion :

La comparaison des quantités de soufre extraites dans l'hexane et le méthanol permet de déterminer trois types de soufre élémentaire de surface (Figure I.10):

- Un soufre de surface accessible et indépendant des autres phases de surface, directement extractible à l'hexane (type I).
- Un soufre emprisonné au sein de composés polyphasiques (sulfates et oxyhydroxydes de fer) et extractible au méthanol (type II). Ce soufre peut également être élué à l'eau puisqu'il est, en fait, contenu dans une gangue sulfatée hydrosoluble.
- Un soufre solidaire de la surface et recouvert par les amas polyphasiques (type III). Ce soufre réfractaire à l'autoclavage est sans doute très fortement lié au minéral.

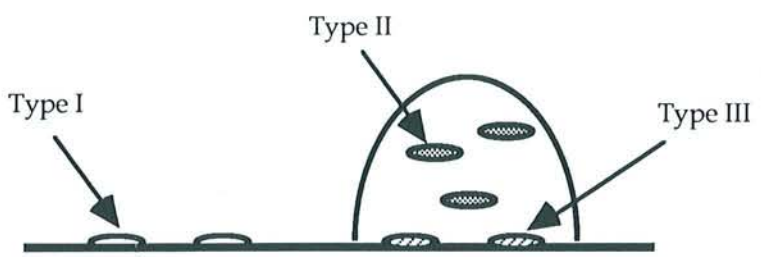
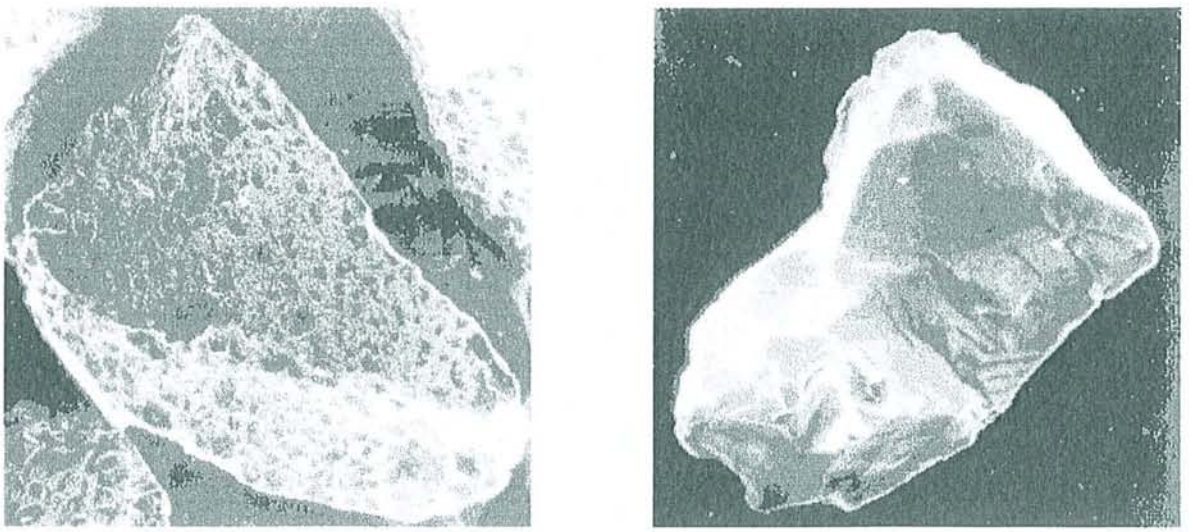


Figure I.10 : Les différents types de soufre élémentaire développés à la surface des pyrites Es et K.

2. Dosage du fer total de surface :

Les extractions des phases oxydées du fer, solubles et hydrophiles (sulfates ferreux et ferriques), sont réalisées par simple agitation du minéral dans de l'eau osmosée. Les quantités de fer et de soufre total hydrosolubles sont dosées en ICP-AES.

En complément, les phases oxydées du fer insolubles telles que les oxy(hydroxy)des de fer (FeOOH, Fe_2O_3) peuvent être extraites par une solution de Citrate-Bicarbonate-Dithionite (CBD). L'efficacité de ce traitement est confirmée par Microcopie Electronique à Balayage (MEB) : l'observation de la pyrite après élution au CBD montre que les surfaces, initialement très couvertes, sont parfaitement décapées (Figure I.11) et ne présentent plus de phases oxydées : le spectre réalisé en EDS ne permet plus de déceler la présence d'oxygène (Figures I.12a et I.12b). Un tel traitement permet aussi de démasquer des fissures à la surface des grains. Ces zones très énergétiques pourraient être rapidement comblées par des composés oxydés. Ainsi, le fer extrait au CBD représente le fer total impliqué dans les phases superficielles oxydées.



(a) (b)

Figure I.11 : Photographies réalisées en MEB :
(a) Grains de pyrite K à l'état naturel oxydé. (b) Grain de pyrite K après élution au CBD.

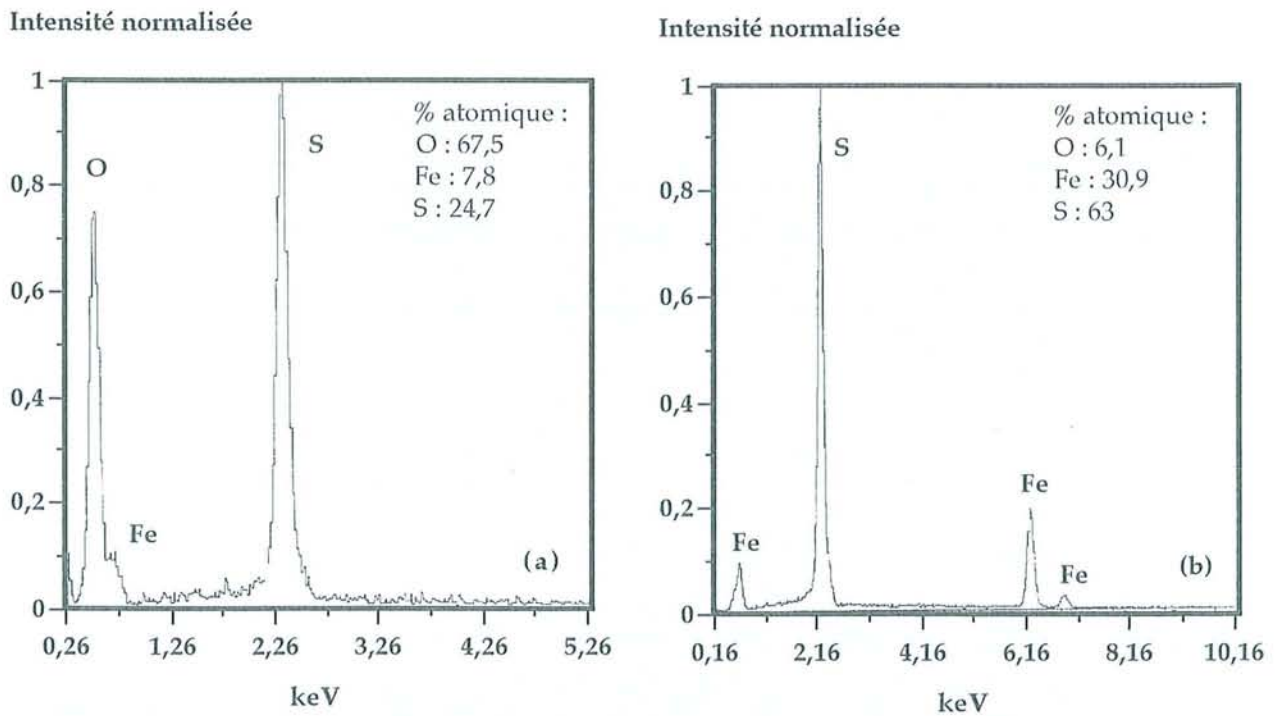


Figure I.12 : Spectres EDS réalisés sur un grain de pyrite K
(a) à l'état naturel (b) après élution au CBD.

Les résultats des dosages concernant les deux pyrites sont résumés dans le tableau I.10.

Tableau I.10 : Dosage du fer et du soufre hydrosolubles ainsi que du fer total extrait au CBD sur les pyrites Es et K à l'état naturel.

	Pyrite K	Pyrite Es
Fer total (CBD) (mg/g)	7,1	6,7
Fer hydrosoluble (mg/g)	6,4	6,4
Soufre Total hydrosoluble ($S_T = SO_4 + S_8$) (mg/g)	17,1	14,3
Sulfates (mg/g)	16,4	14,2
S_T/Fe	1,56	1,3
$S(SO_4)$/Fe	1,49	1,27

Une élution à l'eau conduit à la solubilisation de 6,4 mg de fer par gramme de minéral pour les pyrite Es et K. Ce fer soluble entre dans la composition des sulfates (composés hydrosolubles). La comparaison des quantités extraites à l'eau et au CBD montre qu'une fraction supplémentaire de fer est dosée dans le CBD. Cela correpond aux oxyhydroxydes de fer FeOOH insolubles mis en évidence par les spectroscopies Raman et XPS. Il apparait ainsi que 10% du fer total extractible est présent sous forme d'oxyhydroxydes sur la pyrite K, alors que seulement 5% du fer total provient de FeOOH sur la pyrite Es. Pour les deux pyrites toutefois, les phases oxydées du fer prépondérantes sont les sulfates.

Il est d'ailleurs possible, aux vues des résultats, d'estimer la stœchiométrie des sulfates de fer superficiels, en comparant les quantités de fer et de soufre dissous. En effet, si l'on admet que tout le soufre dosé en ICP provient de la solubilisation des sulfates, le rapport entre le soufre total et le fer total doit être compris entre 1 et 1,5 (S_T/Fe=1,5 si toutes les phases extraites sont des sulfates ferriques et S_T/Fe=1 si tout est sous forme de sulfates ferreux). Or, pour la pyrite K, ce rapport est strictement supérieur à 1,5. Cela signifie que les molécules de soufre élémentaire S_8 emprisonnées dans les amas sulfatés passent en solution, sont dissociées dans le plasma et prises en compte lors du dosage du soufre atomique. Puisque le soufre élémentaire associé aux sulfates a été dosé en GC-MS (différence entre la fraction extraite au méthanol et celle extraite à l'hexane), il est possible de déterminer la quantité de soufre effectivement présent à la surface sous forme de sulfates. Le rapport corrigé $S(SO_4)$/Fe indique alors la stœchiométrie entre le fer et le soufre impliqués dans les sulfates superficiels. Pour la pyrite K, ce rapport est très proche de 1,5, ce qui signifie que la majorité des sulfates sont des composés ferriques. En revanche, la pyrite Es comporte une forte proportion de sulfates ferreux (environ 2/3 des sulfates) puisque ce rapport n'est que de 1,27. Ce résultat est en adéquation avec les conclusion de l'analyse XPS qui mettent en évidence des sulfates ferriques uniquement sur la pyrite K et une majorité de sulfates ferreux sur la pyrite Es.

A la lumière de ces analyses quantitatives, il est posible également de préciser les résultats de la spectroscopie Raman : le mode de vibration totalement symétrique exprimé à 1020 cm^{-1} pourrait correspondre à un sulfate ferrique, alors que le pic centré sur 995 cm^{-1} (repéré principalement sur la pyrite Es) serait attribué à une forme de sulfate ferreux.

Conclusion :

Un bilan peut être réalisé sur les quantités de phases superficielles présentes sur les pyrites Es et K à l'état naturel ou à l'état autoclavé (en moles de composé par gramme de minéral), afin de comparer leur état d'oxydation (Tableau I.11).

Tableau I.11: Estimation du nombre de moles des différents composés oxydés présents sur 1 gramme de minéral.

Phases oxydées (10^{-5}mol/g)	K état naturel	Es état naturel	K autoclavée	Es autoclavée
FeOOH	1,25	0,53	-	-
$Fe_2(SO_4)_3$	5,70	2,85	-	-
$FeSO_4$	ε	5,70	-	-
S_8 total	0,140	0,020	0,060	0,003
S_8 amalgamé	0,04	0,018	-	–
Total	7,1	9,1	<0,1	ε

Finalement, à l'état naturel, la pyrite Es est plus oxydée que la pyrite K. Les principaux produits d'oxydation pour le minéral Es sont les sulfates ferreux (majoritaires) et ferriques. En revanche, la pyrite K est plus riche en sulfates ferriques, oxyhydroxydes de fer et soufre élémentaire.

IV. ETUDE DE LA RÉPONSE ÉLECTROCHIMIQUE DES PYRITES K ET ES.

La grande variété des phases superficielles observées et les quantités développées par oxydation à l'air des grains de pyrite, démontrent la forte réactivité de l'interface et finalement l'importance du transfert des électrons à la surface du minéral. De plus, en présence de bactéries du type *Thiobacillus*, le sulfure va jouer le rôle d'une source d'électrons qui alimentera l'usine cellulaire microbienne sous la forme de composés oxydables ($S°$; Fe^{2+}...).
Ainsi, la dynamique des échanges électroniques entre les microorganismes et le substrat minéral constituerait l'une des clés du processus de biolixiviation. Des méthodes telles que la voltamétrie cyclique semblent particulièrement appropriées pour analyser le comportement électrochimique des pyrites et leur capacité à céder ou à accepter des électrons en présence ou non de bactéries.
Des électrodes massives, constituées d'éclats de pyrite inclus dans de la résine époxy, ont déjà été utilisées (PALENCIA *et al.*, 1991) pour étudier les processus d'oxydation des pyrites. Cependant, les propriétés physiques de ce type d'électrode sont très différentes des propriétés du minéral utilisé dans la biolixiviation qui est souvent broyé assez finement (<50 µm). Il était donc indispensable de disposer d'une électrode permettant l'analyse de grains de pyrite à l'état naturel ou provenant d'un réacteur de biolixiviation à différentes étapes du cycle.

L'électrode développée au cours de ce travail, décrite en détail dans le chapitre des Matériels et Méthodes (Electrode à Grains Fixés), permet dans un premier temps, de compléter l'étude des pyrites Es et K à l'état naturel (c'est à dire après une oxydation lente par l'oxygène atmosphérique). Les mesures complémentaires réalisées sur les pyrites autoclavées sont destinées à préciser les caractéristiques électrochimiques du minéral en début de biolixiviation. Dans un deuxième temps, cette électrode pourra alors suivre l'évolution des propriétés électrochimiques du minéral au cours du cycle de biolixiviation.

1. Pyrite K :

Les voltamogrammes enregistrés pour la pyrite K à l'état naturel et après un autoclavage sont très différents (Figure I.13). Les courants mesurés pour la pyrite autoclavée sont très faibles et un seul pic cathodique (C4) situé vers -270 mV/ECS est clairement mis en évidence. Le voltamogramme de la pyrite oxydée à l'air, en revanche présente de nombreux pics cathodiques (C1 à C4) et un pic anodique intense (A1).

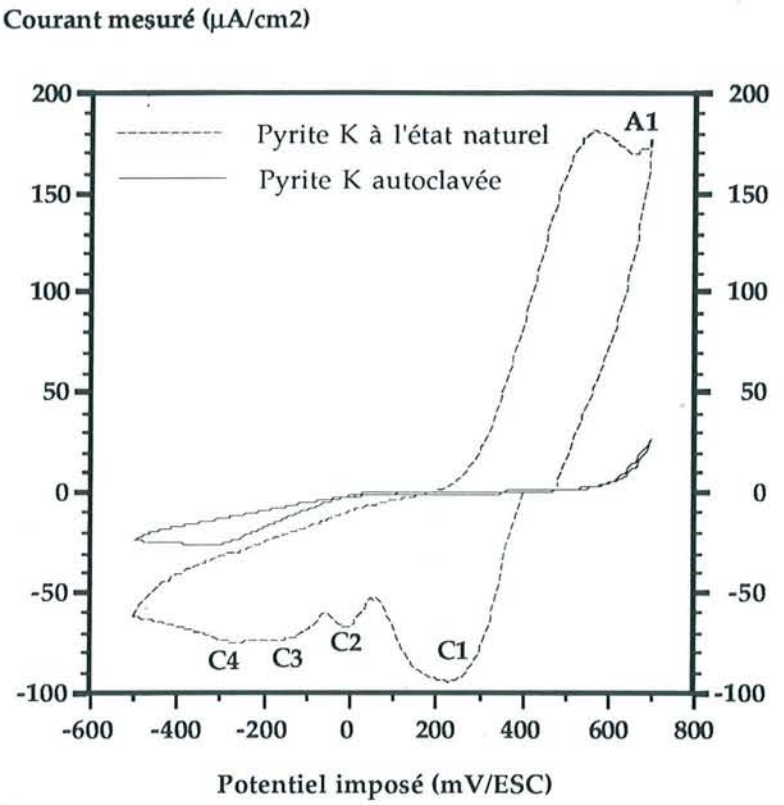


Figure I.13 : Voltamogrammes (réalisés en voltamétrie cyclique dans le milieu M2) de la pyrite K (32-53 µm) à l'état naturel et après un autoclavage.

Ce résultat vient confirmer ceux obtenus par spectroscopie XPS et Raman et montre la sensibilité de l'électrode aux états de surface du minéral. La pyrite oxydée à l'air présente une forte proportion de phases superficielles oxydées. En revanche, après autoclavage, elle est débarassée de la plus grande partie de ces composés de surface. Seule subsiste une fraction de soufre élémentaire représentant 5% des molécules analysées.

Le voltamogramme de la pyrite autoclavée représente donc la réponse électrochimique du minéral pur FeS_2 entre 0 et 700 mV/ECS. Les courants enregistrés (de l'ordre du nA/cm^2) sont négligeables. Cela signifie que la pyrite pure est très peu réactive du point de vue électrochimique : sa capacité à ceder ou à accepter des électrons est très faible.

D'après ADRIAMANANA et LAMACHE (1982), le pic unique C4, situé à -270 mV/ECS, représente la réduction du soufre élémentaire de surface en sulfure d'hydrogène dissout (Eq. I.1).

$$S^\circ + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2S_{(d)} \qquad \text{(Eq. I.1)}$$

Bien qu'il puisse exister plusieurs variétés allotropiques de soufre, les analyses réalisées en spectroscopie Raman et GC-MS sur des pyrites K autoclavées confirment l'existence de quantités non négligeables de soufre élémentaire sous une forme octaédrique. Une électrode de carbone réalisée

avec du soufre S_8 cristallisé (Merck), montre cependant que ce composé n'est pas électrochimiquement actif. La signature à -270 mV/ECS sur le voltamogramme de la pyrite K autoclavée pourrait être attribué à une fraction électroactive du soufre élémentaire S_8, sans doute la fraction des molécules en contact direct avec la surface du minéral semi-conducteur.

L'étude par voltamétrie cyclique de la pyrite K autoclavée permet donc de montrer qu'une pyrite dépourvue de phases superficielles oxydées a une réponse électrochimique négligeable entre -500 et 700 mV/ECS (voltamogramme "plat"). Par conséquent, les courants anodiques et cathodiques importants enregistrés pour la pyrite K à l'état naturel indiquent l'oxydation (pic A1) et la réduction (pics C1 à C4) de phases oxydées de surface mises en évidence par les techniques spectroscopiques.

Le pic C4, correspondant à la réduction du soufre élémentaire, est nettement plus important que sur la pyrite autoclavée. Son existence confirme l'hypothèse formulée au cours des analyse XPS et les dosages de soufre en GC-MS, selon laquelle une grande partie du soufre élémentaire serait solubilisée lors de l'autoclavage sous forme de particules colloïdales.

Le pic C1 est la composition de plusieurs pics de réduction faisant intervenir différentes espèces oxydées du fer. En effet, son potentiel se situe vers 230 mV/ECS et pourrait correspondre à un potentiel mixte entre le potentiel du couple Fe^{2+}/Fe^{3+} (Eq. I.2) impliqué dans des composés de type sulfates et celui du couple Fe^{2+}/FeOOH (Eq. 3) situé vers 100 mV/ECS pour un pH de 1,8 (Eq. I.3).

$$\mathbf{Fe_2(SO_4)_3 + 2e^- \text{---> } 2\ FeSO_4 + SO_4^{2-}} \qquad \textbf{(Eq. I.2)}$$

$E_{(mV/ECS)} \approx 400$ pour la pyrite en milieu acide (ADRIAMANANA et LAMACHE, 1983)

$$\mathbf{FeOOH + 3\ H^+ + e^- \text{---> } Fe^{2+} + 2H_2O} \qquad \textbf{(Eq. I.3)}$$

Avec : $E_{(mV/ECS)} = 415 - 177\ pH - 59{,}1 \log (a_{Fe^{2+}})$ d'après LOWSON (1982).

Le pic C2, situé vers 0 mV/ECS représente, selon LOWSON (1982), la réduction des oxyhydroxydes de fer (FeOOH) en sulfure de fer FeS_2 (Eq. I.4).

$$\mathbf{FeOOH + 2\ SO_4^{2-} + 19\ H^+ + 15e^- \text{---> } FeS_2 + 10\ H_2O} \qquad \textbf{(Eq. I.4)}$$

Avec : $E\ (mV/ECS) = 137 - 75\ pH + 3{,}9 \log (a^2(SO_4^{2-}))$

D'après certaines données de la littérature (SEVEQUE, 1986), le pic situé à -125 mV/ECS peut être attribué à la réduction des polysulfures en sulfure d'hydrogène dissout (Eq. I.5).

$$\mathbf{S_{(n-1)}S^{2-} + 2n\ H^+ + (2n-2)\ e^- \text{---> } n\ H_2S_{(d)}} \qquad \textbf{(Eq. I.5)}$$

Le nombre n d'atomes de soufre associés en chaînes pour former des polysulfures S_nS^{2-} est variable. Les forme S_4S^{2-} et S_5S^{2-}sont les plus stables en solution, mais les conditions thermodydamiques de stabilité des espèces formées à la surface des minéraux sont rigoureusement différentes. L'analyse des pyrites en spectroscopie Raman semble mettre en évidence des polysulfures S_3^{2-}, alors que les analyses en GC-MS après désorption au méthanol montrent la présence de composés à six atomes de soufre (masse 192) correspondant soit à du soufre élémentaire cyclique S_6 (configuration peu stable) soit à des polysulfures S_6^{2-}. Il est cependant très difficile de déterminer précisément la nature des composés soufrés par une méthode électrochimique, l'électrochimie du soufre étant particulièrement complexe. Les potentiels redox des couples obtenus avec les sulfures, les polysulfures et le soufre élémentaire sont très proches et de nombreuses dismutations sont possibles entre les espèces. Ces polysulfures sont d'ailleurs probablement en équilibre avec le soufre de surface (pic C4).

De façon générale, et pour résumer l'étude de la partie cathodique du voltamogramme de la pyrite à l'état naturel, les pics cathodiques situés entre 400 et 0 mV/ECS peuvent être attribués à des espèces oxydées du fer (sulfates et oxyhydroxydes), alors que les pics C3 et C4 situé entre -100 et -300 mV/ECS correspondent à la réduction des polysulfures et du soufre élémentaire en sulfure d'hydrogène dissout.

Contrairement au balayage cathodique, le balayage anodique entre -500 et 700 mV/ECS ne révèle qu'un seul pic (A1), intense et large centré sur 570 mV/ECS. Ce pic est dû à la réoxydation des sulfates ferriques réduits lors du balayage cathodique (les oxyhydroxydes et les oxydes de fer sont réduits en Fe^{2+} et donc solubilisés lors du balayage cathodique : ils ne sont pas réoxydés lors du balayage anodique). Cependant, l'aire du pic A1 est supérieure à celle du pic C1. Cela signifie que du sulfate ferreux préexistant à la surface de la pyrite est également oxydé en sulfates ferriques lors du balayage anodique.

Si l'électrode est maintenue plusieurs heures sous agitation dans le milieu M2, la réponse électrochimique du minéral change de façon très significative (Figures I.14).
Alors que les courants enregistrés en C3 et C4 diminuent significativement, les pics A1, C1 et C2 disparaissent en quasi-totalité (seule persiste un très faible courant en A1 et C1). Cela signifie que les espèces qui s'oxydent en A1 et celles qui sont réduites en C1 et C2 ne sont plus présentes à la surface du minéral. Une simple agitation de la pyrite dans du milieu M2 semble donc dissoudre la majorité des sulfates ferreux, ferriques, des oxyhydroxydes de fer ainsi qu'une partie des polysulfures et du soufre élémentaire.

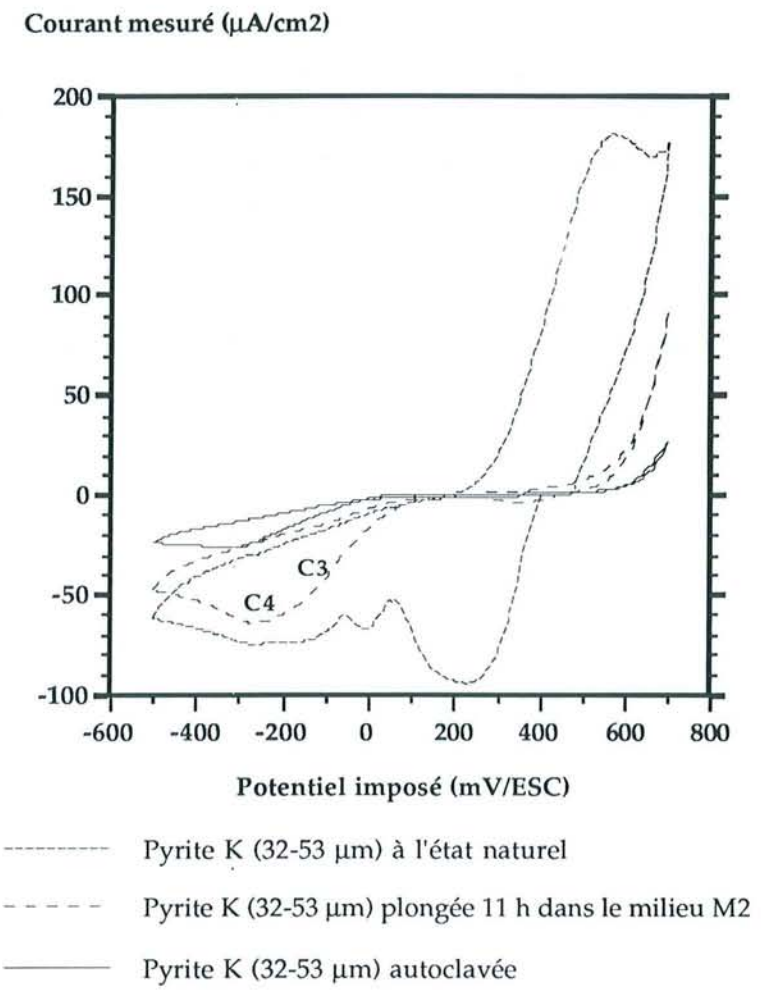


Figure I.14 : Réponse électrochimique de la pyrite K à l'état naturel, après 3 heures d'agitation dans le milieu M2 et après autoclavage.

S'il était raisonnable de penser que les conditions particulières de température et de pression subie par le minéral dans l'autoclave puissent dissoudre totalement les espèces oxydées les moins solubles dans les conditions standard, il est plus étonnant de constater que les espèces non hydropliles passent aussi spontanément en solution après quelques heures de contact avec le milieu. La seule façon de résoudre ce paradoxe, est de supposer que la totalité des oxyhydroxydes de fer, ainsi que la fraction de soufre et de polysulfures solubilisés, ne sont pas au contact direct du minéral, mais sont prisonniers d'un composé polyphasique soluble. Les amas détectés en spectroscopie Raman seraient donc constitués d'une gangue de sulfates de fer emprisonnant une grande partie du soufre et des polysulfures ainsi que la totalité des oxyhydroxydes de fer. Une simple extraction à l'eau entraîne leur mise en solution sous forme de particules colloïdales.

2. Pyrite Es :

Etant donné que les composés superficiels d'oxydation mis en évidence par spectroscopie XPS ou Raman sur les pyrite Es et K à l'état naturel sont de nature comparable, mais présents en quantités différentes, le voltamogramme de la pyrite Es devrait comporter des pics situés aux mêmes potentiels que ceux enregistrés pour la pyrite K , mais d'intensités différentes :

(i) l'intensité du courant enregistré au pic A1 est sensée être très supérieure pour la pyrite Es : la quantité de sulfates ferreux présents à la surface de Es est importante alors qu'elle est très faible sur la pyrite K.

(ii) l'intensité du pic C1 pour Es devrait représenter 50% de l'intensité du pic C1 sur la pyrite K, conformément aux quantités de sulfates ferriques et d'oxyhydroxydes de fer désorbées sur les deux sulfures.

(iii) l'intensité du pic C4 devrait être très supérieure sur K, étant données les quantités importantes de soufre élémentaire présentes sur la pyrite K par rapport à la pyrite Es.

Or, la superposition des voltamogrammes des deux sulfures (Figure I.15) ne confirme pas ces hypothèses.

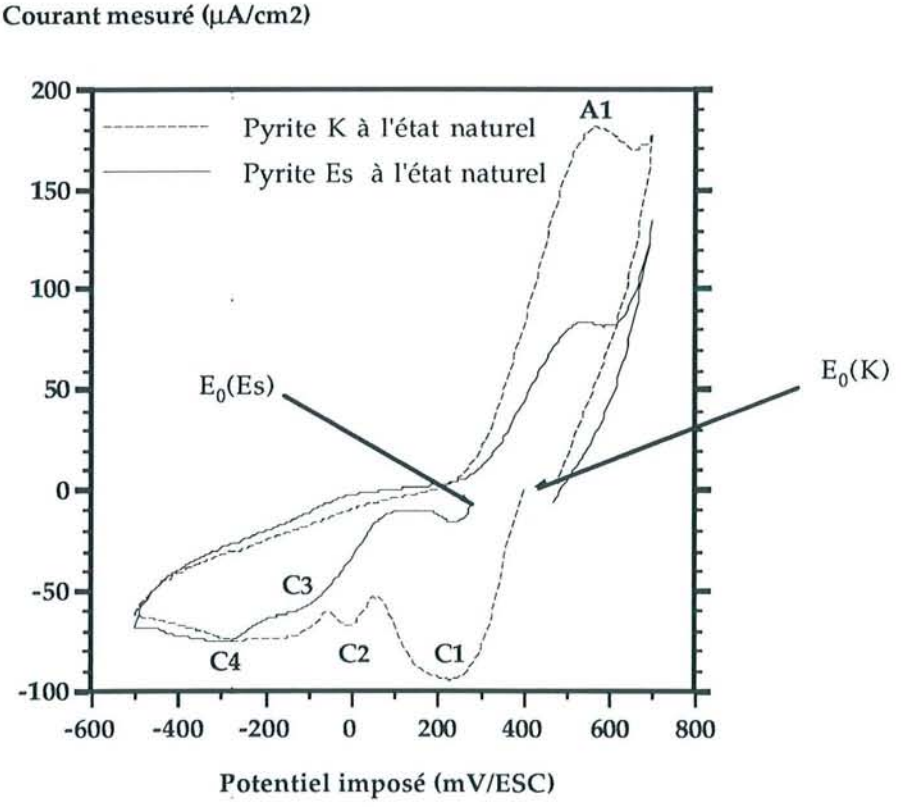


Figure I.15 : Réponse électrochimique des pyrites Es et K à l'état naturel.

Le potentiel de repos de la pyrite Es est très inférieure à celui de la pyrite K : $E_0(Es) \approx 240$ mV/ECS alors que $E_0(K) \approx 400$ mV/ECS. Ce résultat indique que le minéral Es est plus réducteur et peut expliquer la prédominence sur Es du sulfate ferreux par rapport au sulfate ferrique.

Contrairement à toute attente, l'intensité du pic C4 représentant la réduction du soufre est comparable pour les deux pyrites. Cela signifie que la fraction du soufre électroactif est équivalente pour les deux pyrites malgré des résultats quantitatifs très différents obtenus lors du dosage du soufre de surface. Seule une fraction bien déterminée du soufre de surface participe donc aux réactions électrochimiques, la plus grande partie du soufre désorbable étant inactif. Il est raisonnable de penser que la fraction électrochimiquement active du soufre S_8 est constituée des molécules directement en contact avec le minéral semi-conducteur FeS_2. Les résultats obtenus en voltamétrie cyclique semblent donc indiquer que la quantité de molécules de soufre en contact direct avec la surface est identique sur les deux pyrites. Cette remarque constituera une donnée très importante lors de l'élaboration du modèle morphochimique des surfaces des pyrites Es et K .

L'intensité du pic C3 pour la pyrite Es est inférieure à celle du pic C3 enregistré pour la pyrite K. Cela confirme les résultats obtenus en spectroscopie Raman concernant les polysulfures : la pyrite K est plus riche en polysulfures que la pyrite Es.

Les pic C1 et C2 sont peu intenses, ce qui semblerait indiquer que les quantités de sulfates ferriques et d'oxyhydroxydes de fer sont très inférieures sur Es.
De même, le pic A1 est moins intense sur Es que sur K, contrairement aux résultats attendus après les tests de désorption sélective. Pour expliquer cette apparente contradiction, il faut admettre que :

- La plus grande partie du courant enregistré en A1 sur le voltamogramme de la pyrite K correspond, en réalité, à la réoxydation des sulfates ferriques de surface (préalablement réduits en C1), et non à la présence de quantités importantes de sulfates ferreux superficiels. En revanche, pour la pyrite Es qui ne comporte qu'une faible proportion de sulfates ferriques en surface, la quasi totalité du courant enregistré en A1 correspond à l'oxydation de sulfates ferreux effectivement présents sur le minéral.
- La cinétique de dissolution des phases est plus rapide sur Es que sur K. En effet, un test simple de détection du fer solubilisé réalisé par indicateur coloré à proximité de l'électrode de pyrite Es, immédiatement après son introduction dans l'électrolyte, montre la solubilisation quasi-instantanée, au contact du milieu M2, d'une grande partie des sulfates de fer. Le même test effectué sur une électrode de pyrite K ne montre pas cette solubilisation spontanée du fer.

En raison de la forte solubilité des phases de surface, l'étude électrochimique de la pyrite Es à l'état naturel est très délicate. Les observations au microscope réalisées lors des mesures de spectroscopie Raman avaient déjà permis de constater que les phases superficielles présentes sur Es étaient beaucoup moins bien structurées et plus désorganisées que sur la pyrite K. La prédominance de sulfates de type II (c'est à dire ferreux) sur la pyrite Es est un argument supplémentaire.

La diminution progressive des courants enregistrés aux potentiels de A1 et C1, due à la solubilisation des composés oxydés du fer dans le milieu M2, s'effectue en effet beaucoup plus rapidement pour la pyrite Es. Alors qu'il faut quelques heures pour la solubilisation maximale des phases superficielles et stabilisation du voltamogramme de la pyrite K (Figure I.14), quelques minutes suffisent pour la solubilisation des produits d'oxydation de la pyrite Es : le voltamogramme enregistrés après 30 minutes de contact avec le milieu M2 est tout à fait comparable, du point de vue des pics A1 et C1 (oxydation et réduction des sulfates ou oxyhydroxydes de fer) à celui enregistré après 9 heures de contact (Figure I.16). La solubilisation des polysulfures est un peu plus lente (pic C3).

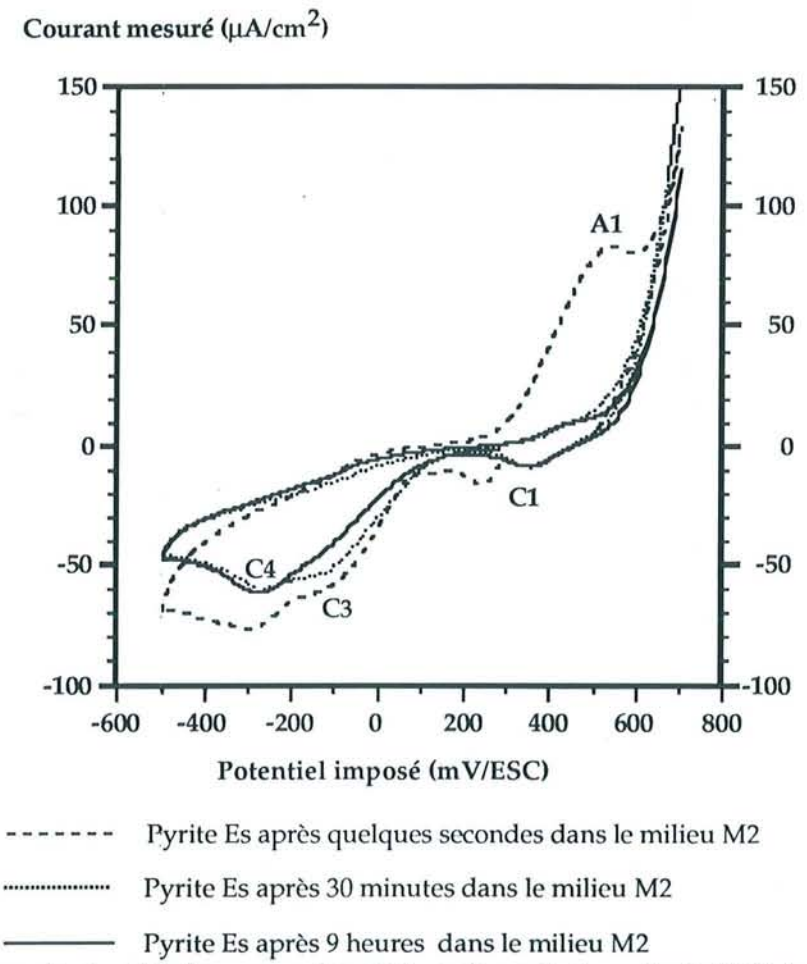


Figure I.16 : Réponse électrochimique en voltamétrie cyclique de la pyrite Es à l'état naturel et après 30 minutes ou 9 heures dans le milieu M2.

Après quelques heures de contact avec le milieu M2, l'équilibre est atteint. Le pic C1 a repris un potentiel de -350 mV/ECS correspondant à la réduction des sulfates ferriques et le pic C4 indique la présence de soufre élémentaire électroactif, non mêlé à des sulfates, et insoluble en milieu aqueux. Les polysulfures semblent avoir disparu de la surface car le pic C3 à -125 mV/ECS est quasi-inexistant.

Comme pour la pyrite K, l'autoclavage décape fortement la surface et solubilise les composés superficiels oxydés (Figure I.17).

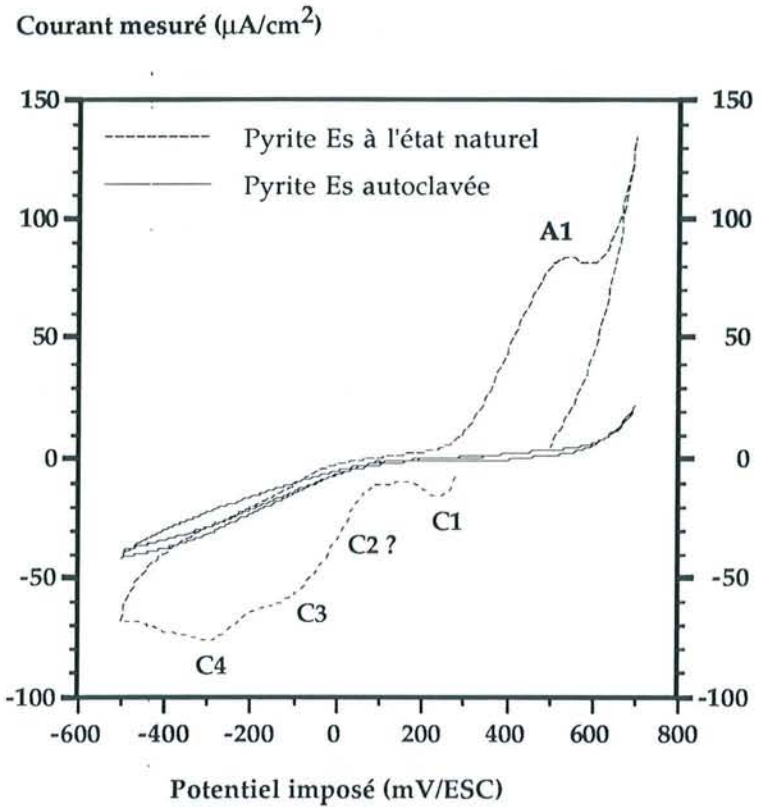


Figure I.17 : Voltamogramme de la pyrite Es à l'état naturel et après autoclavage dans le milieu M2.

Les courants enregistrés aux potentiels de A1 et C1 sont négligeables, ce qui signifie que les composés oxydés du fer et du soufre sont absents de la surface. Le Pic C4 est très réduit et indique qu'une fraction importante du soufre électroactif s'est désolidarisé de la surface sous l'effet de la température et de la pression d'autoclavage.

Les intensités du courant cathodique enregistrées au pic C4 sont d'ailleurs comparables pour les deux pyrites autoclavées, indiquant que la quantité de molécules S_8 en contact direct avec la surface du minéral (seules molécules électrochimiquement actives) est identique pour Es et K. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'XPS, qui donnait un taux de recouvrement statistique identique (5%) pour le soufre élémentaire S_8 sur les deux pyrites autoclavées.

Conclusion :

L'étude réalisée sur des pyrites à l'état naturel ou après autoclavage (surface "décapées") a permis de mettre en évidence la sensibilité pariticulière de l'Electrode à Grains Fixés (EGF) pour les phases superficielles des minéraux oxydés. La pyrite pure FeS_2 a une réactivité électrochimique

négligeable, et la totalité des courants enregistrés sont attribuables à l'oxydation et à la réduction des composés oxydés présents à la surface des pyrites. Leur solubilité en milieu acide (très importante pour la pyrite Es) qui se traduit par une nette diminution du signal électrochimique au cours du temps, rend délicate l'étude électrochimique des surfaces de pyrites hyper-oxydées. Il semble néanmoins que les phases superficielles de la pyrite K soient mieux organisées et moins sensibles à la solvatation que celles de la pyrite Es.

Il faut également rappeler que le but de cette étude n'était pas la caractérisation électrochimique complète des pyrites. Ce travail très complexe nécessiterait l'utilisation d'autres techniques telles que la chronoampérométrie, la chronopotentiométrie ou l'impédance complexe. L'objectif était la mise au point d'un capteur des phases superficielles qui puisse être aisément utilisé pour le suivi du comportement électrochimique des pyrites (sous forme de poudre) au cours d'un cycle de biolixiviation.

CONCLUSION :

La caractérisation chimique des pyrites Es et K réalisée dans ce premier chapitre a mis en évidence l'hétérogénéité très importante de la surface des deux sulfures. Cette étude était fondamentale puisqu'elle a permis de préciser :

- la nature des phases superficielles oxydées et leur répartition 2D (spectroscopies Raman et XPS)
- leur quantification et leur organisation à la surface du minéral (élutions sélectives et dosages en GC-MS)
- la réactivité du minéral (électrochimie).

Bien que la nature des composés oxydés de surface soit identique pour les deux pyrites (sulfates et oxyhydroxydes de fer, polysulfures et soufre élémentaire), leur abondance et leur organisation tridimensionnelle sont très différentes. Toutefois, pour les deux pyrites, il semble que seule une fraction du soufre élémentaire et des sulfates de fer soit présente à la surface de façon individualisée. Les oxyhydroxydes de fer ainsi qu'une grande partie du soufre S_8 et des polysulfures sont emprisonnés dans des structures polyphasiques principalement constituées de sulfates.

La spectroscopie XPS a montré que le taux de recouvrement des composés oxydés est plus important sur la pyrite Es (75% du signal XPS total) que sur la pyriteK (43% du signal XPS). La forte solubilité des phases de la pyrite Es ainsi que leur aspect au microscope optique montrent que ces structures sont sans doute mal organisées et mal cristallisées. La pyrite K semble présenter des phases mieux structurées.

La très grande majorité des composés superficiels analysés sur les deux pyrites sont des sulfates de fer. Les sulfates ferreux sont majoritaires sur la pyrite Es (2/3 des sulfates dosés). Bien que des sulfates ferriques y soient présents en quantité moindre (1/3), il ne sont pas détectés par l'analyse XPS. En revanche, ils constituent la quasi-totalité des sulfates mis en évidence sur K (Raman, XPS et dosages ICP). Ce résultat peut s'expliquer par le caractère plus réducteur du minéral Es. Son potentiel électrochimique de repos est en effet plus bas (240 mV/ECS) que celui du minéral K (400 mV/ECS).
Les oxyhydroxydes de fer ne représentent qu'une faible proportion des phases oxydées (<10% pour Es et environ 20% pour K). Le fait qu'ils soient aisément solubilisés indique qu'ils sont également associés aux sulfates hydrosolubles. Ce résultat est confirmé par l'analyse Raman.

D'après les résultats des élutions sélectives dans l'hexane et le méthanol, trois types de soufre peuvent être distingués sur les deux pyrites :

- un soufre "visible" indépendant des autres phases de surface et directement en contact avec le minéral. Il est électrochimiquement actif et représente 4% du signal XPS pour les deux types de sulfures. Cependant, malgré un taux de recouvrement identique, les quantités éluées dans

l'hexane sur la pyrite K sont 50 fois supérieures. Il faut donc envisager un empilement beaucoup plus important des molécules de soufre sur la pyrite K.

- un soufre emprisonné au sein des amalgames de sulfates (donc solubilisé en milieu aqueux sous forme de particules colloïdales) non électrochimiquement actif et indétectable en XPS. La pyrite K en comporte deux fois plus que la pyrite Es.
- un soufre solidaire de la surface du minéral mais recouvert par des sulfates ou des amalgames. Ce soufre est électrochimiquement actif mais n'est pas détectable en XPS.

Toutes ces considérations permettent finalement d'ébaucher un modèle schématique de l'organisation des composés oxydés et de leurs proportions respectives à la surface des deux pyrites à l'état naturel (Figure I.41).

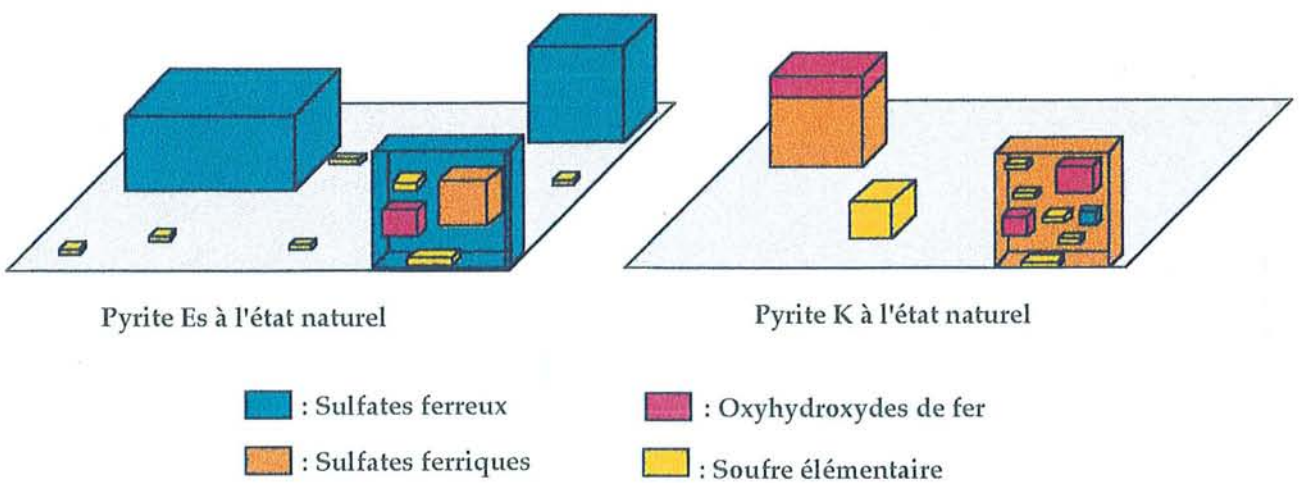
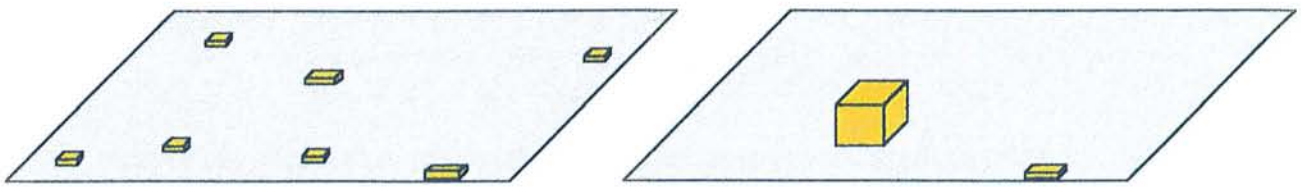


Figure I.41 : Schéma de l'organisation de l'interface des pyrites Es et K à l'état naturel.

Après un autoclavage, les états de surface des deux pyrites sont totalement modifiés. La totalité des phases oxydées du fer et du soufre est solubilisée; seule subsiste une faible proportion de soufre élémentaire et de polysulfures (difficilement quantifiables). Ce soufre élémentaire résiduel correspond aux molécules initialement en contact avec le minéral (c'est-à-dire le soufre non amalgamé), qui ont résisté aux conditions particulières de température et de pression de l'autoclavage. Si le taux de recouvrement du soufre S_8 est identique pour les deux pyrites autoclavées (même contribution de 5% au signal XPS total et même réponse électrochimique), la hauteur des piliers de soufre est très supérieure sur la pyrite K. En effet, les dosages indiquent que la pyrite K autoclavée comporte 20 fois plus de soufre que la pyrite Es autoclavée.

Les résultats des analyses Raman permettent d'avoir une idée sur la répartition de ces piliers de soufre à la surface des deux minéraux : la pyrite Es comporte de nombreux petits piliers éparpillés de

façon assez régulière sur la surface, puisque le soufre est facilement repéré en Raman en focalisant le faisceau au hasard sur les grains. Les molécules de soufre sont toutes regroupées en quelques piliers plus larges et plus haut sur la pyrite K car ils sont très difficiles à dépister en Raman.



Pyrite Es autoclavée

Pyrite K autoclavée

Figure I.42 : Schéma de l'organisation de l'interface des pyrites Es et K autoclaées.

Chapitre II

LA BIOLIXIVIATION DES PYRITES : ROLE DE L'INTERFACE

Chapitre II

EVOLUTION DE L'INTERFACE AU COURS DU CYCLE DE BIOLIXIVIATION.

Les aspects cinétiques de la biooxydation des sulfures par *Thiobacillus ferrooxidans* sont en général abordés par le suivi de différents paramètres en solution (espèces solubilisées, croissance bactérienne et pH). Cette approche s'inscrit bien dans une démarche de mise au point de procédés mais s'avère insuffisante pour comprendre et décrire les mécanismes de la biolixiviation des sulfures.
Le premier chapitre a souligné l'importance de l'hétérogénéité chimique et structurale de la surface des pyrites oxydées à l'air. Bien que l'interface minéral y soit décrite de façon plutôt statique, les expériences de désorption ou d'électrochimie montrent que la surface se réorganise au contact de milieux liquides. Les résultats laissent aussi entrevoir les liens existant entre la réactivité du minéral, la nature et l'organisation des phases, et le comportement de l'interface en milieu aqueux (solubilisation). Ainsi, par analogie avec l'oxydation à l'air, l'organisation particulière des phases à la surface des pyrites au cours de l'oxydation bactérienne, témoignerait des différentes réactions biophysicochimiques dont l'interface est le siège. Par conséquent, pour comprendre réellement les mécanismes de biolixiviation, il est indispensable de pouvoir corréler les cinétiques de dissolution à l'évolution chimique de l'interface.

I. APPROCHE GLOBALE : LES ASPECTS CINETIQUES.

Pour une pyrite donnée, la cinétique de biolixiviation dépend de paramètres opératoires qui peuvent modifier l'activité bactérienne (nutriments, oxygénation, éléments toxiques) ou l'oxydabilité chimique du minéral (espèces oxydées en solution, hétérogénéité des phases

minérales...). Toutefois, un grand nombre de paramètres relatifs aux différents acteurs du système (minéral, solution, bactéries) interviennent, se combinent et finalement déterminent les modalités de l'oxydation bactérienne d'une pyrite.

1. Influence de l'inoculum :

a. Etat physiologique des bactéries :

Les travaux précédents réalisés sur le système *Thiobacillus ferrooxidans*/pyrite, ont montré l'importance considérable de la qualité de l'inoculum dans la cinétique de dissolution du sulfure.
Un inoculum issu d'une culture en phase stationnaire est moins efficace qu'un inoculum provenant d'une culture en phase exponentielle. En effet, un délai de 3 à 4 jours est nécessaire avant que l'oxydation ne commence. Cette période de latence dépend notamment de l'état énergétique des bactéries et en particulier du stock d'ATP cellulaire (déterminé par bioluminescence), plus faible pour les bactéries en phase stationnaire ($2{,}3.10^{-8}$ ng/bact) que pour les bactéries en phase exponentielle ($1{,}8.10^{-7}$ ng/bact) (MUSTIN, Thèse, 1992).

b. Variation de l'activité bactérienne avec la nature du substrat :

Comme la plupart des microorganismes, les Thiobacilles peuvent s'adapter à divers substrats solubles ou solides et récupérer ainsi plus ou moins d'énergie (ΔG) en fonction de la nature du donneur d'électrons. L'adaptation de *Thiobacillus ferrooxidans* à différents substrats (Fe^{2+}, S° ou pyrite) montre que les bactéries cultivées sur pyrite ou sur soufre élémentaire ont une activité oxydatrice initiale nettement supérieure à celles cultivées sur Fe^{2+} (DZIURLA, Thèse, 1995). Au bout de quelques jours, les activités oxydantes sont comparables. Toutefois, ce phénomène ne se manifeste pas par une augmentation de la lixiviation, mais uniquement par la diminution de la durée de la phase de latence. Ces observations soulignent avant tout le rôle déterminant du substrat sur l'activité de *Thiobacillus ferrooxidans* au cours des réactions d'amorce de l'oxydation des minéraux sulfurés.

2. Influence des facteurs minéralogiques :

a. Les propriétés cristallochimiques :

L'étude menée dans le chapitre I montre que l'oxydation à l'air conduit à une proportion et à une organisation très différente des phases oxydées superficielles pour les deux types de pyrite Es et K. Ces propriétés intrinsèques du minéral déterminent sans doute les cinétiques de dissolution des deux sulfures. La Figure II.1 montre clairement, pour une même granulométrie et un même inoculum, l'importance du facteur minéral. L'oxydation plus importante de la pyrite Es par rapport à la pyrite

K se caractérise à la fois par une cinétique de dissolution plus rapide, par un pourcentage final de pyrite oxydée plus important et par une meilleure croissance de la population bactérienne.

Cette différence de comportement est confirmée par les observations microscopiques (figure II.2). Après 50 jours de biolixiviation, la pyrite Es présente de très nombreuses figures de corrosion en forme de tunnels rectilignes et parallèles. La pyrite K, en revanche, semble beaucoup moins corrodée et la répartition des piqûres est plus hétérogène.

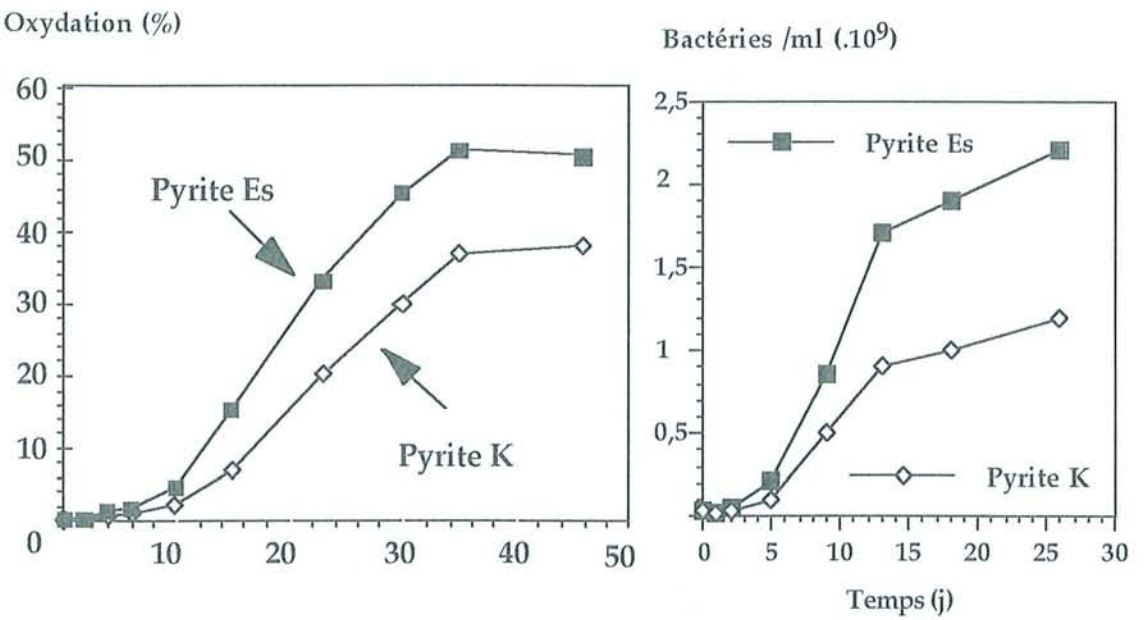
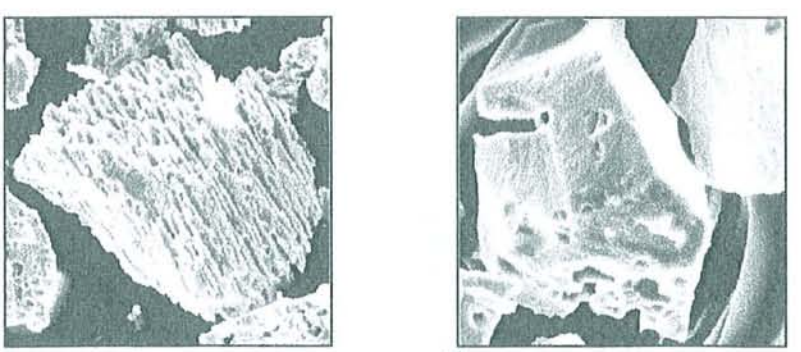


Figure II.1 : Comparaison des cinétiques de dissolution des deux pyrites Es et K (fraction granulométrique 32-53 μm)



2a. 2b.

Figure II.2 : Observation au Microscope Electronique à Balayage de grains de pyrites après 50 jours de biolixiviation.
2a. Pyrite Es 2b. Pyrite K

b. La granulométrie :

Les expériences menées en présence du même inoculum, sur un même minéral à différentes granulométries montrent l'importance considérable de la taille des particules dans la cinétique de dissolution (Figure II.3).

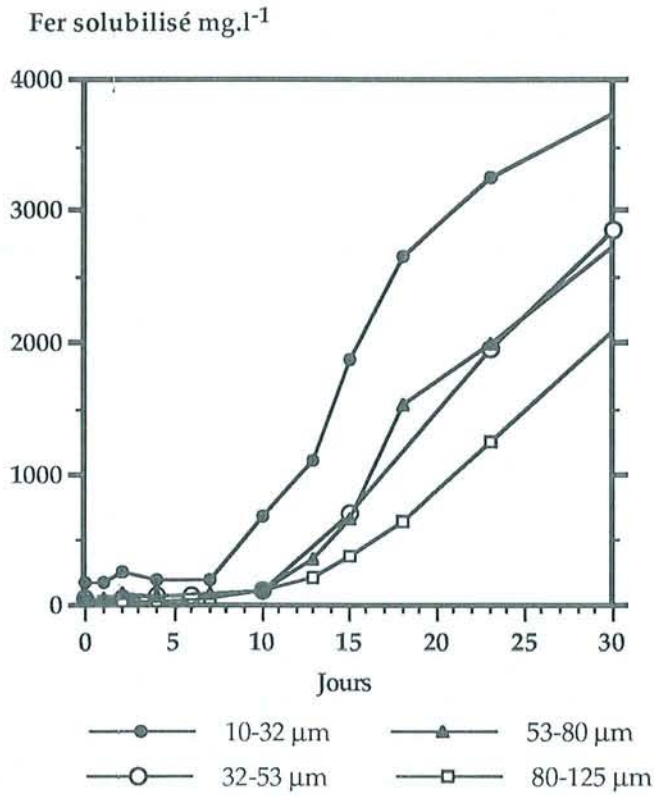


Figure II.3 : Cinétique de dissolution de la pyrite Es en fonction de la granulométrie.

On constate en effet, que plus la granulométrie du minéral est fine, plus l'oxydation est efficace. Cela se manifeste de plusieurs façons :

(i) les phases de latence des processus de lixiviation et de croissance bactérienne diminuent avec la taille des particules

(ii) la vitesse d'oxydation (caractérisée par la pente de la courbe de solubilisation du fer) augmente

(iii) le pourcentage de pyrite oxydée en fin de lixiviation est accru.

Plusieurs raisons peuvent être invoquées pour expliquer les cinétiques de lixiviation plus rapides observées avec les fractions fines. La plus évidente est la formation, lors de broyages intensifs, de surfaces importantes très réactives et souvent amorphisées. Une surface spécifique accrue conduit, en effet, à une réactivité et une instabilité décuplée de la phase minérale.

Cependant, un autre phénomène intervient si l'on considère la quantité de fer en solution au temps t0 de la biolixiviation (Figure II.3) : plus la taille des particules est faible, plus la quantité de fer en solution en début de biolixiviation est importante. Comme il a été démontré dans le chapitre I, le fer total détecté initialement en solution provient de la solubilisation des phases superficielles lors de l'autoclavage. La figure II.4 montre que la quantité de fer et de soufre total impliqués dans les produits d'oxydation superficiels d'une pyrite, augmente quand la taille des particules diminue. Ce résultat est symptomatique d'une surface spécifique ainsi que d'une réactivité plus importante des fractions fines, qui conduisent à la formation d'espèces oxydées plus nombreuses par gramme de minéral.

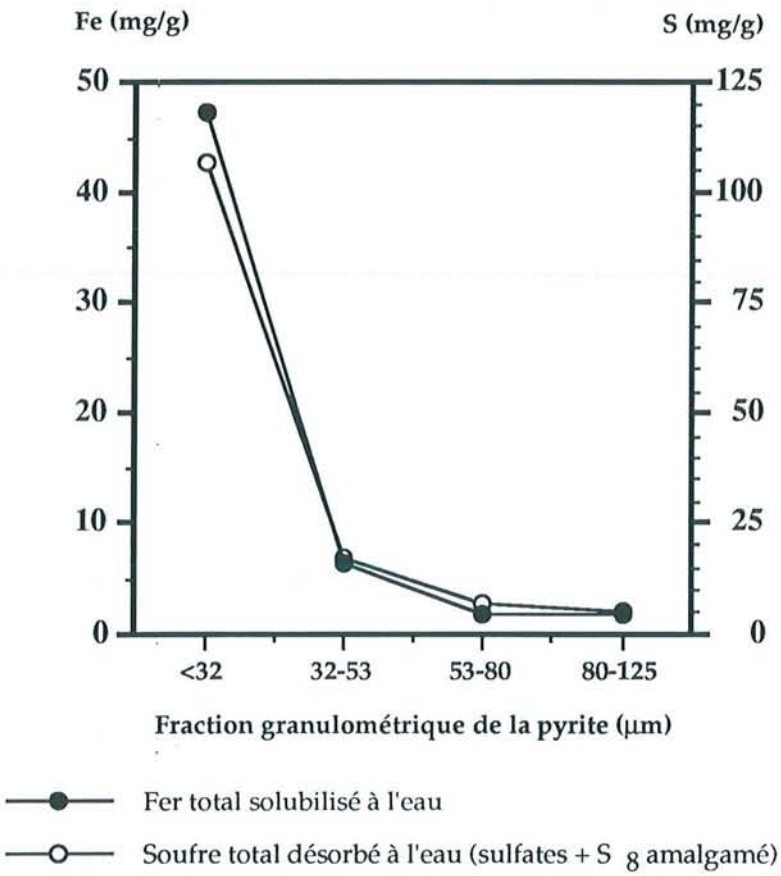


Figure II.4 : Quantité de fer et de soufre désorbées à l'eau de la surface d'une même pyrite à différentes granulométries.

Ces phases oxydées initialement présentes à la surface des pyrites jouent-elles un rôle déterminant dans les processus de lixiviation ou ne sont elles que le reflet des propriétés minéralogiques et cristallographiques du minéral qui, seules, conditionnent la biolixiviation?

Afin de répondre à cette question et de déterminer si l'oxydabilité accrue des fractions fines est due uniquement aux surfaces spécifiques importantes développées ou si la quantité des phases superficielles initiales solubilisées est déterminante, il faut comparer les cinétiques sur une même pyrite, de fraction granulométrique définie mais dont l'état de surface initial a été modifié.

c. L'état initial d'oxydation du minéral :

Une même fraction granulométrique a été divisée en deux lots destinés à une biolixiviation par un même inoculum de *Thiobacillus ferrooxidans*. Le premier lot est autoclavé dans son état naturel d'oxydation, c'est à dire que le minéral est initialement couvert de nombreux composés d'oxydation superficiels (Chapitre I). La pyrite du second lot est débarassée de la totalité de ses phases superficielles par élution à l'eau (sulfates ferreux et ferriques, soufre élémentaire total et oxyhydroxydes de fer amalgamés) avant d'être autoclavée. Un résultat similaire est obtenu si le milieu à l'équilibre avec la pulpe après autoclavage est remplacé par du milieu neuf. La dissolution du fer, indicatrice de la cinétique de lixiviation bactérienne, est suivie pendant plus de 35 jours pour les deux lots de pyrites (Figure II.5).

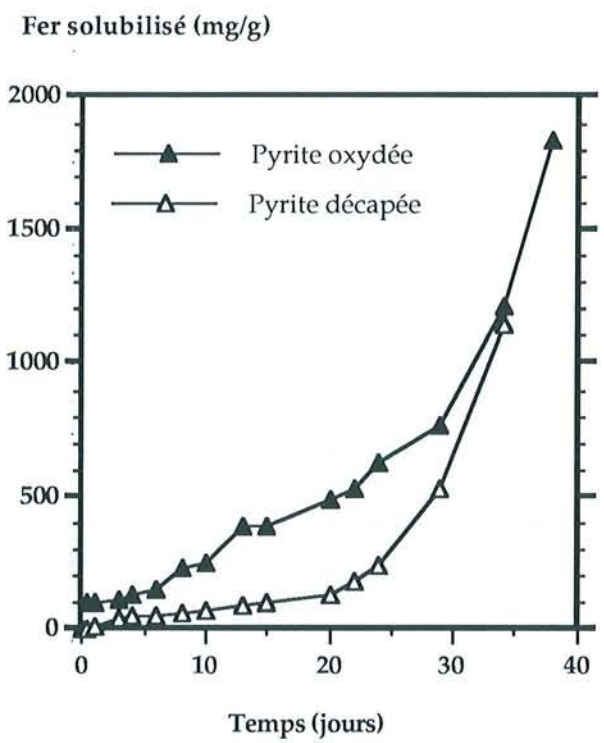


Figure II.5 : Influence de l'état d'oxydation initial d'une pyrite (fraction granulométrique 32-53 µm) sur la cinétique de biolixiviation par *Thiobacillus ferrooxidans*.

A même fraction granulométrique, la pyrite couverte de phases superficielles conduit à une phase de latence plus courte que la pyrite décapée. Le processus de biolixiviation démarre plus rapidement. La différence est surtout évidente pendant les 20 premiers jours du cycle. Par la suite, les deux courbes semblent évoluer parallèlement.

Les composés oxydés provenant de la surface du minéral et solubilisés au cours de l'autoclavage auraient donc un rôle déterminant dans l'initiation du processus de biolixiviation.

En effet, l'étude présentée au chapitre I a montré que l'état de surface du minéral au début du cycle de biolixiviation est identique pour les deux types de pyrites et ne dépend pas de l'état initial

d'oxydation : c'est un état bien décapé (la surface est débarrassée de la majorité de ses produits d'oxydation). En revanche, la composition du milieu M2 après autoclavage des pulpes est dépendante du degré d'oxydation initial du minéral. L'état de surface des pyrites initiales, notamment la quantité de phases superficielles développées, serait primordial pour la lixiviation bactérienne.

Conclusion :

L'ensemble de ces résultats montre qu'il existerait un effet "booster" induit par la présence des phases solubilisées en début de biolixiviation, et que certaines d'entre elles pourraient constituer de bons substrats directement assimilables par les bactéries.

Les phases oxydées de surface sont donc un élément clé pour la compréhension des mécanismes d'oxydation chimique ou bactérienne des minéraux sulfurés. Elles ne sont pas uniquement le reflet de la réactivité et de la dynamique de l'interface, mais semblent jouer un rôle actif et déterminant dans les processus d'oxydation. Afin de préciser le lien entre les phases superficielles, les substrats bactériens, les sites d'adhésion des microorganismes et la corrosion du minéral, il est désormais indispensable de connaître l'évolution parallèle, au cours de la biooxydation, des paramètres en solution et de l'état physico-chimique du sulfure.

II. DESCRIPTION PHYSICO-CHIMIQUE D'UN CYCLE DE BIOLIXIVIATION :

Dans cette partie, un cycle complet de biolixiviation est étudié sur la pyrite K (fraction granulométrique 32-53µm) en prenant en compte à la fois les paramètres en solution (pH, population bactérienne, fer solubilisé et sulfates) et les propriétés physico-chimiques du minéral, afin de cerner au mieux les mécanismes d'oxydation à l'interface. Comme pour l'étude des pyrites à l'état naturel, les spectroscopies XPS et Raman sont destinées à déterminer la nature des composés oxydés évoluant sur la surface tout au long du cycle. Leurs quantités respectives sont estimées à partir d'extractions et de dosages dans différents solvants (eau, hexane ou méthanol).

1. Etude des paramètres en solution :

Les conditions de biolixiviation du réacteur étudié (appelé réacteur R1 dans la suite du mémoire) sont celles utilisées par MUSTIN (Thèse, 1992), DZIURLA (Thèse, 1995) et MELINE (Thèse, 1995). Une pulpe à 2% de pyrite K (4 g dans 200 ml de milieu M2) est agitée dans un réacteur placé dans un bain thermostaté à 30°C.

Avant inoculation à 2.10^7 bactéries.ml^{-1}, la pulpe est autoclavée afin de s'affranchir de toute contamination extérieure. L'étude réalisée dans le premier chapitre montre que cette opération provoque la solubilisation de la quasi-totalité des phases superficielles du minéral. Le milieu M2 se charge alors en fer, en soufre élémentaire, polysulfures, sulfates et oxyhydroxydes de fer. Le minéral présente en revanche une surface exempte de toute trace d'oxydation (excepté une très faible quantité de S_8 et de polysulfures). Les conditions initiales de biolixiviation pour la solution et la pyrite sont résumées dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Résumé des principaux éléments présents en solution et à la surface du minéral à l'instant t0 de la biolixiviation.

	Fer total	Fer (II)	Sulfates	S_8	Polysulfures
Solution (mg/l)	110	11	2700	4	+
Pyrite (µg/g)	ε	ε	ε	150	+

ε : quantité négligeable + : présence démontrée mais non quantifiée

La majorité des sulfates en solution est apportée par le milieu M2. Un dosage permet d'en estimer la concentration à 2300 mg/l. La solubilisation des sulfates ferreux et ferriques du minéral apporte donc 400 mg/l de sulfates supplémentaires. Il est alors possible de calculer la quantité de sulfates initialement présents sur un gramme de minéral : le calcul donne 20 mg/g. Ce résultat est en accord avec les quantités extraites à l'eau et dosées en ICP sur la pyrite K à l'état naturel (16,4 mg/g) (Chapitre I, III-2).

L'étude de la courbe de croissance bactérienne permet de distinguer trois étapes dans le développement de la population (Figure II.6).

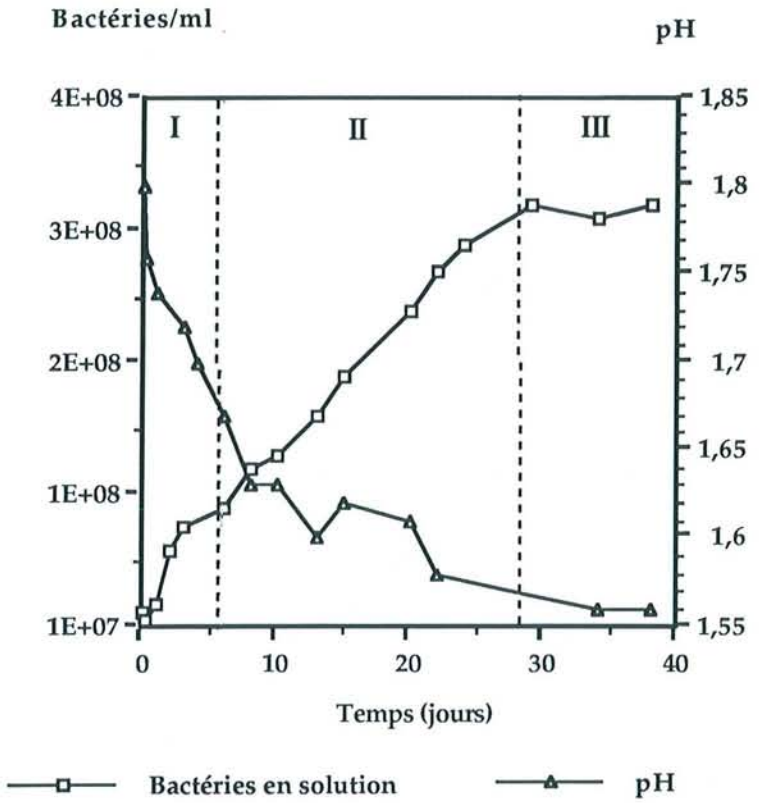


Figure II.6 : Evolution du nombre de bactéries en solution et du pH au cours du cycle de biolixiviation dans le réacteur R1.

(i) Une première phase de croissance rapide entre 1 et 6 jours (Phase I), qui intervient après adsorption d'environ 25% des microorganismes à la surface de la pyrite.

(ii) Une deuxième phase de croissance plus lente entre 6 et 30 jours (Phase II).

(iii) Enfin une phase stationnaire après 30 jours de culture au cours de laquelle la population des microorganismes n'augmente plus (Phase III).

Ce comportement diffère légèrement du comportement "classique" d'une population bactérienne en cours de lixiviation. Généralement, une phase de latence de 1 à 5 jours précède les phases exponentielle et stationnaire de croissance.

Dans l'expérience décrite ici, cette phase de latence est quasiment absente et remplacée par un développement rapide de la population entre 0 et 6 jours. Cette croissance importante s'accompagne d'une diminution sensible du pH (Figure II.6) et de la diminution de la quantité de fer(II) en solution (Figure II.7), sans augmentation significative du fer en solution (Figure II.8).

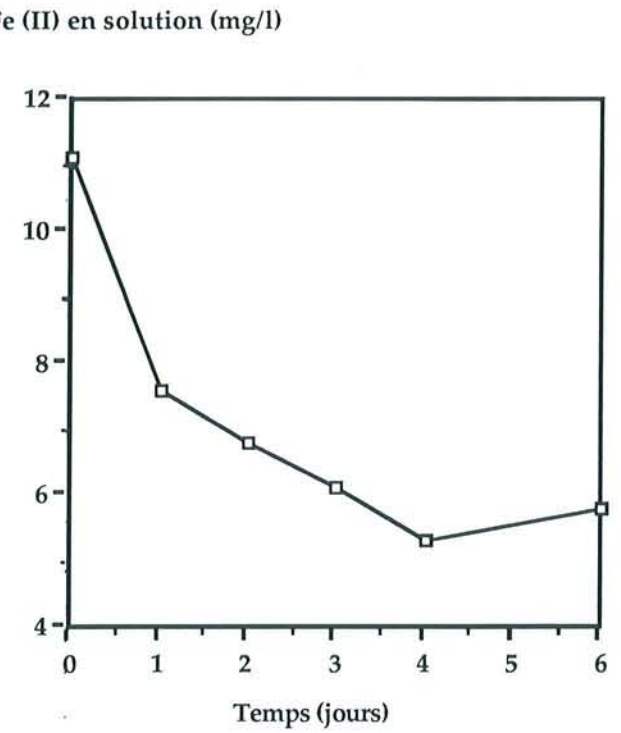


Figure II.7 : Evolution de la concentration de fer(II) en solution pendant les six premiers jours du cycle de biolixiviation.

Durant cette première phase, les Thiobacilles semblent utiliser préférentiellement les deux substrats disponibles en solution que sont les ions ferreux et le soufre élémentaire colloïdal. Le fer (II) est oxydé par voie bactérienne (Eq. II.1) :

$$4\ Fe^{2+} + 4\ H^{+} + O_2 \text{ ---> } 4\ Fe^{3+} + 2\ H_2O \qquad \text{(Eq. II.1)}$$

L'oxydation du soufre élémentaire (et sans doute des polysulfures) génère des protons et contribue à l'acidification du milieu (Eq.II.2) :

$$S_8 + 12\ O_2 + 8\ H_2O \text{ ---> } 16\ H^{+} + 8\ SO_4^{2-} \qquad \text{(Eq. II.2)}$$

Cette oxydation préférentielle du soufre est confirmée par l'étude des courbes de solubilisation du fer et des sulfates (Figure II.8).

Entre 0 et 6 jours, la quantité de sulfates en solution augmente de façon significative et concommitante à l'acidification générée par l'oxydation du soufre élémentaire colloïdal en solution (Eq. II.2). Durant cette même période, la quantité de fer total en solution reste stable et indique que la solubilisation de la pyrite par oxydation bactérienne ne s'est pas amorcée : les microorganismes utilisent principalement les substrats dissous.

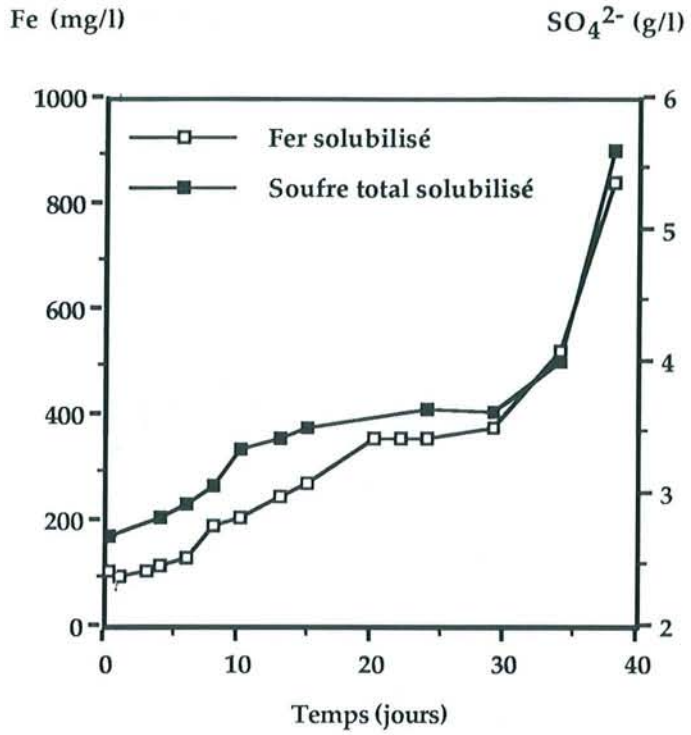


Figure II.8: Evolution du fer et des sulfates en solution au cours du cycle de biolixiviation du réacteur R1.

L'étude des voltamogrammes réalisés sur la pyrite du réacteur R1 (Figure II.9) montre en revanche, que l'oxydation chimique du minéral par le fer (III) en solution s'effectue pendant cette première phase. Du sulfate ferreux (pic A1), ferrique (pic C1), des oxyhydroxydes de fer (pic C2) et du soufre élémentaire (pic C4) se développent à la surface de la pyrite entre 0 et 6 jours.

Le caractère purement chimique de cette oxydation est mis en évidence par l'étude de la réponse électrochimique d'un témoin chimique d'une pyrite K autoclavée (Figure II.10), plongeant plusieurs jours dans du milieu M2 abiotique contenant 100 ppm de Fe^{3+} : les mêmes pics A1, C1, C2 et C4 apparaissent entre 3 et 6 jours de contact entre le minéral et la solution riche en oxydant. Toutefois, les intensités mesurées indiquent un développement plus important de ces phases dans le témoin chimique. Ce résultat sera repris dans la suite de la corrosion.

Ce développement de phases superficielles et notamment de soufre S_8 (pic C4) à l'interface pyrite/solution, est confirmé par les extractions à l'hexane et leur dosages en GC-MS (Figure II.11). Elles montrent que la fraction du soufre extractible à l'hexane (donc éventuellement accessible par les microorganismes), dont une partie est électrochimiquement active, augmente entre 0 et 6 jours. C'est le résultat de l'oxydation chimique de la surface par le fer (III).

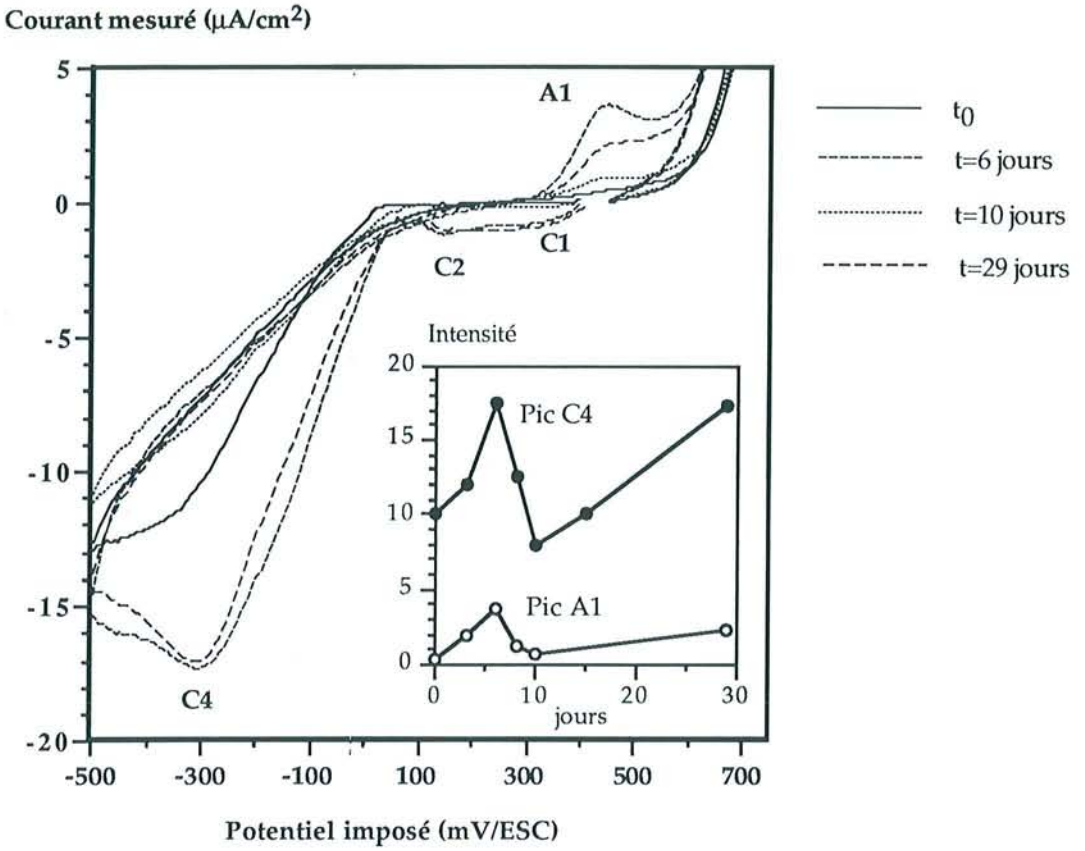


Figure II.9: Voltamogrammes (en balayage cathodique) illustrant l'évolution de l'état de surface de la pyrite dans le réacteur R1 au cours du cycle de biolixiviation.

La phase II, correspondant à la phase exponentielle de croissance des bactéries (entre 6 et 30 jours), est caractérisée par une augmentation régulière des sulfates et du fer total en solution (Figure II.8). Parallèlement, le pic C4 (indicateur du soufre élémentaire électrochimiquement actif) des voltamogrammes diminue progressivement entre 6 et 29 ainsi que le pic A1 (indicateur des sulfates ferreux) entre 6 et 10 jours. La figure II.11 montre en outre que la quantité de soufre extractible à l'hexane diminue très nettement entre 6 et 15 jours.

A partir de 6 jours, les bactéries bénéficient donc d'une source supplémentaire d'électrons : elles métabolisent les substrats nouvellement formés à la surface du minéral. Le fer (II) et le soufre en solution ne constituent plus les substrat principaux et les bactéries oxydent directement le soufre élémentaire et les sulfates ferreux à la surface du minéral.

C'est donc durant cette étape que le minéral subit une importante oxydation bactérienne. La suite de l'étude (Chapitre II.2) sera donc destinée à mettre plus particulièrement en évidence les bouleversements physico-chimiques de la surface au cours de ce processus.

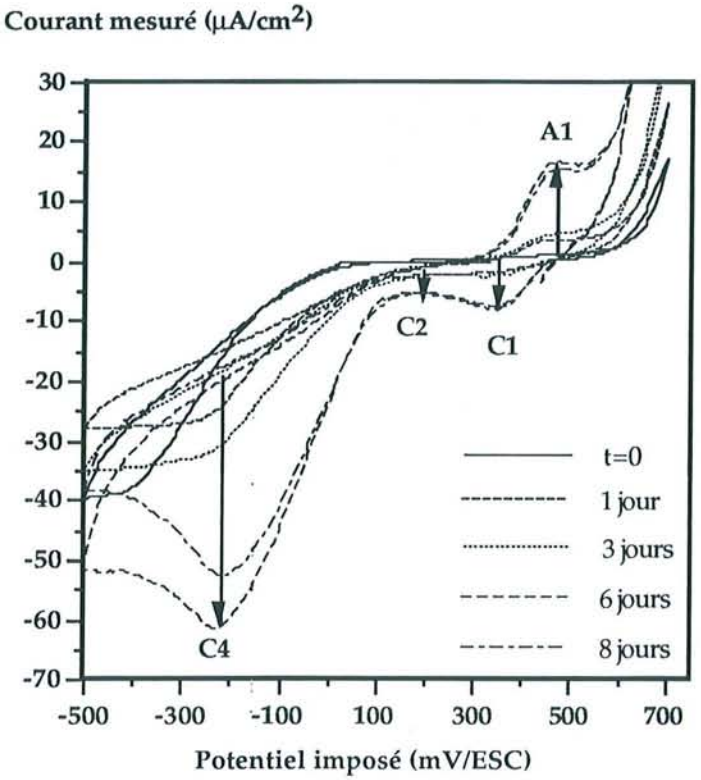


Figure II.10 : Evolution de la réponse électrochimique d'une pyrite au cours de son oxydation chimique (Témoin) par le Fe^{3+} (100 ppm en solution).

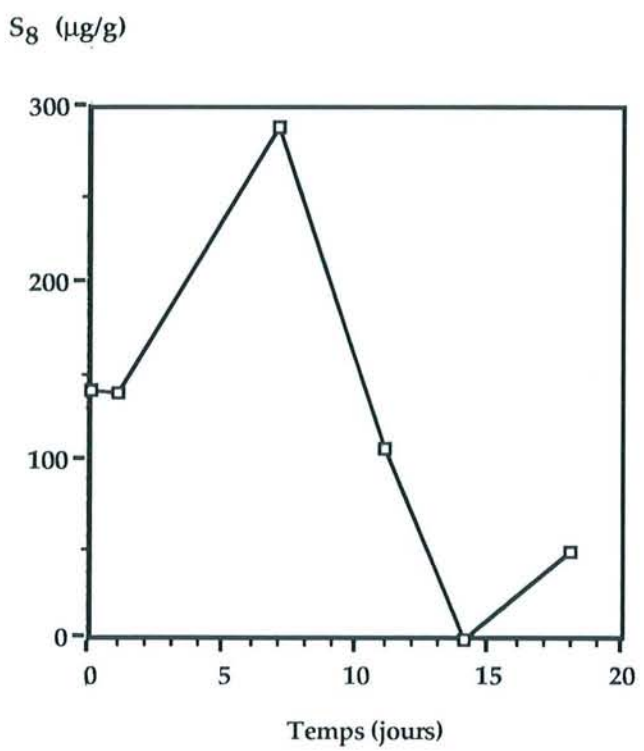


Figure II.11: Evolution de la quantité de soufre superficiel S_8 extractible à l'hexane.

Les courbes de solubilisation du fer et des sulfates (Figure II.8) atteignent ensuite un plateau entre 20 et 30 jours : c'est l'amorce de la phase stationnaire. La population microbienne se stabilise : les microorganismes ne métabolisent désormais que très peu de substrat. Les courbes prennent ensuite une allure d'exponentielle croissante après 30 jours de lixiviation. Ce changement de concavité correspond au début de la prédominance de l'attaque chimique sur l'oxydation biologique puisque la quantité de fer (III) en solution a fortement augmenté durant les phases I et II du cycle. Il constitue la totalité du fer dès le troisème jour.

Dans la phase III, cet oxydant chimique puissant prend le relais des microorganismes pour l'oxydation du sulfure. L'étude électrochimique montre en effet, que les courants enregistrés aux pics A1 et C4 sont plus intenses (Figure II.9). Cependant, en plus des sulfates ferreux et du soufre élémentaire, d'autres produits d'oxydation apparaissent à la surface du minéral : des sulfates ferriques $Fe_2(SO_4)_3$ (pic C1) et des oxyhydroxydes de fer FeOOH (pic C2).

Un développement important de ces phases oxydées (qui ne sont pas des substrats bactériens puisque le fer et le soufre sont à leur degré maximal d'oxydation) pourrait provoquer le recouvrement des substrats solides de surface ($FeSO_4$ et S_8) et entrainer la stagnation de la croissance des microorganismes, privés d'une grande partie de leurs nutriments.

2. Evolution de l'état de surface de la pyrite au cours de la biolixiviation :

Afin de préciser l'évolution de l'état de surface du minéral au cours du cycle de biolixiviation, on a utilisé les mêmes techniques que pour la caractérisation des pyrites à l'état naturel (XPS, Raman, désorption sélectives du fer et du soufre de surface).
La spectroscopie XPS doit permettre d'estimer l'évolution 2D des phases oxydées au cours de la lixiviation bactérienne, alors que la spectroscopie Raman en donne une analyse plus globale.

a. Etude par spectroscopie XPS :

L'état de surface initial du minéral après autoclavage a déjà été décrit dans le premier chapitre : 95% du signal XPS de la pyrite autoclavée provient du minéral pur FeS_2 et 5% du signal total est attribué au soufre élémentaire S_8.
Le spectre de la pulpe prélevée le 3^e jour de biolixiviation met en évidence une certaine oxydation de la surface (Tableau II.2).

Tableau II.2 : Décomposition des orbitales Fe(2p)3/2 du fer et S(2p) du soufre pour pyrite prélevée dans le réacteur R1 le 3e jour de biolixiviation.

Orbitales	Energie de Liaison (eV)	% Pic	% Total	Attribution
	707,7	46	5,7	FeS_2
$Fe(2p)_{3/2}$	709	35,6	4,4	Fe(III)-O, Fe(III)-OH ou Fe(III)-OOH
	712,7	18,4	2,3	$Fe_2(SO_4)_3$
$\Sigma\ Fe(2p)_{3/2}$		*100*	*12,3*	
	162,2	73,4	22	FeS_2
$S(2p)_{3/2}$	164	15,9	4,8	Polysulfures ou S°
	168,1	10,7	3,2	$Fe_2(SO_4)_3$
$\Sigma\ S(2p)_{3/2}$		*100*	*30*	

L'orbitale Fe(2p) du fer témoigne de la formation d'espèces oxydées telles que des oxydes ou des oxyhydroxydes (pic à 709 eV).

L'orbitale S(2p) du soufre (Figure II.12) met en évidence la formation d'une faible quantité de sulfates (doublet à 168,1 eV). Etant donné l'énergie du pic correspondant dans l'orbitale du fer (712,7 eV), il semble que les anions sulfates soient associés à des cations ferriques.

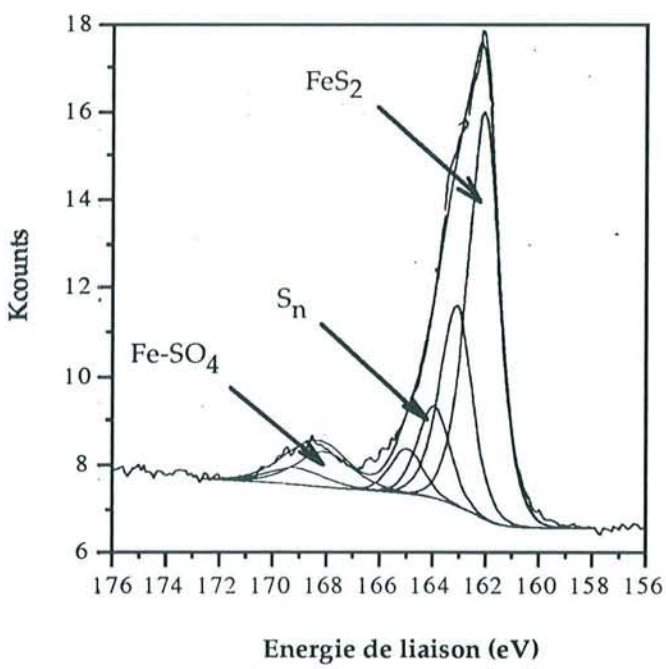


Figure II.12 : Décomposition de l'orbitale atomique S (2p) du soufre de la pyrite au 3e jour de lixiviation dans le réacteur R1.

Ce résultat confirme l'amorce de l'oxydation chimique du minéral par le fer (III) durant la première phase de croissance bactérienne entre 0 et 6 jours (cf. II.1).

A partir du 6e jour, un pic supplémentaire apparaît vers 400 eV dans le spectre global de la pyrite. Il s'agit de l'orbitale N(1s) de l'azote. L'intensité de ce pic augmente entre le 6e et le 10e jour puis reste relativement stable pendant l'ensemble de la biolixiviation (Figure II.13)

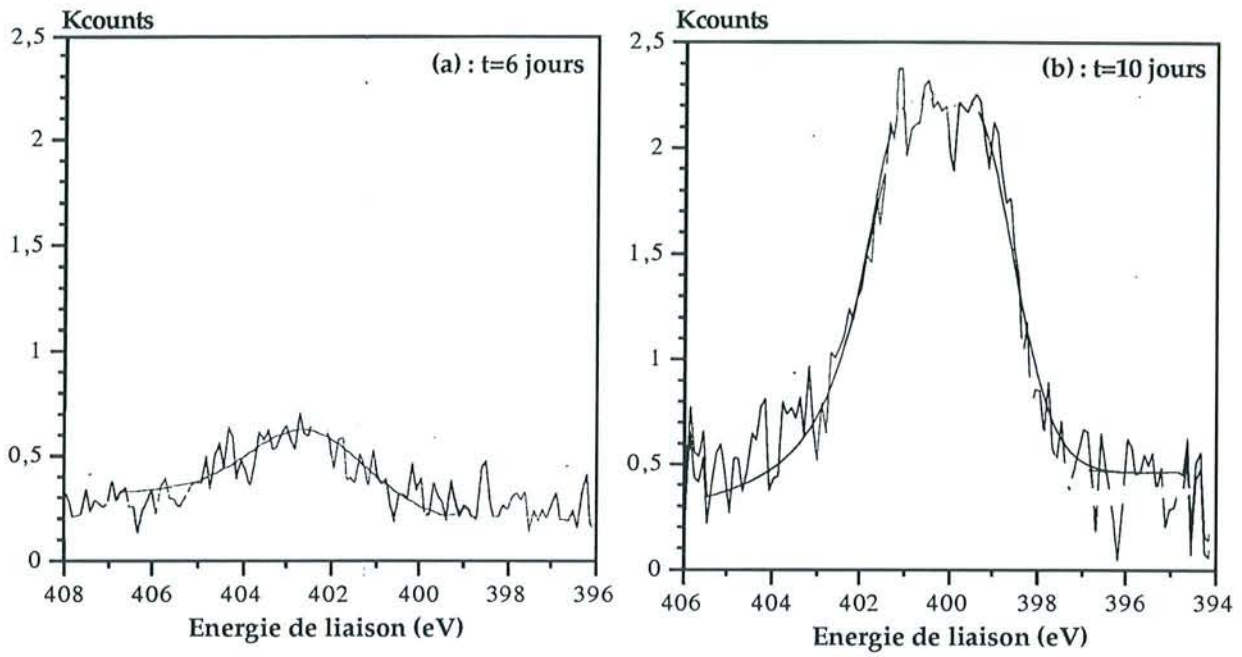
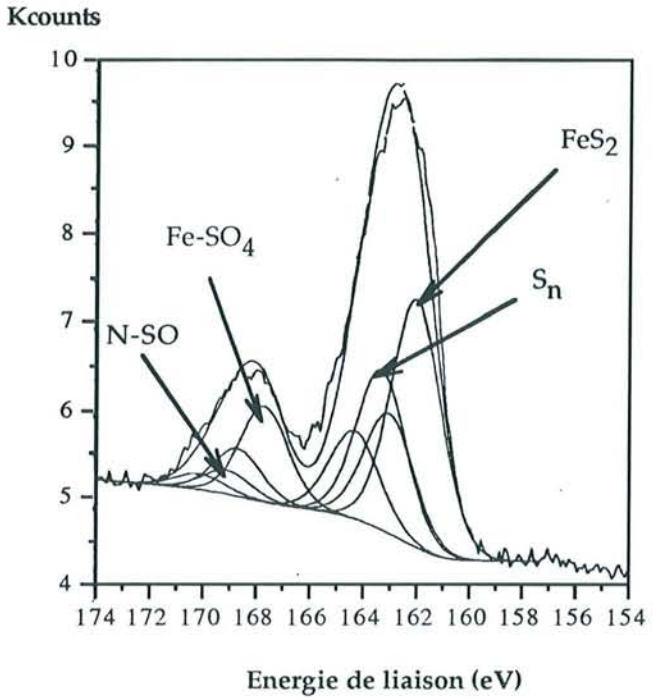


Figure II.13 : Région entre 390 et 410 eV dans les spectres de pyrite issue du réacteur R1 : (a) t=6 jours (surface : 450) (b) t=10 jours (surface : 1500)

Il correspond à l'apparition d'un complexe Amine-Sulfoxyde (liaison N-SO) à la surface des échantillons. Une fraction du pic à haute énergie (entre 166 et 170 eV) dans l'orbitale S(2p) du soufre n'est donc pas due à des sulfates de fer. Par conséquent, dès le 6^{e} jour de lixiviation, la décomposition de ce massif à haute énergie s'effectue à l'aide de deux doublets bien distincts : un doublet à 167,8 eV correspondant à la laison N-SO et un doublet à 169 eV correspondant à la liaison Fe-SO_4 (Figure II.14).

Les analyses CHN réalisées sur les prélèvements de minéral dans ce réacteur entre 6 et 29 jours de biolixiviation donnent une contribution moyenne massique de 0,032% pour le carbone et de 0,009% pour l'azote, ce qui correspond à un rapport C/N de 3,5. Une analyse similaire effectuée sur un culot lyophilisé de *Thiobacillus ferrooxidans* donne un rapport C/N de 3,6, et indique que le signal organique détecté en XPS pourrait être dû à l'adsorption de microorganismes ou de résidus microbiens à la surface du minéral. Les bactéries ou leurs composés recouvrent assez bien la surface de la pyrite, comme le montre l'importance de ce signal en XPS à partir de 6 jours (correspondant au début de la phase II de croissance et à l'utilisation des substrats de surface) (Figure II.15).



S.C.D. - U.H.P. NANCY 1

Figure II.14 : Décomposition de l'orbitale du soufre à partir du 6e jour de biolixiviation.

Toutefois, le signal XPS attribuée au minéral pur FeS_2 (Figure II.15) évolue lui aussi en trois phases successives qui pourraient correspondre aux trois phases de la biolixiviation décrites dans le paragraphe II.1 :

Phase I : entre 0 et 6 jours le minéral se couvre de phases oxydées par oxydation chimique due au fer (III) en solution (diminution du signal).
Phase II : entre 6 et 20 jours, les bactéries métabolisent les phases de surface telles que le soufre élémentaire et fer (II) des sulfates ferreux (augmentation du signal).
Phase III : l'oxydation chimique devenant prépondérante dès le 20e jour, la surface se couvre à nouveau de phases oxydées (diminution du signal).

Cependant, pour les phases II et III, l'importance du signal XPS (N(1s)) provenant des bactéries fixées au minéral gêne considérablement l'interprétation des spectres : le signal organique masque probablement une bonne partie du signal des phases superficielles oxydées.

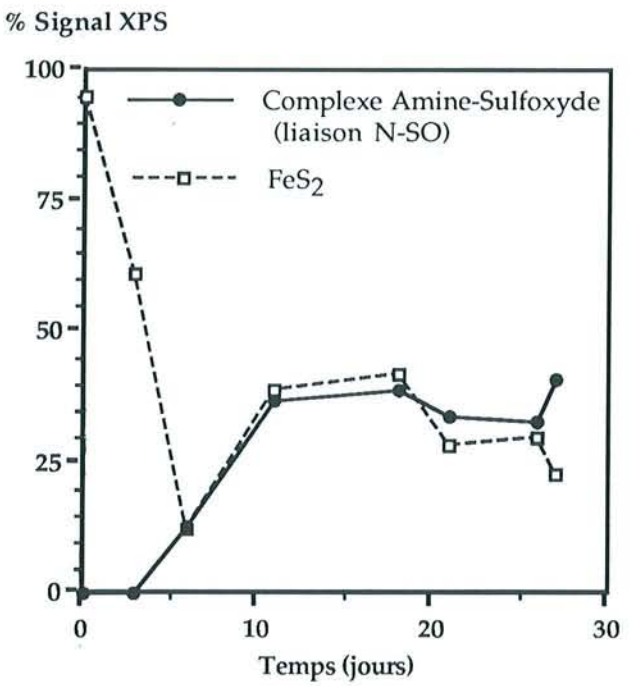


Figure II.15 : Evolution de la contribution du complexe Amine-Sulfoxyde et du minéral FeS_2 au signal XPS total au cours de la biolixiviation.

En effet, les dosages de fer de surface effectués sur la pyrite au cours de la lixiviation confirment que les bactéries se fixent préférentiellement sur les composés oxydés. La figure II.16 montre que les quantités de fer éluées directement à l'eau sont inférieures aux quantités dosées dans l'eau après une élution préliminaire à l'hexane (destinée à solubiliser le film organique). Ces composés organiques peuvent être analysés par GC-MS dans l'extraction hexane (en même temps que le dosage du soufre de surface). Bien qu'on ne puisse en donner une identification précise, les spectres de masse témoignent d'une signature type "acide gras" (C_{16}) très marquée qui pourraient correspondre aux fractions phospholipidiques des parois microbiennes. Une étude plus poussée dans ce domaine serait nécessaire.

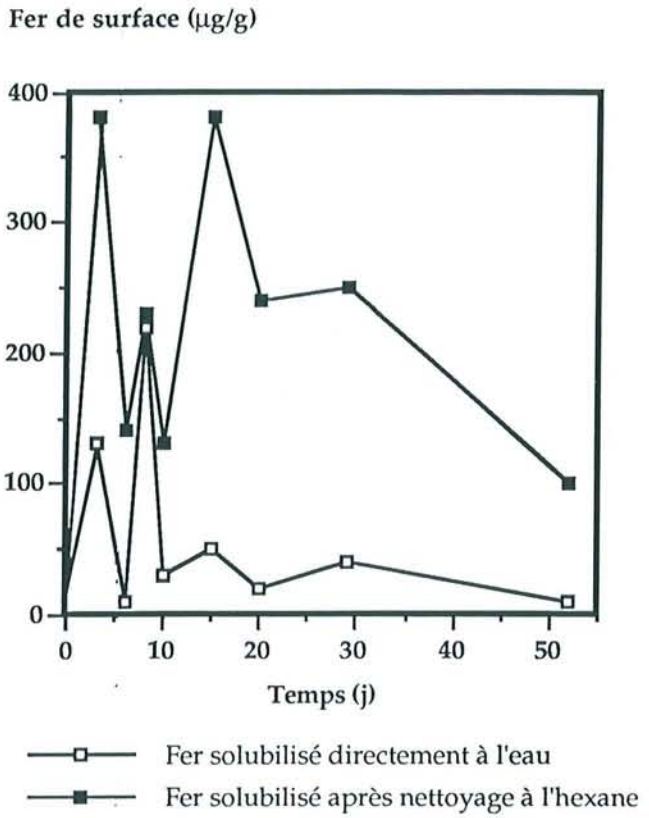


Figure II.16 : Désorption du fer et du soufre directement à l'eau ou après élution à l'hexane.

La spectroscopie XPS, très sensible aux quelques premiers angströms de la surface, ne constitue donc plus une technique adaptée à l'étude de l'oxydation de l'interface puisque le signal des phases minérales superficielles est occulté par celui des bactéries qui y sont fixées.
Pour compenser ce handicap, la spectroscopie Raman, dont la profondeur d'analyse est très supérieure à l'XPS, a été utilisée pour limiter la contribution du signal organique et analyser les phases oxydées.

b. Analyse par spectroscopie Raman :

Le spectre effectué sur la pyrite autoclavée en équilibre avec la solution aqueuse avant inoculation, met en évidence 3 pics (982, 1055 et 1630 cm^{-1}), en plus des modes de vibration caractéristiques du disulfure à 343, 379 et 430 cm^{-1}. Le pic à 1633 cm^{-1} correspond aux vibrations des molécules d'eau du milieu M2. Les pics à 984 et 1055 cm^{-1} disparaissent si le minéral est séché sous azote avant d'être analysé (Figure II.17).

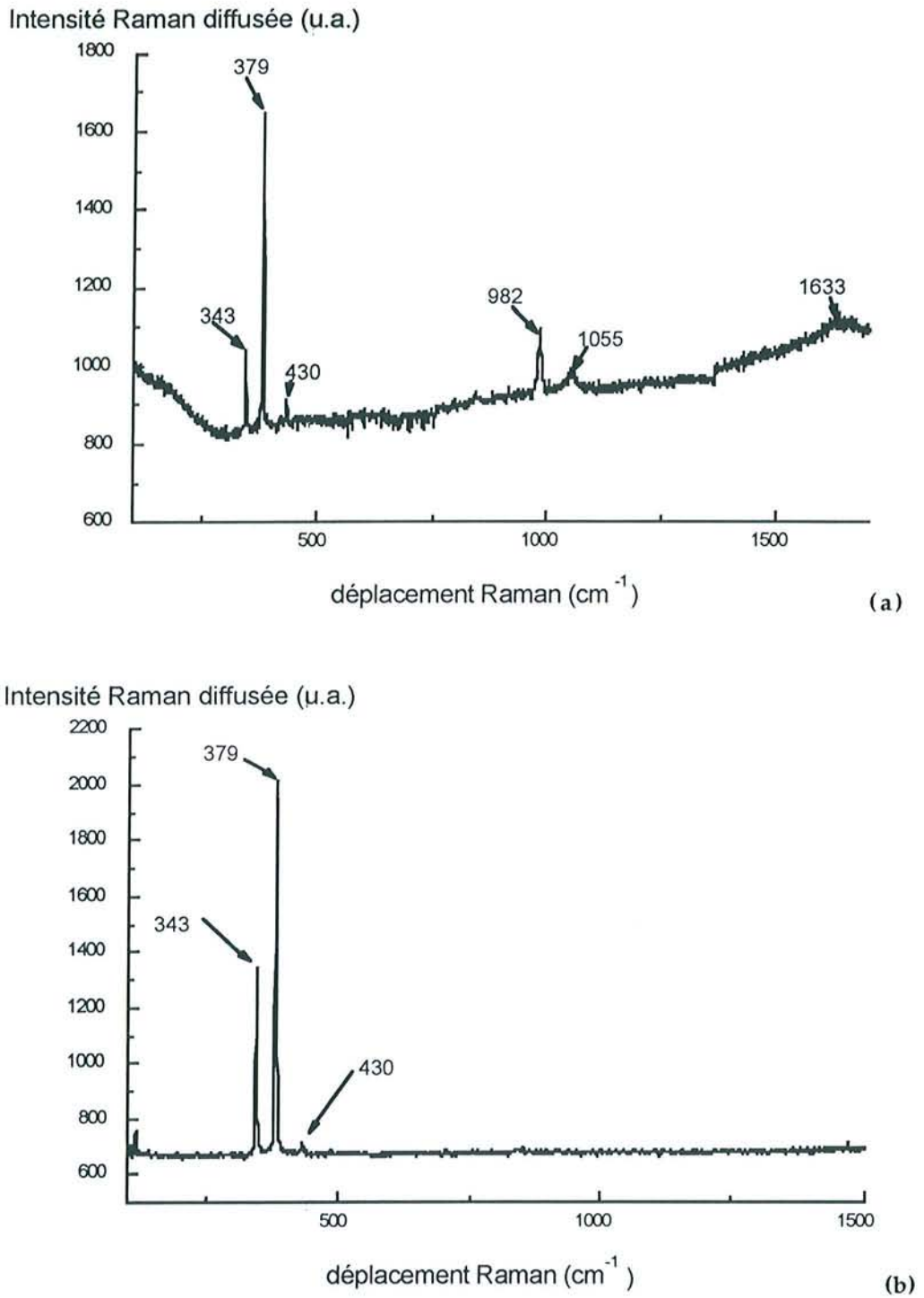


Figure II.17 : Spectres de la pyrite autoclavée réalisé en milieu liquide (a) ou après séchage du minéral (b).

Ces vibrations sont donc attribuées aux sulfates (984 cm^{-1}) et aux carbonates (1055 cm^{-1}) du milieu nutritif M2. Ils seront présents de façon systématique sur tous les spectres réalisés en solution.

L'étude des pyrites prélevées dans le réacteur R1 après 3 jours de biolixiviation comportent cependant d'autres signatures spectrales.

Certains spectres ressemblent à celui de la pyrite autoclavée et mettent en évidence des zones exemptes de toute trace d'oxydation.

D'autres en revanche présentent un large massif de sulfates centré sur 1030 cm^{-1}, avec des composantes probables à 1015 et 1035 cm^{-1} (Figure II.18). Les déformations des groupements sulfates sont bien définies et une levée de dégénérescence est signalée par la présence de deux pics à 585 et 625 cm^{-1}. Le massif à 480 cm^{-1} atteste de la présence de soufre élémentaire de surface (et éventuellement de polysulfures).

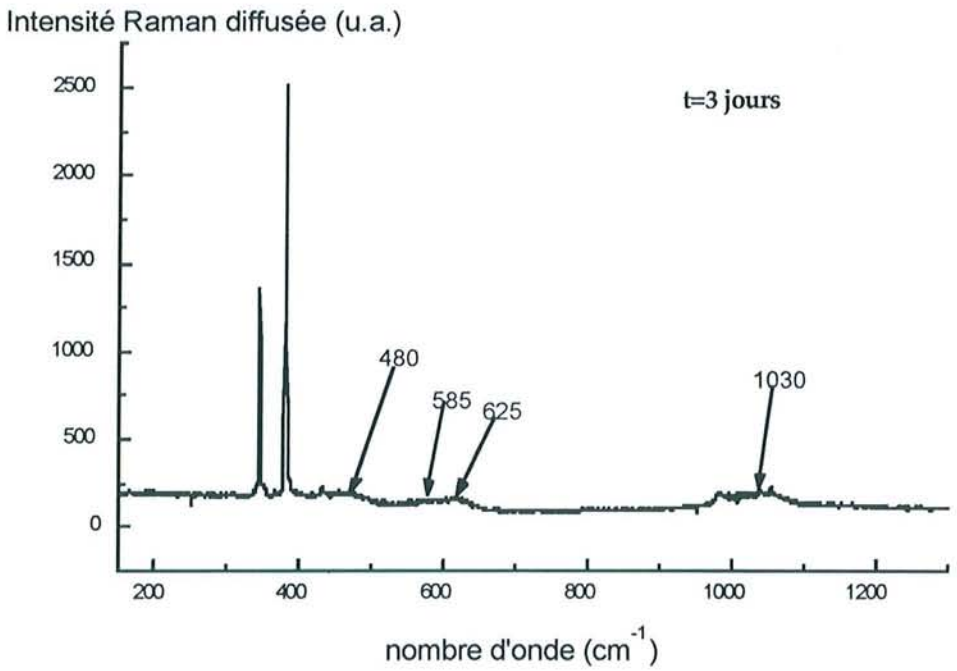


Figure II.18 : Spectre Raman d'une zone faiblement oxydée de la pyrite après 3 jours de biolixiviation.

Après 6 jours de biolixiviation, la pyrite présente deux types de zones caractérisées par deux signatures spectrales différentes. Outre les vibrations d'élongation du soufre élémentaire (et/ou des polysulfures) à 475 cm^{-1} (bande large), deux types de sulfates différents se développent à la surface (Figure II.19):

Type I : ce sulfate est caractérisé essentiellement par une bande vers 1025 cm^{-1} avec une composante à 1045-1050 cm^{-1}. Cette vibration à haute fréquence pourrait correspondre à un sulfate associé à du Fe^{3+} (Figure II.19a).

Type II : ce dernier présente un massif plus large caractérisé par l'émergence d'une composante vers 995-1000 cm^{-1} (sulfates associés au fer(II)?) et une composante à haute fréquence vers 1090 cm^{-1} (Figure II.19b).

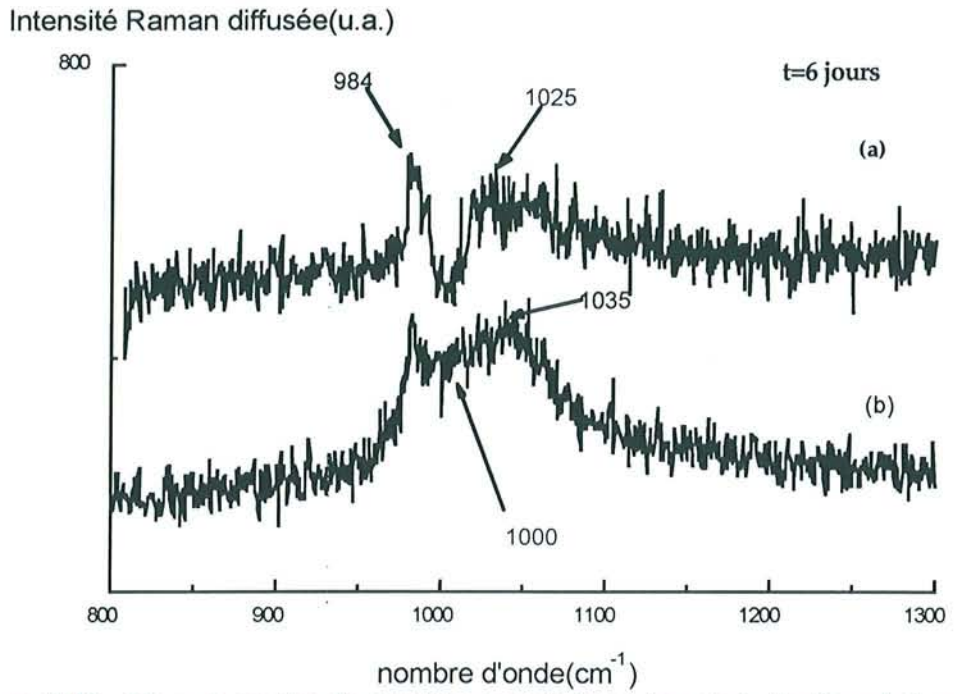


Figure II.19 : Deux exemples de spectres caractérisant les produits d'oxydation de la pyrite du réacteur R1 après 6 jours de biolixiviation.

Ces résultats semblent témoigner de l'oxydation chimique du minéral puisque la signature spectrale concernant l'environnement des sulfates comporte des modes principaux de vibration et d'élongation comparables à ceux d'une pyrite oxydée à l'air.

Les spectres Raman changent totalement d'allure après le 6e jour de biolixiviation. Des amas opaques apparaissent à nouveau en surface. Ils comportent notamment les bandes caractéristiques du soufre élémentaire et probablement des polysulfures (massif centré sur 470 cm^{-1} plus intense). Des massifs très importants sont détectés sur de très nombreuses zones des grains entre 980 et 1150 cm^{-1}, accompagnés de 3 bandes autour 600 cm^{-1} (Figure II.20). Cela signifie que plusieurs types de sulfates coexistent en surface. Leur environnement semble cependant être très différent de celui des sulfates précédemment énoncés. Même un état d'hyperoxydation chimique tel que celui décrit au chapitre I ne provoque pas une telle réponse en spectroscopie Raman. Cette signature spectrale révèle un état d'oxydation particulier des composés de surface, résultant de l'action des microorganismes à la surface minérale.

L'étude des spectres après 29 jours de lixiviation montre des bandes encore très intenses entre 980 et 1150 cm^{-1}, mais mieux résolues et plus fines (Figure II.21). La composante à 990-1000 cm^{-1} s'écroule ainsi que l'une des vibrations autour de 600 cm^{-1}, ce qui pourrait indiquer que la fraction de sulfates de fer (II) disparaît au profit de composés sulfatés du fer (III). Il se pourrait également qu'une certaine symétrie autour des groupements sulfates s'installe à nouveau, traduisant la reprise de l'oxydation chimique par le fer (III) en solution.

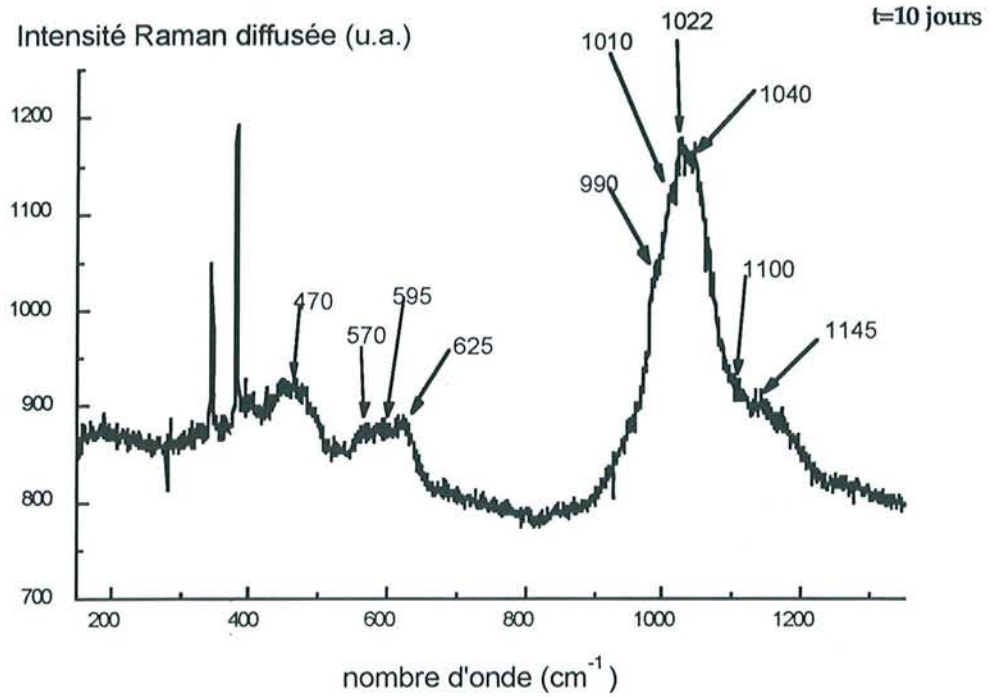


Figure II.20 : Spectre de la pyrite après 10 jours de biolixiviation.

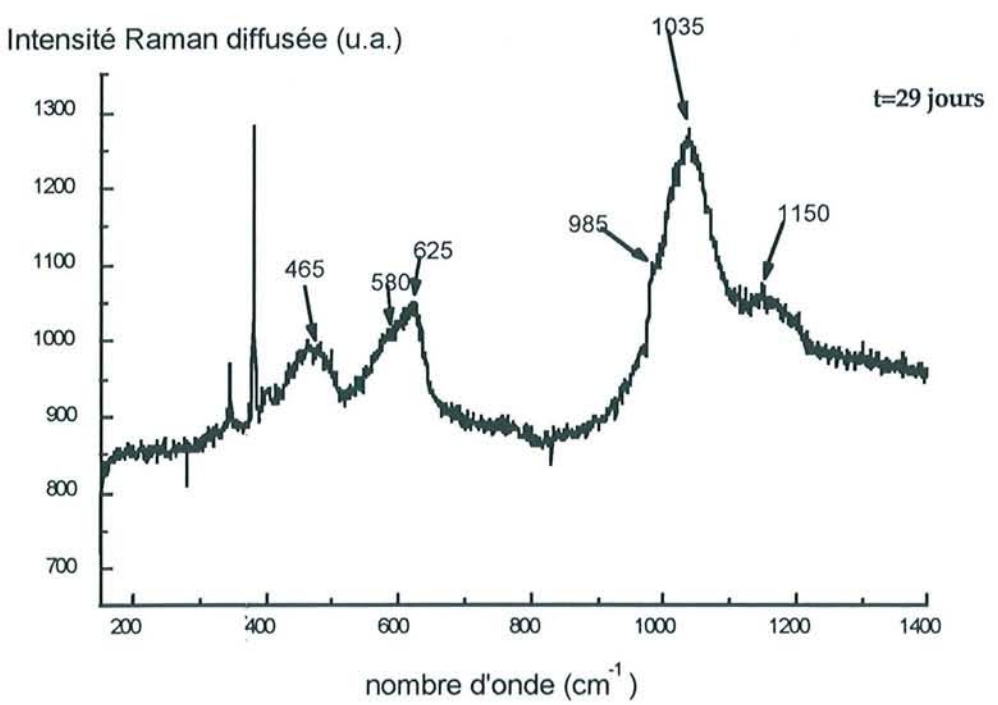


Figure II.21 : Spectre de la pyrite après 29 jours de biolixiviation.

Ainsi, l'analyse du minéral par les deux techniques spectroscopiques a permis de mettre en évidence :

(i) une adsorption importante des bactéries sur les phases oxydées de surface (la spectroscipie XPS est alors inutilisable pour suivre l'évolution 2D des composés superficiels oxydés)

(ii) la présence d'amalgames (amas opaques et non réfléchissants) dès le 10^{e} jour de biolixiviation, constitués de soufre élémentaire et de sulfates dans des environnements chimiques divers

(ii) une signature très intense et très particulière de l'environnement des sulfates lorsque l'oxydation est biologique et non chimique (entre 10 et 29 jours)

Conclusion :

Il existe une relation étroite entre les cinétiques d'oxydation du fer et du soufre mesurables par différents paramètres en solution, et les processus oxydatifs à l'interface bactérie/minéral/solution. Cet interface est le "théâtre d'opération" des processus chimiques (oxydation par le fer (III)) et des processus microbiens divers (adhésion, oxydation des phases de surface...). Il n'est pas pour autant passif et son évolution chimique et structurale au cours des différentes phases de biolixiviation pourrait bien orienter de façon déterminante les cinétiques de dissolution.

Dans cet optique, plusieurs interrogations surgissent et ouvrent de nouvelles voies de recherche :

- Quel est le rôle des phases superficielles? Substrats? Facteurs limitants?
- Quels sont les processus "moteurs" expliquant la dynamique de croissance? Sont-ils chimiques, microbiens, physiques, ou plus généralement bio-physico-chimiques?
- Peut-on décrire de manière déterministe un processus complexe comme la biolixiviation, au travers de l'étude fine de la dynamique de l'interface bactérie/minéral/solution?

III. LES PHASES SUPERFICIELLES SOLUBILISÉES : DE BONS SUBSTRATS BACTÉRIENS

Afin de montrer que les composés oxydés présents à la surface des pyrite à l'état naturel peuvent constituer de bons substrats bactériens, des réacteurs contenant uniquement les solutions à l'équilibre avec la pulpe des pyrites après autoclavage (surnageants) ont été ensemmencés avec des Thiobacilles. Dans ces réacteurs contenant les phases superficielles solubilisées dans du milieu M2, la croissance bactérienne ainsi que l'oxydation du fer et du soufre ont été étudiées.

Deux expériences notées S_K et S_{Es} ont été menées sur les surnageants de pulpes (4% w/w) des pyrites K et Es après autoclavage. Aucun autre substrat soluble ou solide n'est ajouté à ces milieux qui sont inoculés avec une population de *Thiobacillus ferrooxidans* cultivée sur fer(II) pour obtenir une concentration initiale de 6.10^6 bact.ml^{-1}.

Les surnageants des deux pyrites autoclavées qui constituent les milieux de culture des bactéries dans les réacteurs S_{Es} et S_K, ne sont pas limpides. Ils contiennent des particules "floconneuses" et blanchâtres en suspension dont la taille en microscopie optique peut varier de 1 à 20 µm. Les spectres UV réalisés sur les solutions après autoclavage indiquent la présence simultanée de soufre élémentaire et de polysulfures (Figure II.22).

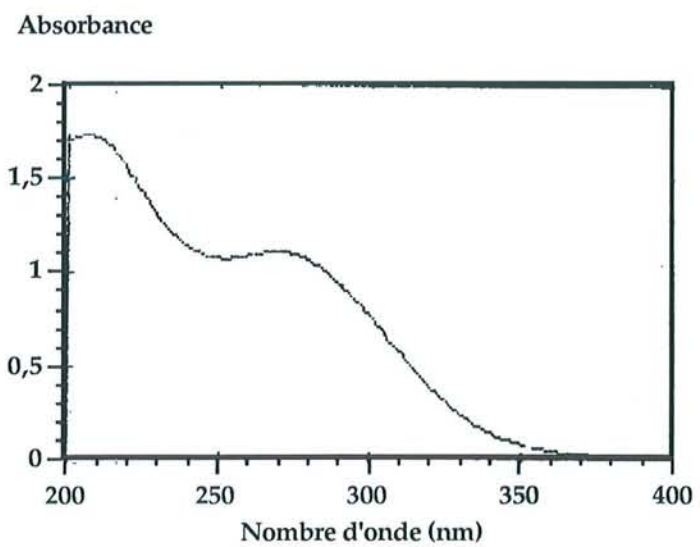


Figure II.22: Spectre UV des milieux de culture initiaux des réacteurs S_{Es} et S_K.

En raison de la mixité du spectre (larges bandes entre 260 et 280 nm), les quantités de soufre élémentaire et de polysulfures ne peuvent pas être dosées précisément. Toutefois, leur abondance relative en début de culture peut être estimée (Tableau II.3) à partir des caractérisations réalisées sur les pyrites Es et K dans le premier chapitre.

Tableau II.3: Compositions initiales des milieux de culture des deux réacteurs S_K et S_{Es} :

	Fe_{total} (mg/l)	Fe^{2+} (mg/l)	S_{total} (mg/l)	S_8	Polysulfures	pH
Réacteur S_K	130	10	2660	++	+	1,73
Réacteur S_{Es}	440	350	3200	+	+	1,78

Ainsi, l'autoclavage apporte en solution deux substrats directement assimilables par les bactéries : les ions ferreux et le soufre élémentaire. Puisqu'aucune méthode précise de dosage des polysulfures n'est envisageable, il est difficile de savoir si ces composés sont directement métabolisés, s'il sont préalablement oxydés en soufre élémentaire (substrat bactérien effectif), ou s'ils sont stables en solution, échappant à toute oxydation chimique et biologique.

Les croissances bactériennes observées dans ces deux milieux (Figure II.23) montrent bien que les phases superficielles constituent, au moins en partie, des substrats biodisponibles. Au cours de la croisssance, trois phases peuvent cependant être distinguées :

- une première phase de croissance très rapide durant les deux premiers jours de culture
- une phase de déclin entre 2 et 10 jours
- enfin, une reprise de croissance après 10 jours de culture.

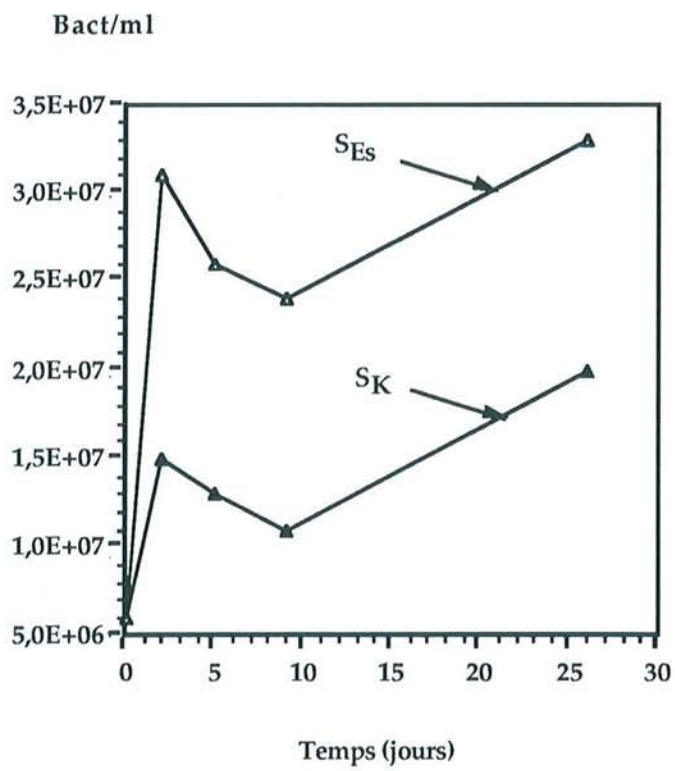


Figure II.23 : Croissance microbienne sur les phases superficielles solubilisées dans le milieu M2 en contact avec les pyrites K (S_K) et Es (S_{Es})

L'évolution du fer(II) et du pH en solution (Figure II.24) permet de mieux interpréter ces croissances microbiennes. Dans la première phase, le fer(II) est oxydé et constitue le principal substrat bactérien (Eq. II.1). Ainsi le développement plus ou moins important de *T. ferrooxidans* dans de cette première étape de croissance ($S_{Es} > S_K$) est à rapprocher directement des quantités de fer(II) présentes initialement dans les différents réacteurs.

$$4\ Fe^{2+} + O_2 + 4\ H^+ \xrightarrow{bact} 4\ Fe^{3+} + 2\ H_2O \qquad \text{(Eq. II.1)}$$

Une fois la totalité du fer(II) métabolisé, il ne reste plus en solution que des ions ferriques (susceptibles d'oxyder les polysulfures en soufre élémentaire), des sulfates, du soufre S_8 colloïdal et des polysulfures.

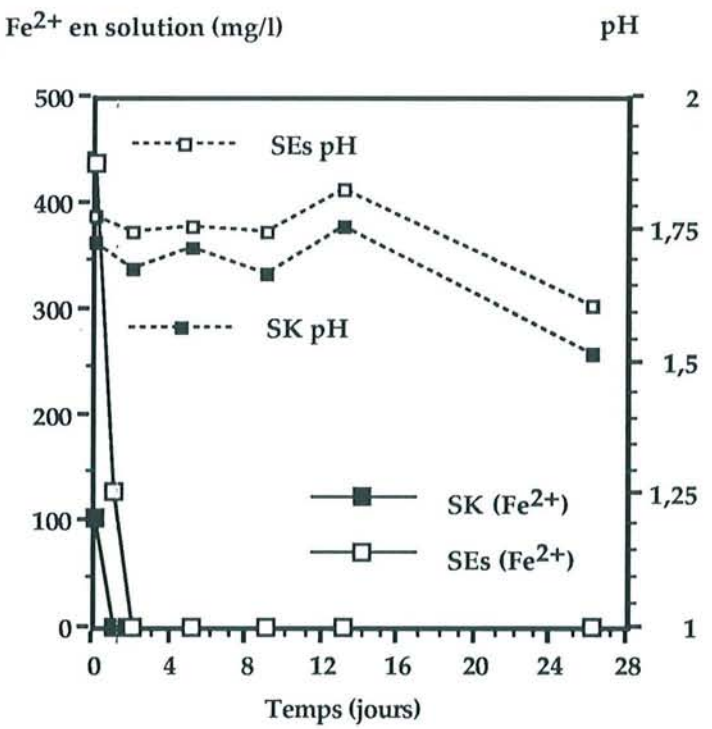


Figure II.24 : Oxydation bactérienne des phases superficielles solubilisées - Evolution du fer(II) et du pH dans les réacteurs S_K et S_{Es}.

Après 10 jours, la population microbienne se développe à nouveau et que le pH chute de façon très significative (Figure II.33) et témoigne de l'oxydation du soufre élémentaire selon l'équation II.3 :

$$2\ S^\circ + 3\ O_2 + 2\ H_2O \xrightarrow{bact} 4\ H^+ + 2\ SO_4^{2-} \qquad \text{(Eq. II.3)}$$

La phase de déclin de la croissance bactérienne correspond donc à une phase d'adaptation des microorganismes à un nouveau substrat. En effet, l'inoculum de *Thiobacillus ferrooxidans* cultivé sur fer(II) a développé préférentiellement des chaînes oxydatives du fer. En l'absence de fer(II),

Thiobacillus doit alors synthétiser d'autres systèmes enzymatiques destinés à l'utilisation d'autres substrats comme le soufre élémentaire.

Des travaux antérieurs (DZIURLA 1995) avait démontré que des bactéries cultivées sur soufre S° ont une efficacité initiale supérieure pour l'oxydation des pyrites et induisent notamment, une phase de latence plus courte. Ce résultat peut désormais s'expliquer aisément : les Thiobacilles ayant développé préférentiellement les fonctions oxydatives du soufre, sont mieux adaptés à l'oxydation initiale du soufre élémentaire issus de la solubilisation des phases superficielles du minéral.

Néanmoins, lorsque la quantité de fer (II) dans la solution initiale est faible (R1), l'adaptation de la population microbienne à l'oxydation du soufre élémentaire est très rapide et une croissance bactérienne importante au cours des quelques premiers jours de la biolixiviation est observable. Bien que les quantités de soufre initialement présentes soient peu importantes et comparables à celles du fer (11 ppm de fer (II) et 4 ppm de S_8 dans le réacteur R1), l'oxydation du soufre apporte suffisamment d'énergie aux bactéries (20 fois plus que l'oxydation d'une mole de fer) pour soutenir cette croisssance :

$$Fe^{2+} + H^+ + {}^1/_4\, O_2 \text{ ----> } Fe^{3+} + {}^1/_2\, H_2O \qquad \Delta G° = -35 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

$$S° + {}^3/_2\, O_2 + H_2O \text{ ----> } H_2SO_4 \qquad \Delta G° = -786 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Tous ces résultats conduisent à considérer les produits superficiels d'oxydation des pyrites comme de véritables substrats bactériens immobilisés à la surface minérale et mobilisables en solution. Par conséquent, l'état d'oxydation de la pyrite et l'amendement substantiel qu'il apporte en début de lixiviation pourrait constituer un facteur essentiel dans le démarrage de la biolixiviation.

IV. LES PHASES SUPERFICIELLES : FACTEURS LIMITANTS DE LA CINÉTIQUE DE BIOLIXIVIATION:

Afin de préciser le rôle des phases superficielles oxydées du fer et du soufre dans le processus de biolixiviation, une série d'expériences de lixiviation a été menée en limitant la contribution des phases superficielles initiales au milieu de culture. Comme pour les expériences classiques, les réacteurs contiennent une pulpe à 2% (Pyrite K de fraction granulométrique 32-53 µm) dans du milieu M2, agitée dans un bain thermostaté à 30 °C et inoculée avec une souche de *Thiobacillus ferrooxidans* pour une concentration initiale de $2{,}2.10^7$ bact/ml. Avant l'inoculation, la pulpe de pyrite est autoclavée à deux reprises mais le milieu est renouvelé entre les deux autoclavages. Ainsi, le soufre élémentaire et les phases oxydées du fer (sulfates et oxyhydroxydes) solubilisés lors du premier autoclavage ne sont plus présents en solution en début de biolixiviation.

Trois types de réacteurs (R2, R3 et R4) sont lancés et correspondent respectivement à la biolixiviation de pyrites décapées :

- dans un milieu inital dépourvu de phases solubles et oxydables du fer et du soufre (R2)
- dans un milieu contenant initialement du sulfate ferreux : $[Fe^{2+}]_0 = 70$ mg.l^{-1} (R3)
- dans un milieu contenant initialement du sulfate ferrique : $[Fe^{3+}]_0 = 70$ mg.l^{-1} (R4)

Dans ces deux derniers réacteurs, les quantités de fer(II) ou de fer(III) apportées au milieu sont comparables aux quantités de fer total présentes généralement en solution au début d'un cycle de biolixiviation (R1). Elles sont destinées à simuler l'oxydation chimique ou biologique initiale du minéral en fournissant directement soit un substrat oxydable par les Thiobacilles soit un oxydant chimique.

Les conditions initiales pour la solution et le minéral dans chaque réacteur sont résumées dans le tableau II.4.

Tableau II.4 : Principaux éléments présents initialement en solution et à la surface du minéral dans les différentes expériences.

		Fer total	Fer (II)	Sulfates	S_8	Polysulfures
R2 :	Solution (mg/l)	10	7	2300	ε	ε
	Surface (µg/g)	ε	ε	ε	150	+
R3 :	Solution (mg/l)	70	70	2450	ε	ε
	Surface (µg/g)	ε	ε	ε	150	+
R4 :	Solution (mg/l)	70	ε	2680	ε	ε
	Surface (µg/g)	ε	ε	ε	150	+

ε : quantité négligeable + : présence démontrée mais non quantifiée

1. Contribution du fer initial en solution à la lixiviation

Bien que les compositions initiales des réacteurs R3 et R4 (70 ppm de Fe^{2+} pour R3 et 70 ppm de Fe^{3+} pour R4) soient différentes, un dosage colorimétrique réalisé après six heures de biolixiviation indique une concentration en fer(II) quasi-équivalente dans les deux réacteurs (# 7 mg/l). Les bactéries du réacteur R3 ont oxydé la quasi-totalité des ions ferreux (Eq. II.1) présent initialement en solution :

$$4\,Fe^{2+} + O_2 + 4\,H^+ \xrightarrow{bact} 4\,Fe^{3+} + 2\,H_2O \qquad \textbf{(Eq. II.1)}$$

Dès lors, d'un point de vue chimique, les deux réacteurs sont identiques : les pulpes de pyrite sont en contact avec une solution ferrique. De même, la croissance bactérienne est similaire dans les deux réacteurs (Figure II.25a) mais demeure très différente de la croissance observée dans les conditions standard de biolixiviation (R1).

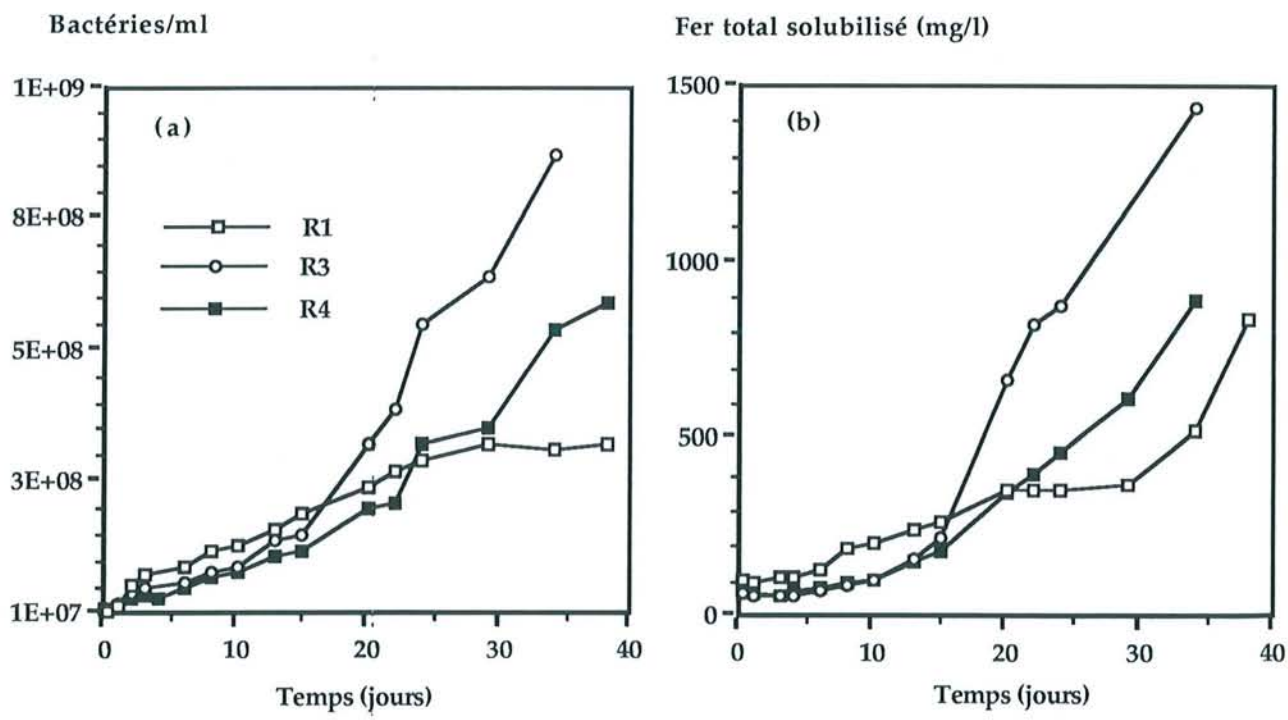


Figure II.22 : Comparaison (a) des croissances bactériennes et (b) du fer total en solution obtenus dans des lixiviations classiques (R1) par rapport à celles obtenues dans des lixiviations particulières (R3 et R4).

Elles se distinguent d'une croissance classique par :

- un développement moindre des bactéries durant les premiers jours de la biolixiviation
- et paradoxalement, par une courbe de croissance plus prononcée dès le 15ème jour de lixiviation, correspond à une croissance exponentielle des microorganismes.

Après 35 jours, la phase stationnaire n'est toujours pas atteinte et les populations microbiennes dénombrées dans ces deux réacteurs dépassent largement celles observées dans des réacteurs classiques (R1). La population légèrement supérieure dans le réacteur R3 par rapport au réacteur R4 résulterait de l'oxydation, dans les premières heures, du fer(II) apporté initialement en solution.

Les résultats obtenus dans les parties II et III de ce chapitre ont montré que la croissance bactérienne importante observée entre 0 et 6 jours pouvait correspondre à l'oxydation préférentielle du soufre colloïdal et du fer(II) présents en solution. Or, ces nouvelles expériences prouvent qu'en présence de fer(II) mais en l'absence de soufre élémentaire, le démarrage de la lixiviation est fortement ralenti.
Le soufre élémentaire en solution (colloïdes) semble donc avoir un effet primordial (R1) sur la croissance bactérienne dans les premiers temps de la biolixiviation (Figure II.25b).
En revanche, la dissolution de la pyrite (Figure II.25b) qui ne s'amorce significativement qu'après le 15^{e} jours, semble nettement favorisée par la présence initiale de fer oxydé ou oxydable en solution (R3,R4).

Toutefois, bien que le milieu initial soit fortement oxydant (70 ppm de Fe^{3+}), les voltamogrammes réalisées sur la pyrite du réacteur R4 mettent en évidence une oxydation moindre de la surface du minéral : sur les voltamogrammes du réacteur R4, le pic A1 correspondant à la présence de sulfates ferreux superficiels est très peu intense et le pic C4 (à -270 mV), correspondant à la réduction du soufre élémentaire de surface, est absent (Figure II.26).
Ce résultat est en contradiction avec l'évolution électrochimique attendue pour une pyrite autoclavée en milieu oxydant dont la surface se charge de soufre élémentaire et de sulfates de fer (Figure II.10) et semble indiquer que les bactéries, sans doute adsorbées, utilisent directement le fer(II) des sulfates ferreux et le soufre élémentaire présents à la surface du minéral.

D'autre part, des extractions à l'eau réalisées sur les prélèvements de pyrite au cours de la biolixiviation montrent que les bactéries ont tendance à recouvrir les phases oxydées du fer et du soufre. En effet, comme pour le réacteur R1, les quantités de fer et de soufre éluées directement à l'eau sont inférieures aux quantités dosées dans l'eau après une extraction préliminaire à l'hexane (Figure II.27). L'extraction préliminaire à l'hexane élimine les corps organiques (bactéries fixées ou composés cellulaires) et démasque les phases oxydées. Les Thiobacilles viendraient donc au contact des phases oxydées du minéral pour y trouver des substrats oxydables.

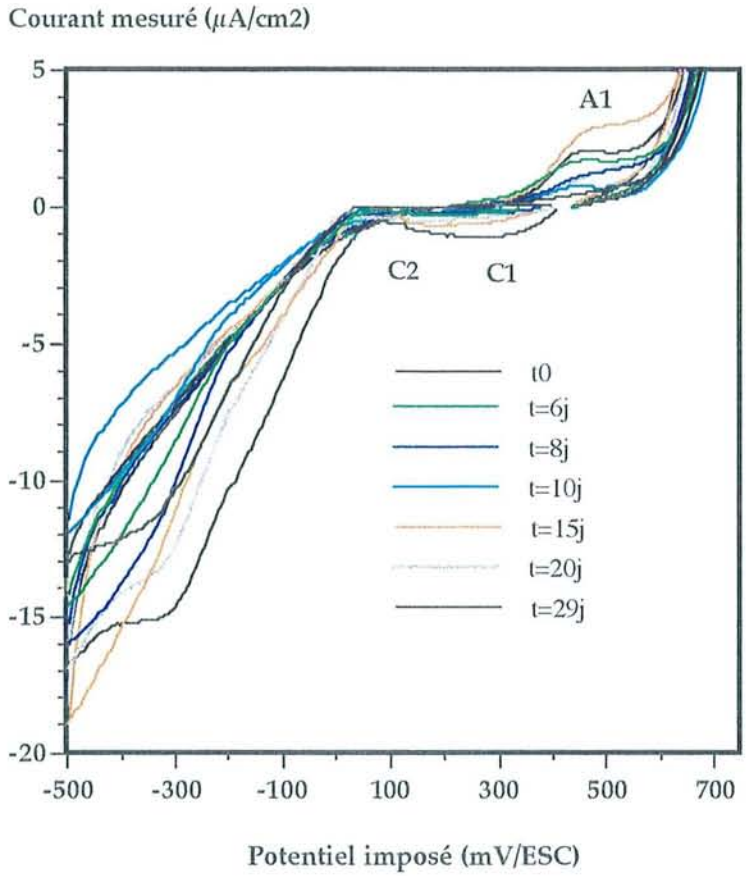


Figure II.26: Evolution de la réponse électrochimique de la pyrite dans le réacteur R4 au cours de la biolixiviation.

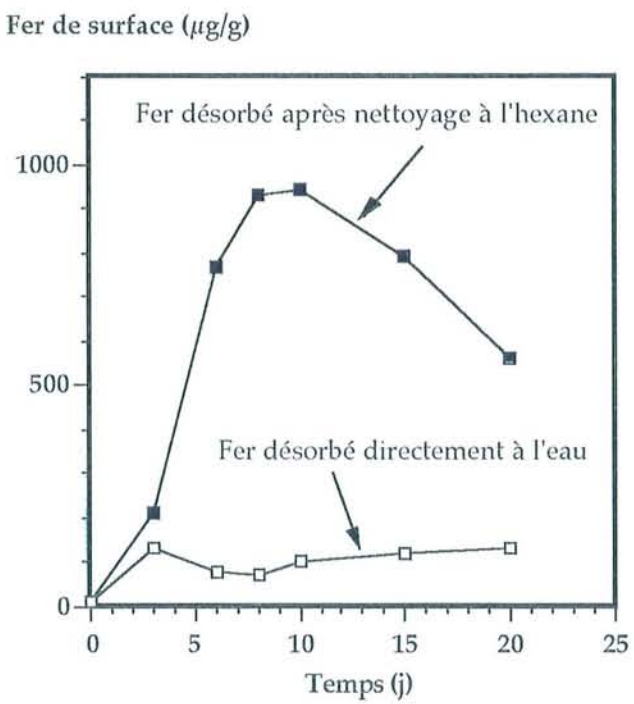


Figure II.27 : Dosage du fer et du soufre de surface élués directement à l'eau ou après une élution préliminaire à l'hexane sur la pyrite du réacteur R4.

L'évolution, au cours de la biolixiviation, du soufre élémentaire de surface extractible à l'hexane et par conséquent accessible aux bactéries, confirme cette hypothèse (Figure II.28). Les quantités de S_8 mesurées à la surface sont très inférieures aux 150 µg/g initialement disponibles.
Le soufre de surface n'a donc pas le temps de se développer sur le minéral car les microorganismes le métabolisent au fur et à mesure qu'il se forme :

$$2\,S^\circ + 3\,O_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{bact} 4\,H^+ + 2\,SO_4^{2-} \qquad \text{(Eq. II.3)}$$

Cette oxydation du soufre de surface se traduit donc, conformément à l'équation II.3, par l'augmentation régulière des sulfates en solution entre 0 et 15 jours accompagnée d'une acidification du milieu (Figure II.29). Cependant, le soufre de surface semble plus difficilement accessible ou moins abondant que le soufre colloïdal présent en solution puisque le rendement initial d'oxydation de la pyrite ainsi que la croissance bactérienne sont moins bons.

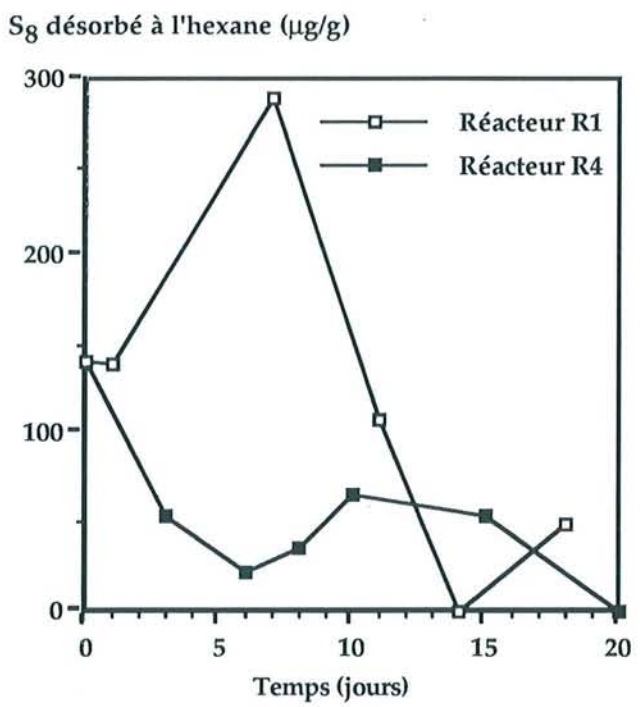


Figure II.28: Quantités de soufre S_8 extractibles à l'hexane dans les réacteurs R1 et R4.

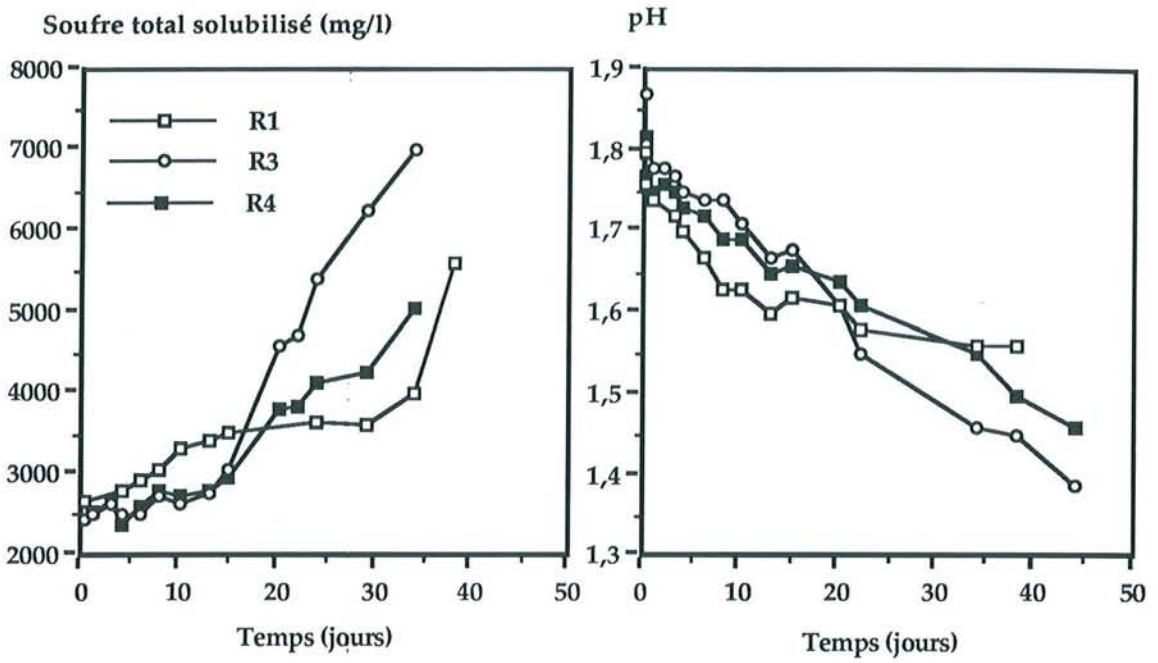


Figure II.29: Evolution des sulfates en solution et du pH dans les réacteur R1, R3 et R4 au cours de la biolixiviation.

L'absence de substrat en solution force donc les bactéries à oxyder directement les substrats solides au contact du minéral dès les premières heures de biolixiviation. Le spectre Raman de la pyrite au premier jours de lixiviation dans le réacteur R4 met d'ailleurs en évidence le même environnement atypique des sulfates que celui développé dans le réacteur R1 après le 10^{e} jour de lixiviation (Figure II.30). Ce spectre est caractéristique d'une oxydation bactérienne de surface.

Après 15 jours, les bactéries sont en pleine phase exponentielle de croissance. La phase stationnaire n'est toujours pas atteinte au 38^{e} jour de lixiviation et le rendement d'oxydation dans les réacteurs R3 et R4 est nettement supérieur au rendement d'une biolixiviation effectuée dans les conditions standart (Figure II.29).

En obligeant, semble-t-il, les bactéries à oxyder directement le minéral dès les premières heures de la biolixiviation, l'élimination des substrats solubles du milieu de culture initial semble avoir un effet catalytique différé sur la dissolution de la pyrite.

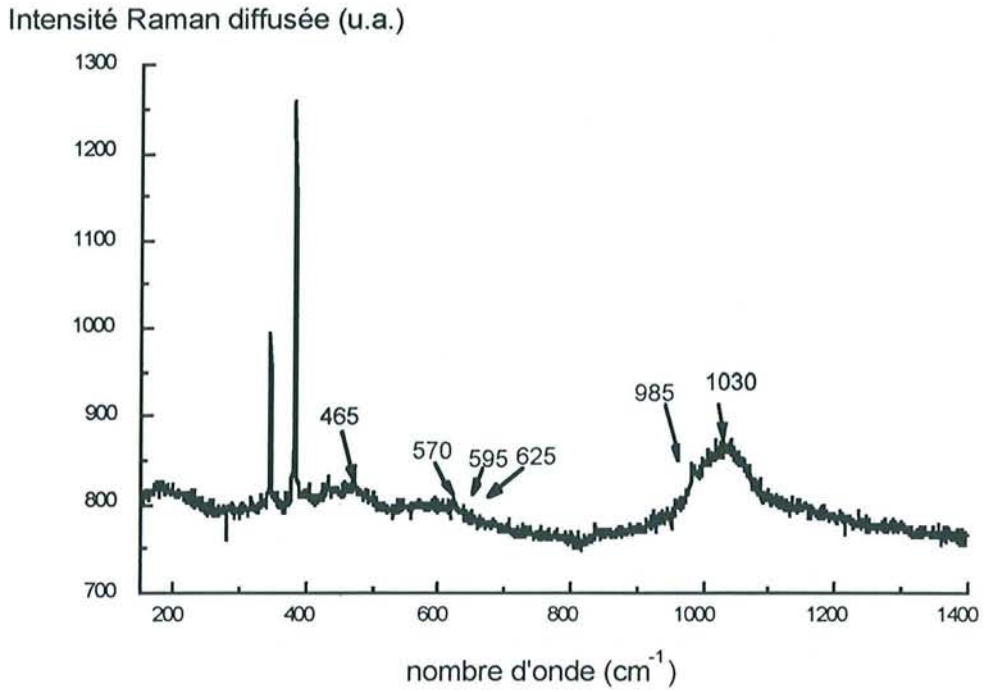


Figure II.30 : Spectre Raman de la pyrite dans le réacteur R_4 au premier jour de lixiviation.

2. La biolixiviation en l'absence d'éléments initiaux oxydables en solution

Lorsqu'on remplace le milieu initial après autocalavage par un milieu neuf, les bactéries ne disposent plus de substrat soluble directement assimilable, et le minéral, privé de toute phase oxydée par l'autoclavage, ne peut pas fournir d'oxydant chimique efficace.

L'allure similaire des courbes de croissance bactérienne et du pH pour les réacteurs R2 et R4 indique que le déroulement de de la biolixiviation y est comparable (Figure II.31).

Comme pour les réacteurs R3 et R4, la croissance s'effectue en deux étapes. La phases stationnaire s'amorce seulement après 38 jours de biolixiviation et la population bactérienne après 30 jours de culture dépasse largement celle du réacteur R1 (stabilisée à environ $3{,}2.10^8$ bact/ml). Cependant, le changement de pente des courbes de croissance bactérienne pour le réacteur R2, correspondant à l'initiation de la phase exponentielle de croissance, n'intervient qu'après 20 jours de lixiviation. Un délai supplémentaire de 5 jours est donc nécessaire par rapport aux réacteurs R3 et R4.
En effet, ce n'est qu'à partir du 15^e jour que la quantité de fer(III) oxydant en solution devient équivalente à celle du réacteur R4 à l'instant initial (Figure II.32).

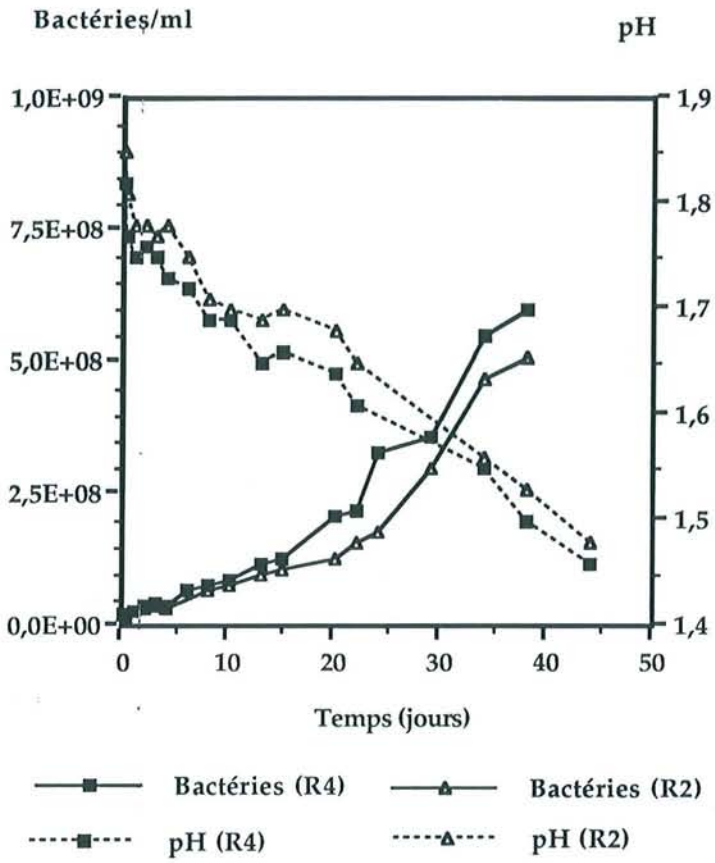


Figure II.31 : Evolution de la population bactérienne et du pH dans les réacteurs R2 et R4.

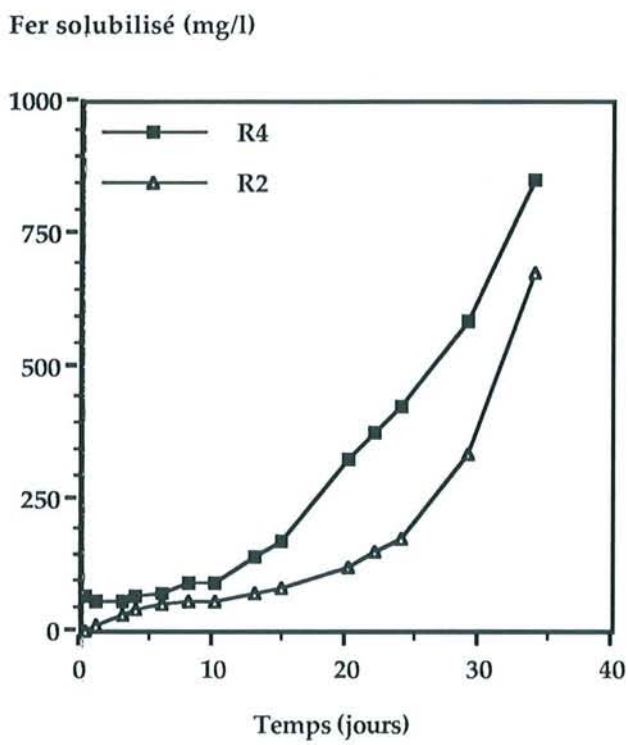


Figure II.32 : Solubilisation du fer dans les réacteurs R2 et R4.

C'est donc seulement à partir du 15e jour que le minéral est susceptible de s'oxyder chimiquement et de développer à sa surface du soufre élémentaire assimilable par les bactéries.
Par conséquent, les mécanismes de lixiviation dans le réacteur R2 sont comparables à ceux décrits pour les réacteurs R3 et R4, à condition que l'oxydation chimique par le fer(III) soit suffisante pour fournir aux bactéries des substrats de surface assimilables.
Les microorganismes semblent donc avoir des difficultés à oxyder directement le minéral pur FeS_2, seul substrat disponible entre 0 et 20 jours. Celui-ci semble être un substrat médiocre.

Conclusion :

L'étude comparative des trois réacteurs R2, R3 et R4, montre que la biodisponibilité des différents substrats en solution (Fe^{2+}, soufre élémentaire colloïdal) ou à la surface du minéral (S_8 préférentiellement) est déterminante pour la biooxydation. Une certaine quantité d'éléments solubilisés directement assimilables semble nécessaire pour que la biolixiviation démarre. Dans le cas contraire, les microorganismes sont capables de trouver des substrats (en particulier le soufre élémentaire) développés à la surface du minéral par l'action chimique des ions ferriques.
Les phases oxydées, solubilisées par autoclavage ou développées à la surface, apparaissent comme un facteur limitant de la biolixiviation. Ce résultat pourrait remettre en cause l'oxydation directe de la pyrite par les bactéries (Eq. II.4).
Cependant, la croissance accrue des Thiobacilles et le rendement exceptionnel de la biolixiviation observés durant cette seconde étape pourraient être dus à une biooxydation décuplée du minéral FeS_2 selon l'équation II.4.

$$2\,FeS_2 + 7{,}5\,O_2 + H_2O \xrightarrow{bact} 2\,Fe^{3+} + 4\,SO_4^{2-} + 2\,H^+ \qquad \textbf{(Eq. II.4)}$$

A ce stade de l'étude, il est impossible de savoir si l'oxydation bactérienne a pour cible le minéral pur (attaque directe) ou si les phases oxydées de surface constituent le seul substrat assimilable par les micro-organismes.

V. LES PHASES SUPERFICIELLES : SEULS SUBSTRATS MÉTABOLISABLES

Dans les expériences de biolixiviation en réacteur "classique" (R1 par exemple), l'amorce de l'oxydation et de la solubilisation du minéral est précédée d'une phase de fixation des *Thiobacillus* à la surface de la pyrite (DZIURLA 1995, MELINE 1996). Comme il a été démontré précédemment, l'interaction des bactéries avec la surface minérale se traduit à la fois par la consommation des composés de surface incomplètement oxydés du soufre et du fer, mais aussi par l'apparition de phases superficielles spécifiques sans doute amalgamées et qualifiées de sulfates particuliers. Par ailleurs, l'utilisation de dispositifs expérimentaux originaux (réacteur à compartiments séparés par une membrane microporeuse, Dziurla 1996) a démontré clairement que le contact bactérie-minéral, sans être nécessaire à l'oxydation du minéral, accélère de façon très significative le processus de biolixiviation. Toutefois, si en l'absence de contact les expériences entreprises montrent bien uniquement le rôle oxydatif du fer(III) dissous, elles combinent, en revanche, dans l'aspect contact, à la fois l'oxydation directe du minéral par les bactéries et son oxydation indirecte par le fer(III). Ainsi, l'action directe des Thiobacilles à la surface des pyrites reste encore inconnue.
Une série d'expériences complémentaires a donc été menée pour vérifier la capacité des Thiobacilles à oxyder directement le sulfure (Eq. II.4) et à produire des composés de surfaces.

Compte tenu du rôle fondamental sur les cinétiques de biolixiviation des phases superficielles solubilisables et du fer initialement présents dans le milieu de lixiviation, le réacteur d'étude doit satisfaire à un ensemble de contraintes :

(i) contenir une pyrite indemne de toute trace d'oxydation et un milieu de lixiviation propre : autrement dit, ni fer (II), ni soufre élémentaire biodisponibles sur le minéral ou en solution.

(ii) limiter l'apparition en solution au cours de l'oxydation d'oxydant chimique potentiel (ferreux ou ferrique) afin d'éviter au maximum l'oxydation superficielle du minéral qui pourrait conduire au développement de substrats ou de composés oxydés de surface ($FeSO_4$ ou S°).

Le réacteur (noté R5) contient donc une pulpe à 2% de pyrite K autoclavée à deux reprises. Le milieu M2 est renouvelé entre les deux autoclavages de façon à éliminer les phases superficielles solubilisées. Un sac de PTFE hydrophile (Durapore©), thermoscellé et de porosité 0,22 µm, contenant 10g de résine sulfonique potassique est placé dans le réacteur. La grande affinité de la résine pour les métaux de transition permet d'échanger en permanence les cations K^+ de la résine par les cations présents dans le milieu, et principalement les ions ferreux et ferriques. La quantité de fer en solution est ainsi maintenue à une valeur négligeable (entre 1 et 3 ppm) tout au long de la biolixiviation (Figure II.33).
Le réacteur est inoculé à $2{,}2.10^7$ bact.ml^{-1} (même inoculum que dans les expériences précédentes).
Au préalable et afin de vérifier l'innocuité de la résine sur l'activité et la viabilité des Thiobacilles, un test de croissance a été effectué. Un inoculum bactérien a été mis plusieurs jours en contact avec un sac de PTFE contennant de la résine sulfonique dans du milieu M2. Cette population bactérienne,

repiquée sur un milieu contenant du Fe^{2+}, s'est développée de la même façon qu'un inoculum témoin n'ayant subi aucun contact avec la résine. La résine, protégée par un sac poreux, n'a donc aucun effet sur la viabilité des micro-organismes.

Un réacteur abiotique supplémentaire (R6), identique au précédent, est placé comme témoin chimique pour contrôler l'action de la résine seule sur l'état de surface du minéral.

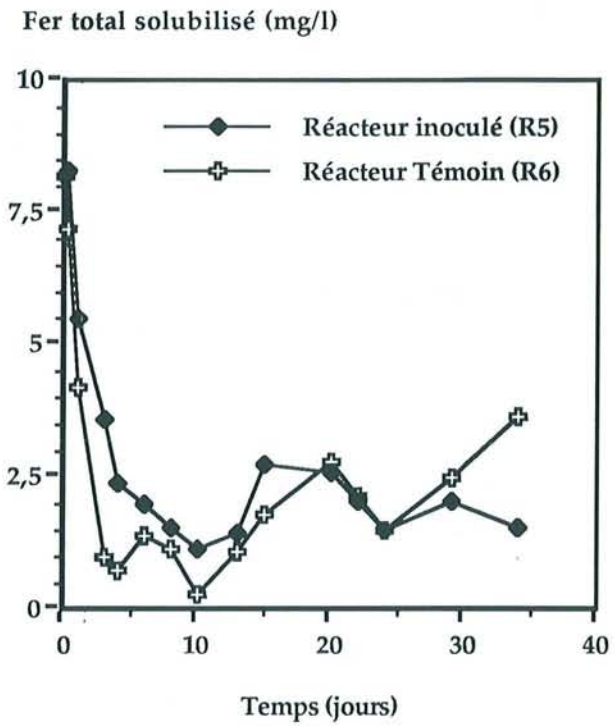


Figure II.33 : Fer total en solution dans les réacteur R5 et R6.

L'étude de la courbe d'évolution de la population bactérienne montre que la croissance des microorganismes est très perturbée (Figure II.34). Par rapport au réacteur R1 (conditions standard de culture), on peut considérer qu'il n'y a pratiquement pas de croissance.

Seule une faible croissance est détectée entre 0 et 8 jours et correspond à l'oxydation microbienne de la petite quantité de fer(II) présente dans le milieu (Figure II.35). Toutefois, dès le huitième jour, une phase de déclin s'amorce, suivie d'une phase de croissance stationnaire.

Au cours des dix premiers jours, les bactéries restent viables et capables d'oxyder directement le minéral soit le fer dissout (Figure II.35), comme en témoigne la prédominance en solution du fer(III) par rapport au fer(II). Au delà, le fer disponible en solution n'est plus oxydé par les bactéries ($[Fe^{2+}]>>[Fe^{3+}]$).

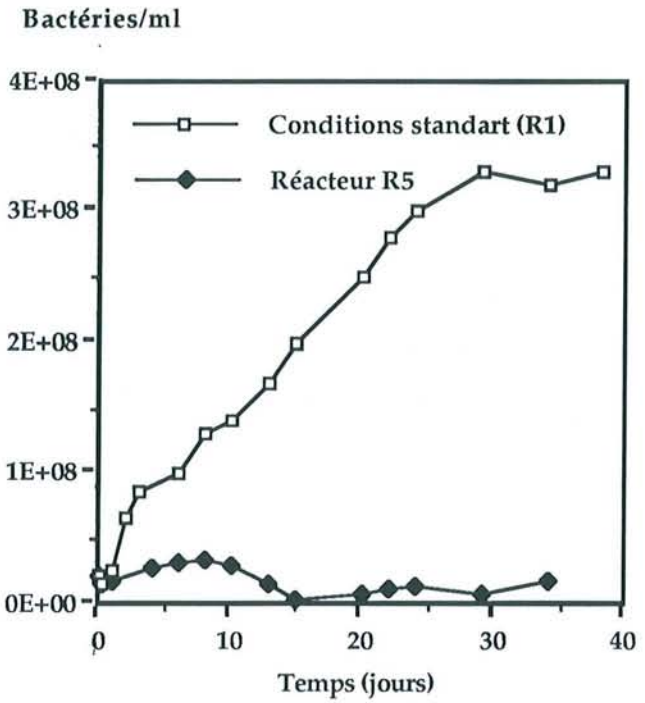


Figure II.34: Croissance bactérienne dans les réacteurs R1 et R5.

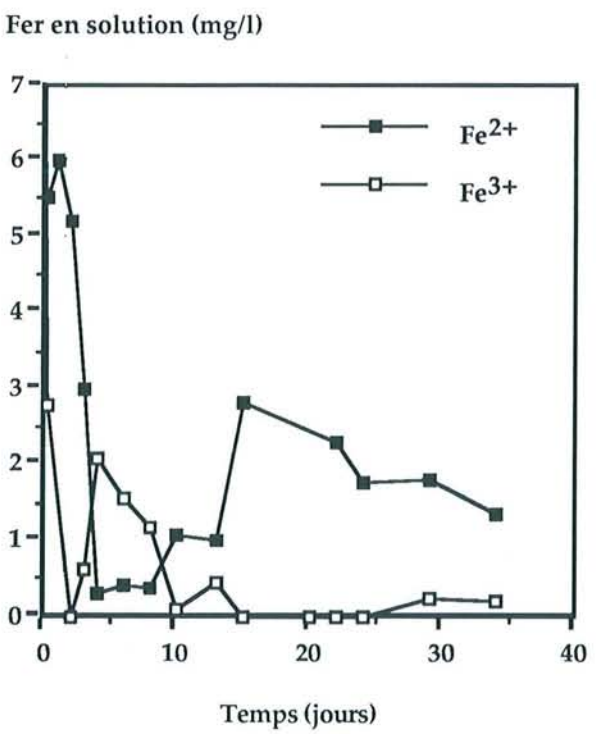


Figure II.35 : Evolution des quantités de fer (II) et de fer (III) dans le réacteur R5 au cours de la biolixiviation.

Or, jusqu'au 8ème jour de biolixiviation, les voltamogrammes réalisés sur les pulpes de pyrite (Figure II.36) montrent que seul le pic A1 est détectable. La surface de la pyrite est donc couverte d'une très faible quantité de sulfate ferreux. D'autre part, le pic C4 à -270 mV est inexistant et les extractions à l'hexane (ou au méthanol) réalisées sur les prélèvements de pulpe confirment l'absence totale de soufre élémentaire superficiel. Au delà de 8 jours, la réponse électrochimique de la pyrite est négligeable.

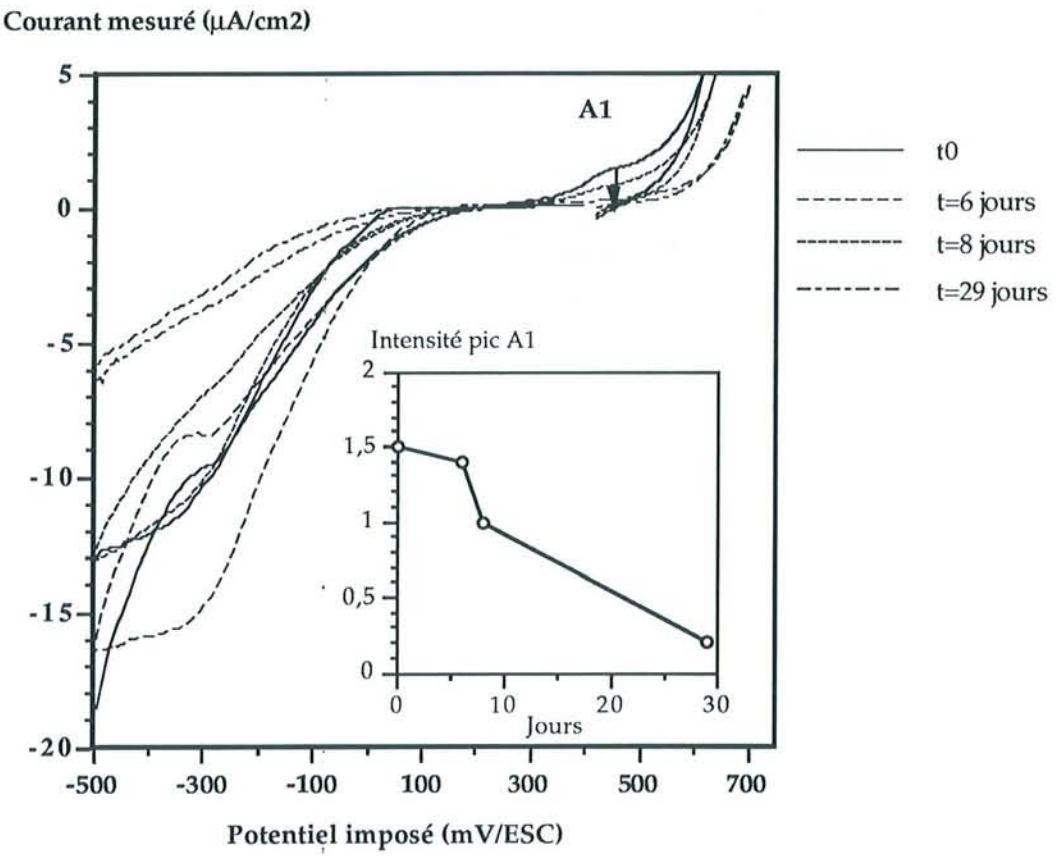


Figure II.36 : Evolution de la réponse électrochimique de la pyrite dans le réacteur R5 au cours de la biolixiviation.

Par conséquent, la disparition du pic A1 des voltamogrammes coïncide avec le début de la phase de déclin de la population bactérienne et semble indiquer qu'en l'absence de substrat en solution les Thiobacilles oxydent ou solubilisent le sulfate ferreux de surface. Toutefois, si le dosage du fer total de surface confirme la disparition des phases sulfatés contenant du fer après le 8ème jour (Figure II.37), il est impossible de savoir si les bactéries métabolisent directement les sulfates ferreux au contact du minéral ou si elles bénéficient du fer (II) résultant de son éventuelle solubilisation.

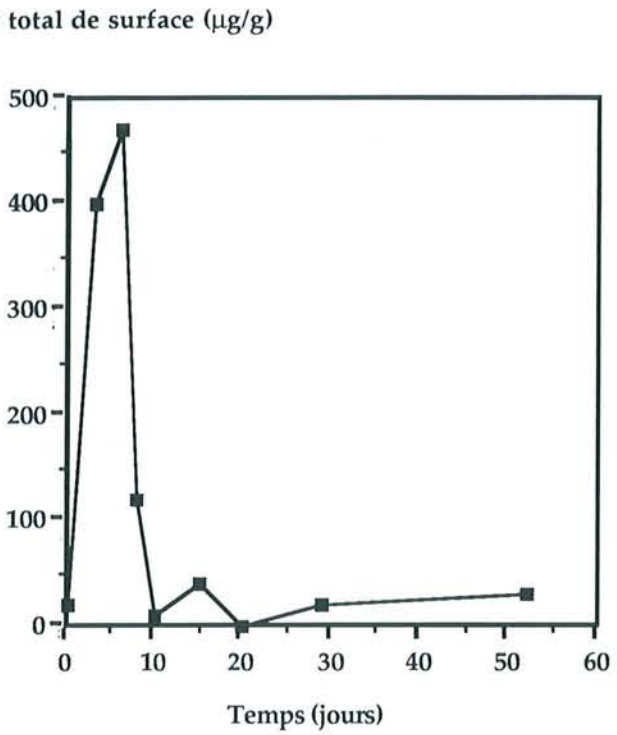


Figure II.37 : Evolution du fer présent à la surface du minéral dans les phases oxydées (Réacteur inoculé R5).

De plus, la réponse électrochimique de la pyrite dans le réacteur témoin (R6) est tout à comparable à celle du réacteur R5. La disparition du sulfate ferreux de surface ne serait pas simplement due à leur assimilation directe par les micro-organismes mais résulterait en partie d'une solubilisation accrue des phases superficielles oxydées hydrophiles en présence de résine. La résine, en provoquant un déplacement important de l'équilibre minéral-solution, priverait progressivement les bactéries de tout substrat de surface, et en limitant l'action oxydante du fer(III) de solution sur le minéral, elle ne permettrait pas leur régénération en surface.

Dans ces conditions, dès le huitième jour, le seul substrat restant est le minéral pur FeS_2, exempt de substrat de surface potentiel tel que les sulfates ferreux ou le soufre élémentaire.

Enfin, au cours de cette expérience, comme le montre la figure II.39, la stabilité du pH et de la concentration en sulfates dans les 2 réacteurs (R5 et R6) indiquent que la pyrite ne s'oxyde pas. De plus, les bilans du fer fixé sur les résines donnent des quantités de fer lixiviées négligeables : 30 $mg.l^{-1}$ pour le réacteur inoculé (R5), et 21 $mg.l^{-1}$ pour le réacteur témoin (R6).

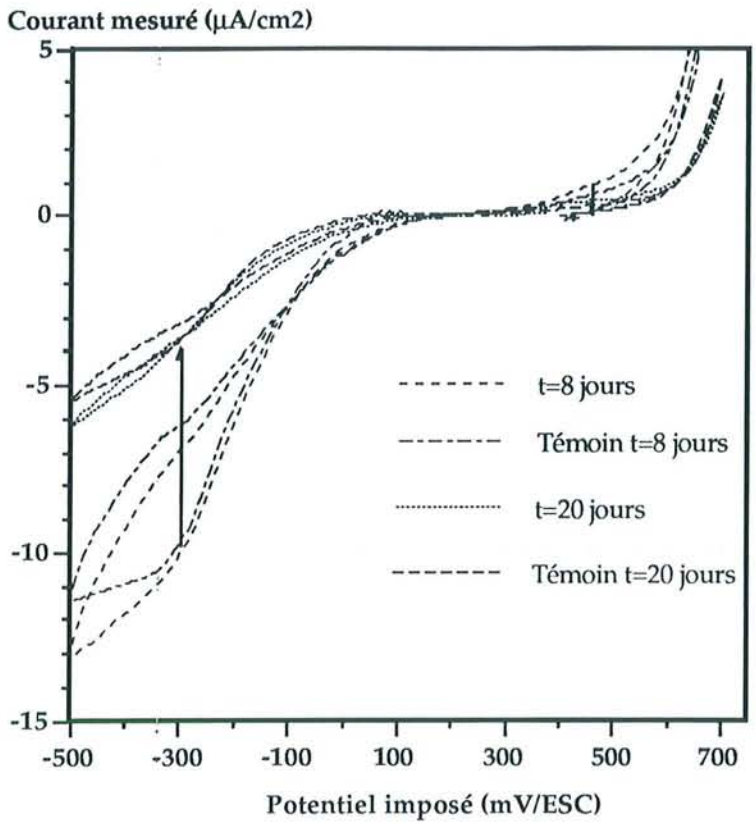


Figure II.38 : Réponse électrochimique de la pyrite dans les réacteurs R5 et R6.

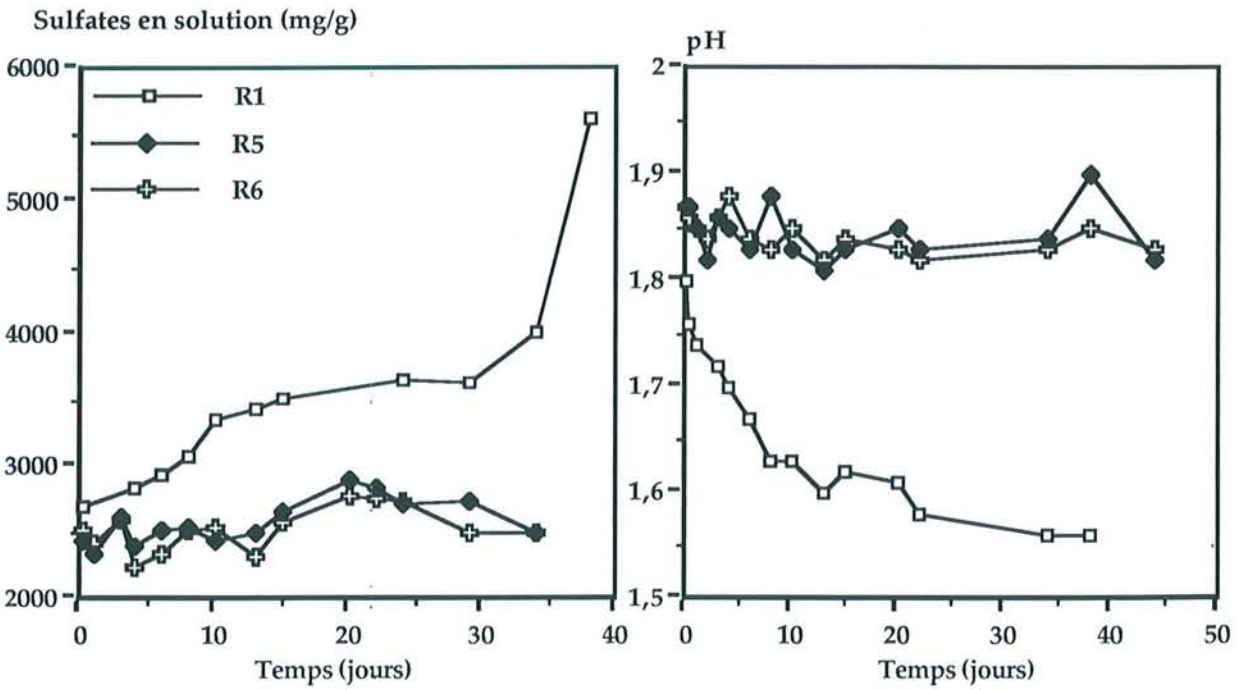


Figure II.39: Evolution du pH et des sulfates dans les réacteur R5 et R6.

Cette étude met en évidence un fait nouveau en ce qui concerne la biolixiviation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* : en absence de substrat soluble ou de phases superficielles oxydées et métabolisables, les bactéries ne se développent pas et la lixiviation de la pyrite ne s'amorce pas.
Les véritables substrats solides sont donc les composés superficiels tels que le soufre élémentaire ou les sulfates ferreux, et non le minéral lui-même. Une oxydation préalable de la surface du minéral par le fer(III) est donc indispensable à l'initiation et au déroulement du processus de biolixiviation
Le mécanisme d'attaque directe de la pyrite par *Thiobacillus ferroxidans* (Eq. II.4) proposé par Panin (PANIN *et al.*, 1985) et adopté par de nombreux auteurs est donc remis en cause dans ce travail.

$$2\,FeS_2 + 7{,}5\,O_2 + H_2O \xrightarrow{bact} 2\,Fe^{3+} + 4\,SO_4^{2-} + 2\,H^+ \qquad \text{(Eq. II.4)}$$

Cette équation trop globale ne prend pas en compte la nature et la réactivité des phases superficielles et sépare abusivement l'oxydation directe de l'oxydation indirecte.

CONCLUSION :

L'étude réalisée dans le chapitre II a montré l'importance capitale des phases superficielles de la pyrite dans les processus de biolixiviation. Elles ne sont pas seulement des témoins passifs de la lixiviation du minéral. Leur rôle est déterminant car elles constituent des facteurs favorables ou limitants pour les mécanismes d'oxydation chimique et biologique :
(i) en solution elles apportent des substrats indispensables à la croissance bactérienne ($S°$ et Fe^{2+}) ainsi que l'agent oxydant principal de l'oxydation chimique du minéral (Fe^{3+}).
(ii) au niveau de la surface minérale elles constituent les seuls substrats utilisables (soufre élémentaire et sulfates ferreux) par les microorganismes qui s'avèrent totalement incapables de bénéficier des électrons la pyrite pure FeS_2.
L'état de surface et la réactivité de la pyrite à l'état naturel est alors déterminant pour les cinétiques de biolixiviation. En effet, il conditionne la quantité et la nature des substrats disponibles en solution en début de lixiviation (puisque l'autoclavage provoque la solubilisation des composés superficiels oxydés) ainsi que le développement d'éventuels substrats solides de surface, indispensables à la poursuite de la biolixiivation.
La présence de polysulfures à la surface de la pyrite au cours du cycle de biolixiviation est très probable (Raman). Cependant, il est très difficile de les quantifier et de définir leur véritable rôle. Constituent-ils des substrats métabolisables par les micro-organismes ou participent-ils uniquement à l'équilibre électrochimique "Soufre élémentaire ⇔ Polysulfures" à la surface du minéral?

Chapitre III

TOPOGRAPHIE DE L'INTERFACE

Chapitre III

GEOMETRIE DE L'INTERFACE PYRITES /THIOBACILLES/SOLUTION

Le couplage des différentes méthodes spectroscopiques (XPS et Raman), électrochimiques (EGF) et de désorption sélective des composés de surface a permis d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur les phases oxydées présentes initialement à la surface minérale ou développées au cours des différentes étapes de la biooxydation. Les spectroscopies Raman et de photo-électrons X peuvent ainsi renseigner sur la composition chimique, le taux de recouvrement statistique et l'association (amalgames polyphasiques) des composés oxydés présents. En complément, les désorptions sélectives et les mesures réalisées en voltamétrie cyclique permettent, entre autre chose, de quantifier les phases superficielles et de déterminer la dynamique électrochimique de l'interface minérale en présence ou non de bactéries.

Bien que ces techniques ne donnent que des informations globales et statistiques, le recoupement des différents résultats obtenus laisse entrevoir l'importance des liens existants entre l'organisation de l'interface minéral-solution, la réactivité du minéral et l'activité microbienne. Pour parvenir à l'élaboration d'un véritable modèle morpho-chimique de la surface des deux pyrites, il est donc indispensable de pouvoir visualiser et mesurer les phases oxydées afin de disposer d'une base de raisonnement concernant leur organisation tridimensionnelle.

L'observation des surfaces par microscopie électronique à balayage (MEB) montre que les grains de pyrite à l'état naturel sont recouverts d'amas de tailles et de formes variables disposés de façon hétérogène sur la surface et que de l'oxygène peut y être détecté par analyse EDS. De plus, le décapage du minéral à l'aide d'une solution de CBD, entraîne la disparition concomittante des amas et du pic d'oxygène dans le spectre EDS (Cf Figure I.12)

Ainsi ces objets organisés à la surface de la pyrite correspondraient aux composés oxydés du fer et du soufre identifiés et quantifiés par l'ensemble des autres techniques. Malheureusement le MEB et les

techniques associées ne permettent pas d'accéder aux données géométriques (surface, volume,...), indispensables pour réaliser un modèle morphochimique réaliste et effectuer des corrélations entre les quantités désorbées par élutions sélectives, le volume des phases et leur taux de recouvrement.
Pour obtenir ces informations, nous avons eu recours à une microscopie de champ proche : la Microscopie à Force Atomique (AFM). Son emploi a été préféré à la Microscopie à Effet Tunnel (STM), qui bien que mieux maîtrisée actuellement (théorie complète) ne peut être effectuée que sur des échantillons possédant des propriétés conductrices ou semi-conductrices isotropes. Pour des structures complexes, pouvant présenter localement de grandes variations de conductivité électrique (changement de phase), les images obtenues peuvent ne pas refléter la géométrie des structures. En revanche, l'AFM permet de travailler avec tous types de surfaces (isolantes ou conductrices) et en milieu liquide.
La figure III.1a et la planche III.1 donnent une bonne idée de la variabilité des structures présentes à la surface des pyrites étudiées. L'image en niveaux de gris permet de distinguer d'emblée, des bosses de formes et de tailles variables et dont l'agencement peut être complexe. Toutefois, seule la représentation 3D donne une bonne appréciation des paramètres géométriques des structures, car l'œil humain perçoit difficilement les nuances de teintes, surtout si elles sont proches les unes des autres ou encore trop claires ou trop foncées. En reportant les données dans un repère cartésien orthonormé (O,x,y,z), la modélisation 3D de la surface normalise les gammes d'altitude rendant plus facile les comparaisons entre objets différents (Fig III.1b).

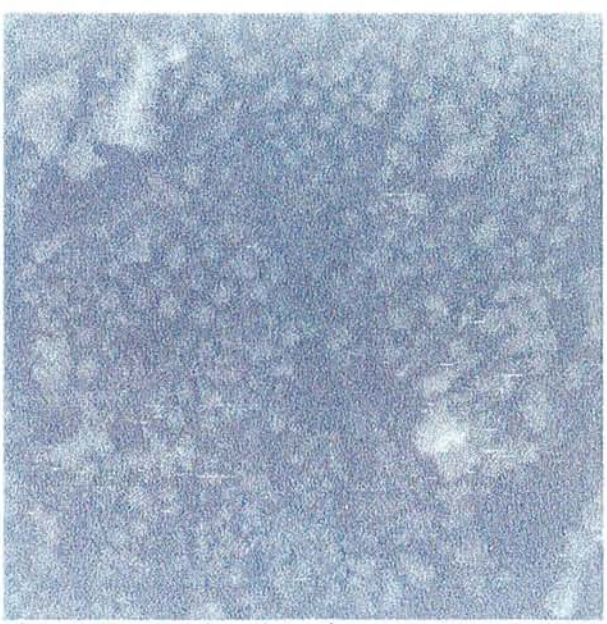
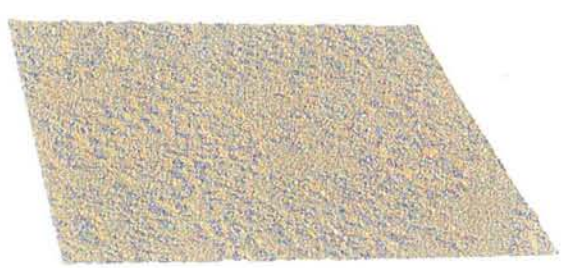


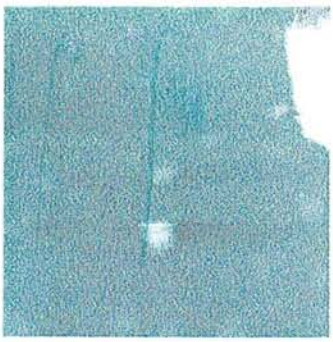
Figure III.1 : Surface de pyrite vue en microscopie à force atomique (20x20 μm^2)

← **(a) Image AFM en niveau de gris**
Déviation verticale maximale : 250 nm

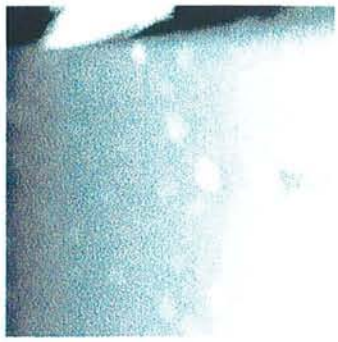


↑

(b) : Représentation 3D de l'image AFM ,



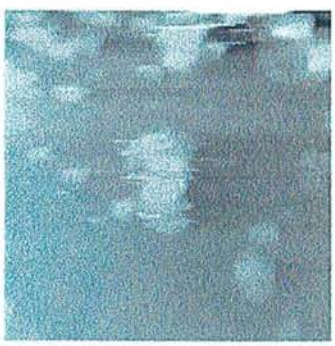
a.1



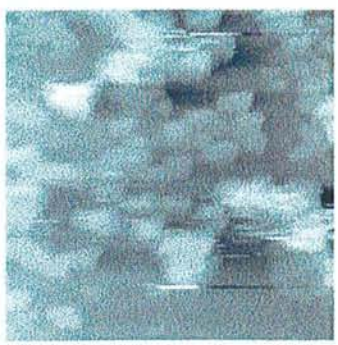
a.2



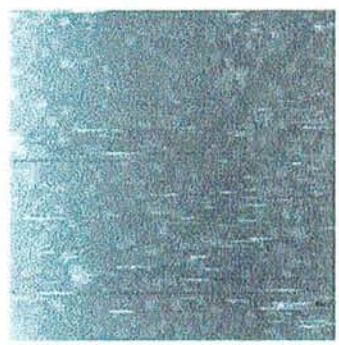
a.3



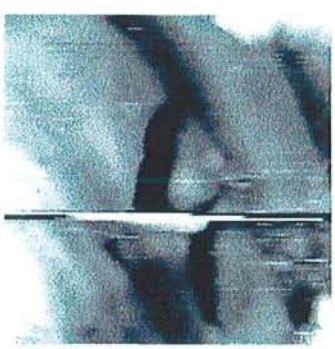
a.4



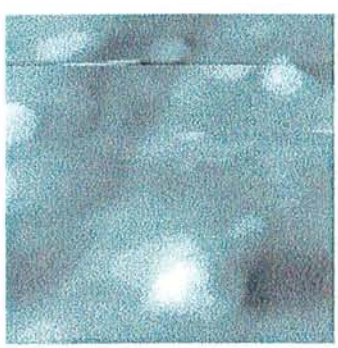
a.5



a.6



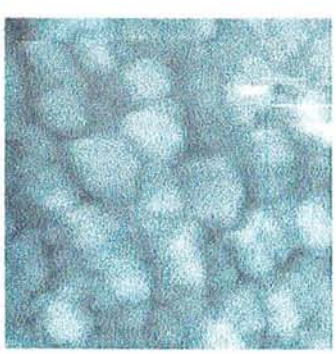
b.1



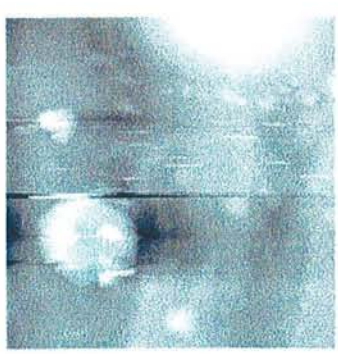
b.2



b.3



b.4



b.5



b.6

Planche III.1 : Images AFM réalisées sur différentes zones (5x5μm) d'une même surface de pyrite à l'état naturel oxydée : (a) pyrite K4 ; (b) pyrite Es

I. REPRESENTATION 3D ET EXPLOITATION DES IMAGES :

La microscopie AFM est une technique rarement employée à des fins prospectives. Elle est le plus souvent utilisée sur des supports homogènes, plans, et pour lesquels les expérimentateurs (souvent des physiciens) connaissent bien ce qu'ils doivent mesurer. Dans la plupart des cas, les structures visualisées par le microscope sont simples (alignement d'atomes, relief) et facilement reconnaissables par un spécialiste. De ce fait, on a très peu recours à l'analyse d'image et les logiciels de traitement d'images AFM sont très orientés vers l'amélioration de la qualité visuelle des images.
Afin d'obtenir des informations statistiques sur la distribution 2D des phases et des données géométriques corrélables aux analyses spectroscopiques et quantitatives décrites dans le précédent chapitre, il a été nécessaire de développer une nouvelle méthode d'approche et d'exploitation des images. Ainsi, la Microscopie à Force Atomique (AFM) a été couplée d'une part à des outils statistiques d'analyse d'images et d'autre part à un puissant outil interactif de modélisation 3D (GOCAD©).

1. Les images d'AFM et leur artéfacts

Sur certaines images bruitées et présentant des stries, les variogrammes sont inexploitables, non seulement dans la direction de balayage (angle = 0°) qui présente une importante dérive, mais également dans toutes les autres directions analysées (Figure III.2).
Les techniques classiquement mises en oeuvre pour débruiter ou éliminer les stries sont basées soit sur l'utilisation de filtres globaux (type FFT), soit sur des méthodes d'interpolation polynomiales après suppression des lignes défectueuses. Les méthodes utilisant les transformées de Fourier supposent que le bruit peut être assimilable à une fonction périodique convoluée avec l'image. Ces méthodes qui éliminent certaines gammes de fréquences (hautes fréquences = bruit) sont bien adaptées pour des résolutions atomiques (10 Å) où les fluctuations de la pointe déforment le signal. En revanche, elles s'avèrent inefficaces voire destructives dans le cas d'artéfacts locaux en supprimant de façon systématique et non controlée une partie du signal (par exemple des petites structures).
D'autres techniques comme l'Analyse en Composantes Principales (ACP) ou la Méthode à Entropie Maximale (MEM décrite par FUCHS *et al.*, 1995) présentent les mêmes inconvénients : elles moyennisent le signal et transforment l'information. Il est donc nécessaire de développer des méthodes de correction locales des artéfacts, qui interviennent spécifiquement sur la zone endommagée de l'image en préservant la partie saine.
Certaines singularités des minéraux naturels peuvent aussi gêner l'interprétation des variogrammes. En effet, si on ne dispose pas de minéraux préalablement coupés, polis et nettoyés ou présentant des plans de clivage parfaits, ce qui est le cas avec les cassures conchoidales des pyrites,

la pointe du microscope se déplace sur des surfaces non planes. Les images présentent alors des pendages qui se traduisent dans le variogramme par des effets de dérive (Figure III.3).

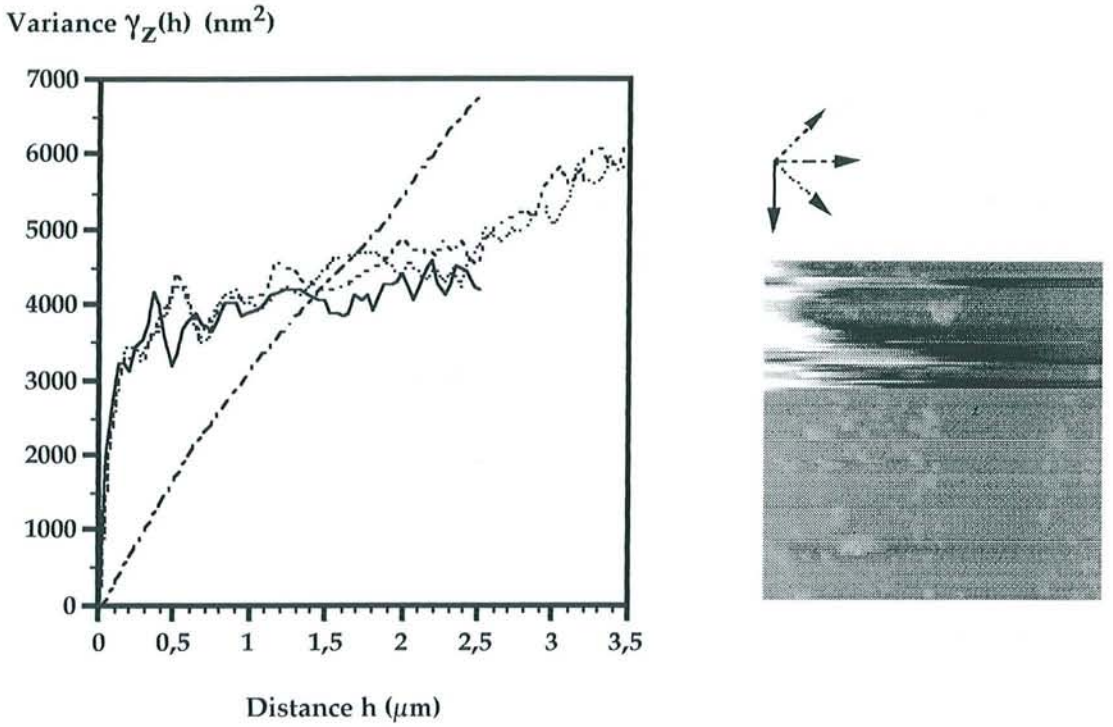


Figure III.2: Variogrammes réalisés dans quatres direction (0°, -45°, 45° et 90°) sur une image striée.

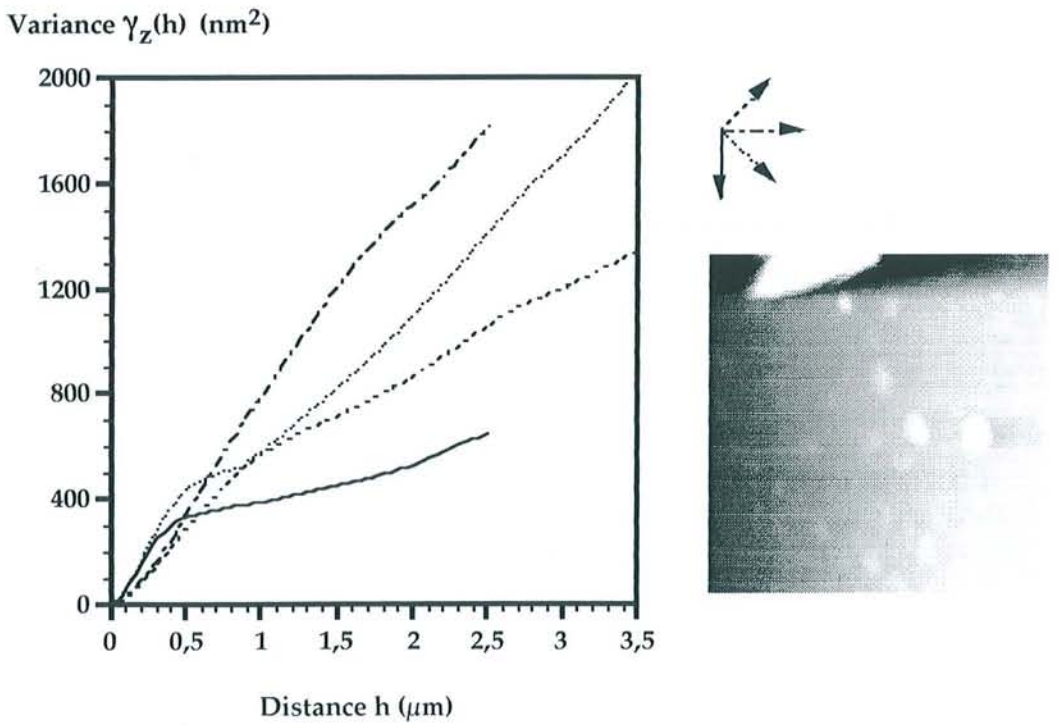


Figure III.3 : Variogrammes réalisés dans quatres directions (0°, 45°, -45° et 90°) sur une image présentant un pendage important

De tels résultats sont inexploitables et il est indispensable de corriger le pendage de l'image afin de pouvoir calculer et interpréter correctement les variogrammes sur une surface "remise à plat". Cette correction est aussi nécessaire pour disposer d'un référentiel d'altitudes, appelé plan porteur, qui donnera la hauteur réelle en chaque point et qui permettra, par la suite, de comparer les structures présentes à l'interface et d'en calculer certains paramètres géométriques (surface, volume...). Cette correction peut être assimilée à une correction de ligne de base en 3 dimensions.
L'utilisation d'un modeleur 3D s'est donc imposée à la fois pour mieux percevoir les structures développées et corriger les défauts précedemment énoncés. Notre choix s'est porté sur le modeleur GOCAD développé au Laboratoire d'Informatique et d'Analyse de Données de l'Ecole Nationale Supérieure de Géologie de Nancy.

2. Correction par modélisation 3D et partionnement

Après avoir tranformé l'image brute en une surface mathématique continue Ω (cf Matériel et méthodes), l'exercice consiste à discriminer de façon pertinente les points appartenant aux stries, au plan porteur ou aux trous et aux bosses. Pour cela, on a recours aux procédures de calcul sur des propriétés locales définies ou définissables en tous points de la surface offerts par le modeleur GOCAD.
On désigne par Ω l'ensemble des points (α_i) constituant la surface et Ω_Φ l'ensemble de leurs propriétés respectives notées $\Phi_V(\alpha_i)$. L'objectif est donc de partitionner Ω en fonction des propriétés connues Φ_V en 4 sous-ensembles disjoints de points distincts représentant respectivement le plan porteur (P_1), les stries (P_2), les trous (P_3) et les bosses (P_4) :

$$\Omega = P_1 \cup P_2 \cup P_3 \cup P_4 = \bigcup_{i=1}^{i=4} P_i$$

La seule propriété connue initialement est l'altitude du point $\Phi_Z(\alpha_i)$ ou plus simplement notée z_i. Cette propriété, trop dépendante du référentiel choisi, n'est pas suffisamment discriminante pour partitionner Ω. Il faut par conséquent avoir recours à d'autres propriétés calculées en chaque point α_i à partir des données initiales connues xi,yi et zi.
Parmi les analyses discriminantes envisagées et testées sur les images initiales ou sur les surfaces mathématiques, on peut citer :

- les analyses en composantes principales (ACP) des images brutes.
- les produits de convolution matriciels utilisant :
    - les fonctions dérivées (en 1 ou 2 dimensions)
    - les gradients de Robert et Sobel
    - les Laplaciens
- le calcul des courbures locales (maximale, minimale, moyenne, totale, ...) dans différentes directions.

Seule les méthodes utilisant des calculs en 3 dimensions de courbures locales permettent de réaliser une partition correcte. Toutes les autres méthodes ne permettent pas de s'affranchir complètement du plan porteur ou d'isoler parfaitement les bosses.

Les propriétés discriminantes retenues sont basées sur le calcul en tout point des courbures locales moyennes (H) et des courbures selon l'axe y (h_y), direction perpendiculaire au sens de balayage. La courbure moyenne H s'exprime de la façon suivante :

$$H = \frac{(h_{\min} + h_{\max})}{2}$$

où $h_{\min}$ et $h_{\max}$ désignent respectivement les courbures locales minimales et maximales calculées dans le voisinage $N(\alpha)$ de chaque point.

Le plan porteur est alors constitué de l'ensemble des points pour lesquels la valeur locale de la courbure moyenne est voisine de zéro. Une valeur seuil déterminée par l'opérateur sert à ranger dans la partition P_1, les points α_i dont la courbure $\Phi_H(\alpha_i)$ a une valeur absolue inférieure au seuil choisi.

Les stries, quant à elles, présentent une courbure extrémale dans la direction y. Comme pour le plan porteur une valeur seuil sert à sélectionner les points qui constitueront la partition P_2.

Dans les cas où les valeurs seuils sont difficiles à apprécier, il peut être nécessaire d'avoir recours à un partitionneur, c'est à dire un programme de classement automatique des points en fonction de leur courbure en différents sous-ensembles repérés par leur barycentre.

Une fois le plan porteur reconstruit, la partition P_3 correspondant aux zones en dépression ou aux trous est simplement défini par les points dont la hauteur est inférieure à celle du plan porteur.

Ainsi, le traitement des images s'effectue en plusieurs étapes successives:

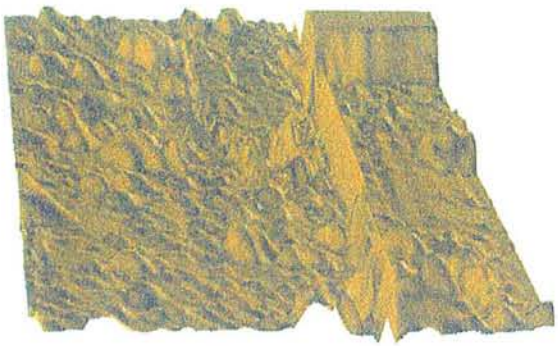
1. Détermination et localisation des points appartenant au plan porteur (P_1)
2. Détermination et localisation des points appartenant aux stries (P_2)
3. Détermination et localisation des trous dus à la corrosion (P_3).

Finalement par complémentarité, on obtient les points correspondants aux bosses (P_4), c'est à dire ceux n'appartenant pas à $P_1 \cup P_2 \cup P_3$:

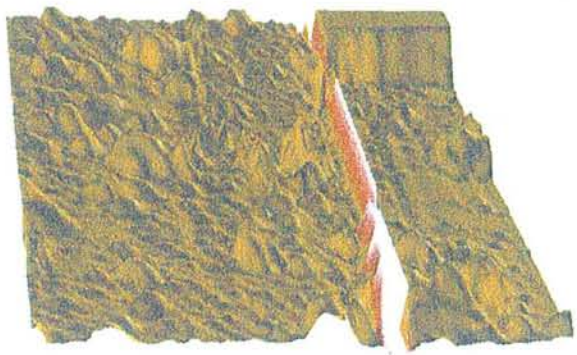
$$P_4 = C_\Omega P_1 \cup P_2 \cup P_3$$

a. Elimination des stries et des zones de saturées: (Planche III.2)

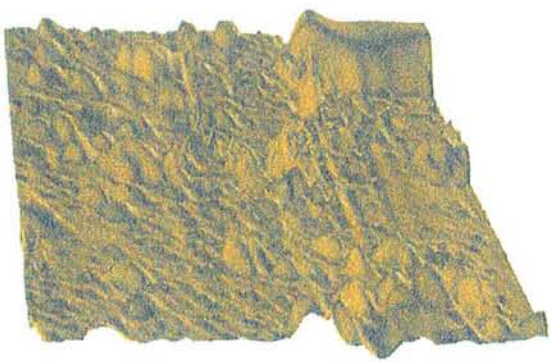
Une fois la partition P_2 formée, les points n'appartenant pas à celle-ci (Ω-P_2) vont être affectés d'une contrainte de stationnarité, c'est à dire que leurs coordonnées spatiales sont figées. Seuls les points de la partition sont libres de se déplacer selon z. Une interpolation sous contraintes DSI (Discrete Smooth Interpolation) détermine alors pour chaque point de P_2 une nouvelle position en z. La solution trouvée est unique et correspond à la position du point "la plus naturelle" (rugosité minimum), compte tenu de la position de ses plus proches voisins.



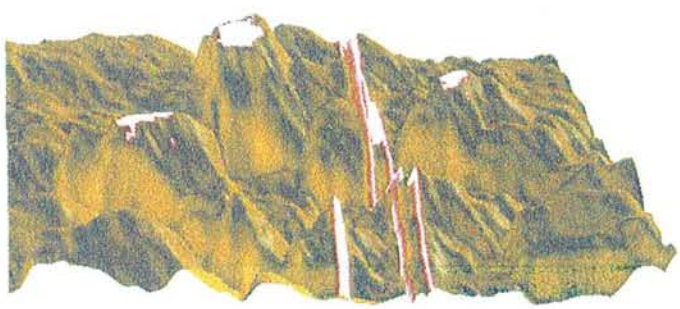
1a. Surface initiale non corrigée



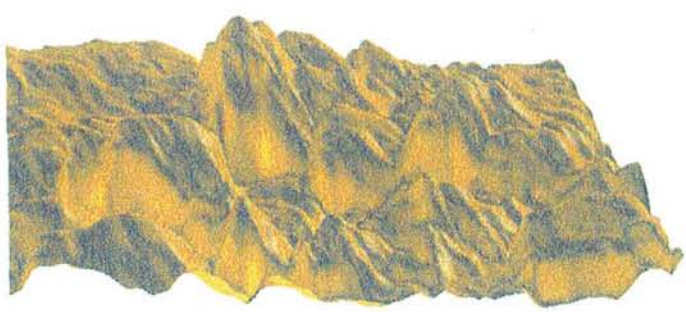
2a. Sélection de la strie à partir de la courbure maximum selon y (hy)



3a. Elimination de la strie par interpolation sous contrainte

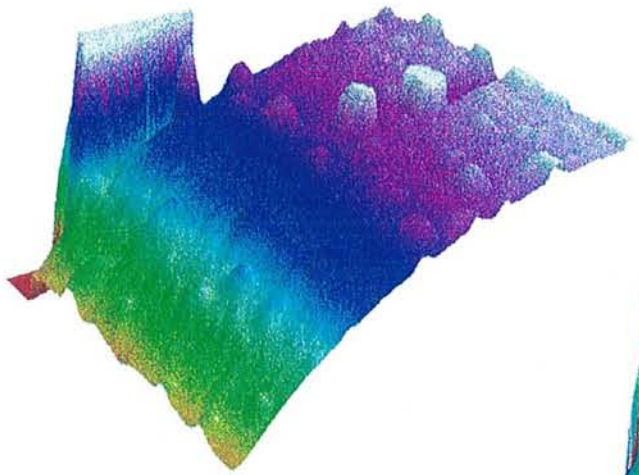


1 b. Sélection des stries et zones de saturation (limites de débattement de la pointe)

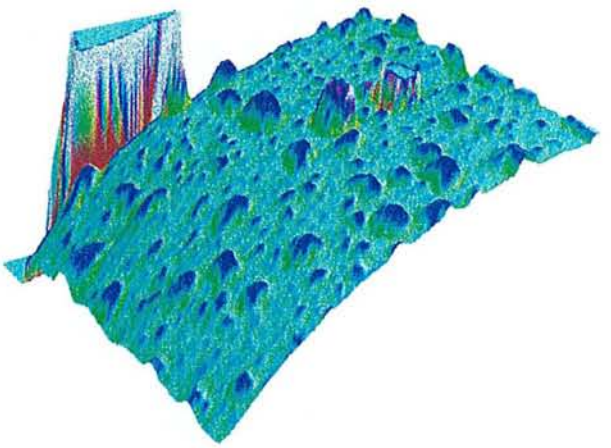


2b. Elimination des stries et saturation par interpolation sous contrainte

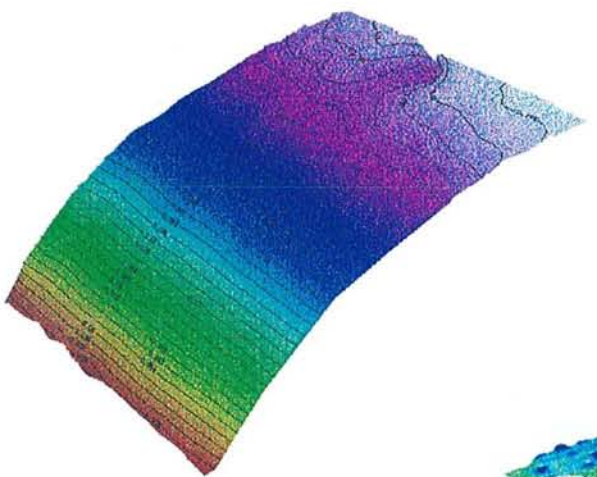
Planche III.2 : Elimination des stries et des zones de saturation grâce à la méthode DSI



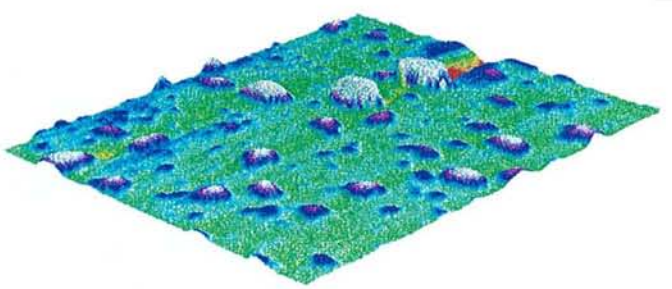
1.- Surface initiale non corrigée



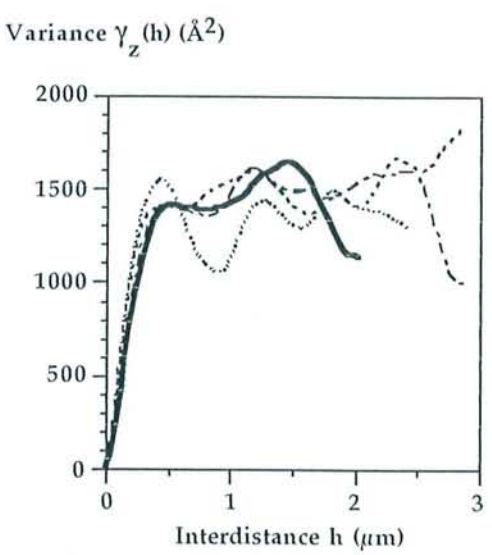
2.- Calcul des courbures moyennes (H)
en tout point de la surface



3.- Extraction du plan porteur
(H # 0)



4.- Soustraction du plan porteur
Surface avec un nouveau référentiel d'altitude



5.- Calcul des variogrammes
après correction

Planche III.3 : Les différentes étapes de correction du plan porteur

Le même type de correction peut être effectué sur des zones saturées correspondant aux limites de débatement positif ou négatif de la pointe.

b. Correction du plan porteur (Planche III.3)

A partir de la partition (P_1), un plan porteur est calculé par interpolation DSI. Le plan est connexe et une contrainte vectorielle de construction permettant de respecter la perpendicularité du plan en tout point aux normales locales, lui assure son univoquité. La nouvelle surface Ω_p obtenue représente la surface structurale du minéral sur laquelle sont posées les bosses. Elle constitue un référentiel d'altitudes pour recalculer la hauteur réelle des bosses.
Si on soustrait point par point l'altitude du plan porteur à celle de la surface initiale, on obtient une surface corrigée et ramenée à l'horizontale. Il devient alors possible :

- d'optimiser le calcul des variogrammes (qui ne présentent plus de dérive) et d'étendre leur interprétation
- de partionner les bosses en fonction de différents paramètres géométriques (hauteur, largeur..)
- de calculer les surfaces et les volumes développés par les bosses et leur taux de recouvrement à lasurface.

II. APPROCHE GÉOSTATISTIQUE : LES VARIOGRAMMES

Une simple observation ne permet pas de quantifier aisément les informations complexes exprimées par les images brutes ou les surfaces modélisées en trois dimensions : distribution spatiale, taille et forme des bosses, périodicité des structures.... Pour estimer ces différents paramètres, le recours à des méthodes mathématiques et statistiques d'analyse d'image inspirées de la géostatistique a été nécessaire. L'outil essentiel utilisé dans cette étude est le variogramme qui est chargé de résumer et de quantifier au moyen de différents paramètres une analyse structurale réalisée sur un champ de hauteur (Z) correspondant à la description topographique d'une surface de pyrite. Il ne faut pas oublier qu'il s'agit d'un traitement numérique de l'image, qui ne crée pas d'information mais qui la transforme sous une forme synthétique et opérationelle.
Par son formalisme mathématique, le variogramme est très sensible à la régionalisation des données , autrement dit à leur dispersion dans le champ étudié (ici la surface AFM).

$$\gamma_z(h,\theta) = \frac{1}{N(h)} \cdot \sum_{i=1}^{N(h)} \gamma_z(\alpha_i, h, \theta)$$

Si l'on se fixe une direction θ, le variogramme (Figure III.5) croît généralement avec le module de h (interdistance), c'est à dire que 2 points d'une surface AFM sont d'autant plus différents que leur

interdistance est plus grande. Il arrive que cette croissance se stabilise au delà d'une certaine distance appelée portée (notée le plus souvent a) indiquant une limite de corrélation et une variance maximum (γ_z max). On comprend qu'il soit aussi très sensible aux artéfacts locaux (stries, pics..) : quelques valeurs aberrantes élevées au carré peuvent modifier complètement un variogramme. Toutefois, la conduite de l'analyse structurale entreprise ici sur des surfaces (5x5 μm) de pyrite, permet d'entrevoir plusieurs champs d'investigations.

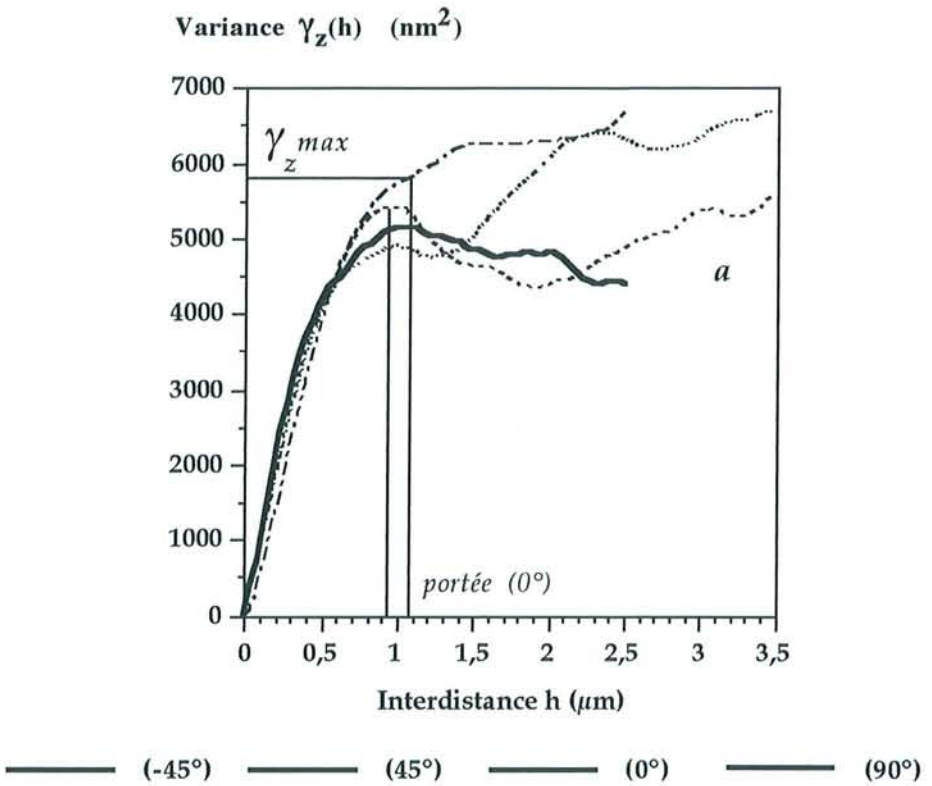


Figure III.6 : Variogrammes dans quatre directions sur une surface AFM de la pyrite K : (a) surface initiale

Pour mieux saisir la signification des variogrammes, il est possible d'illustrer ces propos à l'aide de variogrammes expérimentaux ou modèles (Fig. III.7 et Planche III.3).

Structures gigognes et hétérogénéité :

Dans les images d'AFM, la variabilité des variogrammes a de multiples causes à différentes échelles : les variogrammes calculés (Figure III.7) à grande échelle incluent plus ou moins les informations des échelles inférieures (structures gigognes).

De plus, il convient d'ajuster l'échelle de calcul pour que l'observation expérimentale soit bien focalisée sur les variabilités intéressantes, ce qui assure la qualité de l'estimation projetée : des structures ayant une portée de 50 nm ne seront pas révelées par un pas minimum de calcul de 100 nm.

En effet, dans cette étude, le variogramme est utilisé pour estimer la variabilité de la distribution spatiale des phases superficielles à la surface des pyrites. Par conséquent à petite échelle (1x1 μm)

le variogramme reflètera essentiellement l'organisation locale des bosses (nanostructures) alors qu'à plus grande échelle (5x5µm), il informera sur la distribution des phases à la surface (microstructrures).

A grande échelle (20x20µm), il indiquera l'existence de super-structures sans doute représentative de l'organisation géométrique de la surface minéral : cassure, clivage, alternance de faces cristallines...

Ainsi seules les zones (5x5 µm) et leur analyse variogrammique correspondent à l'évaluation recherchée pour la distribution des phases à la surface de la pyrite.

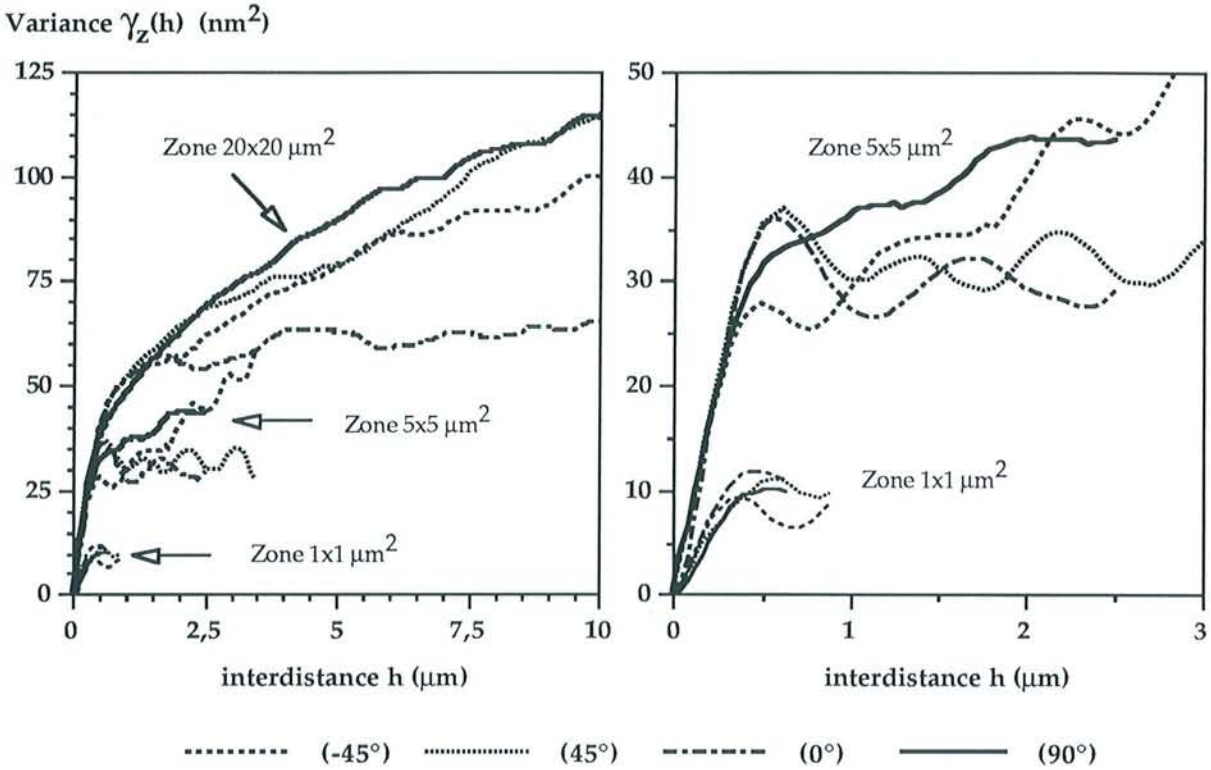


Figure III.6 : Calcul de variogramme à différentes échelles sur la surface présentée Figure III.1. Mise en évidence de structures gigognes

Autre effet gignogne classiquement rencontré : le plan porteur c'est à dire la surface structurale sur laquelle les phases sont organisées. Sa variance n'est pas très élevée, mais il participe plus ou moins en fonction de la direction à la dérive du variogramme général et il est nécessaire de le supprimer. Après correction de la dérive à l'aide du modeleur 3D (Figure III7.b), le variogramme présente moins d'anisotropie et révèle mieux certaines structures.

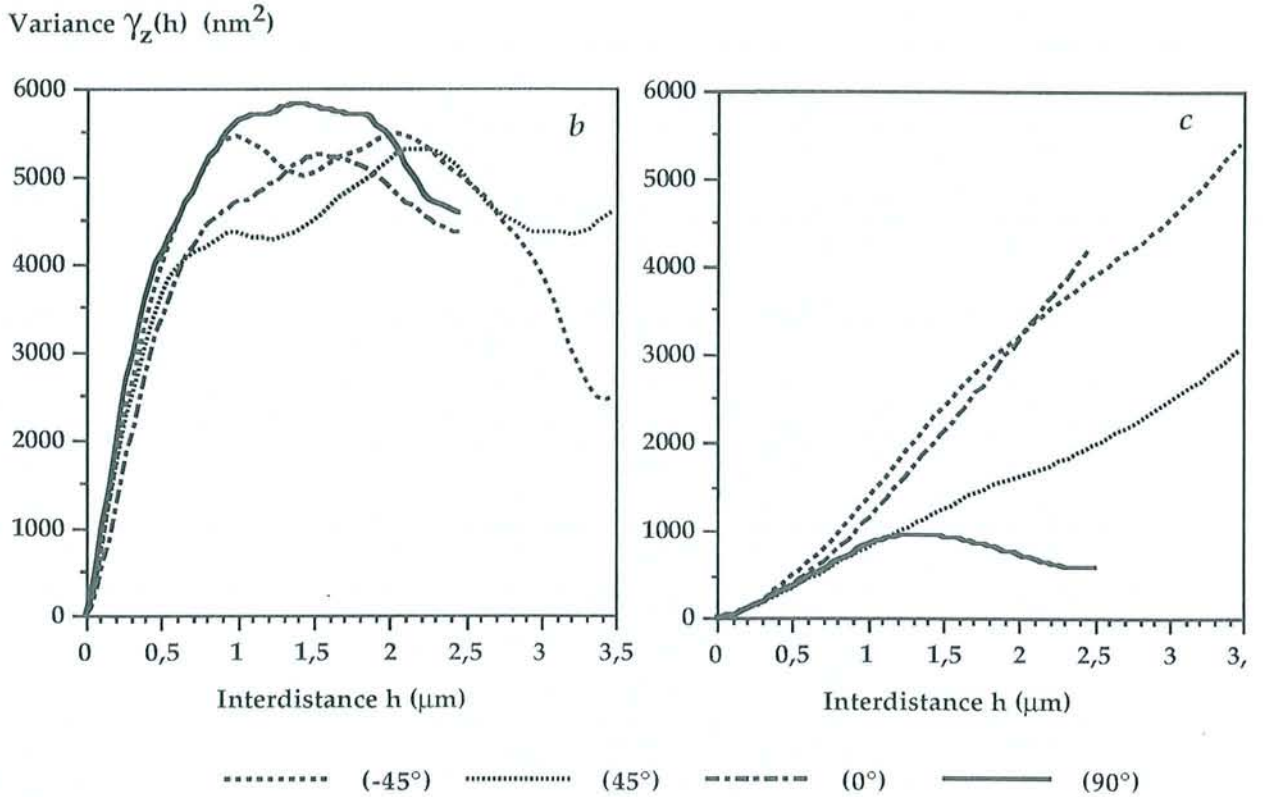


Figure III.7 : Variogrammes dans quatre directions sur une surface AFM de la pyrite K : (b) surface corrigée ; (c) plan porteur

Signification de la portée : Géométrie des bosses

La portée donne une estimation numérique de la zone d'influence des structures observées à la surface des pyrites. Au delà, l'écart quadratique moyen entre l'altitude de 2 points ne dépend plus de l'interdistance h.

A toute échelle, la portée permet d'estimer l'extension horizontale moyenne des bosses. Pour des objets rectangulaires, elle coincide avec la moyenne des largeurs mesurées, alors que pour des objets plus sphériques, elle reflètera plus une largeur moyenne à mi-hauteur.

C'est l'estimateur le plus robuste du variogramme. La portée est peu sensible à l'anisotropie de distribution ou aux variations de hauteur des bosses. Calculée dans différentes directions, elle sert à caractériser l'anisotropie géométrique des structures analysées (Planche III.4). Elle sera plus difficile à interpréter lorsque les structures sont difficilement discernables : par exemple des bosses peu nombreuses ou trop coalescentes. Dans ce cas, c'est le choix de la variable aléatoire (Z) qui est à revoir.

Toutefois, l'augmentation fréquente de la portée dans la direction de balayage (0°) n'est pas nécessairement liée à une anisotropie structurale naturelle des bosses. Elle est due à l'interaction pointe-surface et plus particulièrement aux forces de friction qui confèrent artificiellement une certaine asymétrie aux bosses. Ces modifications engendrées par le déplacement de la pointe sur la surface ou par la forme de la pointe elle-même, sont des défauts techniques souvent décrits par les

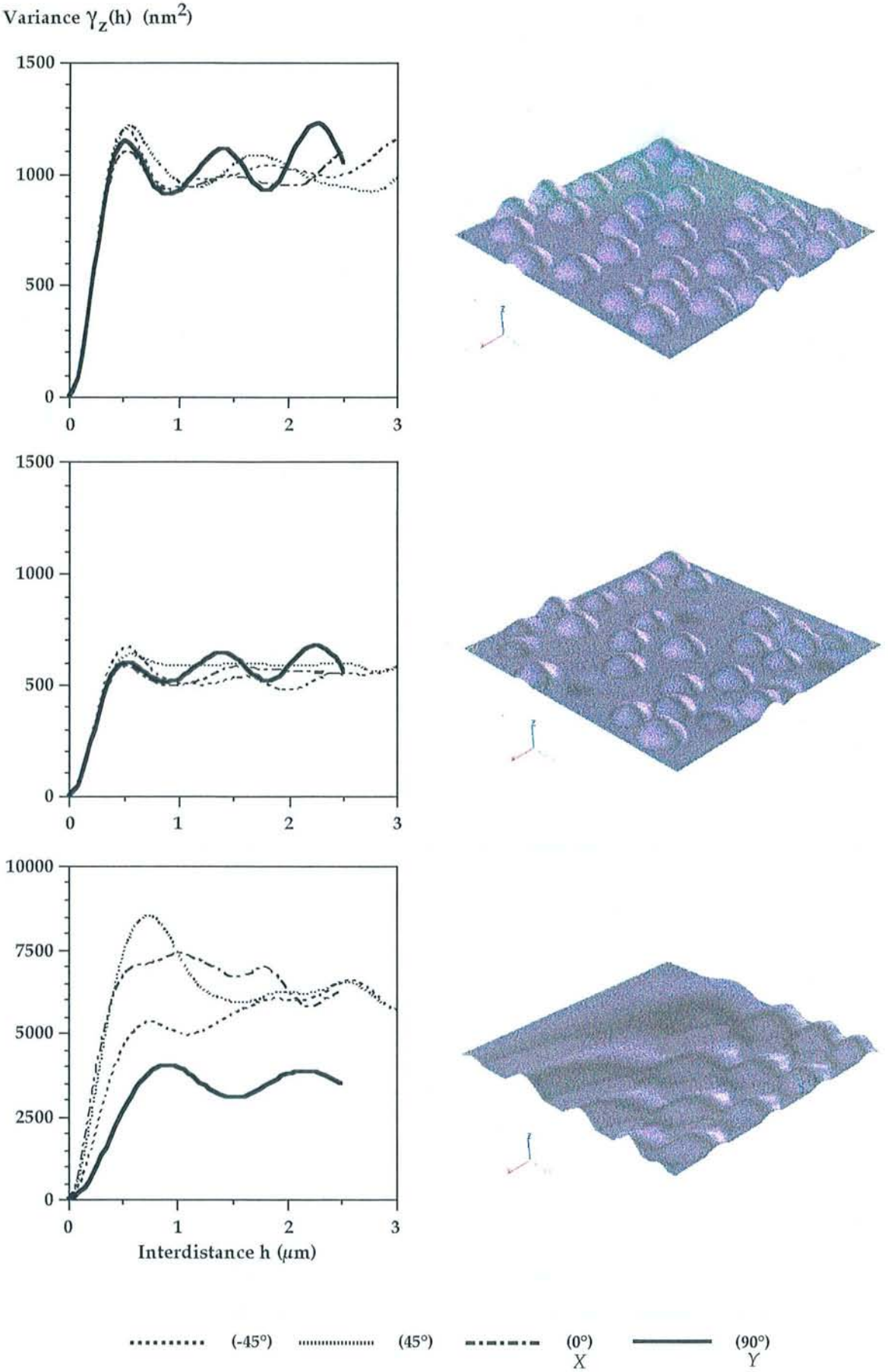


Planche III.4 : Variogrammes sur des surfaces modèles
Surface 5x5μm; Hauteur maximale des bosses 100nm

auteurs (GODOWSKY *et al.*, 1995 ; KAUPP *et al.*, 1995 ; FRETIGNY et BOISSET, 1994) mais qui demeurent très difficile à quantifier et à résoudre. Une méthode de correction tirant partie des contraintes et de la méthode DSI pourra être développée dans l'avenir.

Signification de la variance maximale : Stationnarité

La connaissance de la valeur maximale de la variance apporte des renseignements sur l'hétérogénéité de la surface selon z (Figure III.6 & 7).

Si les structures présentent une certaine continuité, un palier est observé (stationnarité). Sa valeur absolue est en général proportionelle à la hauteur moyenne des bosses mais il peut aussi inclure une information concernant la dispersion des bosses (Fig III.8)

De plus, des variations d'amplitude du variogramme à partir du palier indiquent à la fois des stationnarités locales et des discontinuités structurales (ou effet de trou).

Sur les surfaces de pyrite, elles correspondent à la succession de bosses et de parties planes (zone stationnaire). Ces variations n'indiquent pas nécessairement l'existence d'une périodicité structurale. En revanche, si cette succession n'est pas isotrope, l'effet de trou ne sera pas observé dans toutes les directions.

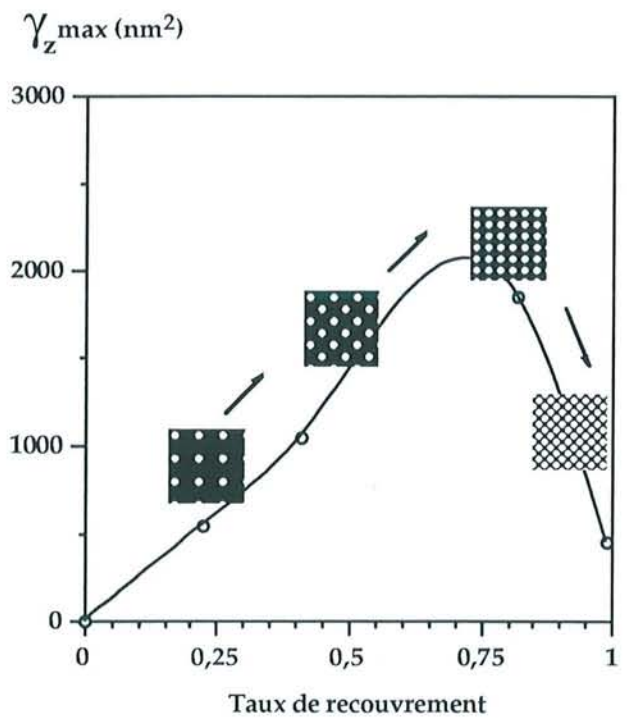


Fig III.8: Evolution de la variance maximum en fonction du taux de recouvrement statistique des bosses (Calottes hémisphériques Hauteur = 100 nm ; Diamètre = 750 nm)

Quand, l'anisotropie affecte à la fois les caractéristiques de variabilité et les caractéristiques géométriques du variogramme, on parle d'anisotropie zonale. Elle correspond le plus souvent à une anisotropie génétique reconnue préférentiellement dans une direction donnée.

III. DISTRIBUTION SPATIALE DES PHASES SUPERFICIELLES

Afin d'étudier statistiquement et comparativement la surface des pyrites à l'état initial ou après biolixiviation, un grand nombre de clichés AFM a été réalisé à différentes échelles (1x1 µm, 5x5 µm et 20x20 µm). Seuls les clichés 5x5 µm suffisamment représentatifs pour l'étude de l'hétérogénéité ont été étudiés dans leur intégralité. Après leur modélisation 3D et les quelques corrections d'usage (stries, plan porteur), les variogrammes sont calculés. La variance maximum et la portée sont utilisées pour décrire les images et une étude comparative a pu être menée en reportant ces valeurs dans des diagrammes variance = f(portée) (Figures III.8 et suivantes).

1. Les pyrites à l'état naturel:

L'analyse variogrammique entreprise sur les surfaces de la pyrite K initiale (Figure III.9) indique que la distribution des phases superficielles est très hétérogène. Il faut préciser que les amalgames micrométriques observés en microscopie optique couplée au spectromètre Raman, ne sont jamais présents sur les images d'AFM, en raison de la limitation technique imposée par le débattement maximal de la pointe .
Toutefois, si l'on fait abstraction de ces structures d'extension verticale très importante, il semble que les phases oxydées puisse être classées en deux groupes distincts :

- des phases de faible hauteur (faibles portée et variance), probablement divisées en deux catégories : les larges et les fines.
- des phases larges et hautes (grandes portée et variance).

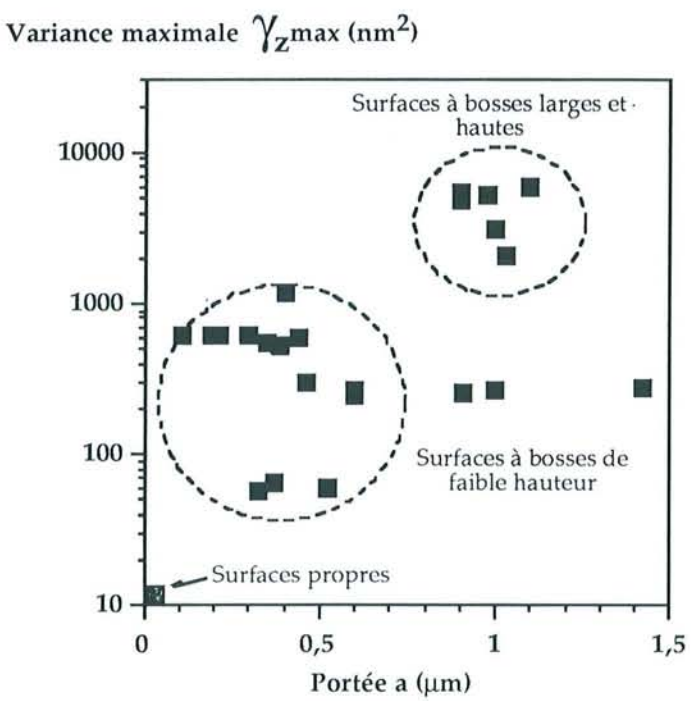


Figure III.9: Corrélation portée/variance pour la pyrite K oxydée à l'état initial

De plus , dans la majorité des variogrammes (90%), on observe une forte anisotropie de distribution, marquée par des pseudo-périodes très différentes selon les directions de calcul (Figure III.6b).
Cette technique d'analyse permet aussi de très bien discriminer

- les surfaces striées qui présentent de petites portées associées à de très grandes variances (Fig. III.3).
- les surfaces propres comme celle des pyrites décapées ou autoclavées qui présentent de petites portées associées à de très faibles variances (Fig III.10)

Dans ce dernier cas, on dispose d'une analyse de la surface géométrique des grains de pyrite. La faible variance indique plutôt des surfaces relativement plates et rugueuse à petite échelle. Ces variogrammes présentent très souvent un effet pépite (variance à l'origine non nulle), qui indique une très forte hétérogénéité de la surface : forte variabilité à petite échelle. Le variogramme calculé dans la direction (0°) est fortement bruité et caractérise les fluctuations de l'asservissement de la pointe au cours du balayage de la surface. En revanche, dans d'autres directions, le variogramme fait apparaître des structures larges et planes (portée supérieure à 1 à 2 µm) qui correspondent sans doute aux cassures des éclats.

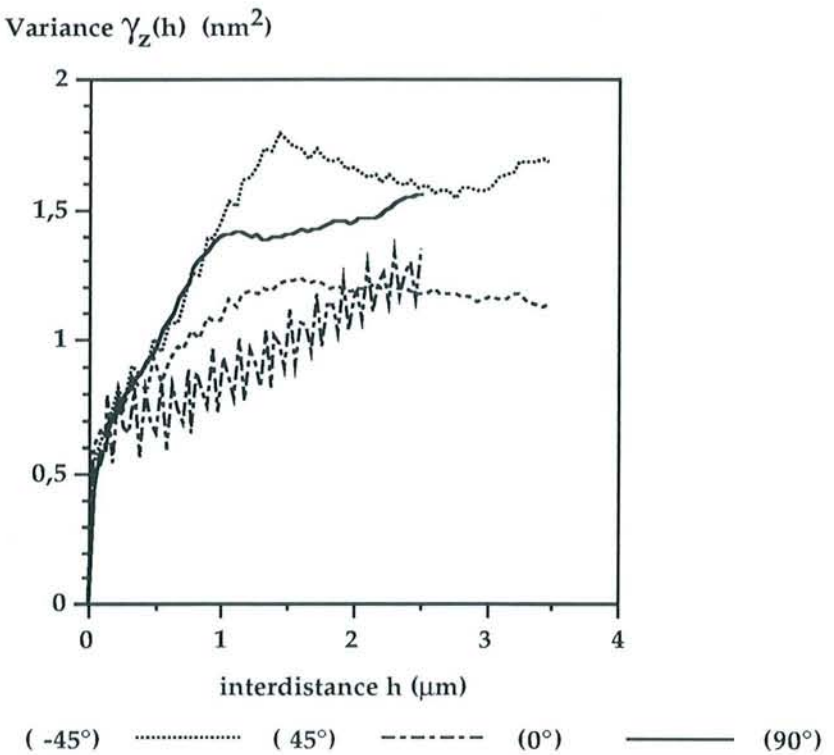


Figure III.10 : Variogramme type de surfaces autoclavées

D'autre part, la comparaison des analyses variogrammiques réalisées sur les deux pyrites montrent très nettement que les phases superficielles sont plus larges et plus hautes ou répartie de façon plus

homogène sur la pyrite Es. En effet, les représentations 3D montrent très nettement que les deux pyrites sont avant tout discernables par la répartition des phases à leur surface :

- pour la pyrite K : une distribution très hétérogène avec des phases d'extension verticale importante et très localisées (0,4<a<1µm)
- pour la pyrite Es : une distribution plus homogène avec une tendance à la coalescence de certaines phases (0,6<a<1,5 µm).

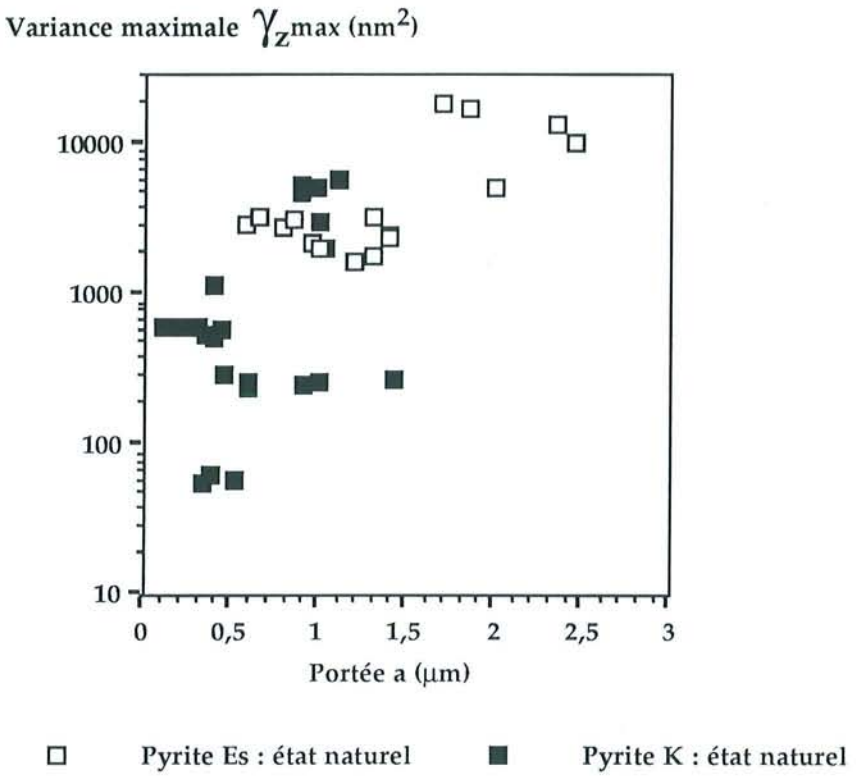


Figure III.11: Comparaison de la corrélation portée/variance pour les pyrites Es et K oxydées à l'état naturel

2. Les pyrites biolixiviées:

Les résultats concernant les surfaces biolixiviées des pyrites K sont tout à fait différents (Figure III.11). Une nette augmentation de la variance et de la portée est remarquable pour plus de 50% des images analysées. La distribution des bosses est beaucoup plus continue et un regroupement en classes comme effectué précédemment est impossible. Cette augmentation de la variance n'est pas seulement due au développement d'une porosité intragranulaire au cours de la biolixiviation mais suggère une totale réorganisation de la surface avec probablement une croissance (surtout latérale) significative des phases de surface.

En revanche sur la pyrite Es, la réoorganisation n'est pas visible et il semble que la dispersion initiale soit conservée.

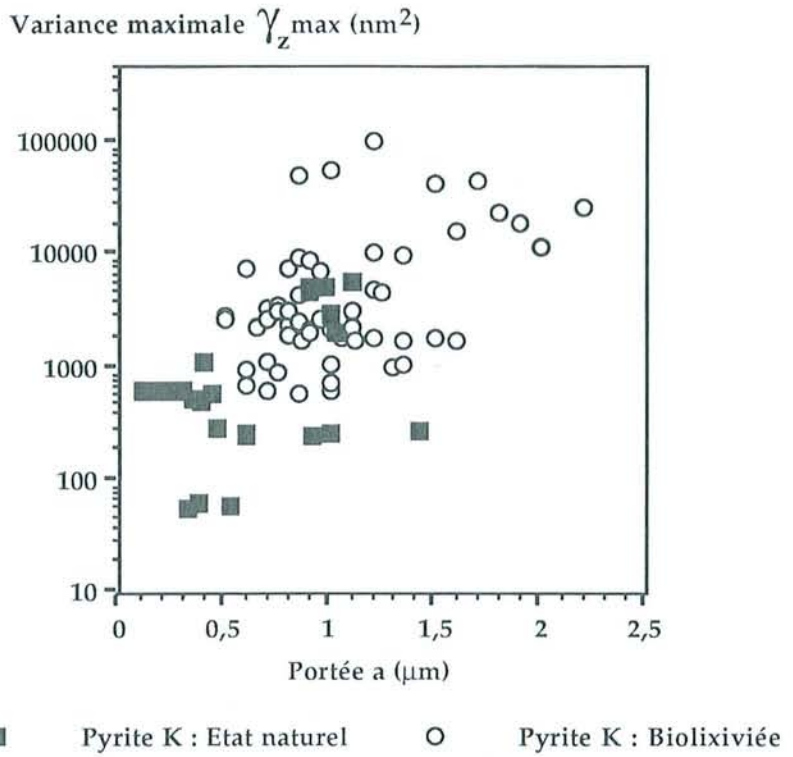


Figure III.11: Comparaison portée/variance entre des pyrites K initiales et biolixiviées (45 jours).

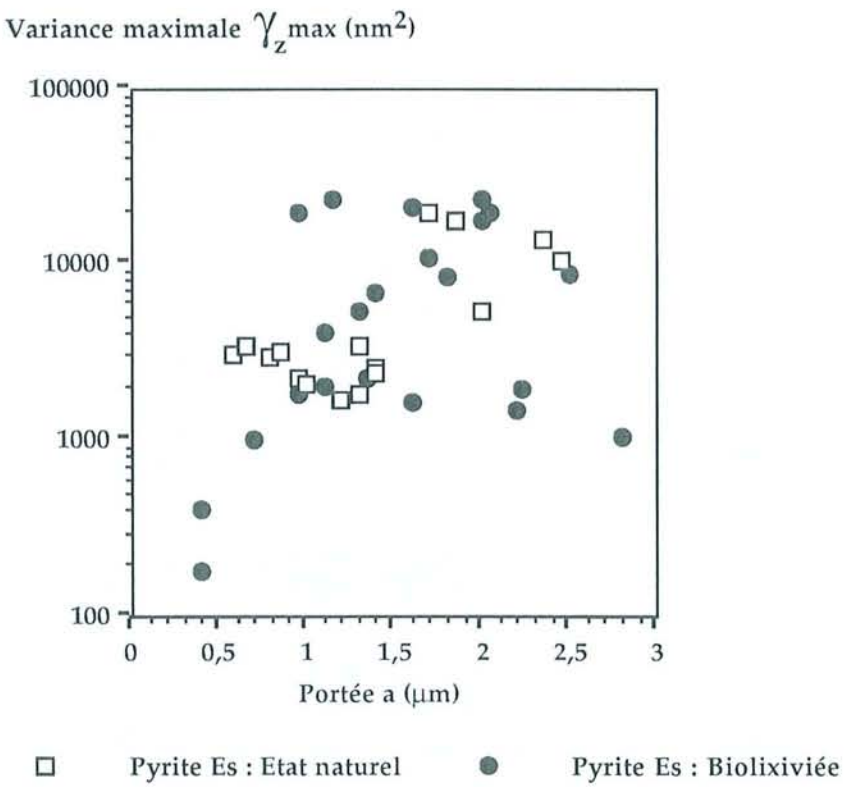


Figure III.12: Comparaison portée/variance entre des pyrites Es initiales et biolixiviées (45 jours).

IV. QUANTIFICATIONS GÉOMÉTRIQUES : EXTENSION DES PHASES SUPERFICIELLES

Les images d'AFM réalisées sur des éclats de pyrites Es et K à l'état naturel mettent en évidence des bosses de tailles variables semblant reposer sur la surface du minéral (Planche III.3). Ces piliers sont attribués aux phases oxydées détectées par ailleurs à l'aide d'autres techniques microscopiques (MEB couplée à l'EDS) ou spectroscopiques (XPS et Raman).

En complément de l'analyse géostatistique, la modélisation 3D permet à la fois d'apprécier la géométrie et de mesurer certains paramètres extensifs des phases superficielles à la surface du minéral.

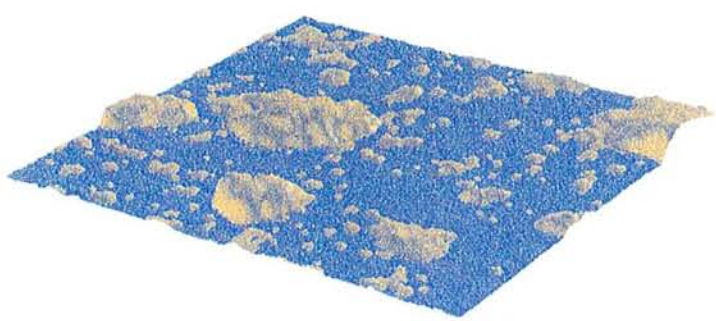
D'autre part, la représentation des surfaces analysées dans un repère cartésien (x,y,z) évite de nombreuses erreurs d'appréciation visuelle sur des images en niveaux de gris dont les extensions verticales et horizontales sont variables. Toutes les surfaces peuvent être ainsi plus facilement comparées.

1. Géométrie des phases superficielles :

Grâce à un angle de contact très ouvert (>30°) avec la surface, les bosses sont facilement discernables d'un plan porteur. Cette discordance angulaire permet de définir une limite topographique entre la bosse et le plan, qui peut être révélée par une analyse des variations de courbures maximale ou d'orientation des normales. Cette limite est en général mieux marquée sur les pyrites initiales que sur les pyrites biolixiviées, sans doute en raison de l'étalement des bosses.

A partir de leur hauteur (H) et de leur largeur (L) réelles, l'analyse géométrique permet de distinguer 2 classes de bosses :

- larges et hautes à géométrie prismatique marquée (L>0,5 μm ; 150<H<250nm)
- petites d'apparence plus rondes (L<0.2 μm ; 50<H<100nm)

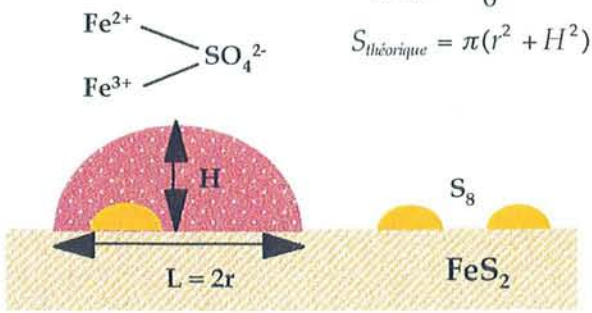


Les plus grandes bosses sont souvent réparties de façon assez hétérogène sur les surfaces au moins à l'échelle 5x5 μm.

Leur forme géométrique peut être modélisée par des calottes hémisphériques de hauteur H et de largeur L=2r (Figure III.14), bien que pour certains piliers très prononcés, un modèle plus cubique serait mieux adapté à leur description.

$$V_{théorique} = \frac{\pi H}{6}(3r^2 + H^2) \quad avec\, H \leq r$$

$$S_{théorique} = \pi(r^2 + H^2)$$



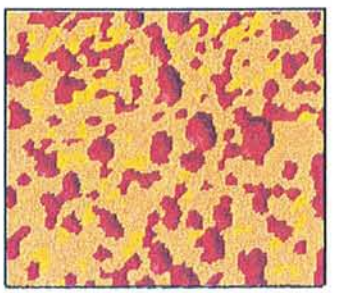


Fig. III.14 : Modèle de calotte hémisphérique basée sur le partionnement des surfaces AFM

Tableau III.1 : Paramètres géométriques des bosses modélisés par des calottes hémisphériques (données pour une bosse)

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

Ss = surface spécifique développée pour un composé de densité 1

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

Ainsi avec un référentiel correctement choisi, il est possible de partitionner chaque surface en au moins 2 sous-ensembles représentant d'une part les différentes familles de bosses et d'autre part une surface de pyrite indemne de traces d'oxydation.

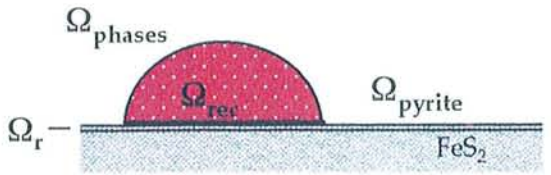
D'autre part, en tenant compte des résultats établis dans les chapitres I et II dans lesquels 2 types de phases oxydées ont été distinguées, il est assez logique de penser que les petites bosees pourrait correspondre au soufre élémentaire et les grandes bosses aux amalgames sulfatés ferreux ou ferriques. Toutefois, une analyse quantitative s'avère nécessaire pour valider ce modèle morpho-chimique.

2. Quantification des phases superficielles par modélisation 3D :

Une fois les corrections de plan porteur effectuées, les représentations 3D des surfaces "remises à plat" (Ω_S) peuvent être utilisées pour déterminer la surface, le volume et le taux de recouvrement développés par les phases superficielles (Planche III.4).

Cette étape de la modélisation nécessite de fixer une surface de référence (Ω_r), qui servira de référentiel pour l'intégration des paramètres extensifs et la détermination des partitions résultant de l'intersection des surfaces Ω_S et Ω_r.

Si l'on pose : $\Omega_s = \Omega_{phases} \cup \Omega_{pyrite}$ et $\Omega_r = \Omega_{pyrite} \cup \Omega_{rec}$



on obtient : $\Omega_{pyrite} = \Omega_s \cap \Omega_r$ et par conséquent $\Omega_{phases} = \Omega_s - (\Omega_s \cap \Omega_r)$ et $\Omega_{rec} = \Omega_r - (\Omega_s \cap \Omega_r)$

Après avoir déterminé ces trois partitions, le modeleur calcule aisément les surfaces développés par les phases et la pyrite et le volume des phases (Tableau III.2). Le calcul du taux de recouvrement est alors immédiat.

Tableau III.2: Quelques exemples de paramètres géométriques globaux des phases superficielles oxydées mesurées à l'aide du modeleur GOCAD (Pyrite K).

	Volume (μm^3)	Surface (μm^2)	θ (%)	ΔS (%)	Ss (m^2/g)
Pyrites oxydées	0,329 (±0,007)	7,872	29	2,4	0,19
à l'état naturel	0,163 (±0,012)	13,752	50	4,8	1,35
	0,063 (±0,007)	7,124	31	6,6	2,5
Pyrites	0,443 (±0,014)	15,033	58	3,9	0,45
biolixiviées	0,403 (±0,018)	19,330	72	5,2	0,83

Tous ces calculs peuvent être effectués soit localement sur chaque bosses ou de manière globale.

Ces résultats viennent parfaitement confirmer l'approche géostatistique, en soulignant l'hétérogénéité et la forte organisation des phases superficielles sur les pyrites initiales :

- surfaces peu couvertes avec de grandes ou de petites phases
- surfaces plus couvertes avec des petites phases

et la plus grande homogénéité des surfaces de pyrite biolixiviées : phases très couvrantes et relativement importantes

Mais le plus remarquable, est la concordance des taux de recouvrement calculés par le modeleur avec ceux obtenus en XPS sur des poudres ou des éclats : 40% en moyenne pour les pyrites initiales et 65% pour les pyrites biolixiviées. Par conséquent, si l'on considère que la distribution des phases est analogue entre les éclats et les poudres, la surface vue en AFM pourrait servir de modèle morpho-chimique. Les surfaces et les volumes développés par les phases peuvent rendre compte à la fois :

- des surfaces spécifiques (S_S) particulièrement élevées mesurées par adsorption de gaz (Argon) :

  Pyrite K à l'état naturel : S_S=1,2 m^2/g

  Pyrite K autoclavée : S_S=0,2 m^2/g

- des quantités désorbées par extraction sélectives (Chapitre I et II) si l'on considère qu'il s'agit majoritairement de sulfates ferriques et de soufre élémentaire (Tableau III.3).

Néanmoins, pour les pyrites oxydées à l'état naturel, les plus gros amalgames sulfatés (H >1μm) ne sont pas pris en compte, ce qui minimise les quantités estimées par intégration géométriques.

Tableau III.3: Paramètres géométriques globaux des phases superficielles oxydées (Pyrite K) calculés à partir du modèle de calottes hémisphériques

	L (nm)	H (nm)	N	θ (%)	St (μm^2)	Vt (μm^3)	Qp ($\mu g/g$)
Pyrite	500	140	25	20	6,448	0,380	380*
initiale	200	80	40	6	2,340	0,064	150**
Pyrite	900	50	25	64	16,10	0,400	400*
biolixiviée							

L = largeur ; H = hauteur ; N = Nombres de bosses ; θ = Taux de recouvrement ; St = surface totale développée ; Vt = volume total ; Qp = Quantité de phase correspondante de type amalgames sulfatés (*) ou soufre élémentaire (*)

Finalement, sur la base d'un modèle hémisphérique et compte tenu de l'analyse géostatistiques, il est possible de proposer un modèle morpho-chimique pour les surfaces des pyrites initiales et biolixiviées décrit par un ensemble de bosses de géométrie variable pour obtenir des résultats compatibles avec les différentes analyses spectroscopiques et quantitatives.

CONCLUSION :

Les surfaces oxydées ou biooxydées de pyrites sont couvertes de phases organisées sous la forme de bosses à peu près symétriques et qui peuvent être assimilés en premier lieu à des calottes hémisphériques. Leur taille est très variable et peut pour les extrêmes se situer entre 50 et 300 nm de haut pour 50 à 800 nm de large. Mais ce qui est le plus remarquable, c'est l'hétérogénéité de leur distribution spatiale qui présente fréquemment des anisotropies directionelles.

En considérant à la fois leur allure géométrique et leur distribution spatiale, principalement 2 classes de bosses ont pu être distinguées:

- des petites bosses en 50 et 100 nm de haut réparties de façon assez homogène sur la surface et que l'on pourrait attribuer à un soufre S_8 de surface (sans doute électrochimiquement actif)
- des grandes bosses de 100 à 300 nm de haut réparties de façon plus hétérogène et recouvrant par endroit les bosses de tailles inférieures. Ces bosses correspondraient à aux sulfates ou à de petits amalgames soufre/polysulfures/sulfates.

Par ailleurs, l'intégration des surfaces et des volumes développés par ces phases sont tout à fait en accord (dans l'ordre de grandeur) d'une part avec les taux de recouvrement statistiques donnés par l'XPS et d'autre part avec les quantités de phases désorbées par extraction sélective dans différents solvants aqueux ou organiques.

Les images d'AFM ainsi obtenues permettent de proposer un modèle réaliste pour la distribution des phases superficielles oxydées à la surface des pyrites, car contrairement aux autres techniques employées, l'AFM fournit ici un modèle local de la topographie de l'interface étudié qu'il est possible d'utiliser comme base de raisonnement pour la réalisation d'un modèle réactionnel de l'interface *Thiobacille*/pyrite. Les outils de statistique et de modélisation 3D sont absolument nécessaires pour appréhender l'organisation de l'interface. Les différents paramètres mesurés se combinent pour donner une image de l'état organisé et ordonné des phases, autrement dit, des sites réactionnels à la surface du minéral. En ce sens, les paramètres géométriques et leur variabilité indiquent l'évolution thermodynamique et entropique de la surface minérale au cours de son oxydation.

Mais pour aboutir à un modèle morpho-chimique complet de l'interface il faudrait pouvoir associer réellement une classe de bosses à un composé chimique de surface particulier. Il serait judicieux à l'avenir de compléter l'étude par des analyses en spectroscopie RAMAN de champ proche afin d'obtenir une cartographie chimique de l'interface.

Il sera alors possible d'analyser les espèces présentes en terme de sites électrochimiques donneurs ou accepteurs d'électrons par des analyses complémentaires en électrochimie (couplées à l'AFM si possible) et localiser ainsi les sites de corrosion ou d'adhésion, les substrats bactériens...

Chapitre IV

SYNTHESE ET MODELE

Chapitre IV

SYNTHESE ET MODELE MORPHOCHIMIQUE DYNAMIQUE DE L'INTERFACE

Dans leur description de la biolixiviation des sulfures par *Thiobacillus ferrooxidans*, de nombreux expérimentateurs considèrent que le minéral est une entité pure et parfaitement homogène. Bien qu'ils en reconnaissent volontiers la complexité, les processus ayant cours à l'interface minéral/bactérie/solution sont souvent décrits par des équations globales et les réacteurs naturels ou industriels sont considérés comme des "boîtes noires".

Ce travail révèle, au contraire, la grande hétérogénéité chimique et physique de la surface des sulfures qui ne peut plus être assimilée à une phase pure. Toutefois, cette hétérogéneité n'est pas synonyme de désordre mais inclut surtout une organisation tridimensionelle. Ces résultats originaux ont pu être obtenus, notamment, grâce :

- à la microscopie de champ proche (AFM) couplée à un puissant outil intéractif de modélisation 3D (GOCAD) pour l'étude topographique et l'analyse statistique de la distribution des phases oxydées à la surface de la pyrite.

- à l'utilisation conjointe des spectroscopies Raman en microscopie confocale ou d'électrons X, et de quantifications sélectives afin d'établir la nature chimique et l'organisation spatiale des composés oxydés de surface des pyrites à l'état naturel ou au cours d'un cycle de biolixiviation.

- au développement d'une électrode spécifique (EGF) pour étudier la réactivité et l'évolution de l'interface pyrite/solution au cours de l'oxydation biologique du minéral par *Thiobacillus*

ferrooxidans et appréhender le rôle des phases superficielles sur les cinétiques de la biolixiviation.

Toutes ces données aboutissent à la proposition d'un modèle morpho-chimique dynamique de l'interface et à la détermination de facteurs limitants pour l'oxydation bactérienne des sulfures et leur corrosion. Cette approche conduit aussi à redéfinir clairement le processus de lixiviation de la pyrite par *T. ferrooxidans* et les paramètres fondamentaux qui peuvent contrôler l'oxydation bactérienne des sulfures en réacteurs naturels (mines, sédiments, sols...) ou industriels.

I. MODÈLE MORPHO CHIMIQUE DE L'INTERFACE

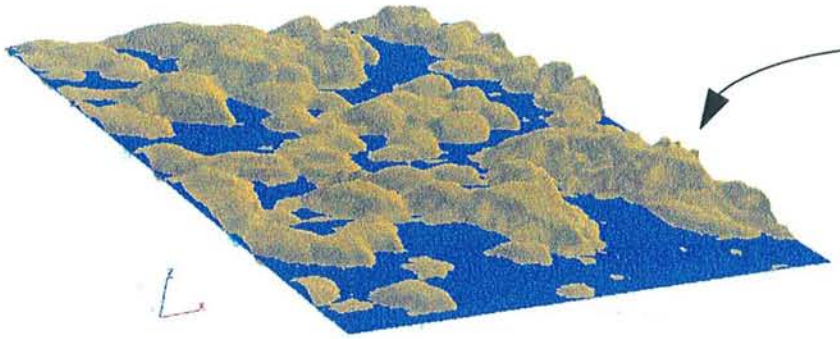
1. Diversité chimique de l'interface

La caractérisation chimique de la surface des pyrites à l'état naturel par différentes méthodes spectroscopiques et de désorption sélectives, révèle la grande diversité des produits d'oxydation de surface : sulfates et oxyhydroxydes de fer, polysulfures et soufre élémentaire octaédrique.
Tous ces produits ont pu être identifiés (principalement en spectroscopie Raman) mais aussi quantifiés (par dosage sélectifs en ICP et GC-MS). Parmi les résultats les plus originaux de cette étude, c'est la première fois que les polysulfures, le soufre élémentaire et certains oxydes de fer (gœthite ou lépidocrocite) sont identifiés *in situ*. La présence de composés soufrés (polysulfures et S_8) à la surface, souvent controversée, est désormais clairement établie et l'amélioration prochaine des protocoles de dosage en GC-MS permettra de les quantifier précisément.
De plus, la balance Fe(II)/Fer(III) des sulfates de surface a pu être estimée en prenant en compte à la fois la stœchiométrie fer-soufre obtenue à partir du dosage d'élutions et les signatures spectrales particulières observées en Raman. Toutefois, pour confirmer le statut du fer, il est nécessaire d'avoir recours à d'autres spectroscopies (Mössbauer par exemple).
Il semble que la proportion relative de ces différentes espèces chimiques dépende des propriétés cristallochimiques du minéral. Ainsi, une pyrite dotée de propriétés réductrices plus prononcées (type Es) développera préférentiellement des sulfates ferreux en surface. Les propriétés réductrices particulières de certaines pyrites seraient conditionnées par la présence d'impuretés minéralogiques comme l'arsenic qui leur confère des propriétés électrochimiques plus proche des arsénopyrites. Ainsi, l'arsenic comme d'autres impuretés fréquentes dans les pyrites (Cu, Mo, Co...) peuvent modifier les propriétés conductrices du minéral (n ou p) et conditionner indirectement la réactivité électrochimique et l'organisation des phases de surface, qui sont alors plus ou moins structurées, stables et sensibles à la solvatation.

Malheureusement, ce lien de cause à effet, ne peut pas reposer simplement sur des lois thermodynamiques ou de la physique du solide, puisque ces phases superficielle oxydées ne se présentent pas uniquement sous la forme de structures homogènes et distinctes, mais sont souvent associées dans des structures polyphasiques plus ou moins importantes. De plus, des études réalisées en spectroscopie Raman laissent entrevoir un lien entre le type de face cristalline exprimé par les grains minéraux et la nature des produits d'oxydation qui s'y développent.
Ainsi, plus qu'un simple lien entre la réactivité et la chimie des phases oxydées de surface, il existerait une relation plus complexe entre la nature, l'organisation des composés oxydés du soufre et du fer et les propriétés spécifiques de la surface minérale sous-jacente, dont le formalisme thermodynamique reste à définir.

2. Organisation et distribution spatiale des phases oxydées à l'interface

L'utilisation d'une microscopie de champ proche (AFM) est venue compléter cette approche et donner une base de réflexion essentielle pour comprendre l'organisation de l'interface à l'échelle micrométrique. Les phases superficielles s'organisent en bosses d'extensions horizontales et verticales variables à la surface de la pyrite. Leur répartition est très hétérogène : certaines zones balayées par la pointe du microscope ne présentent qu'une très faible rugosité, alors que d'autres sont couvertes de nombreux piliers de taille variable.
L'étude statististique de la répartition 3D des phases superficielles à l'aide des variogrammes a permis d'effectuer une analyse plus fine des images. La détermination de la variance maximale selon z et de la portée (zone d'influence) fournit des paramètres opérationels intéressants pour estimer l'hétérogénéité de l'interface et comparer les surfaces entre-elles. La modélisation 3D apporte un complément indispensable à cette analyse statistique pour déterminer des grandeurs extensives (surface, volume, hauteur..) des structures présentes à l'interface.
Ces modélisations permettent de distinguer les 2 types de pyrites (Es et K) qui diffèrent plus par l'organisation et la proportion relative des phases entre-elles que par la nature et la quantité des composés présents (environ 80 $\mu mol.g^{-1}$ de phases oxydées pour les deux pyrites).
L'hétérogénéité de la surface des pyrites se manifeste à plusieurs niveaux : hétérogénéité de forme ou de taille des phases et distribution anisotrope des structures à la surface. Par conséquent, aucun modèle de distribution ne peut être établi à l'échelle d'observation choisie (pas de périodicité, pas d'évidence d'agencement fractal...).
En revanche, il semble que les grandeurs extensives soient relativement bien conservées d'une zone à une autre. Il est fort probable que la forme, la taille et la répartition des structures à la surface des sulfures dépendent directement de la nature des phases : les plus gros piliers pourraient correspondre aux amas ou aux sulfates de fer plus ou moins hydratés alors que les bosses de taille inférieure seraient attribuées au soufre élémentaire. Une perspective intéressante consisterait à réaliser une partition des bosses (Figure IV.3) en fonction de différents paramètres (hauteur, volume, surface,



$V_{phases} = 1{,}42\ \mu m^3$

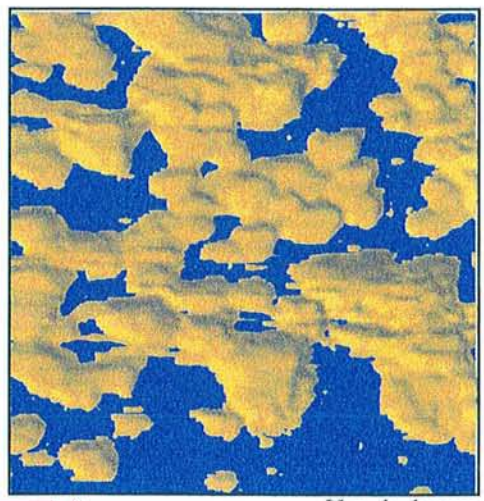
$S_{phases} = 20{,}8\ \mu m^2$

$\Theta_{rec} = 70\ \%$

$H_{maximum} = 250$ nm

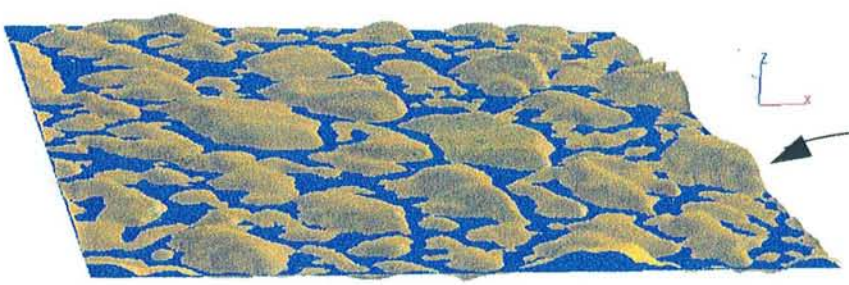
Pyrite K état oxydée

Distribution hétérogène



x

Vue de dessus



$V_{phases} = 0{,}85\ \mu m^3$

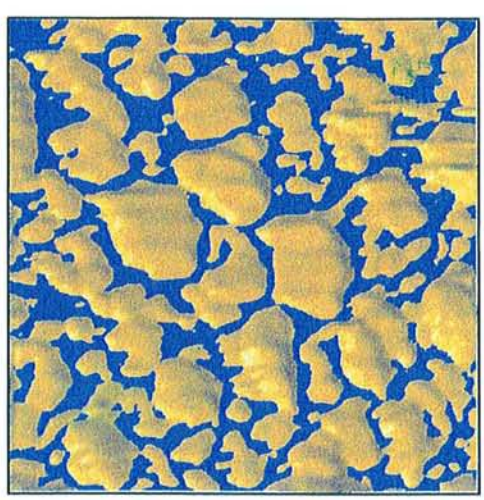
$S_{phases} = 21{,}58\ \mu m^2$

$\Theta_{rec} = 78\ \%$

$H_{maximum} = 160$ nm

Pyrite Es état oxydée

Distribution homogène



x

Vue de dessus

Planche IV.1 : Comparaison des distributions spatiales des phases oxydées du fer et du soufre à la surface des pyrites K et Es

allongement..) et d'effectuer une analyse statistique sur chaque classe d'objets. Chaque classe pourrait alors être affectée d'un ensemble de propriétés chimiques et définir ainsi un domaine de réactivité homogène au sens thermodynamique du terme. Dans cette perspective, l'idéal serait de disposer d'un spectromètre Raman équipé d'une fibre optique pour effectuer des analyses en champ proche. Ainsi, la correspondance entre les structures tridimensionnelles et la nature des phases pourrait être démontrée.

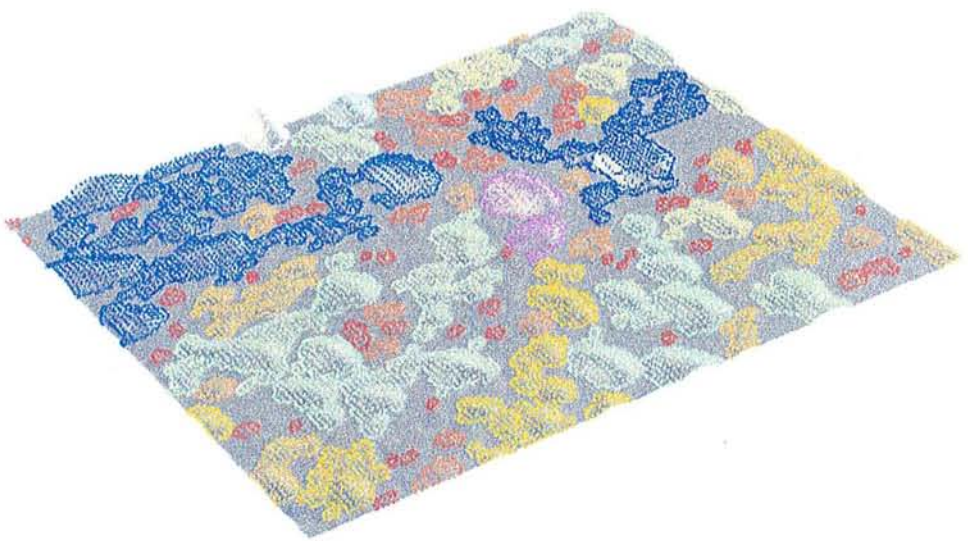


Figure IV.3 : Partitionnement des bosses à la surface d'une pyrite en fonction de leur volume

De plus, ces grandeurs extensives peuvent, sans difficulté, expliquer les taux de recouvrement observé en XPS, les quantités désorbées par extraction sélective et les surfaces spécifiques mesurées par isotherme d'adsorption de gaz (BET).

Néamoins, les plus gros amalgames visibles au microscope optique sur les grains de pyrites oxydées échappent souvent à cette technique d'investigation de surface, car ces structures dépassent le micron, et par conséquent le débattement maximal de la pointe. Ces amalgames contiennent une grande partie du fer et du soufre de surface (plusieurs mg/g pour les surfaces à l'état naturel). Ainsi, l'estimation des quantités de fer de surface, réalisée sur les images d'AFM à partir du calcul du volume total des bosses couvrant une zone de 25 μm^2, est inférieure aux quantités effectivement désorbées. En revanche, pour les pyrites biolixiviées qui ne présentent pas ces très gros amalgames, les quantités estimées à partir des images AFM sont tout à fait comparables à celles effectivement désorbées (de l'ordre de 100 à 500 $\mu m/g$).

Pour avoir une représentation géométrique complète de l'interface, il faudrait réaliser des images à plus grande échelle avec un microscope permettant l'analyse de structures d'extension verticale importante (plusieurs microns).

Quoi qu'il en soit, les images d'AFM peuvent être utilisées comme base de raisonnement pour la réalisation d'un modèle réactionnel de l'interface *Thiobacillus*/pyrite et plus généralement d'une

interface bactérie/minéral. Elles sont indispensables à la compréhension des mécanismes d'altération locaux et d'interactions solution/bactérie /surface.
Aujourd'hui l'hétérogénéité des surfaces des sulfures ne peut plus être ignorée et l'expérimentation doit en tenir compte dans le choix des méthologies à employer. Il est clair qu'il vaut mieux privilégier dans ce cas une approche naturaliste et descriptive à une approche théorique.
D'autre part, la surface minérale étant l'interlocuteur direct des bactéries dans les processus de biolixiviation, il est légitime de se demander si les Thiobacilles "perçoivent" et tirent profit de cette hétérogénéité spatiale et réactionnelle de la surface. Plusieurs questions se posent alors : "Quelle est la fonction biologique des phases : substrats ou sites d'interaction purement physico-chimiques? Quelle est l'influence de leur distribution spatiale et de leur "état" sur la réactivité globale du système (adhésion, oxydation biologique, chimique ...)? Y-a-t-il un lien entre l'adhésion bactérienne, le développement des phases superficielles et le développement des pores de corrosion?

II. DYNAMIQUE DES PROCESSUS LOCAUX DE LA BIOLIXIVIATION

1. Les phases superficielles : indicateurs d'oxydation et substrats bactériens.

L'étude de cycles de biolixiviation effectués dans des conditions initiales diverses répond en partie à ces interrogations.
Le minéral pur FeS_2 n'est jamais attaqué directement par *Thiobacillus ferrooxidans* et ne représente pas un substrat assimilable. L'oxydation directe de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans*, mentionnée par de nombreux auteurs, n'a sans doute pas de réalité. En revanche, les phases superficielles de la pyrite solubilisées lors de l'autoclavage représentent des apports en fer(II) et en soufre élémentaire qui constituent des substrats énergétiques et biodisponibles d'emblée en solution pour les micro-organismes. De la même façon, les phases oxydées du fer (sulfates ferreux) et du soufre (soufre élémentaire S_8) développées sur la surface minérale par oxydation chimique constituent également des substrats assimilables. Les Thiobacilles sont capables d'utiliser directement ces composés organisés, voire cristallisés, en surface. La spectroscopie XPS ainsi que les désorptions sélectives des pyrites montrent d'ailleurs que ces phases sont recouvertes par un film organique engendré par l'adsorption des micro-organismes. Les phases superficielles oxydées orientent donc les processus d'oxydation bactérienne à la fois par leur nature et par leur disponibilité.
Par ailleurs, les sites actifs où se développent les produits d'oxydation sont sans doute localisés aux abords des sites de corrosion. Les produits d'altération du minéral sont en partie métabolisés par les bactéries (oxydation des sulfates ferreux, du soufre élémentaire et éventuellement des polysulfures), donc désorganisés et solubilisés *in situ*. Progressivement la surface se perfore et la dissolution localisée du sulfure est alors enclenchée et entretenue sous l'action concommitante du fer(III) (seul responsable de l'oxydation du minéral et du développement des phases) et des bactéries qui les "digèrent".

2. Les différentes étapes de la biolixiviation des pyrites par *Thiobacillus ferrooxidans*.

A l'aide des résultats obtenus, un modèle en trois étapes est proposé afin de décrire plus précisément le déroulement et les mécanismes de la biolixiviation d'un sulfure par *Thiobacillus ferrooxidans* L'état du système avant inoculation est schématisé par la figure IV.1 : la surface du minéral est décapée (seule subsiste une faible fraction de soufre élémentaire) et les sites de croissance des phases oxydées sont démasqués. La solution comporte la totalité des phases superficielles à l'état soluble (Fe^{2+}, Fe^{3+} oxydant, polysulfures, SO_4^{2-}) ou sous forme de particules colloïdales (S_8, FeOOH).

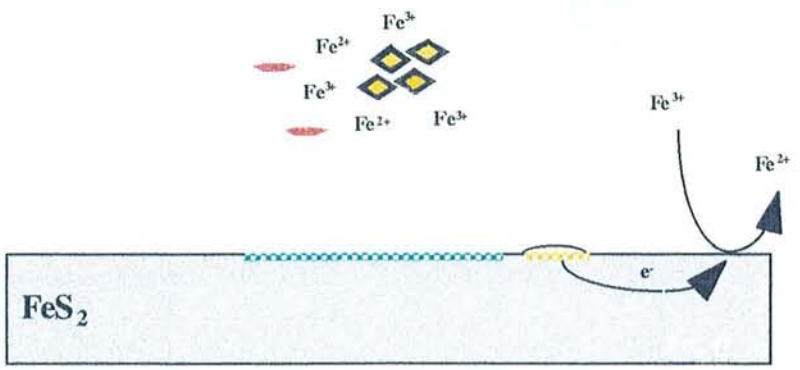


Figure IV.1: Etat initial du système pyrite/solution (après autoclavage et avant inoculation)

• **Phase I :**

Les bactéries utilisent principalement, lorsqu'ils sont présents, les substrats directement disponibles en solution (Fe^{2+}, S° et polysulfures (?)) qui résultent de la solubilisation des phases oxydées du minéral par l'autoclavage (Figure IV.2). La métabolisation du soufre élémentaire constitue un apport d'énergie supérieur à l'oxydation du fer(II) mais l'adaptation préalable de la population de Thiobacilles, sur soufre ou sur fer, peut orienter l'utilisation préférentielle de l'un ou de l'autre, dans les premièrs temps de la biolixiviation. Il est difficile de savoir si les polysulfures constituent un substrat bactérien.

La solubilisation des phases de surface apporte une quantité non négligeable de fer(III) en solution qui, complétée par l'oxydation bactérienne des cations ferreux durant les premiers jours de biolixiviation, contribue à l'augmentation de la quantité d'oxydant chimique en solution. Le fer(III) constitue le seul oxydant efficace de la pyrite à pH acide alors que l'oxygène dissout n'a qu'un effet limité. Ainsi, l'oxydation chimique de la pyrite par le fer ferrique débute dès les premiers instants de la lixiviation et initie la dissolution du minéral. Il se forme du soufre élémentaire, des polysulfures, des sulfates ferreux et ferriques, des oxyhydroxyde de fer, ainsi que des composés polyphasiques (amalgames de sulfates, polysulfures et soufre S_8).

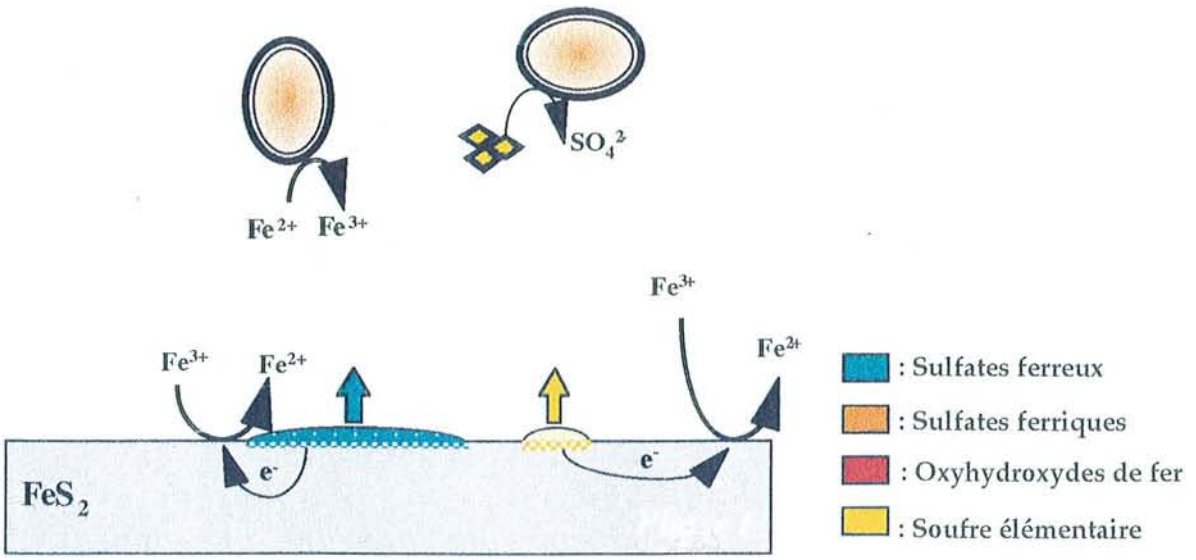


Figure IV.2 : Principaux événements de la phase I du processus de lixiviation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* :
- les bactéries oxydent préférentiellement les substrats en solution
- la pyrite est oxydée par le Fe^{3+} (formation de S_8 et $FeSO_4$ essentiellement)

• **Phase II :**

Les bactéries, venues au contact du minéral, métabolisent les substrats solides (soufre élémentaire et sulfates ferreux principalement) nouvellement formés à la surface (Figure IV.3a). Il est envisageable que les polysulfures, dans l'hypothèse où ils ne constituraient pas un substrat directement assimilable, puissent s'oxyder en soufre élémentaire sous l'action du fer(III) et être ainsi indirectement consommés. Dans une certaine mesure, et sans imaginer un chimiotactisme, les Thiobacilles perçoivent l'hétérogénéité de la surface minérale et les substrats énergétiques que constituent certaines phases superficielles. Il pourrait s'établir un pont chimique, par le biais du fer(III) (hypothèse de Blake, 1982), entre la phase de surface et les sites complexants pariétaux du Thiobacille.

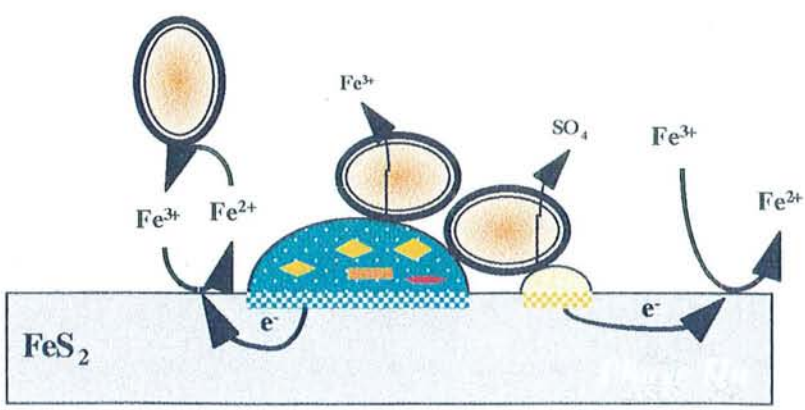


Figure IV.3a : Principaux événements de la phase II du processus de biolixiviation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* : après adsorption, les bactéries métabolisent directement les substrats solides de surface (S_8 et $FeSO_4$ essentiellement)

La corrosion perforante s'amorce alors par la base de ces substrats métabolisables (Figure IV.3b). La répartition des figures de corrosion correspond, par conséquent, aux sites particuliers où se développent le soufre élémentaire et les sulfates ferreux, seules phases assimilables par les micro-organismes.

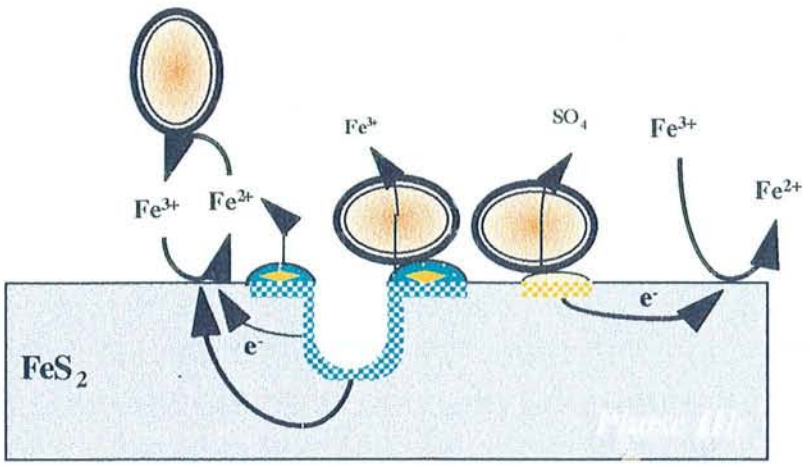


Figure IV.3b : Principaux événements de la phase II du processus de biolixiviation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* : la corrosion s'effectue par dissolution du minéral à la base des phases oxydées métabolisées.

• **Phase III :**

La quantité de fer (III) en solution est importante et l'oxydation chimique du minéral devient prépondérante. Le développement de composés tels que les sulfates ferriques et les oxyhydroxydes de fer (qui ne sont pas des substrats bactériens) gêne l'accès des bactéries aux substrats solides (S° et $FeSO_4$) et marque le début de la phase stationnaire de croissance bactérienne (Figure IV.4).

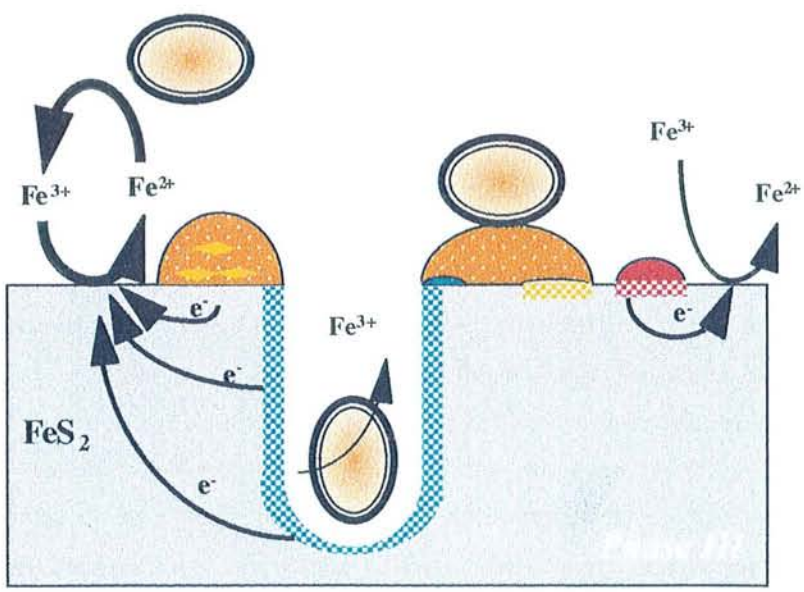


Figure IV.4: Principaux événements de la phase III du processus de biolixiviation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* : accroissement de la taille des pores précédemment formés et oxydation chimique accrue du minéral.

La surface du minéral pourrait être alors protégée de l'apparition de nouvelles piqûres et la corrosion se poursuivrait uniquement sur les zones d'attaque préexistantes (perforation et élargissement des tunnels par exemple). Cette corrosion par propagation de pores semble déterminée dès l'amorce du processus.

Dans cette dernière phase, et jusqu'au bout de la lixiviation, les processus d'oxydation sont sous le contrôle des propriétés électrochimiques et cristallochimiques du minéral.

III. SYNERGIE DES PROCESSUS CHIMIQUES ET MICROBIENS

Au terme de cette étude, il semble qu'il existe une véritable synergie entre les processus chimiques et microbiens intervenant au cours de la biolixiviation des sulfures par *Thiobacillus ferrooxidans*. La modification des conditions initiales conduit à des comportements imprévisibles à long terme, voire chaotiques. Par exemple, le fait de priver les microorganismes de soufre élémentaire biodisponible en solution en début de lixiviation, provoque une attaque décuplée du minéral et des rendements de biolixiviation très importants après 20 jours. On peut également s'étonner que de très faibles quantités de soufre élémentaire (quelques ppm) ou de fer (50 à 100 ppm) initialement présents ou non en solution aient de telles conséquences sur les cinétiques de lixiviation bactérienne.

Ainsi, l'état de surface du sulfure conditionne et oriente les processus de biooxydation, par la nature, la quantité et la biodisponibilité des phases superficielles qu'il comporte à l'état naturel. A la lumière du modèle phénoménologique de biolixiviation et de la caractérisation des pyrites à l'état naturel, on peut désormais comprendre que les cinétiques de lixiviation et la corrosion de la pyrite Es soient différentes de la pyrite K. Par rapport à la pyrite K, la solubilisation des phases superficielles de la pyrite Es libère en solution :

- une quantité de fer(II) très importante (sulfates ferreux)
- et une faible quantité de soufre élémentaire colloïdal (4 fois moindre).

et fournit ainsi des substrats favorables à la mise en place d'un cycle oxydatif dès les premiers instants de la biolixiviation (Chapitre II-III). Contrairement à la pyrite K, l'oxydation bactérienne du fer(II) stimule la production assez homogène de soufre élémentaire et de sulfates ferreux très rapidement solubilisés. Les bactéries disposent alors d'un plus grand nombre de sites où trouver du substrat et la répartition homogène des sites d'oxydation expliquerait également la répartition isotrope des figures de corrosion sur Es (Chapitre I).

D'autre part, le caractère plus réducteur de la pyrite Es conduit au développement préférentiel de structures polyphasiques de sulfates ferreux et de soufre élémentaire et non de sulfates ferriques qui ne sont pas des substrats pour les Thiobacilles. Les propriétés réductrices du minéral limiteraient sans doute aussi l'apparition de phases oxydées telles que les sulfates ferriques ou les oxyhydroxydes de fer qui gênent la biolixiviation de la pyrite K en phase III.

La biolixiviation obéirait ainsi à un schéma général dans lequel, quelle que soit la phase du cycle en cours (I,II ou III), le fer(III) est le principal moteur d'oxydation (Figure IV.5). Dans ce schéma fonctionnel, la totalité des phases superficielles oxydées seraient produites par l'oxydation chimique du minéral par le fer(III).

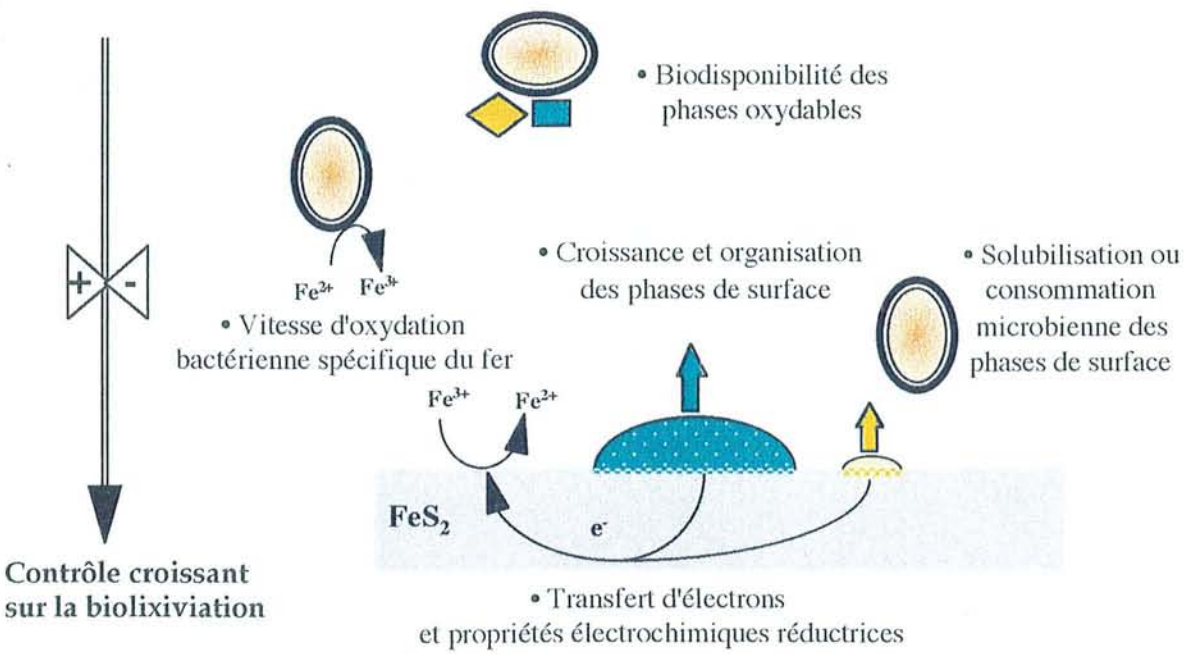


Figure IV.5 : Principaux paramètres contrôlant le processus de biolixiviation de la pyrite par Thiobacillus ferrooxidans

Cette hypothèse semble se confirmer par des expériences en cours concernant le fractionnement isotopique du soufre ($\delta^{34}S$) à la fois dans la solution, à la surface du minéral et dans le minéral, au cours du cycle de biolixiviation. Les phases superficielles produites par oxydation à l'air ou par biolixiviation présentent, en effet, un enrichissement en isotopes lourds par rapport à la pyrite pure et à la solution du réacteur (Tableau III.3). Bien que l'enrichissement en isotope léger soit toujours moins significatif pour les processus d'oxydation biologiques que pour ceux de réduction (sulfato-réduction par exemple), il semble bien que la production chimique de phases superficielles soit à l'origine des variations isotopiques mesurées dans les milieux de lixiviation.

Tableau III.3 : Fractionnement isotopique du soufre sur les différents composants liquides ou solides d'un réacteur de biolixiviation (Pyrite K).

	Solution initialeM2	Solution finale (30j)	Pyrite initiale	Pyrite autoclavée	Phases sup. biolix	Phases sup. oxydées air
$\delta^{34}S$ (‰)	2,03 (±0,06)	4,28 (±0,23)	4,35 (±0,04)	4,10 (±0,06)	5,70 (±0,20)	5,80 (±0,20)

D'autre part, la régulation des processus à l'interface minéral/bactérie/solution (croissance des phases, corrosion...) est principalement contrôlée par la biodisponibilité du fer(II) oxydable, par les propriétés électrochimiques du minéral et par l'activité oxydatrice spécifique des bactéries vis à vis du fer. En revanche, même si sa présence renforce la croissance bactérienne, le soufre colloïdal libéré en solution apparaitrait plus comme un "leurre bactérien", limitant la corrosion bactérienne du minéral.
Ainsi l'évolution du processus de biolixiviation est déterminée à la fois par le développement et l'organisation des phases de surface, mais aussi par l'établissement d'un cycle oxydatif stable et durable entre la bactérie, le minéral et le fer en solution.

IV. CONSÉQUENCES SUR LES LIXIVIATIONS NATURELLES ET INDUSTRIELLES

Ce canevas opérationel de l'oxydation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* apporte quelques réponses sur le fonctionnement naturel ou industriel des lixiviations bactériennes de minéraux sulfurés.

1. Le contact bactérie/minéral :

Dans les biooxydations (industrielles ou non) menées en réacteur, l'amorce de l'oxydation et de la solubilisation des pyrites est précédée d'une phase d'adhésion forte des bactéries (*T.ferrooxidans* en l'occurence) à la surface minérale qui suggère à de nombreux auteurs un rôle déterminant des bactéries fixées. L'apport du contact est d'autant plus déterminant que la vitesse d'oxydation diminue si l'on empêche le contact bactérie/minéral, ou si l'on diminue la concentration bactérienne de l'innoculum ou la densité de pulpe. De plus, la croissance bactérienne semble toujours favorisée en présence du contact. Or, les résultats obtenus dans cette étude montrent que les bactéries directement au contact ne parviennent pas à oxyder le minéral !
En fait, ces résultats ne sont pas contradictoires car l'apport du contact n'est pas à voir du point de vue du minéral lui-même mais au niveau des phases superficielles qui servent de substrats aux bactéries. De plus, comme la production de ces substrats est directement liée à l'oxydation de la surface de la pyrite par le Fe(III), il parait assez évident qu'à la fois la densité de pulpe et le taux de bactéries disponibles puissent devenir des facteurs limitants.
En effet, l'augmentation de la densité de pulpe accroît significativement le nombre de surfaces réactives et par conséquent la production de substrats biodisponibles. Un nombre supérieur de bactéries au contact est donc nécessaire pour consommer ces substrats et limiter le recouvrement des surfaces actives. En absence de contact ou si le nombre de bactéries en solution est trop faible, les surfaces se passivent rapidement en se couvrant de sulfates ferriques et de soufre.
Les bactéries au contact ou au voisinage de la surface aurait donc un double rôle : (i) débarasser les surfaces des substrats oxydables (sulfates ferreux et soufre) et (ii) oxyder le minéral en produisant

localement un agent de corrosion très efficace : le fer (III). Ainsi lorsqu'il y a contact la croissance bactérienne se trouve naturellement favorisée

Il y a sans doute un compromis à trouver à la fois entre le nombre de bactéries et la densité de pulpe pour atteindre un fonctionnement en flux tendu avec des surfaces quasiment propres et du fer(III) libre en solution tout au long du cycle de biolixiviation.

2. L'activité oxydatrice des bactéries :

De même si des biooxydations sont effectuées en utilisant soit des *consortia* de bactéries oxydatrices du fer et du soufre (*T. ferrooxidans* et *T. thiooxidans*), soit des *Thiobacillus ferrooxidans* cultivés préalablement sur différents substrats (S°, Fe^{2+}, sulfure..), on peut noter une amélioration assez systématique des rendements d'oxydation en présence de bactéries oxydatrices du soufre.

Là encore, les résultats obtenus dans ce travail suggèrent que l'efficacité d'un processus de biolixiviation dépendrait aussi la capacité des bactéries à utiliser rapidement les composés réduits du soufre présents soit sur le minéral ou sous forme de particules plus ou moins colloïdales en solution.

La production de soufre en surface favorise fortement la croissance bactérienne mais n'améliore pas nécessairement les rendements de lixiviation, car l'oxydation du minéral passe obligatoirement par la production microbienne de fer(III).

Le soufre élémentaire pourrait même avoir, à long terme, un effet négatif sur les cinétiques de lixiviation en limitant l'activité oxydatrice spécifique des *Thiobacillus ferrooxidans* vis à vis du fer. Peut-être faudrait-il trouver le moyen de piéger ou de limiter la production électrochimique de soufre, pour améliorer les rendements d'extraction de certains réacteurs.

En revanche dans les milieux naturels, c'est un élément peu mobile qui peut, en s'accumulant, servir d'amorce efficace pour le démarrage de cinétique de lixiviation.

3. Etat de surface , granulométrie et propriétés électrochimiques

Dans ce travail, le rôle déterminant des phases superficielles sur les cinétiques d'oxydation bactérienne de la pyrite a été clairement démontré. Par conséquent, il est fort probable que des modifications drastiques des états de surfaces peuvent donner lieu à des lixiviations très différentes.

Ces états de surface peuvent être modifiés artificiellement par décapage sélectif ou plus simplement lors du broyage des minerais. Les conditions opératoires (à sec, par voie humide, à pH contrôlé...) vont influencer directement la nature chimique des phases superficielles alors que l'intensité du broyage déterminera les quantités développées. Ainsi, les fractions de faible granulométrie apportent des quantités importantes de phases oxydées en solution et selon leur

nature, elles peuvent alors constituer des substrats utilisables par les bactéries et orienter les processus d'oxydation.

Il est clair que le vieillissement des minerais soit lors de leur stockage à l'air libre (tas de stérils ou résidus de flottation) ou lors de leur confinement dans des galeries de mines abandonnées, peut avoir des conséquences favorables sur le développement de phases oxydées utilisables par les bactéries dès que les conditions environnantes deviennent favorables. Très souvent, un simple arrosage suffit pour démarrer ou redémarrer des biolixiviations sur des vieux résidus sulfurés.

Mais, quoi qu'il en soit, ce sont avant tout les propriétés électrochimiques et cristallochimiques du sulfure qui définissent son oxydabilité par le fer (III) et donc indirectement son oxydation par les bactéries. Ainsi, même si il est possible d'améliorer les performances oxydatives des Thiobacilles par génie génétique ou d'optimiser les paramètres opératoires pour accroître leur activité, le minéral reste toujours le facteur limitant.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Tout comme Van LEEUWENHOECK, lorsque BOLTZMANN pressentait que les propriétés macroscopiques de la matière dépendent de l'action conjuguée des atomes et de leur interactions, il était bien loin d'imaginer toutes les facettes du fonctionnement intime de la Nature et notamment les "bizarreries"du monde microscopique. Dans le système *Thiobacillus*/Pyrite, ce jeu d'interactions entre la matière minérale et la matière vivante conduit effectivement à l'apparition de structures microscopiques organisées (phases oxydées) qui conditionnent le fonctionnement macroscopique du système. Au cours de la biolixiviation de la pyrite, le formidable moteur de cette transformation est avant tout l'énergie d'altération : le minéral se détériore en fournissant de l'énergie à la bactérie. Mais cette dispersion d'énergie, au lieu d'aboutir à un effondrement brutal et unique de la structure minérale prend la forme d'une évolution progressive de la matière qui conduit à l'apparition plus ou moins transitoire de structures locales organisées : les phases superficielles oxydées.

Ainsi, le processus d'oxydation bactérienne d'une pyrite apparaît aujourd'hui plus comme un dialogue étroit et une synergie fonctionnelle entre le minéral et la bactérie, chacun étant soumis aux réactions de l'autre. Dès lors, il ne faut plus négliger l'importance des réactions physico-chimiques dans un tel système et prendre conscience que la surface minérale constitue une auréole réactionnelle primordiale. Au travers des modifications structurales et chimiques dont elle est le siège, il est possible de percevoir très sensiblement l'évolution de l'environnement réactionnel de l'interface, à l'échelle micrométrique. Par conséquent, le minéral ne doit plus être considéré comme une entité parfaite ou une phase "pure" au comportement idéal puisque la variabilité des caractéristiques physico-chimiques des pyrites (chimie, états de surface...) montre que les surfaces minérales sont très largement hétérogènes.

Afin de mieux prendre en compte cette hétérogénéité, des dispositifs originaux et des techniques analytiques spécifiques ont été développés dans cette étude :

- L'électrode EGF a permis de suivre l'évolution de la réactivité d'une pulpe minérale en amplifiant les phénomènes oxydo-réducteurs se produisant à la surface des grains. Cette nouvelle électrode constitue un capteur sensible des phases superficielles électrochimiquement actives se développant, de façon transitoire, sur la surface de la pyrite. Elle permet de suivre la solubilisation ou la croissance de ces composés de surface dans différents milieux (oxydants et abiotiques, inoculés...).
- A l'aide de techniques spectroscopiques variées (XPS et Raman) couplées au dosage sélectif des composés oxydés de surface (GC-MS, ICP), il a été possible pour la première fois d'obtenir par recoupement, une répartition spatiale des phases superficielles oxydées des pyrites Es et K à l'état naturel ou après un autoclavage (état de surface des sulfures en début de biolixiviation).
- Le recours à une microsopie de champ proche (AFM) s'est avéré indispensable pour préciser l'hétérogénéité et l'organisation tridimensionnelle de l'interface. L'étude statistique de la répartition des structures à la surface des pyrites a permis de confronter et de valider les modèles schématiques établis pour les interfaces, aux véritables topographies. Cependant, l'idéal pour étudier la morpho-chimie de la surface serait de disposer d'une sonde chimique de champ proche.

Au terme de ce travail, les corrélations établies au cours du cycle de biooxydation de la pyrite entre le comportement électrochimique du minéral et le développement des phases superficielles permettent d'appréhender le processus d'oxydation bactérienne au travers d'une évolution morpho-chimique de l'interface. Cette évolution structurale et morphologique du système pyrite-*Thiobacillus* permet de préciser les mécanismes de biolixiviation ainsi que le dialogue bactérie-minéral, à l'échelle micrométrique ou de la bactérie.

Plusieurs faits nouveaux ont d'ailleurs été démontrés :

(i) les phases superficielles solubles (notamment les sulfates ferreux et le soufre élémentaire) constituent les premiers substrats métabolisés par les microorganismes. Ils sont biodisponibles, facilement assimilables et la durée de la phase de latence de la croissance bactérienne est inversement proportionnelle à leur abondance en solution en début de biolixiviation.

(ii) Le développement de phases oxydées à la surface du minéral résulte de l'action exclusive de l'oxydant chimique présent en solution (Fe^{3+}). Parmi les composés superficiels ainsi produits les sulfates ferreux, le soufre élémentaire (et les polysulfures?) sont les seuls substrats effectivement métabolisés par les bactéries.

(iii) Les bactérie sont incapables d'oxyder directement le minéral pur FeS_2.

Les phases superficielles oxydées et leur répartition à la surface des sulfures constituent des facteurs limitants assurant la régulation de la lixiviation bactérienne. Leur présence est capitale pour l'initiation et le déroulement de la biolixiviation. Le modèle proposé considère d'ailleurs que les sites de corrosion coïncident en partie avec les sites de croissance des composés incomplètement oxydés du fer et du soufre et métabolisables. De plus, certains résultats de l'analyse Raman suggèrent que la nature des phases oxydées développées dépend directement du type de face cristalline exprimé. L'interdépendance des propriétés cristallochimiques des sulfures, de la nature et de l'organisation des composés d'oxydation superficiels, de la corrosion et des mécanismes de biolixiviation semble donc être démontrée et explicitée dans ce travail.

Cette étude n'aurait pu aboutir sans l'utilisation conjointe et le couplage de techniques très variées, permettant de confronter des analyses globales et locales de l'interface. L'idée précise que l'on a désormais de l'hétérogénéité et de la complexité d'une interface, permettra, à l'avenir, de mieux cibler les techniques à employer pour étudier efficacement les processus qui s'y déroulent. La mise au point de certaines techniques de champ proche couplant les analyses spectroscopiques et topographiques de la surface du minéral pourrait d'ailleurs s'avérer judicieuse pour de tels sujets.. D'autre part, le couplage d'une cellule électrochimique et d'un spectromètre Raman pourrait affiner les relations établies entre la nature et l'organisation des phases oxydées et la réponse électrochimique et la réactivité du sulfure.

Finalement, puisque les crises environnementales actuelles mettent en évidence la fragilité des "équilibres" naturels et nos difficultés à appréhender les multiples facettes des systèmes polyphasiques où se côtoient le vivant et le minéral, il convient d'élaborer de nouveaux outils permettant d'unifier les connaissances interdisciplinaires nécessaires à la compréhension des phénomènes naturels biogéochimiques et à la maîtrise de procédés biogéotechnologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allen, G. C., Paul, M. and Hallam, K. R., 1995. An X-Ray Photoelectron Spectroscopic study of the high temperature oxidation of pyrite. **Can J. Appl. Spectrosc. Vol. 40, no 6:** 160-166.

Ammou-Chokroum, M., 1975. Aspect électrochimique de la dissolution des sulfures et des minerais sulfurés. **Bull. Soc. Fr. Min. Crista., 98 :** 121-129.

Andriamanana, A and Lamache, M., 1983. Etude électrochimique de la pyrite en milieu acide. **Electrochim. Acta 28:** 177-183.

Bailey, L.K., and Peters, E., 1976. Decomposition of pyrite in acids by pressure leaching and anodization : the case for an electrochemical mechanism. **Can. Met. Quart. 15 :** 333-344.

Bang, Sookie S., Deshpande, Sandeep S. and Han, Kenneth N., 1995. The oxidation of galena using *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy 37:** 181-192.

Bartels, C. C., Rojas-Chapana, J. A. and Tributsch, H., 1995. In-situ video microscopic technique for visualization and control of bacterial leaching activity on thin synthetic sulfide films. **Biohydrometallurgical Processing,** 131-139.

Berry, V.K. and Murr, L.E., 1978. Direct observations of Bacteria and Quantitative Studies of their catalytic role in the leaching of low-grade, copper-bearing waste. In: Murr, E.L., Torma, A.E. and Brierley, J.A. (Editors), **Metallurgical applications and bacterial leaching and related microbiological phenomena. Academic Press :** 103-136.

Berthelin, J. 1987. Des bactéries pour extraire des métaux. **La Recherche, 188 :** 720-725.

Berthelin, J. et Belgy, G., 1979. Processes induced by partial sterilisation of soil. **Geoderma, 21 :** 297-310.

Berthelin, J., 1988. Physical and chemical weathering in geochemical cycles. In : **A. Lerman and M. Meybeck (Eds.) Kluwer Academic Publisher.** 33-59.

Berthelin, J., Koblevi, A. et Dommergues, Y., 1974. Microbial weathering of a brown forest soil : Influence of partial sterilization. **Soil Biol. Biochem., 6 :** 393-400.

Bigham, J. M., Carlson, M. and Murad, E., 1994. Schwertmannite, a new iron oxyhydroxy-sulphate from Pyhäsalmi, Finland, and other localities. **Mineral Mag., Vol 58:** 641-648.

Bigham, J. M., Schwertmann, U., Carlson, M. and Murad, E., 1990. A poorly crystallized oxyhydroxysulphate of iron formed by bacterial oxidation of Fe(II) in acid mine waters. **Geochim. Cosmochim. Acta, Vol. 54**: 2743-2758.

Bigham, J. M., Schwertmann, U., Traina, S. J., Winland, R. L. and Wolf, M., 1996. Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters. **Geochim. Cosmochim. Acta, Vol. 60, No 12:** 2111-2121.

Blagov, E. V., Klimchitskaya, G. L., Lobashov, A. A. and Mostepanenko, V. M., 1996. How to describe AFM constant force surfaces in repulsive mode? **Surf. Sci. 249:** 196-206.

Blake II, R. C., Lyles, M. M. and Simmons, R. C., 1995. Morphological and physical aspects of attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite and sulfur. **Biohydrometallurgical Processing**, 13-22.

Boon, M., Hansford, G. S. and Heijnen, J. J., 1995. The role of bacterial ferrous iron oxidation in the bio-oxydation of pyrite. **Biohydrometallurgical Processing.** 153-163.

Boon, M., Heijnen, J.J., 1993. Mechanisms and rate limiting steps in bioleaching of sphalerite, chalcopyrite and pyrite with Thiobacillus ferroxidans. **Biohydrometallurgical Technologies, vol I, Bioleaching Processes**, ed Torma, A.E., Wey, J.E., Lakshmanan, V.I. A publication of T.M.S. Minerals Metals Materials.

Brion, D., 1980. Etude par spectroscopie de photoelectrons de la dégradation superficielle de FeS_2, $CuFeS_2$, ZnS et PbS à l'air et dans l'eau. **Appl. Surf. Sci., 5**: 133-152.

Brion, D., Hayer, J. and Predali, J.J., 1980. Characterization by ESCA of surface compounds of fine pyrite during the flotation process. **109th AIME An. Meet. Las Vegas.**

Brierley, C.L., 1982. Microbiological Mining. Scientific american, 247 (2) : 42-51.

Buckley, A. N. and Woods, R., 1985. X-ray Photoelectron Spectroscopy of oxidized pyrrhotite surfaces. II : Exposure to aqueous solutions. **Appl. Surf. Sci. 20:** 472-780.

Buckley, A. N. and Woods, R., 1987. The surface oxydation of pyrite. **Appl. Surf. Sci. 27:** 437-452.

Cases , J.M., de Donato, Ph., Kongolo, M. and Michot, L. 1989. An infrared investigation of amylxanthate adsorption by pyrite after wet grinding. **Coll. and Surf., 36 :** 323-338.

Cases, M. et de Donato, Ph., 1991. FTIR analysis of sulfide mineral surfaces before and after collection : Galena. **Int. J. Min. Proc., 33 :** 49-65.

Chander, S. and Briceno, A., 1987. Kinetics of pyrite oxydation. **Min. Met. Proc.** August 1987 : 171-176.

Chander, S., Zhou, R. and Briceno, A., 1994. Effect of sample storage on the kinetics of pyrite oxidation. **Min. Met. Proc., August 1994:** 141-147.

Charlot, G., 1957. L'analyse qualitative et les réactions en solution. **Masson et Cie, Paris, 4e Ed.**: 298-311.

Cognot, R., 1996. La méthode DSI : Optimisation, Implémentation et Applications. **Thèse de L'Institue National Polytechnique de Lorraine**, Nancy.

Colmer, A.R., and Hinkle, M.E., 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage : A preliminary report. **Science, 106**: 253-256.

de Donato, P., 1987. Mécanismes de la collection de la galène par les xanthates. **Thèse de doctorat d'Université**, INPL, Nancy.

de Donato, Ph., Cases , J.M, Kongolo, M., Michot, L. and Burneau, A. 1990. Infrared investigation of amylxanthate adsorption on galena : influence of oxidation, pH and grinding. **Colloids and Surfaces, 44 :** 207-228.

de Donato, Ph., Cases , J.M., Kongolo, M., 1989. Mécanismes de fixation de l'amylanthate de potassium sur la galène et la pyrite : conséquences sur la flottation de ces minéraux. **J. Chem. Phys., 96 :** 410-429.

de Donato, Ph., Mustin, C., Benoit, R. et Erre, R., 1993. Spatial distribution of iron and sulfur species on the surface of pyrite. **Appl. Surf. Sci., 68 :** 81-93.

de Donato, Ph., Mustin, C., Berthelin, J. and Marion, Ph. 1991. An infrared investigation of pellicular phases observed on pyrite by scanning electron microscopy during its bacterial oxidation. C.R. Ac. Sci. Paris, 312 série II:241-248.

Dunn, J. G., Gong, W. and Shi, D., 1992. A Fourier transform infrared study of the oxidation of pyrite. **Thermochim. Acta, 208:** 293-303.

Dziurla, M.A., 1995. Contribution à l'étude de réactions à l'interface Bactérie-Minéral au cours de la lixiviation de minéraux sulfurés (pyrites) par *Thiobacillus ferrooxidans*. **Thèse Université de Nancy I :** 223 p.

Dziurla, M.A., Monroy, M., Lam, B.T., Picquot, S. and Berthelin, J., 1992. A method to estimate the acidophilic bacteria (*Thiobacillus ferrooxidans*) attached to pyrite. Comparison with counts of non-adhering bacteria on solid media. In "**Proceed. Sixth Int. Symp. on Microbial Ecology (ISME-6)**", Barcelona : 288.

Escobar, B., Jedlicki, E., Wiertz, J. and Vargas, T., 1996. A method for evaluating the proportion of free and attached bacteria in the bioleaching of chalcopyrite with *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy, 40**: 1-10.

Fretigny, C. and Boisset M. C., 1994. Contact AFM on soft surfaces: Elasticity and friction effects. **Microsc. Microanal. Microstruct., 5**: 447-453.

Fuchs, G.M., Prohaska, T., Friedbacher, G., Hutter, H. and Grasserbauer, M., 1995. Maximum entropy deconvolution of AFM and STM images. **Fresenius J. Anal. Chem. 351**: 143-147.

Gasser, U. G., Jeanroy, E., Mustin, C., Barres, O., Nüesch, R., Berthelin, J. and Herbillon, A. J., 1996. Properties of synthetic goethites with Co for Fe substitution. **Clay Minerals, 31** : 465-476.

Gehrke, T., Hallmann, R., and Sand, W., 1995. Importance of exopolymers from *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching. **Biohydromettallurgical Processing.**

Godowski, P. J., Maurice, V. and Marcus, P., 1995. Analytical problems in Atomic Force Microscopy: Distortion of surface structure during imaging. **Chem. Anal. (Warsaw), 40**: 231-242.

Grishin, S.I. and Tuovinen, O.H., 1988. Fast Kinetics of Fe2+ Oxidation in Packed-Bed Reactors: **Applied and Environmental Microbiology, 54 :** 12. 3092-3100.

Hamilton, I.C. and Woods, R., 1981. An investigation of surface oxidation of pyrite and pyrrhotite

by linear potential sweep voltammetry. **J. Electroanal. Chem.**, 118 : 327-343.

Jeanroy, E., Rajot, J.L., Pillon, P. et Herbillon, A., 1991. Differential dissolution of hematite and goethite in dithionite and its implication on soil yellowing. **Geoderma, 50 :** 79-94.

Johnson, D. B., 1995. Acidophilic Microbial Communities: Candidates for Bioremediation of Acid Mine Effluents. **Int. Biodeterior.,** 41-58.

Johnson, D. B., 1995. The role of 'iron bacteria' in the biodegradation of minerals. **Biodeterioration Abstracts, Vol. 9, No1.**: 1-7.

Kaupp, G., Schmeyers, J., Pogodda, U., Haak, M., Marquardt, T. and Plagmann, M., 1995. AFM for the imaging of large and step submicroscopic features, artifacts and scraping with asymetric cantilever tip. **Thin Solid Films, 264:** 205-211.

Kongolo, M., 1991. Interactions de l'amylxanthate de potassium avec la galène et la pyrite finement broyées : conséquences sur la flottation. **Thèse de doctorat d'Etat,** INPL, Nancy, 407 p.

Lamontagne, B., Guay, D., Roy, D., Sporken, R. and Caudano, R., 1995. AFM and XPS characterization of the Si(111) surface after thermal treatment. **Appl. Surf. Sci., 90:** 481-487.

Lazaro, I., Martinez-Medina, N., Rodriguez, I., Arce, E. and Gonzalez, I., 1995. The use of carbon paste electrode with non conducting binder for the study of minerals: Chalcopyrite. **Hydrometallurgy 38:** 277-287.

Li, J., Zhu, X. and Wadsworth M. E., 1993. Raman spectroscopy of natural and oxidized metal sulfides. **EPD Congress, J. P. Hager Ed, The Minerals, Metals and Materials Society :** 229-223.

Lopez-Delgado, A. and Lopez, F. A., 1995. Thermal decomposition of ferric and ammonium sulphates obtained by bio-oxidation of water pickling liquors with *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Mater. Sci., 30**:5130-5138.

Lowson, R. T., 1982. Aqueous Oxidation of Pyrite by Molecular Oxygen. **Chem Rev., 82 : 462-493.**

Mackintosh, M. E., 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Gen. Microbiol. 105** : 215-218.

Mallet, J. L., 1992. Discrete Smooth Interpolation in Geometric Modelling. **Computer Aided Design, Vol. 24,** 178-191.

Marion, Ph., Mustin, C., Monroy, M. and Berthelin, J., 1991. Effect of auriferous sulfide minerals structure and composition on their bacterial weathering. **Source, Transport and deposition of Metals. Proceedings of the 25 years anniversary meeting. 30August- 3 September 1991.** 561-564.

Meline, F., Mustin, C. and de Donato, Ph., 1996. Inhibition de l'oxydation bactérienne de la pyrite par adsorption de thymol. **C.R. Acad. Sci. Paris, t. 322, série II a**: 959-964.

Misra, M., Bukka, K. and Chen, S., 1996. The effect of growth medium of *Thiobacillus ferrooxidans* on pyrite flotation. **Minerals Engineering, Vol.9, No.2**:157-168.

Monroy, M. G., 1993. Biolixiviation - cyanuration de minerais sulfurés aurifères réfractaires en dispositifs de percolation : comportement des populations de *Thiobacillus ferrooxidans*.et influence de la minéralogie et des conditions opératoires. **Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy** : 238 p.

Monroy, M. G., Dziurla, M. A., Lam, B.-T., Berthelin, J. and Marion P., 1994. A laboratory study on the behavior of *Thiobacillus ferrooxidans*.during pyrite bioleaching in percolation columns. In Galindo, E. and Ramirez, O. T. (Editors) : **"Advances in Bioprocess Engineering"** Kluwer Academic Publishers, Netherlands : 509-517.

Monroy-Fernandez, M. G., Mustin, C., de Donato, Ph., Barres, O., Marion, Ph. and Berthelin, J., 1995. Occurences at Mineral-Bacteria Interface during Oxidation of Arsenopyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnol bioeng, Vol. 46**: 13-21.

Monroy-Fernandez, M. G., Mustin, C., de Donato, Ph., Berthelin, J., and Marion, Ph., 1995. Bacterial behavior and evolution of surface oxidized phases during arsenopyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biohydrometallurgical Processing**, 57-66.

Moses, C.O., Nordstrom, D.K., Hermann, J.S and Mills, A.L., 1987. Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. **Geochim. Cosmochim Acta, 51** : 1567 - 1571.

Moses, C.O. and Hermann, J.S., 1991. Pyrite oxidation at circumneutral pH. Geochim. **Cosmochim Acta, 55** : 471 - 482.

Mustin, C., 1992. Approche physico-chimique et modélisation de l'oxydation bactérienne de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans*.: rôle déterminant de la phase minérale. **Thèse Université de Nancy I** : 222 p.

Mustin, C., Berthelin, J., Marion, Ph., and de Donato, Ph., 1992b. Corrosion and electrochemical oxidation of a pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. and Env. Microbiol., 58 :** 1175-1182.

Mustin, C., de Donato, P. and Berthelin, J., 1993a. An approch to spatial distribution of iron and sulfur species present on pyrite surface. **Biohydrometallurgical technologies, I, Biological Processes**, Torma, A.E., Wey, J.E. et Lakshmanan, V.I., éd., 163-175.

Mustin, C., de Donato, P. and Berthelin, J., 1993b. Investigation of superficial oxidized species development during the bacterial oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biohydrometallurgical technologies, II, Biological Processes**, Torma, A.E., Wey, J.E. et Lakshmanan, V.I., éd., 175-184.

Mustin, C., de Donato, Ph. and Berthelin., J., 1992a. Quantification of the intergranular porosity formed in bioleaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotech. and Bioeng., 39 :** 1121-1127.

Mustin, C., de Donato, Ph., Berthelin, J., and Marion, Ph. 1993c. Surface sulphur as promoting agent of pyrite leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEM'S Microb. Rev., 11 :** 77-78.

Mustin, C., Marion, Ph., Berthelin, J., de Donato, Ph. and Monroy, M., 1991. An original technique to study bacterial oxidation of pyrite : packed electrodes. **C. R. Ac. Sci. Paris 312, sérieII** : 1197-1203.

Nadjo, L. and Keita, B. Application des microscopies de proximité en électrochimie. **Analusis Magazine, Vol. 22, No 8:** M13-M16.

Nesbitt, . H. W. and Muir, I.J., 1994. X-Ray Photoelectron Spectroscopic study of a pristine pyrite surface reacted with water vapour and air. **Geochim. Cosmochim. Acta., Vol. 58, No 21**: 4667-4679.

Nesbitt, H. W., Muir, I.J. and Pratt A. R., 1995. Oxidation of arsenopyrite by air and air-saturated, distilled water, and implications for mecanism of oxidation. **Geochim. Cosmochim. Acta., Vol. 59, No 9**: 1773-1786.

Nunzi, F., 1993. Relations structure/fonction de la rusticyanine chez *Thiobacillus ferrooxidans* : du fermenteur au cristal. **Thèse d'Université d'Aix-Marseille I.**

Nyavor, K., Egiebor, N. O. and Fedorak. P. M., 1996. Bacteria oxydation of sulfides during Acid Mine Drainage formation : a mechanistic study. **EPD Congress 1996. The Minerals, Metals and Materials society, 1995.** 269-287.

Palencia, I., Wan, R. Y., and Miller, JD., 1991. The electrochemical behavior of a semiconducting natural pyrite in the presence of bacteria. **Metallurgical Transactions, Vol. 22b**: 765-774.

Panin, V. V., Karavaiko, G. I. and Pol'kin, S. I., 1985. Mechanism and kinetics of bacterial oxidation of sulfide minerals. *In* : Karavaiko, G. I. and Groudev, S. N. (Eds). **Biogeotechnology of metals.** UNEP Moscow URSS, 197-215.

Pesic, B. and Kim, I., 1993. Electrochemistry of Thiobacillus ferrooxidans interactions with pyrite. **Metallurgical Transactions B. Vol. 24b**:717-727.

Pratt A. R., Nesbitt, H. W. and Muir, I.J., 1994. Generation of acids from mine waste: Oxidative leaching of pyrrhotite in dilute H_2SO_4 solutions at pH 3.0. **Geochim. Cosmochim. Acta., Vol. 58, No 23**: 5147-5159.

Rimstidt, J. D., Chermak, J. A. and Gagen, P. M., 1993. Rates of reaction of galena, sphalerite, chalcopyrite, and arsenopyrite with Fe(III) in acidic solutions. **Environmental Geochemistry of sulfide oxidation, Chapter1:** 1-13.

Sand, W., Gerke, T., Hallmann, R. and Shippers, A., 1995. Sulfur chemistry, biofilms, and the (in)direct attack mecanism - a critical evaluation of bacterial leaching. **Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:** 961-966.

Sasaki, K., 1994. Effect of grinding on the rate of oxidation of pyrite by oxygen in acidic solutions. **Geochim. Cosmochim. Acta., Vol. 58, No. 21**: 4649-4655.

Sasaki, K., Tsunekawa, M., Ohtsuka, T. and Konno, H., 1995. Confirmation of a sulfur rich layer on pyrite after oxidative dissolution by Fe(III) ions around pH 2. **Geochim. Cosmochim. Acta., Vol. 59, No 15**: 3155-358.

Schwertmann, U., Bigham J. M. and Murad, E., 1995. The first occurence of schwertmannite in a natural stream environment. **Eur. J. Mineral., 7**: 547-552.

Scofield, J. H., 1976. Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV. **J. Electron Spectrosc. Related Phenom. 8 :** 129-138.

Seveque, J. L., 1986. Etude expérimentale de la dissolution des minéraux sulfurés en milieu oxydant : application à la prospection minière. Thèse d'Université. Paris VI. 500 p.

Shrihari, Bhavaraju, S.R., Modak, J.M., Kumar, R., Gandhi, K.S., 1992. Dissolution of sulfur particles by *Thiobacillus ferrooxidans* : substrate for unattached cells. **Biotechnology and bioengineering, 41 :** 612-616.

Shrihari, Jayant M. Modak, Kumar, R. and Gandhi, K. S., 1995. Dissolution of particules of pyrite mineral by direct attachment of Thiobacillus ferrooxidans. **Hydrometallurgy, 38:** 175-187.

Siebert, D. and Stocker, W., 1992. Investigation of a (100) surface of pyrite by STM. **Phys. Stat. Sol., 134**: K17-K20.

Singer, P. C., and Stumm, W., 1968. Kinetics of the oxydation of ferrous iron. **Proc. 2nd Symp. Coal Mine Drainage Res.,** 12-34.

Sugio, T., Hirose, T., Oto, A., Inagaki, K and Tano, T., 1990. The regulation of Sulfur Use by Ferrous Ion in Thiobacillus ferrooxidans: **Agric. Biol. Chem.: 54**; 8: 2017-2022.

Sugio, T., Mizunashi, W., Tano, T. and Imai, K., 1986. Production of ferrous ions as intermediates during aerobic sulfur oxidation in Thiobacillus ferrooxidans: Agric. Biol. Chem.: 50 (11. 2755-2761.

Torma, A.E., 1988. Leaching of metals. In: Rehm, H.J. and Reed, G. (Editors), **Biotechnology**, 6b : V.C.H., Federal Republic of Germany: 367-399.

Torma, A.E., 1989. The Microbiological Extraction of less common Metals. **Journal of Metals** : June 1989: 32-36.

Turcotte, S. B., Benner, R. E., Riley, A. M., Wadsworth, M. E. and Bodily, D., 1993. Application of Raman spectroscopy to metal-surfide surface analysis. **Applied Optics, Vol. 32, No 6:** 935-938.

Valensi, G., Van Muylder, G. and Pourbaix, M. Extrait du rapport C15 de la **Commission des Etudes Fondamentales et Applications du CEBELCOR.**

Vogt, H., Chattopadhyay, T. and Stolz, H. J., 1983. Complete first order Raman spectra of the pyrite structure compounds FeS_2, MnS_2 and SiP_2. **J. PHys. Chem. Solids, Vol 44, N° 9,** 869-873.

Wadsworth, M. E., Zhu, X. and Li, J., 1993. Electrochemistry of pyrite. **Hydrometallurgy, Hyskey, J. B. and Warren, G. W., Ed., (Fundamental, Technology and Innovation, Society for Minning, Metallurgy and Exploration, Inc., Littleton, CO):** 85-99.

Zehri, M., and Frenay, J., 1995. Bioleaching of pyrite: Evolution of porosity and specific surface area. **Biohydrometallurgical Processing,** 141-152.

Zhu, X., Li, J. Bodily, D. M. and Wadsworth, M. E., 1993. Transpassive oxidation of pyrite. **J. Electrochem. Soc., Vol. 140, No 7:** 1927-1935.

ANNEXES

An XPS and AFM Coupled Study of Air and Bio-oxidized Pyrite Surfaces

TONIAZZO V.*, MUSTIN C.*, VAYER-BESANÇON M.**, ERRE R.** and BERTHELIN J.*

* Centre de Pédologie Biologique, UPR 6831 du CNRS
B.P.5, 54501 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France
** Centre de Recherche sur la Matière Divisée UMR 131 du CNRS
45071 Orléans Cedex 02

ABSTRACT

Oxidized compounds present on pyrite surface have been studied using XPS and AFM. The decomposition of the Fe $(2p)_{3/2}$ core level in XPS spectra showed that only a part of the signal due to iron species could be assigned to clean FeS_2 surfaces. Others signals indicated that the pyrite surface is covered by oxidized iron and sulfur species (Fe-SO, S_8, Fe-O, Fe-OOH). The AFM study of pyrite sample (flakes) oxidized by atmospheric oxygen or biooxidized by *Thiobacillus ferrooxidans* led to the determination of the spatial distribution of these species. Various surface structures (separate or join bumps with various vertical and horizontal extension, holes and smooth areas) have been observed and suggested that the distribution of superficial oxidized species must be described as an heterogeneous field of piles. Furthermore, geostatistical analysis of AFM pictures showed that the distribution of the oxidized compounds at the surface of biooxidized pyrite was really different from these observed on chemically oxidized pyrite.

INTRODUCTION

In most sulfide ore deposits, the main gangue mineral is pyrite which was often considered as a nuisance in mining enterprises (wastes, acid mine drainage..) or for natural environments (acidification, soil and water pollution by heavy metals ..). Nowadays, many mineral weathering processes, including natural metal leaching and industrial metal recovery involved bacteria : sulfide oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* is a typical example. Frequently, bio-oxidation of sulfides is described with pure biological and chemical processes which do not take into account the variability of mineral properties. In fact, biooxidation processes are complex and strongly dependent on the cristallographic and electrochemical characteristics of the mineral (MARION *et al.*, 1991 ; MUSTIN*et al.*, 1992a). These physical properties seem also to govern both development of corrosion pores and oxidized phases at the sulfide surface (MUSTIN *et al.*, 1993a, MONROY *et al.* 1995). The physico-chemical modification of the mineral interface, more neglected, could be of first importance for the biooxidation of sulfides.

Different authors (BRION *et al.*, 1980, DE DONATO *et al.*, 1993, NESBITT and MUIR 1994, SASAKI *et al*, 1995) have demonstrated the presence of various amounts of oxidized iron and sulfur species ($FeSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$, FeOOH, S_8) at the pyrite surface, by combining different qualitative spectroscopies (X-ray Photoelectron Spectroscopy, Raman and Infrared) and quantitative methods (chromatographic desorption). These oxidized compounds are suspected to form non-continuous structure with various vertical extension depending on their nature (DE DONATO *et al.*, 1993). However, this hypothesis of work has not been clearly demonstrated. In complement, their qualitative evolution during bioleaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* have been also investigated (MUSTIN *et al.*, 1993a ; 1993b ; DE DONATO*et al.*, 1991). According to these previous studies, the superficial oxidized spieces (mainly sulfates and elemental sulfur)

seems to be fundamental for bacterial oxidation of pyrite and the variation of their amount is a good tracer to follow a bioleaching cycle step by step (MUSTIN *et al.*, 1993c). They could be also consider as a bioavailable substrat for *Thiobacillus* ; therefore the following global equations (Eq. 1 and Eq. 2), generally admitted for the direct mineral biooxidation, must be discussed :

$$2FeS_2 + 7.5\,O_2 + H_2O \xrightarrow{bact} 2Fe^{3+} + 4\,SO_4^{2-} + 2\,H^+ \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$FeS_2 + Fe_2(SO_4)_3 \xrightarrow{bact} 3FeSO_4 + 2S^\circ \quad \text{(Eq. 2)}$$

Unfortunatly, technics (XPS, IR., desorption...) already used to caracterize the pyrite interface give global, quantitative and qualitative informations. Thus, it is essential to obtain precise topographic data of the bioleached pyrite surfaces, in order to relate locally the setting of oxidized species, corrosion patterns and bacterial adsorption sites. Recently, near field techniques like Atomic Force Microscopy (AFM) have been extensively developped to investigate mineral surfaces (LAMONTAGNE *et al.*, 1995). However, previous studies were often limited to simple observations.

The aim of this study is then to use AFM in complement of XPS to compare the spatial distribution of oxidized species present on air oxidized pyrite and on bioleached pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. In complement, a new methodology is presented to gain the best advantage from the images and to relate these microscopic data to physicochemical characteristics of the minerals.

This present work is the first step of a research subject concerning the synergetic effect of surface mineral properties and bacteria on mineral weathering.

MATERIAL AND METHODS

Sulfide : The pure pyrite used for this study comes from a hydrothermal Peruvian deposit and contains minor impurities (less then 0.5%). Little flakes of pyrite of about 2 x 2 mm^2 were selected and analyzed by X-ray Photoelectron Spectroscopy after a natural oxidation in air, or after 45 days of bioleaching by *Thiobacillus ferroxidans.*

Bacteria and nutrient medium : The chemiolithotrophic, Gram negative acidophilic bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* was provided by the Deutsche Sammlung Mikroorganismen (DSM 583). The nutrient medium used was made of 0.4 g KH_2PO_4, 1 g $(NH_4)_2SO_4$ and 0.4 g $MgSO_4.7H_2O$ per liter adjusted to pH 1.8 with 50 ml H_2SO_4 (1N). After sterilizing, pyrite fraction of 32-53 µm was added to obtain a 2% weight pulp. Then, the reactor containing 200 ml of pulp was inoculated with an actively growing culture to have an initial population of $2x10^7$ bacteria per ml. Several flakes of pyrite of about 2 x 2 mm^2 have been enclosed in a polyamide woven bag (pore size of 20 µm to allow the contact with the bacteria) and put in the reactor for bioleaching. The flakes are analysed by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Atomic Force Microscopy (AFM) after 45 days of bioleaching and compared with other flakes chemically oxidized by atmospheric oxygen (ambient wet air).

Electron Spectroscopy (XPS) measurements : XPS measurements were carried out with a VG ESCALAB Mk II spectrometer using $AlK\alpha_{1/2}$ excitation at an analyser chamber pressure of about 10^{-7} Pa. The C(1s) core level of saturated hydrocarbons at 284.6 eV was used for energy calibration. Using these experimental conditions, the precision is ± 0.2 eV on the energy values and ± 0.6 eV on area ratios.

After a non-linear background substraction, the line shapes of individual peaks are fitted to Gaussian spectral line functions using a non-linear least-squares fitting method. Several fundamental core levels such as C(1s), O(1s) and S(2p) were curve fitted using this procedure. The fundamental $Fe(2p)_{3/2}$ core level is very sensitive to the effect of the chemical surroundings and allows a good determination of the degradation products. Thus, it has been fitted using the method of Doniac and Sunjic, which takes the asymmetry of the peak into account.

Atomic Force Microscopy : AFM images were obtained on a PSI (Park Scientific Instrument) microscope operating in air and in contact mode with a Si_3N_4 cantilever tip and a laser beam deflection system. Natural oxidized flakes of pyrite and bioleached ones have been investigated several time (>10) on different areas (5 x 5 μm^2) to have a statistical representation of the whole surface.

RESULTS AND DISCUSSION

On the assumption that oxidized superficial compounds are fundamental for the bioleaching processes of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* (and probably good substrates for bacterial growth), it is important to compare the nature of iron and sulfur oxidized species present on the mineral surface after a natural oxidation in air and after a biooxidation. Table 1 summarizes the main results concerning the $S(2p)_{3/2}$ and $Fe(2p)_{3/2}$ core levels, obtained on pyrite flakes, using X-ray Photoelectron Spectroscopy.

On chemically air oxidized pyrite, the $Fe(2p)_{3/2}$ core level was decomposed into three components. The peak centered on 707.7 eV corresponds to pure pyrite FeS_2; the peak at 710.4 eV is due to ferric oxidized species, probably ferric oxihydroxide (FeOOH) or oxides (Fe_3O_4 or Fe_2O_3), while the contribution of ferric sulphates isdetected at 713 eV.

Table 1 : Comparison of the main XPS results concerning naturally air oxidized and bio-oxidized flakes of pyrite.

	Air oxidized surface		Biooxidized surface		
Core Level	BE	% Peak	BE	% Peak	Assignment
$Fe(2p)_{3/2}$	707,7 710,4 713	24 53 23	707 709,5 711,8	40 25 35	FeS_2 Fe oxides/Oxihydroxides Ferric Sulfate
$S(2p)_{3/2}$	162,1 167,7 163,9	49 36 15	162,4 169 163,5	27 28 45	Disulfide $S\text{-}S^{2-}$ Ferric Sulfate Elemental Sulfur S_8

BE : Binding energy of core level (eV), calibrated with the C(1s) orbital of saturated hydrocarbons at 284.6 eV
% Pic : Part of the considered species in the total peak area of $Fe(2p)_{3/2}$ or S(2p).

The study of the S(2p) core level confirms the presence of sulphates (peak at 167.7 eV), but it suggests also a minor contribution of elemental sulphur ($S(2p)_{3/2}$, BE = 163.9 eV).
The results concerning the decomposition of the $Fe(2p)_{3/2}$ and S(2p) core levels for bioleached pyrite are quite similar. Beside the signal of pure pyrite ($Fe(2p)_{3/2}$, BE = 707 eV ; $S(2p)_{3/2}$, BE = 162.4 eV), different oxidized compounds are detected : ferric oxides and oxihydroxides (Fe(2p)3/2, BE = 709.5 eV), ferric sulphates ($Fe(2p)_{3/2}$, BE = 711.8 eV ; $S(2p)_{3/2}$, BE = 169 eV) or elemental sulphur ($S(2p)_{3/2}$, BE = 163.5 eV).

No major differences, concerning the nature of oxidized compounds on natural air oxidized pyrite and on biooxidized one, have been detected by XPS measurements. Both of them was partially covered by similar oxidized species. However, shifts (of about 1 eV) observed for the peaks of ferric oxi-hydroxi-species and ferric sulphates in the $Fe(2p)_{3/2}$ core level of biooxidized pyrite could indicate that the chemical surroundings of iron is quite different. Moreover, variation in the contribution of oxidized species to the global signal of iron (represented by the part of the peaks areas between 709.5 and 713 eV in the total peak area of $Fe(2p)_{3/2}$) for the two samples suggests some differences in the structure, in the relative abundance or in the distribution of superficial phases at the interface.

In this way, AFM measurements have allowed to study more precisely the distribution of these oxidized phases on chemically oxidized pyrite surfaces and to have an idea of their geometric caracteristics (shape, volume ...) . The same AFM investigations are then performed on pyrite oxidized by *Thiobacillus ferrooxidans* to compare the effect of bio-oxidation and chemical oxidation on the surface morphology. For this, pyrite flakes exposed to biological attack in the little woven bag are removed from the bioleaching reactor after 45 days and analyzed by AFM.

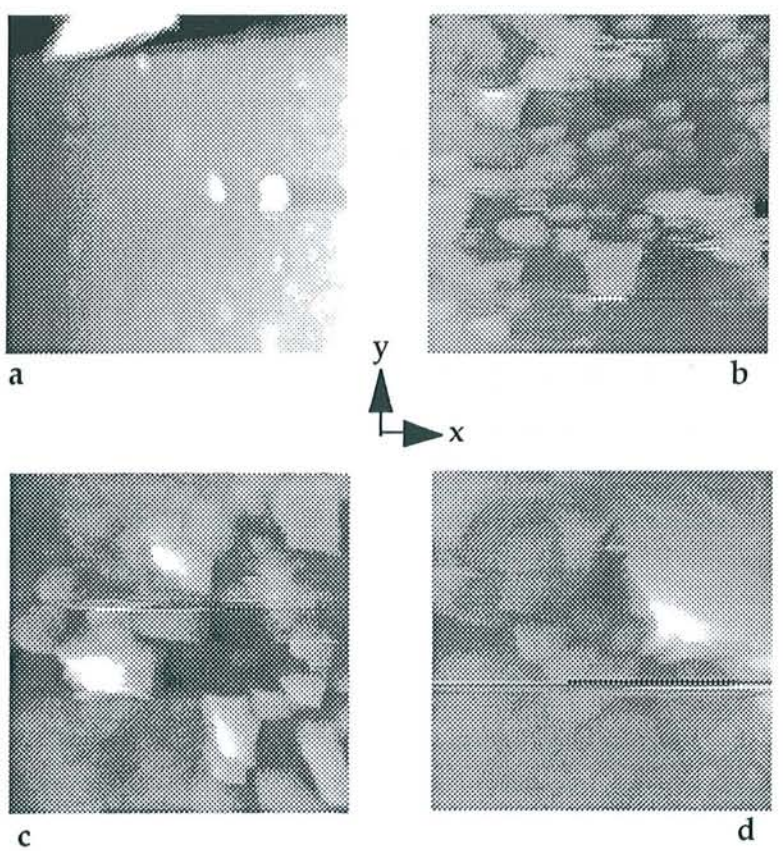


Figure 1 : AFM pictures (5 µm x 5 µm) of pyrite surfaces
a, b : two areas of the same chemically air oxidized pyrite flake
c, d : two examples of bioleached pyrite flakes
Gray levels(256) indicate the height of points : $scale_Z$ = 1500 Å (a) , $scale_Z$ = 5000Å (b,c,d)

The first conclusion is that all the surfaces are highly heterogeneous (Figure 2). On the samples, various structures have been observed : well rounded or angular bumps, islands (bumps with a large horizontal extension), holes (on bioleaching samples), smooth surfaces.... Moreover one flake can present zonation with high structural diversity. As represented in the

few examples on figure 2, some pictures show very smooth and regular surfaces with only few little "bumps", while some others seem to be covered by a lot of piles of different vertical and horizontal extension.

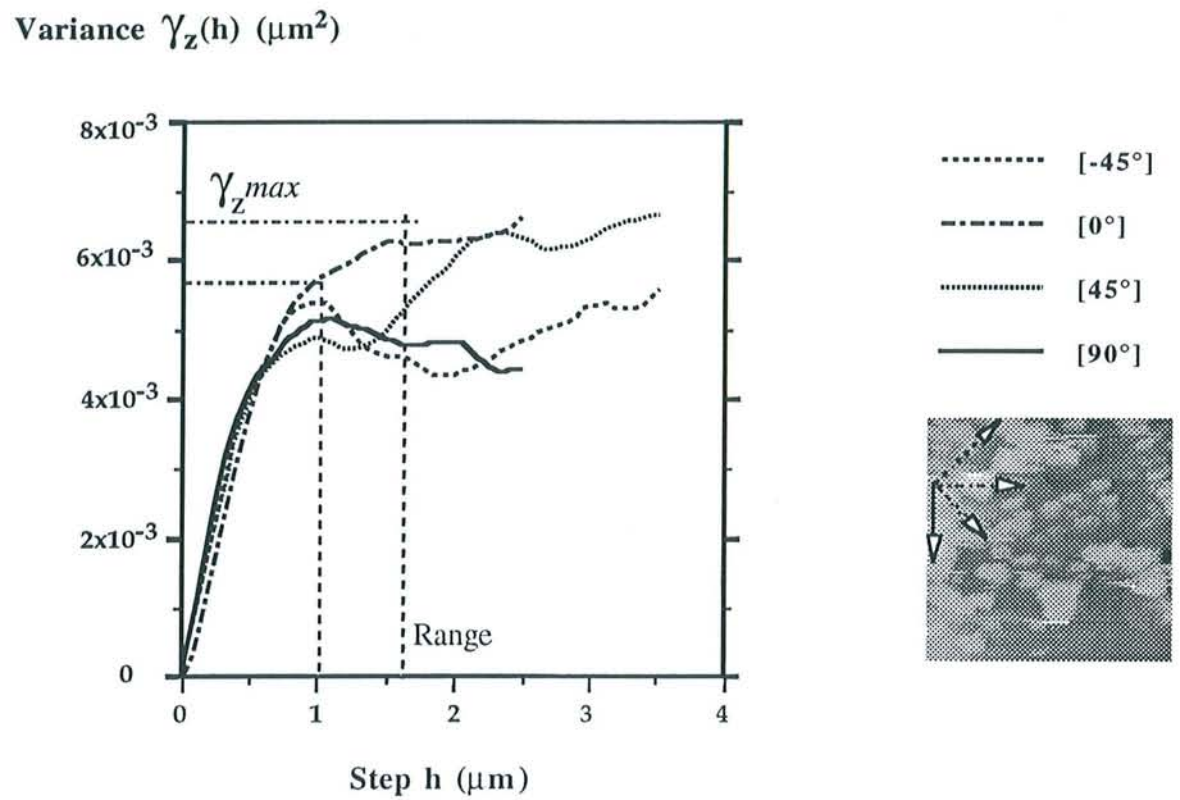


Figure 2 : Example of variograms in four directions (-45, 0, 45, 90°) for the picture Fig. 2b

However, the simple observation of the AFM images is not sufficient to differenciate natural oxidized surfaces from bioleached ones. Then, a new methodology to gain the best advantage of these pictures is necessary. This method uses geostatistic tools which are statistical means to analyse geological data, like, for example, metal abundance in mineral deposits. Let us consider an AFM picture as a regular and a two dimensions set of data points. In each point of the picture, the height z , expressed in gray levels or after correction in micrometers, could be defined as the values of a geostatistical variable (Z). If a step (h) and a direction in the xy plane are set, the variogram γ_z can be calculated at each point as follows :

$$2\gamma_Z(x,h) = E[\{ Z(x+h) - Z(x) \}^2]$$

Then, the plot of the variance (expressed in μm^2) versus an increasing step h (expressed in μm), gives the variogram of the Z variable in the chosen direction (Figure 2).

On pyrite images, the maximal variance γ_{max} is representative of the heterogeneity of the interface and related to the maximal height of piles, while the range (maximum distance for points to be correlated) represents their mean horizontal extension.

For all analysed pictures, as showed by Figure 2, the first important result is the higher range in variograms for the x direction than for the ranges in the other directions. Because the x direction is the scanning one, this result puts the emphasis on the possible modifications of the surface due to the tip scan. Therefore, the piles asymmetry is artificially increased. This problem and other pre-occupations concerning image analyses (noise, filters, sloping samples)

will be discussed later. Methods to overcome these difficulties are already performed.
Another interesting point is related to the fluctuations at the variogram plate. They seem to indicate the existence of periodic structures at the surface of pyrite. Different methods to correct the noise of the images and to calculate the right value of the periods in the different directions are also developped elsewhere.

In order to compare air oxidized pyrite surface and bioleached ones, a lot of AFM images have been studied using the variogram method in a defined direction (different from the scanning one). Each picture is represented by a (variance max, range) couple that can be plotted in a graph $\gamma_z=f(\text{range})$ (Figures 3 and 4).

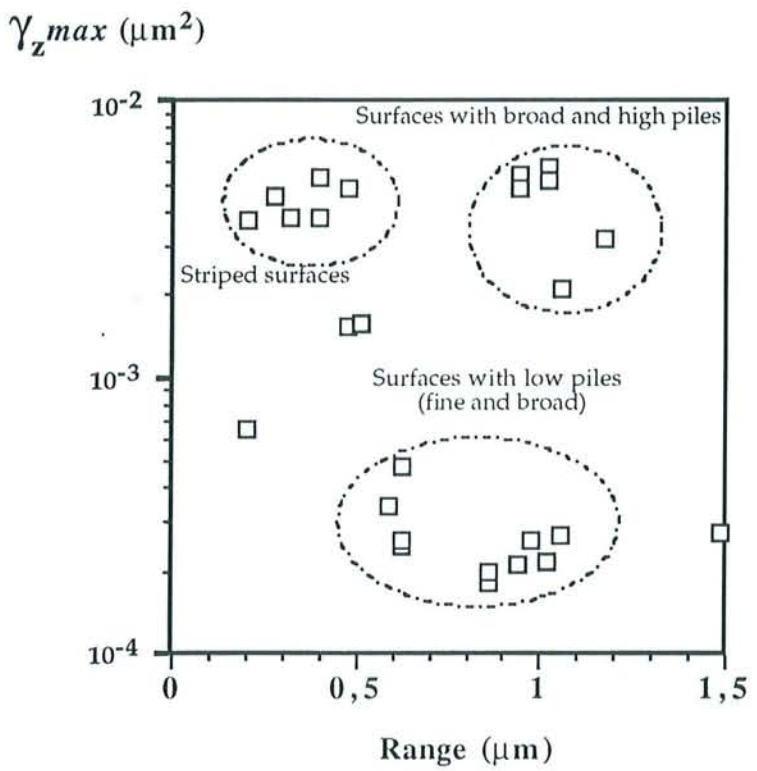


Figure 3 : Variance/Range correlation for naturally air oxidized pyrite surfaces

On natural oxidized pyrite (Figure 3), flakes surfaces present oxidized phases which can be classified in two distinct groups : (i) the low piles (may be divisible into two categories : the fine and broad ones) and (ii) the broad and high piles which have large ranges and variances.

The scratched surfaces can be separated from the other ones because they lead to a small range associated with a very high variance.

Results concerning bioleached surfaces are different from those obtained with natural surfaces (Figure 4). A general and important increase of the variance is evident for more than 30% of the analysed pictures. The piles distribution on the surface is much more continuous, thus it is not possible anymore, in these cases, to distinguish well defined categories of piles. These increases of variance are not only due to the developpement of pores during the bioleaching of pyrite (MUSTIN *et al.*, 1992b), or to the increase of the maximal height of piles. It indicates a real and global rearrangement of piles distribution at the interface, as suggested by the previous XPS results. This is related to an improvement of the surface heterogeneity induced by the bacterial oxidation.

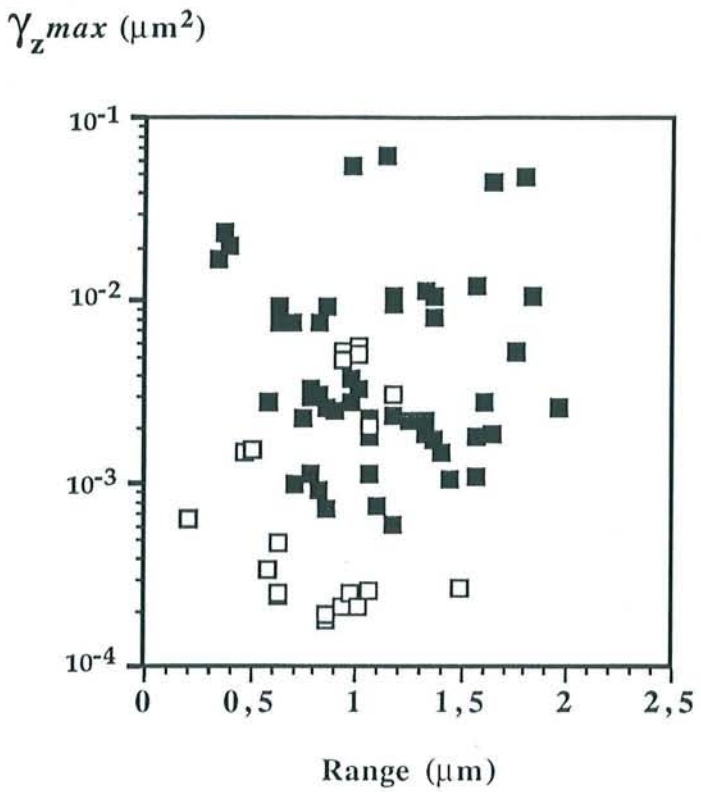


Figure 4 : Variance/Range correlation for bioleached pyrite in comparison with initial pictures.
□ Natural oxidized pyrites ■ Pyrites after 45 days of bioleaching

These results complete previous studies, where only qualitative modifications of oxidized species could have been observed using global and "blind" spectroscopic technics (XPS, IR ...). It is now established that the shape and distribution of the piles changes during bioleaching. However, at this stage of the study, topographic structures could not yet been related to chemical data, corrosion patterns or adsorption sites for bacteria.

Even if this method seems to be very promising to evaluate the evolution of superficial phases distribution, different problems appeared during the study :

The first one already mentioned concerns the interpretation of the variogramm in the x scanning direction. Because of the artefact due to the tip scan, it is difficult to compare the x direction with the other ones ; this could lead to interesting results concerning the piles

alignment, the periodicity of the structures and finally the isotropy or anisotropy of the interface.

A second problem is related to the representativity of AFM images for the all complex surface (extended to a large scale). The high heterogeneity of the interface at micrometer scale has been easily demonstrated by the observation of few areas of the same flake. However, the area investigated by the cantilever tip is quite small (5x5 μm^2) and a complete analysis would require the acquisition of a very high number of images. To solve partially this problem, a new Atomic Force Microscope, which can analyse 20x20 μm^2 ranges, will soon be available.

Another disadvantage is the poor quality of some of the images, where the variogramms are then impossible to interpret and discuss. They present scratches or saturations due to the limitation of the tip vertical motion.

CONCLUSION

This work is the first step of a larger study which is related to the collection of chemical and topographic data on pyrite surface during

bioleaching. In complement of some preliminary covered by a various amount of oxidized species, the present results prove that superficial phases are distributed in well defined and separate piles. The geostatistical analysis of pictures showed that the spatial distribution of piles on pyrite surface is really different after a natural oxidation by air and after bioleaching. Unfortunatly , because of the presence of artefacts (slope, scratches), variograms and other parameters concerning the distribution of piles (periodicity, shape, surface coverage) could not be calculated. For example, variogram calculations are not available if flakes present a gentle slope in the scanned area, which is frequently observed on a random fresh cleaved surface of pyrite. Moreover in this case, the determination of surface coverage of piles which needs to know precisely the ground (i.e. the zero level) of the mineral surface is impossible. Thus, as to minimize artefacts and to establish links between the abundance of oxidized surface species detemined by spectroscopic techniques and the surface topography, a new way of AFM picture analyses is a necessity. Our focus will be on the developpement of 3D mathematical models of the interface which will complete this statistical approach. As well, a discret method is being developped to determine increasingly sophisticated surface properties studies which have shown that pyrite surface is including : roughness, local curvature, partition of piles and chemical composition. These models will provide an essential tool for realistic representation of the surface. In future, they could be used for the establishment of interfacial dynamic models during the bioleaching of pyrite.

REFERENCES :

DE DONATO, P., MUSTIN, C., BERTHELIN, J. and MARION, P. 1991. An infrared investigation of pellicular phases observed on pyrite by scanning electron microscopy during its bacterial oxidation. C.R. Ac. Sci. Paris, 312 série II:241-248.

DE DONATO, P., MUSTIN, C., BENOIT, R. and ERRE, R., 1993. Spatial distribution of iron and sulfur species on the surface of pyrite. **Appl. Surf. Sci., 68 :** 81-93.

LAMONTAGNE, B., GUAY, D., ROY, D., SPORKEN, R. and CAUDANO, R., 1995. AFM and XPS characterization of the Si(111) surface after thermal treatment. **Appl. Surf. Sci., 90:** 481-487.

MARION, P., MUSTIN, C., MONROY, M. and BERTHELIN, J., 1991. Effect of auriferous sulfide minerals structure and composition on their bacterial weathering. **Source, Transport and deposition of Metals. Proceedings** Pajel, M., éd. 30August- 3 September 1991. 561-564.

MONROY-FERNANDEZ, M. G., MUSTIN, C., DE DONATO, P., BERTHELIN, J., and MARION, P., 1995. Bacterial behavior and evolution of surface oxidized phases during arsenopyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biohydrometallurgical Processing,** 57-66.

MUSTIN C., BERTHELIN J., MARION P. and DE DONATO, P. 1992a. Corrosion and electrochemical oxidation of a pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Env. Microbiol.** 58: 1175-1182.

MUSTIN, C., DE DONATO, P. and BERTHELIN, J., 1992b. Quantification of the intergranular porosity formed in bioleaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotech. and Bioeng., 39:** 1121-1127.

MUSTIN, C., DE DONATO, P. and BERTHELIN, J., 1993a. An approch to spatial distribution of iron and sulfur species present on pyrite surface. **Biohydrometallurgical technologies, I, Biological Processes,** Torma, A.E., Wey, J.E. et Lakshmanan, V.I., éd., 163-175.

MUSTIN, C., DE DONATO, P. and BERTHELIN, J., 1993b. Investigation of superficial oxidized species development during the bacterial oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biohydrometallurgical techno-logies, I, Biological Processes,** Torma, A.E., Wey, J.E. et Lakshmanan, V.I., éd., 175-184.

MUSTIN, C., DE DONATO, P., BERTHELIN, J., and MARION, P. 1993c. Surface sulphur as promoting agent of pyrite leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEM'S Microb. Rev., 11:** 77-78.

NESBITT, . H. W. AND MUIR, I.J., 1994. X-Ray Photoelectron Spectroscopic study of a pristine pyrite surface reacted with water vapour and air. **Geochim. Cosmochim. Acta., Vol. 58, 21:** 4667-4679.

SASAKI, K., TSUNEKAWA, M., OHTSUKA, T. and KONNO, H., 1995. Confirmation of a sulfur rich layer on pyrite after oxidative dissolution by Fe(III) ions around pH 2. Geochim. **Cosmochim. Acta., Vol. 59, 15:** 3155-358.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

FACULTÉ DES SCIENCES

Mademoiselle **TONIAZZO Valérie**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

en GEOMICROBIOLOGIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le - 3 MAR 1998 n° 10

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I
LE PRÉSIDENT
JM FINANCE

3C-F9

Résumé

A l'échelle de la bactérie, les processus microscopiques qui conduisent à l'oxydation corrosive de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* sont encore mal décrits, tant d'un point de vue microbiologique que d'un point de vue physico-chimique. Pour mieux cerner et comprendre les réactions à l'interface bactérie-minéral, une étude locale à l'échelle micrométrique, de l'interface pyrite-solution, a été réalisée dans ce travail.
Les techniques employées (spectroscopies XPS, Raman, électrochimie et GC-MS) pour la description physico-chimique de la surface des pyrites oxydées, décapées ou biolixiviées ont permis de caractériser qualitativement ou quantitativement les phases superficielles oxydées (soufre élémentaire, oxyhydroxydes de fer, sulfates ferreux ou ferriques, polysulfures). A cette diversité chimique s'ajoute une hétérogénéité de distribution spatiale des produits d'oxydation, caractérisée et évaluée grâce à la Microscopie à Force Atomique (AFM). Une approche mathématique et statistique de la topographie de la surface minérale a été développée pour établir une modélisation morpho-chimique de l'interface.
D'autre part, l'emploi conjoint de techniques microbiologiques, physico-chimiques et spectroscopiques, a établi les liens existant entre les cinétiques de solubilisation, le développement de la corrosion et l'organisation des phases superficielles au cours de la biolixiviation. Résultant exclusivement de l'action du fer(III) à la surface du minéral, ces composés de surface apparaissent comme les seuls substrats solides utilisables par *Thiobacillus ferrooxidans*, incapable d'oxyder directement la pyrite. Produits indirectement par l'oxydation bactérienne du fer(II) en solution, ils contrôlent aussi la corrosion de la pyrite par leur organisation chimique et leur distribution spatiale.
Tous ces résultats fondamentaux permettent de proposer un modèle morpho-chimique dynamique de l'interface pyrite-solution au cours de son oxydation par *Thiobacillus ferrooxidans*.

Mots-clés : Pyrite, *Thiobacillus ferrooxidans*, Oxydation, Phases superficielles, AFM, XPS, Raman, Electrochimie, Morpho-chimie.

Abstract

Bioleaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* is a very complex process and many fields have to be more deeply investigated : microbiology, cell genetics, and especially physical chemistry of reactions at the mineral/bacterium interface.
This work concerns a local study, at micrometric scale, of the morpho-chemistry of mineral/solution interface and is a fundamental feature to understand the mecanisms of pyrite biooxidation.
The use of various technologies (XPS and Raman spectroscopies, electrochemistry, GC-MS) for the description of pyrite surface after air oxidation, cleaning or bioleaching, allows the qualitative and quantitative characterization of superficial oxidized compounds (elemental sulfur, iron oxihydroxide, ferrous or ferric sulfate, polysulfide). Besides this chemical diversity, the use of Atomic Force Microscopy reveals the deep spatial heterogeneity concerning the arrangement of oxidized products on the mineral surface. In order to define a realistic morpho-chemical model, statistical and mathematical tools have been developped to relate the topography and the chemistry of the pyrite surface.
Moreover, the combination of the previous approach with microbiological experiments elucidates connections between solvatation kinetics, corrosion patterns growth and spatial arrangement of oxidized compounds during bioleaching. These superficial phases are exclusively produced by soluble ferric iron and are the only substrate for the bacteria. Their chemical production controls the biooxidation kinetics because the *Thiobacilli* are unable to oxidize directly pure pyrite mineral grains.
Taking all these fundamental results into account, a dynamic model including morphochemical changes of pyrite during its oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* is suggested.

Key Words : Pyrite, *Thiobacillus ferrooxidans*, Oxydation, Surface Compounds, AFM, XPS, Raman, Electrochemistry, Morpho-chemistry.