



► **To cite this version:**

Marion Egal. Chemical signatures of bacterial activity in acid mine drainage. Geochemistry. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2008. French. <tel-00455420>

HAL Id: tel-00455420

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00455420>

Submitted on 10 Feb 2010

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

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

UNIVERSITE MONTPELLIER II

- Sciences et Techniques du Languedoc -

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Sciences de la Terre et de l'Univers

Ecole doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie,
Géosciences, Hydrosciences, Environnement

Titre :

SIGNATURES CHIMIQUES DE L'ACTIVITE BACTERIENNE DANS LES EAUX ACIDES MINIERES

Marion EGAL

Date prévisionnelle de soutenance : 25 Novembre 2008

JURY

F. ELBAZ-POULICHET	Directrice de Recherche au CNRS - Montpellier	Directrice de thèse
C. CASIOT	Chargée de Recherche au CNRS - Montpellier	Co-directrice de thèse
A. DIA	Chargée de Recherche au CNRS - Rennes	Rapporteur
J. SANCHEZ-ESPAÑA	Docteur-Ingénieur IGM - Madrid	Rapporteur
P. NEGREL	Docteur-Ingénieur BRGM - Orléans	Examineur
M. CONDOMINE	Professeur à l'Université Montpellier II	Examineur
H. BRIL	Professeur à l'Université de Limoges	Invité

REMERCIEMENTS

Voilà trois années qui s'achèvent et voici venu le temps de faire le bilan, un bilan aussi bien professionnel qu'humain. Une thèse représente certes trois années de travail de recherche mais ce sont aussi des années riches en rencontres qui contribuent de près ou de loin à la réussite de ce travail. Cette étape finale de rédaction qui clôt le chapitre entrepris 3 ans auparavant pourrait paraître de loin la plus facile. C'est quand il s'agit de mettre sur papier ces remerciements que l'on se rend compte de toute la difficulté que cela représente. Pourtant que serait une thèse sans toutes ces personnes qui apportent leur aide, leurs connaissances, leur savoir-faire et bien d'autres choses encore qu'il est impossible d'énumérer. Aussi je voudrais commencer par remercier les personnes clé pour la réussite de ce projet.

En premier lieu, je tiens à remercier **Eric Servat** pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire HydroSciences et m'avoir ainsi permis de passer 3 années très enrichissantes dans ces murs.

Je remercie vivement **Françoise**, ma directrice, pour avoir dirigé cette thèse ainsi que pour les nombreux conseils, remarques et relectures qui m'ont beaucoup apporté. Je la remercie d'avoir été disponible quand j'en avais besoin et de m'avoir accompagnée lors de conférences aussi bien pour les présentations que pour les visites touristiques plus ou moins folkloriques (visite éclair de Victoria, kilomètres dans Vancouver ou encore retour difficile d'Oviedo).

Je remercie aussi très sincèrement **Corinne**, ma co-directrice, pour toute son aide si précieuse au cours de ces 3 années, pour m'avoir énormément appris et pour avoir toujours fait tout son possible pour être disponible.

Je tiens à remercier **Aline DIA** d'avoir accepté de rapporter ce travail. *Gracias a Javier SANCHEZ-ESPAÑA quien a aceptado revisar este trabajo* et je remercie l'ensemble des **membres du jury** pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie pour leur collaboration :

- **Philippe Négrel, Alain Cocherie et Michelle Robert** du BRGM d'Orléans pour les analyses d'isotopes du fer sur le Neptune (MC-ICP-MS) ainsi qu'**Emma Engström, Lars-Gunnar Omberg et Ilia Rodushskin** de l'Université de Luleå et ALS Laboratory Group pour leur très grande efficacité dans l'analyse de la deuxième série d'isotopes du fer et leurs conseils avisés (analyses dans les 3 jours suivant l'envoi des échantillons !!)
- **Agüi et José-Miguel** pour leur accueil à Huelva et pour m'avoir accompagné sur le terrain pour les prélèvements sur le Rio Tinto
- **Guillaume** pour les analyses de minéralogie (DRX, EXAFS, XANES) à l'IMPMC à Paris ainsi qu'**Odile et Christian** pour m'avoir initiée à la microbiologie classique
- **Mouss'** pour toutes les analyses que tu as fait sans jamais rien dire (ou presque !) et toujours avec le sourire et dans la bonne humeur.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements à quelques personnes qui ne m'ont pas forcément aidé pour la recherche mais qui sont tout aussi importantes :

- **Séverin**, pour m'avoir permis de faire le monitorat et de poursuivre par un ATER ce qui m'a fait découvrir l'enseignement. Un grand merci aux filles de l'Axe 2 (**Chris, Val et Véro**) pour

vosre bonne humeur (voire très bonne humeur !!), vos rires dans les couloirs et les discussions de filles pendant les repas de midi. Merci à l'Axe 2 pour votre aide durant les trois années de Monitorat et pour m'avoir initié à l'hydrogéologie.

- **Michel, Jean-François, Denis et Sandra**, pour les moments de détente et les pensées plus ou moins philosophiques (plutôt moins d'ailleurs !!) qui ont grandement contribué à parfaire ma culture générale...
- les personnes que j'ai pu côtoyer quasi quotidiennement : **l'équipe café du matin** (Sandra, Jean-Luc, Christian et les autres), **Marie-Claude et Nicole** pour toutes les missions, pour votre disponibilité, votre efficacité et votre réactivité hors norme, ainsi que **Jean-Louis, Fred et Eric** pour vous être soucieux de mon état à de nombreuses reprises ainsi que pour les petits bonjours du matin qui font toujours plaisir. Une attention particulière pour **Christine** et pour tout ce qu'elle fait pour rendre ce labo un peu plus humain et pour que les personnes ne fassent pas que se croiser sans se voir (les pique-niques...).
- une pensée pour les **thésards et autres chercheurs en herbe** que j'ai croisés au cours de ces 3 années de thèse et/ou avec qui j'ai pu partager des pauses café, des pique-niques à la plage ou autres soirées avec dans le désordre: Caroline, Noémie, Christine, Amélie, Marion, Marouan, Cristina, Rim, Hadil, Neelam, Marcos, Wilson, Vincent, Guillaume, Julien, Tahina, Fabiola, ...
- **Odile** pour m'avoir supportée dans le bureau malgré nos divergences de point de vue quant à la température de travail idéale ou plutôt à la température de survie dans le bureau pendant l'hiver. Je la remercie d'avoir accepté d'empiler les pulls pour éviter que je me retrouve trop légèrement vêtue.
- **Merci à Philippe, Richard et autres GM** d'avoir accepté de « m'héberger » dans leurs locaux pendant la phase de rédaction de ce manuscrit. Il devenait en effet difficile de concilier la fonction de « dame-pipi » et de rédaction efficace !

Et dans une aventure, certaines personnes comptent plus que d'autres. Peut-être parce qu'on se sent plus proches d'elles ou parce qu'elles ont été là au bon moment ; voici les personnes indissociables de ces trois années de thèse, à qui je dois énormément, sinon tout, sans qui je n'en serais pas là maintenant :

- **Kenza, Paulina**, mes deux amies les plus précieuses de la MSE sans qui je ne serais sans doute pas arrivée jusqu'ici et qui m'ont permis de souffler et de tenir dans les moments difficiles. Merci pour les longues discussions sur des sujets plus ou moins d'actualité et plus ou moins sérieux ainsi que les moments de franches rigolades (Madagascar, les PFP ou PFK et tout le reste...). Merci pour ce que vous êtes et pour tous les échanges précieux que j'ai pu avoir avec vous. Vous me manquez... je ne vous oublierai pas !!!
- **Linda** pour avoir été ma co-bureau (ou l'inverse !) pendant la rédaction et pour tes nombreux conseils toujours très avisés, les relectures, les soirées au labo ainsi que les we. Je te remercie aussi pour tout ce que tu m'as fait découvrir pendant ces 3 ans et demi passés à Montpellier : les restos, les jeux, les festivals, la musique (et ses chanteuses Ecossiennes !!), pour tous les fous rires qu'on a pu avoir et pour les « luquettes® » dont tu as fait sa spécialité et qui ont permis d'égayer un certain nombre de repas, pauses café, soirées ou autres moments de discussions. Lo siento de no hablar español contigo pero quizás cambiará pronto...

- **Denis** pour toujours avoir été là pour me remonter le moral, pour avoir été présent pendant la phase de rédaction et surtout pour m'avoir encouragée à aller jusqu'au bout ... Je te remercie pour ce que tu es, pour les discussions plus ou moins sérieuses qu'on a pu avoir sur tout, pour avoir grandement amélioré ma culture musicale (faut dire je partais de pas grand-chose !) et pour avoir aiguisé ma réactivité aux contrepèteries... J'ai encore des progrès à faire mais j'y travaille !!! En te remerciant, je voudrais aussi remercier **Sophie**, qui m'a elle aussi encouragée ... un immense merci à tous les deux !!
- **Marie-Ange** pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ce que tu es, pour les longues discussions pendant les repas de midi, certains soirs ou week-end, pour m'avoir supporté même dans les moments les plus désagréables et pour tout le reste (sans oublier Eric et petit Mark pour m'avoir changé les idées). Même loin je ne t'oublierai pas...
- **Christelle** pour m'avoir souhaité tant de « soirées ! » et « week-end ! » et pour avoir toujours le mot pour rire ou faire rire ; heureusement qu'il y a encore des blondes... !!! Même si tu es en train de vouloir le cacher, c'est l'esprit qui compte... Et puis une attention pour Nico aussi, qui n'a pas fini de se moquer, je l'entends encore rire...
- **Chrystelle** pour m'avoir emmenée faire la tournée du BV Hérault, nous avoir accompagnés à Carnoulès et avoir été toujours très attentionnée à mon égard. Je te remercie pour avoir été présente dans tous les moments marquants au cours de ces 3 années de thèse et pour savoir si bien faire la blonde...

Je voudrais remercier les personnes suivantes que j'ai croisées plus ou moins longuement et qui ont fait que la thèse ne se limite pas à 3 années de recherche :

- les **géologues et assimilés du bâtiment 22** pour les pique-niques plage, plus particulièrement Pierre pour avoir assisté avec moi à bon nombre de réunions T2E et Olivier pour, dans le désordre, les barbec', les jeux, les rires et tout le reste.
- **Linda** et **Olivier** pour m'avoir accueillie à de très (trop ??!) nombreuses reprises dans ma deuxième maison ainsi que **Muriel** et **Manu** pour les repas, les soirées jeux...
- les échanges enrichissants avec les personnes rencontrées au cours de conférences à l'étranger (Clara x2, Manuel, Patricia, Ángel, Lars, Anika, ...)

Pour finir je remercie également **mes proches** pour m'avoir supportée, soutenue et encouragée pendant cette thèse, à ne pas lâcher prise même dans les moments les plus difficiles (Karibou, Manue, Guillaume, Clément, Julien, Lulu, Cissou, Sandrine, Maud, Pauline, Mimi, Flo, Pierrot, Aurore, Oua, et les autres).

Merci à **mes parents** qui ont cru en moi plus que moi et qui ont enduré ces 3 années de thèse en faisant de nombreux sacrifices pour que ce projet soit mené à son terme ; merci à **ma sœur** qui n'y est pas pour rien dans tout ça...

Et enfin, une pensée à toutes les personnes extérieures à ce travail mais qui m'ont beaucoup apportées par leur soutien, leur présence, ou simplement par ce qu'elles étaient ou ce qu'elles faisaient et qui m'ont ainsi permis d'avancer et de voir plus loin...

TABLE DES MATIERES :

REMERCIEMENTS.....	3
INTRODUCTION	11
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
Chapitre 1 : Les Drainages Miniers Acides.....	19
I. GENERALITES SUR LES DRAINAGES MINIERES ACIDES (DMA)	21
A. Formation des DMA	21
B. Précipitation du fer dans les DMA.....	22
C. Piégeage d'arsenic par les hydroxydes de fer dans les DMA.....	23
1. Mode de fixation de l'arsenic sur les hydroxydes de fer.....	23
2. Efficacité du piégeage de l'arsenic sur les hydroxydes de fer.....	24
3. Evolution des hydroxydes de fer et rétention d'arsenic	24
II. IMPLICATIONS DES BACTERIES DES DMA DANS LE CYCLE DU FER	25
Chapitre 2 : Les Isotopes du Fer.....	29
I. GENERALITES APPLIQUEES AUX ISOTOPES DU FER	31
A. Abondance isotopique du fer.....	31
B. Principe du fractionnement isotopique.....	31
1. Terminologie.....	31
2. Conditions de fractionnement	32
3. Fractionnement à l'équilibre	33
4. Fractionnement cinétique	33
5. Fractionnement de Rayleigh	34
6. Les facteurs de fractionnement	35
II. FRACTIONNEMENT DES ISOTOPES DU FER EN MILIEU AQUEUX.....	36
A. Processus de fractionnements abiotiques	36
1. Réactions d'oxydoréduction.....	37
2. Dissolution des minéraux	37
3. Précipitation des minéraux.....	38
4. Adsorption.....	39
5. Diffusion	40

B.	Processus de fractionnement biologique	41
1.	Réduction Dissimilaire du Fer (DIR)	41
2.	Oxydation bactérienne du fer	44
3.	Bactéries magnétotactiques	47
4.	Action indirecte des bactéries : dissolution en présence de ligands organiques.....	47
III.	FRACTIONNEMENTS DES ISOTOPES DU FER DANS LES ENVIRONNEMENTS AQUEUX MODERNES	49
A.	Les systèmes hydrothermaux marins	50
B.	Les sédiments et dépôts marins	52
C.	Apport fluvial.....	53
 PARTIE 2 : BIOGEOCHIMIE DU FER ET DE L'ARSENIC DANS LES DMA.....		57
 Chapitre 3 : L'atténuation naturelle des concentrations en arsenic dans le Reigous (Article n°1).....		61
	Abstract	65
	Introduction	66
	Site description	67
	Material and methods.....	67
	Results.....	69
	Discussion	71
	Conclusion.....	72
 Chapitre 4 : Influence de la cinétique sur la minéralogie des précipités formés dans les DMA (Article n°2)		85
	Abstract	89
	Introduction	90
	Materials and Experimental	90
	Results.....	92
	Discussion	95
	Conclusion.....	98

PARTIE 3 : FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE DU FER DANS LES DMA113

Chapitre 5 : Les isotopes du fer dans les eaux et les solides du bassin Tinto-Odiel (Sud-ouest de l'Espagne) (Article n°3)117

Chapitre 6 : Fractionnement isotopique du fer lors des processus d'oxydation et de précipitation dans un DMA131

I.	INTRODUCTION	133
II.	PRESENTATION DU SITE D'ETUDE.....	134
III.	MATERIELS ET METHODES.....	134
	A. Prélèvement d'échantillons.....	134
	B. Expériences de cinétiques en réacteurs fermés.....	136
	C. analyses chimiques, minéralogiques et isotopiques.....	138
	1. Minéralisation des échantillons solides.....	138
	2. Mesures d'isotopes du fer	138
IV.	RESULTATS	140
	A. Variation de la composition isotopique du fer <i>In-Situ</i>	140
	B. Variation de la composition isotopique du fer en reacteur fermé.....	141
V.	DISCUSSION.....	143
	A. Importance de l'oxydation dans le fractionnement global	143
	B. Importance relative de la précipitation dans le fractionnement.....	145
	C. Influence de la minéralogie et des cinétiques de réaction sur le fractionnement isotopique du fer	146
VI.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	147

CONCLUSION GENERALE.....149

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....155

ANNEXES.....169

Annexe 1 : Impact du DMA du Reigous sur l'hydrosystème aval171

Annexe 2 : Diversité des populations d'*Archaea* dans le DMA de Carnoulès213

Annexe 3 : Un cas de pollution à grande échelle : les fleuves Tinto et Odiel (Andalousie, Espagne)225

INTRODUCTION

PROBLEMATIQUE

Depuis de nombreuses années, l'environnement et l'idée d'un développement durable est au cœur de toutes les attentions, que ce soit d'un point de vue des émissions atmosphériques, des ressources énergétiques limitées ou encore de la pollution des sols et des eaux. Les besoins croissants en eau pour la consommation humaine ou pour l'agriculture font de la préservation ou du renouvellement de cette ressource un enjeu majeur. Parmi les pollutions qui affectent les milieux aquatiques, les drainages de mine constituent l'une des plus préoccupantes. Ces écoulements issus de l'activité minière actuelle ou passée sont caractérisés par des concentrations élevées en métaux et métalloïdes toxiques et le plus souvent une forte acidité ; on les appelle aussi drainages miniers acides (DMA). La durée de vie des DMA est de plusieurs centaines d'années et la pollution métallique peut s'étendre sur des dizaines de kilomètres en aval des mines. C'est le cas par exemple des rivières Tinto et Odiel qui drainent la province minière Sud-Ibérique, avec pour conséquence un enrichissement en métaux dans le Golfe de Cadix (Elbaz-Poulichet *et al.*, 2001).

Malgré leur hostilité apparente, les DMA abritent une faune microscopique variée et parfaitement adaptée. Les bactéries que l'on rencontre dans ces milieux tirent leur énergie des réactions rédox impliquant le fer et le soufre et sont donc les premiers acteurs de la propagation de la pollution métallique. Inversement, l'oxydation bactérienne du fer dans ces milieux conduit à la précipitation d'(hydr)oxydes qui constituent d'excellents pièges pour les métaux toxiques. Les bactéries jouent donc un rôle essentiel dans l'atténuation naturelle de la pollution métallique.

L'enjeu environnemental toujours plus important qui vise à réduire les pollutions en général et les pollutions métalliques en particulier nécessite une connaissance des mécanismes réactionnels impliqués dans la remédiation naturelle des DMA par les microorganismes. La compréhension des processus à petite échelle est donc capitale pour pouvoir développer ensuite des stratégies à grande échelle, c'est-à-dire pour la mise en œuvre de schémas de remédiation contrôlée par le biais de procédés de traitement applicables à ces environnements.

L'IDEE ET LES OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'idée de départ de cette thèse était d'identifier un certain nombre de marqueurs témoignant de l'activité bactérienne dans les DMA et permettant de mieux comprendre le rôle des microorganismes dans la remédiation naturelle de ces milieux. Ces marqueurs ont été recherchés dans le cycle du fer car cet élément, qui est à la base d'un métabolisme chimiolithotrophe, joue un rôle central dans la capacité d'autoépuration naturelle des DMA. Ainsi, les changements de spéciation résultant de réactions d'oxydoréduction (passage de Fe(II) à Fe(III)), la précipitation de minéraux de fer spécifiques qui ne peuvent se former que sous l'action d'une catalyse bactérienne, ou encore des modifications de la composition isotopique du fer constituent autant de traces mesurables de l'activité

bactérienne dans les DMA. L'un des plus beaux exemples de l'action bactérienne dans les DMA est la présence de concrétions laminées qui ressemblent aux stromatolithes que l'on rencontre dans les milieux carbonatés ; elles résultent de la précipitation de phases minérales, généralement des oxydes de fer, autour de structures bactériennes (Leblanc et al., 1996 ; Brake et al., 2004, Fang et al., 2007 ; Sanchez-España et al., 2007).

L'observation de fractionnements isotopiques du fer plus important dans les roches précipitées chimiquement comparé aux roches clastiques pauvres en C et S (Beard & Johnson, 2004) laissait initialement pressentir que les bactéries, en oxydant le fer, pouvaient laisser une empreinte au niveau atomique et induire un fractionnement isotopique du fer. Cependant, avec l'avancée fulgurante de la recherche dans le domaine des isotopes du fer au cours de ces trois dernières années, la détermination d'une telle signature de l'activité bactérienne s'est avérée incertaine. Les isotopes du fer qui peuvent aussi être des traceurs des processus physico-chimiques ont alors été utilisés pour l'étude des mécanismes contrôlant le fractionnement isotopique du fer dans les DMA. Bien que particulièrement intéressants d'un point de vue géochimique du fait des concentrations particulièrement élevées en fer et de l'importance de l'activité bactérienne dans ces milieux, les DMA n'ont été que très peu étudiés d'un point de vue isotopique. A l'heure actuelle, seule une étude rapporte des données de composition et de fractionnement isotopique du fer dans un stock de déchets miniers (Herbert & Schieppers, 2008).

L'objectif principal de ce travail de thèse était donc l'identification des signatures chimiques qui témoignent de l'activité bactérienne dans les DMA, c'est-à-dire de l'intervention des bactéries dans les processus physico-chimiques qui peuvent être aussi bien des changements de spéciation, la formation de biominéraux ou encore un fractionnement isotopique.

L'étude menée tout au long de ces 3 années de thèse a donc été axée sur la détermination du rôle des bactéries dans les réactions d'oxydation mais aussi de précipitation du fer et par conséquent le rôle de ces bactéries dans la formation de certains précipités rencontrés dans les DMA. Indirectement, il s'agissait de déterminer le rôle joué par les bactéries dans les processus d'atténuation naturelle des concentrations de fer et d'arsenic dans ces milieux mais aussi d'évaluer leur influence sur la formation de certaines phases minérales ou sur le fractionnement isotopique du fer.

Ce manuscrit est organisé en trois parties :

La première partie est introductive et présente une synthèse bibliographique divisée en deux chapitres. Un bref aperçu de ce que l'on appelle les drainages miniers acides est présenté dans un premier chapitre ; l'accent est mis sur le rôle prépondérant joué par les bactéries dans ces milieux. Le deuxième chapitre aborde les isotopes du fer. Le propos commence par quelques généralités puis sont présentés les fractionnements isotopiques (abiotiques et biotiques) dans les milieux aqueux, suivis pour finir des données concernant les environnements aqueux modernes.

La deuxième partie de ce travail de thèse s'attache à décrire les processus biogéochimiques mis en jeu dans le cycle du fer et de l'arsenic dans le système minier acide de Carnoulès (Gard, France). Le premier chapitre présente les résultats du suivi sur plusieurs années de la physico-chimie des eaux et des sédiments du Reigous (Gard, France) et décrit les processus qui contrôlent l'atténuation naturelle des teneurs en fer et arsenic dans le cas particulier de ce DMA en relation avec la formation de certaines phases minérales particulières. Le deuxième chapitre présente les études conduites en laboratoire sur la biooxydation du Fe et de l'As qui visaient à identifier les différents paramètres qui contrôlent la variabilité des phases minérales rencontrées *in situ*.

La troisième et dernière partie est consacrée aux isotopes du fer. Cette partie est divisée en deux chapitres. En premier lieu sont présentées des mesures *in situ* de composition isotopique du fer dans les eaux et les solides riches en fer prélevés dans les bassins du Rio Tinto et de l'Odiel. Ces deux fleuves, situés dans le sud-ouest de l'Espagne au cœur de la ceinture ibérique de pyrite, sont fortement impactés par les drainages miniers acides et présentent des concentrations dissoutes en Fe(III) importantes, jusqu'à 20g/l. Un deuxième chapitre développe l'étude de la composition isotopique du fer dans le drainage minier acide du Reigous où, à l'inverse du Rio Tinto, le fer en solution est sous forme réduite, Fe(II). Ces mesures *in situ* sont couplées à des mesures *in vitro* afin de déterminer les processus de fractionnement des isotopes du fer et l'influence des cinétiques de réaction sur ce fractionnement isotopique.

PARTIE 1 :
ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les Drainages Miniers Acides

I. GENERALITES SUR LES DRAINAGES MINIERES ACIDES (DMA)

Les Drainages Miniers Acides (DMA) désignent toutes les eaux acides d'origine minière résultant de l'oxydation spontanée de minéraux sulfurés. Cette oxydation résulte de processus chimiques et biologiques. Les effluents formés sont très riches en sulfates (jusqu'à 4,9 g/l) et généralement en fer (jusqu'à 1,7 g/l) (Casiot *et al.*, 2004). Ils contiennent des concentrations élevées en métaux toxiques (Pb, Cd, Zn, Tl, ...) et métalloïdes (As, Sb).

Les DMA constituent une source importante de préoccupations depuis plusieurs années, du fait de la menace qu'ils représentent tant pour l'environnement que pour la santé humaine (Bhattacharya *et al.*, 2007).

A. FORMATION DES DMA

Plusieurs études reprennent en détail la formation des drainages miniers acides ainsi que leurs caractéristiques et les traitements possibles (Akcil & Koldas, 2006; Blodau, 2006; Sarmiento, 2007). Un bref aperçu des DMA est présenté ici.

Les minerais de Pb, Zn, Au, etc., contiennent comme principale impureté des sulfures qui contiennent eux-mêmes des traces de nombreux métaux et métalloïdes tels que As, Cd, Co, Cu, Pb, Sb, Se, Zn (Abratis *et al.*, 2004). Ces derniers se retrouvent donc en grandes quantités dans les stocks de déchets miniers ou stériles miniers. Lors d'un contact de ces dépôts avec de l'eau partiellement oxygénée (météorique ou d'infiltration), les processus d'oxydation et dissolution vont provoquer une acidification des eaux et une mise en solution de ces éléments traces métalliques. L'ensemble de ces processus conduit à la formation de DMA (Blodau, 2006).

De nombreux sulfures comme la sphalérite (ZnS), la chalcopryrite (CuFeS), l'arsénopyrite (FeAsS), la galène (PbS) ou encore la chalcocite (Cu₂S) peuvent être à l'origine de la production de DMA. Parmi ces minéraux, les sulfures de fer et plus particulièrement la pyrite (FeS₂) tiennent une place particulière. En effet, la pyrite est le sulfure de fer le plus abondant et il affecte la quasi-totalité des exploitations minières.

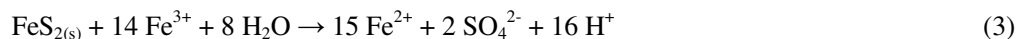
La succession des réactions aboutissant à la génération de DMA commence par l'oxydation des sulfures (ici de la pyrite) par l'oxygène selon la réaction suivante :



puis le fer ferreux est oxydé en fer ferrique selon la réaction :



Le fer ferrique formé par la réaction (2) est un oxydant puissant qui peut à son tour oxyder la pyrite et générer une forte acidité selon la réaction :



Les équations précédentes présentent l'oxydation de la pyrite dans le cas où cette phase serait pure. Cependant dans les stériles miniers, la pyrite contient de l'arsenic en grande quantité, tout comme d'autres sulfures de fer parmi lesquels l'arsénopyrite (FeAsS), la pyrite arsénifiée (pyrite riche en arsenic) ou encore le réalgar (As_4S_4) et l'orpiment (As_2S_3). La pyrite arsénifiée et l'arsénopyrite représentent la principale source d'arsenic dans les stériles miniers. L'oxydation de tels sulfures va donc conduire à la libération de quantités importantes de ce métalloïde sous forme d'As(III) qui peut ensuite être oxydé en As(V) par l'activité bactérienne de souches telles que *Thiomonas sp.* (Bruneel *et al.*, 2003; Yunmei *et al.*, 2004; Morin & Calas, 2006).

Dans le processus d'altération des sulfures de fer (qu'ils soient arséniés ou non), la réaction d'oxydation du fer ferreux en fer ferrique (réaction (2)) est l'étape limitante (Evangelou & Zhang, 1995). Pour des pH au-delà de 4, cette réaction peut se produire avec ou sans catalyse. Cependant, pour des valeurs plus faibles de pH, l'oxydation de Fe(II) est lente (Stumm & Morgan, 1981) et nécessite une catalyse qui est généralement assurée par des microorganismes (Johnson & Hallberg, 2003). Ces microorganismes puisent leur énergie et couvrent leurs besoins métaboliques grâce à des réactions d'oxydoréduction du soufre et du fer principalement. En catalysant la production de fer ferrique, les bactéries Fe-oxydantes jouent un rôle primordial dans le processus de dégradation de la pyrite (Johnson & Hallberg, 2003) et de formation des DMA.

Le cycle du fer apparaît donc comme un moteur essentiel dans la formation des DMA.

B. PRECIPITATION DU FER DANS LES DMA

Dans les DMA, l'oxydation de Fe(II) en Fe(III) et la neutralisation progressive des eaux acides conduisent à la précipitation d'oxyhydroxysulfates de Fe(III) plus ou moins cristallisés. Selon les conditions physicochimiques du milieu (pH, Eh, etc.) et la concentration en espèces dissoutes (Jang *et al.*, 2003; Johnson, 2006), il se forme de la jarosite ($\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, et $\text{M} = \text{K}^+, \text{Na}^+ \text{ ou } \text{H}^+$), de la schwertmannite ($\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{8-2x}(\text{SO}_4)_x$, $x \leq 1$), de la ferrihydrite ($\text{Fe}_5(\text{OH})_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ou encore de la goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$) (Figure 1).

Ces minéraux peuvent incorporer des quantités importantes de métaux et métalloïdes toxiques. Ils jouent donc un rôle essentiel dans l'atténuation naturelle de la pollution métallique. Parmi les éléments piégés dans ces phases minérales, l'arsenic a suscité un intérêt particulier ces dernières années (Carlson *et al.*, 2002; Regenspurg, 2002; Pedersen *et al.*, 2006); il est présent à des

concentrations extrêmement élevées (≈ 200 mg/l) dans le DMA de Carnoulès qui fait l'objet de notre étude.

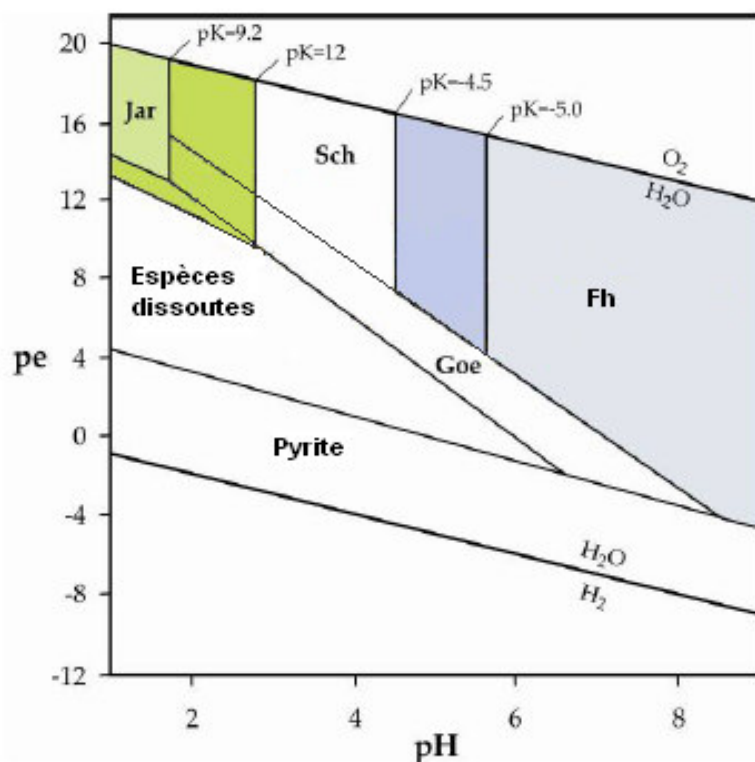


Figure 1 : Domaine de stabilité des oxydes de fer dans le système Fe-S-K-OH (d'après Bigham, 1996, repris par Sarmiento, 2007). Abréviations : Jar=jarosite, Sch=schwertmannite, Fh=ferrihydrite, Goe=goéthite. Les couleurs plus foncées représentent l'extension des domaines de stabilité de la ferrihydrite et de la K-jarosite pour des valeurs plus faibles de produits de solubilité.

C. PIEGEAGE D'ARSENIC PAR LES HYDROXYDES DE FER DANS LES DMA

1. Mode de fixation de l'arsenic sur les hydroxydes de fer

Les (hydr)oxydes de Fe(III) qui se forment dans les DMA peuvent piéger des quantités importantes d'éléments traces métalliques et notamment d'arsenic. L'arsenic peut ainsi être retenu par sorption (Dzombak & Morel, 1990; Fukushima *et al.*, 2003a; Fukushima *et al.*, 2003b; Fukushima *et al.*, 2004; Jönsson & Sherman, 2008) ou coprécipitation (Regenspurg, 2002; Morin *et al.*, 2003; Morin & Calas, 2006; Pedersen *et al.*, 2006). Le mode de fixation dépend de la nature de la phase minérale considérée, de son degré de cristallisation et de sa surface spécifique. Par exemple la majeure partie de l'arsenic est liée à la surface dans le cas de la rouille verte (Jönsson & Sherman, 2008) ou de la ferrihydrite alors que pour la goéthite et la magnétite, l'arsenic est préférentiellement incorporé à la structure

minérale (Pedersen *et al.*, 2006). La concentration en arsenic dans le milieu influence également le mode de fixation ; une concentration élevée peut favoriser la précipitation de surface d'arséniate (As(V)) sur la ferrihydrite (Jia *et al.*, 2006) ou au contraire l'incorporation d'arsenic dans la structure comme dans le cas d'arséniate (As(V)) sur la schwertmannite (Carlson *et al.*, 2002).

2. Efficacité du piégeage de l'arsenic sur les hydroxydes de fer

Les capacités de rétention de l'arsenic sur les hydroxydes de fer dépendent de plusieurs paramètres tels que les caractéristiques de la phase minérale considérée ainsi que des conditions physico-chimiques du milieu.

Ainsi, l'efficacité du piégeage dépend notamment de la cristallinité. Une augmentation de la cristallinité diminue généralement les capacités de piégeage de l'arsenic (Regenspurg & Peiffer, 2005). Ainsi, des phases amorphes d'arséniate ferrique peuvent présenter des rapports molaires As/Fe proche de 1 alors que la goethite ou la ferrihydrite ont généralement des rapports molaires As/Fe relativement faibles, de l'ordre de 0,001 à 0,005 (Pedersen *et al.*, 2006). Pour la schwertmannite, des rapports molaires supérieurs à 0,15 entraînent une déstructuration du minéral (Carlson *et al.*, 2002). Dans des cas plus rares, la coprécipitation de l'arsenic avec le fer peut conduire à la formation de scorodite ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (Langmuir *et al.*, 2006) ou de tooeleite ($\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4(\text{SO}_4)(\text{OH})_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) (Morin *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2007; Nishimura & Robins, 2008).

La spéciation est un autre paramètre important qui peut influencer l'efficacité du piégeage de l'arsenic sur les hydroxydes de fer. Le comportement de l'As(III) vis-à-vis de la surface de ces hydroxydes de fer est très différent de celui de l'As(V). Raven *et al.* (1998) ont montré que pour des conditions de pH acides (de l'ordre de 4,6), le maximum d'adsorption de l'arsenic sur la ferrihydrite correspondait à un rapport molaire As/Fe de 0,6 pour As(III) et de 0,25 pour As(V). Ces auteurs ont aussi montré que la spéciation de l'arsenic influe sur la vitesse d'adsorption. As(V) s'adsorbe plus rapidement qu'As(III) pour de faibles concentrations en arsenic et de faibles pH alors que pour des concentrations élevées en arsenic l'adsorption d'As(III) devient plus rapide. De plus, pour As(III) l'adsorption est généralement plus efficace que la coprécipitation (Fuller *et al.*, 1993; Thorar, 2004). Au contraire, As(V) est préférentiellement incorporé à la structure des hydroxydes de fer dans des conditions de pH acides (Waychunas *et al.*, 1996; Carlson *et al.*, 2002; Dixit & Hering, 2003; Regenspurg & Peiffer, 2005).

3. Evolution des hydroxydes de fer et rétention d'arsenic

Les oxydes de fer formés dans les DMA peuvent naturellement évoluer en d'autres phases plus ou moins cristallisées, modifiant ainsi la rétention de l'arsenic. C'est le cas de la schwertmannite qui peut évoluer au cours du temps et se transformer en goethite (FeOOH) (Bigham *et al.*, 1996a;

Regensburg *et al.*, 2004; Jönsson *et al.*, 2006; Burton *et al.*, 2008), ou en jarosite (Acero *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Il en est de même pour la ferrihydrite qui peut aussi évoluer en goethite (Pedersen *et al.*, 2006).

Cette transformation s'accompagne en général de la libération d'As en solution (Acero *et al.*, 2006; Burton *et al.*, 2008). A l'inverse, la transformation des oxydes de fer peut améliorer la rétention d'As en favorisant l'incorporation, dans la structure des oxydes de fer, d'arsenic précédemment adsorbé à leur surface (Pedersen, 2006; Tufano & Fendorf, 2008). C'est le cas pour la ferrihydrite qui incorpore l'arséniate adsorbé lors de sa transformation en un oxyde de fer mieux cristallisé (Pedersen *et al.*, 2006).

On retiendra donc que les hydroxydes de fer présentent des capacités importantes de piégeage de l'arsenic. Cependant l'efficacité du piégeage dépend de nombreux paramètres. Dans certaines conditions, ces hydroxydes de fer peuvent aussi devenir une source potentielle d'arsenic par remise en solution du métalloïde préalablement immobilisé dans la phase solide.

II. IMPLICATIONS DES BACTERIES DES DMA DANS LE CYCLE DU FER

Les bactéries sont très largement répandues dans l'environnement, y compris dans les drainages miniers acides où elles ont su s'adapter à des conditions extrêmes (Baker & Banfield, 2003). Les communautés microbiennes sont influencées par les conditions physicochimiques de leur environnement sur lesquelles elles influent en retour, laissant ainsi des traces de leur passage ou de leur présence. Ceci est particulièrement visible dans le cas de microorganismes acidophiles associés à l'altération de dépôts de sulfures métalliques qui génèrent les DMA (Sampson *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2008).

Les bactéries qui oxydent le fer ont un rôle majeur dans les environnements miniers. Au sein des dépôts de stériles (ou stocks de déchets miniers), elles régénèrent le Fe(III) qui est un oxydant puissant des sulfures, permettant ainsi au processus de génération des DMA de s'auto-entretenir. D'autre part, dans les eaux de drainage des stériles miniers, les bactéries peuvent favoriser la précipitation d'hydroxydes de fer. L'action des bactéries peut se faire de manière directe ou indirecte. Dans le premier cas, les bactéries agissent en augmentant la vitesse d'oxydation de Fe(II) de plusieurs ordres de grandeur. Dans le second cas, elles peuvent produire des molécules à la surface de leur cellule ou exopolysaccharides (EPS) qui facilitent la nucléation hétérogène (Fortin *et al.*, 1998; Warren & Ferris, 1998; Kasama & Murakami, 2001; Rancourt *et al.*, 2005; Ghauri *et al.*, 2007). Les bactéries peuvent donc être des précurseurs et catalyseurs dans les réactions de sorption, de nucléation et de précipitation de nombreux minéraux (Kawano & Tomita, 2001; Rohwerder *et al.*, 2003; Fortin & Langley, 2005).

Les interactions entre les bactéries et les phases solides sont facilitées par des liaisons électrostatiques. Les hydroxysulfates de fer ferrique que l'on rencontre en proportions importantes dans les DMA sont chargés positivement pour des pH acides (Sigg *et al.*, 2001). A l'inverse, certaines bactéries acidophiles (*Acidithiobacillus ferrooxidans* par exemple) produisent des exopolysaccharides (EPS) chargés négativement (Ghauri *et al.*, 2007). Ces EPS favorisent ensuite la dissolution ou la précipitation d'oxydes de fer selon les cas (Rohwerder *et al.*, 2003). Les bactéries peuvent aussi produire des sidérophores (élément chimique permettant la fixation du fer) pour permettre une mobilisation plus facile du fer nécessaire à leur métabolisme comme illustré sur la figure 2.

Les solides qui se forment en proche association avec les bactéries (que ce soit des précipités internes ou externes aux parois cellulaires) sont appelés des biominéraux. Les oxydes de fer biogéniques sont généralement présents sous forme de nanocristaux et couvrent une large gamme de caractéristiques morphologiques et minéralogiques (Konhauser, 1998; Fortin & Langley, 2005; Rancourt *et al.*, 2005; Jones & Renaut, 2007). Certains de ces biominéraux ont été retrouvés dans des DMA (Benzerara *et al.*, 2008).

En catalysant la précipitation des oxydes de fer, les microorganismes facilitent le piégeage des éléments traces et notamment de l'arsenic (Inskeep *et al.*, 2004). Leur rôle ne s'arrête pas là. Par la suite, les bactéries vont intervenir sur la rétention des éléments traces par exemple en favorisant la cristallisation de certains oxydes (Kappler *et al.*, 2005).

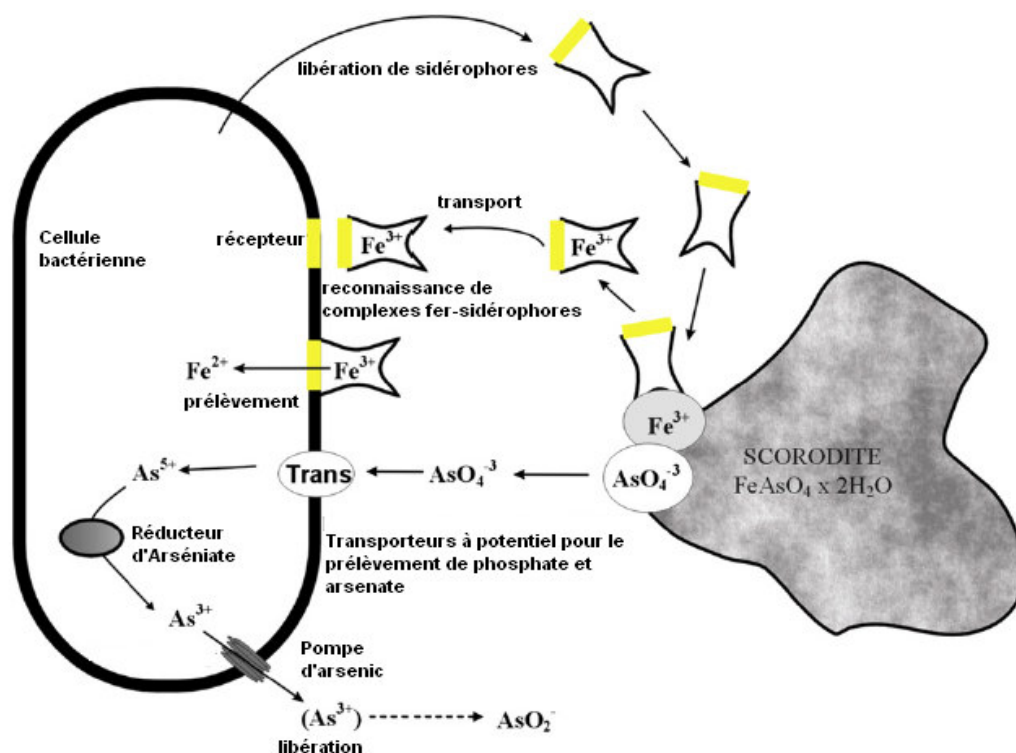


Figure 2 : Exemple de mécanisme de mobilisation du fer et de l'arsenic proposé par Drewniak *et al.* (2008).

Les précipités riches en fer produits par l'activité bactérienne dans les DMA présentent souvent une morphologie particulière. Ce sont des concrétions laminées qui correspondent à des précipités d'oxydes de fer autour de structures bactériennes. Ces concrétions, qui s'apparentent aux stromatolithes rencontrés dans les milieux carbonatés, résultent de l'assimilation intra ou extracellulaire du fer et autres métaux, notamment par des bactéries acidophiles et des microorganismes eucaryotes (Leblanc *et al.*, 1996; Brake *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2007; Sanchez-España *et al.*, 2007b). Ces systèmes géomicrobiologiques renferment des informations importantes quant à l'interaction entre les microorganismes et leur environnement proche.

On retiendra donc que les bactéries qui oxydent le fer jouent un rôle majeur dans les DMA. D'une part elles sont responsables de la régénération de Fe(III), ce qui permet aux DMA de s'auto-entretenir, mais elles jouent aussi un rôle important en tant que catalyseurs de la précipitation des hydroxydes de fer et par suite de la séquestration d'arsenic dans ces phases.

Chapitre 2 : Les Isotopes du Fer

I. GENERALITES APPLIQUEES AUX ISOTOPES DU FER

A. ABONDANCE ISOTOPIQUE DU FER

Le fer possède quatre isotopes principaux dont l'abondance est la suivante : ^{54}Fe (5,8 %), ^{56}Fe (91,8 %), ^{57}Fe (2,1 %) et ^{58}Fe (0,3 %).

A la surface de la Terre, les roches ignées ont une composition isotopique très homogène et les variations observées dans les proportions des différents isotopes sont très faibles. L'étude des isotopes du fer nécessite la mise en œuvre de spectrométrie de masse comme le TIMS (spectrométrie de masse à ionisation thermique) ou plus récemment la MC-ICP-MS (spectrométrie de masse à ionisation par plasma à couplage inductif et un détecteur multi collecteur). Cette dernière a réellement permis l'analyse à grande échelle des isotopes stables du fer pour des applications variées, dans les domaines des sciences (Stenberg *et al.*, 2005; Walczyk & von Blanckenburg, 2005) et des sciences de l'environnement notamment.

B. PRINCIPE DU FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE

Bien que les caractéristiques chimiques des isotopes ou des molécules contenant les différents isotopes d'un même élément soient considérées comme équivalentes, des différences infimes sont observées dans le comportement chimique et physique de ces molécules, si la mesure est suffisamment précise. Le phénomène à l'origine de l'existence de ces différences isotopiques est appelé *fractionnement isotopique*. Ainsi, le concept de fractionnement isotopique rend compte des variations de répartition des isotopes d'un élément entre plusieurs espèces. Il s'agit du phénomène par lequel un élément va être modifié par le passage du composé dans lequel il se trouve d'un état physique ou chimique à un autre. Les principes des processus de fractionnement isotopique dépendant de la masse ont largement été discutés dans la littérature, et repris notamment par Johnson and Beard (2004b).

1. Terminologie

Afin de pouvoir décrire les effets isotopiques, les isotopes, et en particulier ceux du fer, sont définis sous la forme de rapports isotopiques, généralement des deux isotopes les plus abondants, soit $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, parfois $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, pour des raisons analytiques par exemple. La composition isotopique s'exprime généralement en δ c'est-à-dire sous la forme de rapports d'isotopes stables par rapport à un matériau de référence et les données sont habituellement présentées en ‰ (pour mille), comme suit:

$$\delta^{56}\text{Fe} = [({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{échantillon}} - ({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{std}}] / ({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{std}} \times 1000 \quad (1)$$

avec $({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{échantillon}}$ le rapport isotopique du fer dans l'échantillon et $({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{std}}$ le rapport isotopique du fer dans le standard de référence. Les données sont généralement reportées par rapport au matériau de référence certifié pour la composition isotopique du fer, IRMM-014. Cependant, certains auteurs utilisent la composition isotopique du fer dans les roches ignées comme référence à leurs mesures. Il faut alors ajouter +0,09‰ à la valeur de $\delta^{56}\text{Fe}$ pour obtenir la valeur avec l'IRMM-14 comme référence ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{IRMM-14}} = \delta^{56}\text{Fe}_{\text{roches ignées}} + 0,09\text{‰}$). Lorsque les données sont représentées par des rapports ${}^{57}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe}$, les valeurs de $\delta^{57}\text{Fe}$ doivent être multipliées par un facteur de 0,667 pour être converties en notation $\delta^{56}\text{Fe}$ (Beard & Johnson, 2004; Wiederhold *et al.*, 2006).

Pour exprimer les variations de compositions isotopiques observées au cours d'un processus de transfert entre un composé source et un composé cible (composés de départ et d'arrivée de l'élément Fe pour le processus en question), on parle de facteur de fractionnement (noté α) qui peut être calculé directement à partir des rapports isotopiques des compartiments source et cible des processus de transfert :

$$\alpha = ({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{cible}} / ({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{source}} \quad (2)$$

Le fractionnement isotopique (noté Δ et exprimé en ‰) se traduit par une différence de composition isotopique entre la cible et la source :

$$\Delta^{56}\text{Fe} = \delta^{56}\text{Fe}_{\text{cible}} - \delta^{56}\text{Fe}_{\text{source}} \quad (3)$$

et

$$\Delta^{56}\text{Fe} = (\alpha - 1) \times 1000 \quad (4)$$

Par définition, lorsque la composition isotopique du fer est négative, l'espèce est enrichie en isotopes légers (ou appauvrie en isotopes lourds) et inversement.

2. Conditions de fractionnement

La première condition pour qu'il y ait un fractionnement isotopique entre deux espèces est que le processus mis en jeu soit dépendant de la masse. De plus, la condition pour que des variations d'isotopes stables soient visibles dans la nature est que les composés source et cible d'un processus de transfert puissent être séparés l'un de l'autre. Il faut qu'ils puissent être isolés et mesurés séparément, que ce soit lors d'une séparation physique (évaporation, diffusion) ou d'une séparation chimique (élément présent dans plusieurs composés). Le transfert de l'élément ne doit cependant pas être total afin d'éviter que la composition isotopique du composé cible soit identique à celle du composé source.

3. Fractionnement à l'équilibre

Le fractionnement à l'équilibre se produit lorsque des réactions chimiques ou physicochimiques sont dans un état d'équilibre et peut être représenté par la réaction suivante :



où A et B sont deux espèces contenant du fer. Habituellement, ces fractionnements ont lieu si un élément est converti d'une espèce à une autre pour laquelle les forces de liaison sont différentes. La théorie de ce fractionnement est expliquée en détail par Schauble (2004). Les prédictions qualitatives gouvernant le fractionnement à l'équilibre sont les suivantes :

- l'intensité de l'effet isotopique décroît avec l'augmentation de la température selon l'équation suivante (dans le cas du fer) :

$$10^3 \ln \alpha_{\text{Fe(III)-Fe(II)}} = (0,334 \pm 0,032 \times 10^6) / T^2 - 0,88 \pm 0,38 \quad (6)$$

où la température est exprimée en °C et le facteur de fractionnement $\alpha_{\text{Fe(III)-Fe(II)}}$ est exprimé pour le couple ^{56}Fe - ^{54}Fe entre les espèces Fe(III) et Fe(II) (Welch *et al.*, 2003) ;

- les effets isotopiques sont plus importants pour les éléments légers, qui ont souvent une différence de masse relative plus importante entre isotopes ;
- les isotopes lourds sont concentrés dans les espèces chimiques à l'intérieur desquelles les liaisons sont les plus fortes. Le solide est donc généralement enrichi en isotopes lourds par rapport au liquide ou à la vapeur.

4. Fractionnement cinétique

Le fractionnement cinétique, en opposition au fractionnement à l'équilibre, peut se produire lorsque le transport est unidirectionnel (*i.e.* ne permettant pas l'équilibre chimique des atomes ou molécules) ou lorsque la réaction chimique se déroule en un temps insuffisant pour atteindre un équilibre. Ceci signifie que la vitesse d'échange isotopique doit être plus lente que la vitesse de réaction ou de transfert, comme lors de l'évaporation d'un gaz avec enlèvement instantané de la vapeur, lors de la cristallisation rapide d'un solide à partir d'un liquide ou lors de la diffusion d'une espèce à travers une membrane (Johnson & Beard, 2004b).

Dans la plupart des environnements à basse température, le fractionnement cinétique est d'intensité plus importante que le fractionnement à l'équilibre. Les isotopes légers ont tendance à réagir plus vite que les isotopes lourds, ils sont donc généralement concentrés dans les produits de réaction alors que les réactifs sont enrichis en isotopes lourds.

5. Fractionnement de Rayleigh

Lorsque l'intensité de la variation dépend de la fraction transférée entre les deux compartiments, on parle de fractionnement de Rayleigh. Les formalismes employés sont appelés « équations de Rayleigh » et sont expliqués en détail par Johnson and Beard (2004b). Dans l'exemple de la Figure 3, un élément est transféré à partir du compartiment source dont la composition isotopique initiale est de -1‰ et avec un fractionnement $\Delta^{56}\text{Fe}$ de -1,5‰ pour ce processus, c'est-à-dire que le rapport isotopique de chaque fraction de l'élément transféré est toujours plus faible de 1,5‰ par rapport à celui de l'élément dans le compartiment source. Le compartiment source s'enrichit progressivement en isotopes lourds du fait de la perte continue d'isotopes légers, proportionnellement à la quantité de composé transféré. La composition isotopique instantanée du compartiment cible présente alors la même variation que celle du compartiment source. La composition isotopique globale correspond à la composition isotopique de l'ensemble des fractions instantanées. Lorsque le processus de transfert est total, la composition isotopique globale de l'élément dans le compartiment cible est identique à la composition isotopique initiale dans le compartiment source, soit -1‰ dans le cas présent.

Le comportement de Rayleigh peut être exprimé en fonction du facteur d'enrichissement isotopique (ϵ) et de la proportion de fer restant dans le compartiment source (f), comme suit :

$$\delta^{56}\text{Fe}_{\text{source}} = \epsilon_{\text{cible-source}} \ln(f) \quad (7)$$

avec :

- $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{source}}$ la composition isotopique du fer restant dans le compartiment source à un temps donné,
- ϵ , le facteur d'enrichissement isotopique, défini par :

$$\epsilon_{\text{cible-source}} = 1000 \times (\alpha_{\text{cible-source}} - 1) \quad (8)$$

et α , le facteur de fractionnement isotopique défini dans le paragraphe précédent.

Certains auteurs utilisent donc le facteur d'enrichissement isotopique (équivalent au fractionnement isotopique) pour exprimer les variations observées dans certaines de leurs expériences, comme Balci *et al.* (2006) notamment.

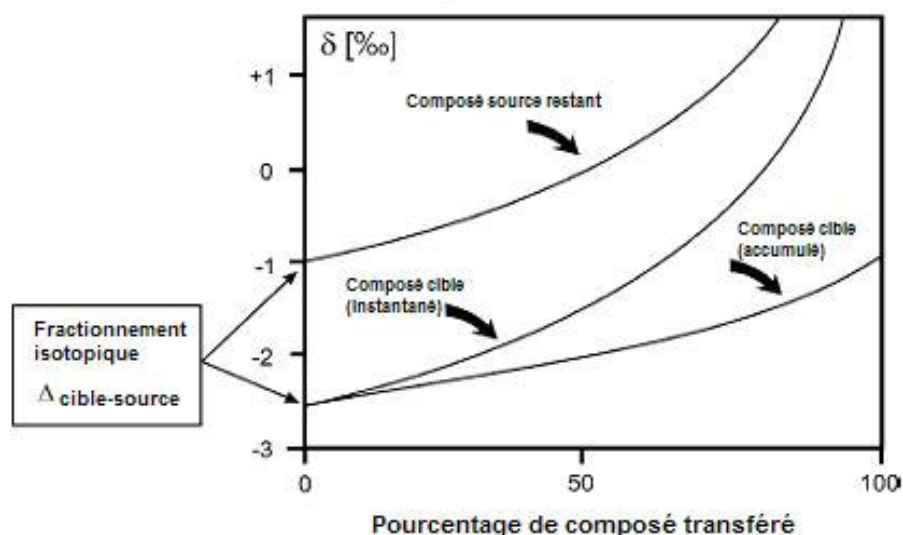


Figure 3 : Fractionnement de Rayleigh (d'après Johnson *et al.*, 2004)

6. Les facteurs de fractionnement

Les facteurs de fractionnement isotopiques peuvent être déterminés de manière théorique par le biais de modèles de calcul (Polyakov & Mineev, 2000; Schauble, 2004; Anbar *et al.*, 2005; Polyakov *et al.*, 2007) et plusieurs approches peuvent être envisagées pour la détermination de ces facteurs de fractionnement, telles que :

- (1) les fonctions de partitions moléculaires théoriques calculées à partir des fréquences de vibration, détaillées par Schauble *et al.* (2001),
- (2) les expériences en laboratoire menées dans des conditions aussi proches que possible des conditions naturelles,
- (3) la détermination de facteurs de fractionnement empiriques à partir des observations naturelles.

Un des principaux obstacles dans les expériences est de savoir si l'équilibre chimique a été totalement atteint ou si le fractionnement isotopique mesuré est dû à un effet cinétique (Johnson *et al.*, 2004). Les facteurs de fractionnement empiriques sont calculés à partir des équations de type Rayleigh. En général, le fractionnement isotopique naturel résulte d'une série de plusieurs étapes de fractionnement, alors que le facteur de fractionnement déterminé est un facteur global qui correspond à la somme de toutes les étapes.

II. FRACTIONNEMENT DES ISOTOPES DU FER EN MILIEU AQUEUX

Les variations de compositions isotopiques rencontrées dans la nature peuvent être attribuées à différents processus parmi lesquels les réactions fluide-solide (Rouxel *et al.*, 2003; Albarède & Beard, 2004), les réactions d'oxydoréduction en milieu aqueux (Matthews *et al.*, 2001; Schauble *et al.*, 2001; Welch *et al.*, 2003; Anbar *et al.*, 2005), les fractionnements d'équilibre entre différents minéraux (Polyakov & Mineev, 2000), le rôle de certains microorganismes (Johnson *et al.*, 2004b), ou encore le prélèvement de métaux par des microorganismes, des plantes ou des humains (Walczyk & von Blanckenburg, 2002; Walczyk & von Blanckenburg, 2005).

Initialement, la possibilité pour les isotopes du fer, d'être utilisés comme (Johnson *et al.*, 2004)me des traceurs de la vie dans les environnements terrestres et extraterrestres, passés et présents, représentait une motivation très forte pour l'analyse des compositions isotopiques du fer (Beard & Johnson, 1999). Les études suivantes ont remis en question cette idée et montré que les isotopes du fer pouvaient être fractionnés dans des environnements aqueux sous des conditions ne permettant pas la vie (Anbar *et al.*, 2000; Bullen *et al.*, 2001; Skulan *et al.*, 2002; Roe *et al.*, 2003; Welch *et al.*, 2003; Anbar, 2004; Brantley *et al.*, 2004; Rodushkin *et al.*, 2004). Les isotopes du fer ne peuvent donc pas être utilisés directement en tant que biosignatures mais peuvent tout de même servir pour le traçage du transport du fer dans les environnements aqueux. La théorie du champ cristallin prédit que les isotopes du fer varient lors de l'équilibre entre deux phases dans lesquelles le fer forme des liaisons de forces différentes (Polyakov, 1997; Polyakov & Mineev, 2000; Schauble *et al.*, 2001; Schauble, 2004; Anbar *et al.*, 2005). De nombreux aspects de la chimie en solution des isotopes du fer ont été testés ces dernières années.

L'ensemble des études portant sur le sujet s'accorde à dire que le fractionnement isotopique du fer à température ambiante peut résulter aussi bien de processus biologiques que non biologiques. (Johnson *et al.*, 2008) reprennent une partie des fractionnements isotopiques du fer dans les cycles rédox et biogéochimiques. A haute température, le constat est différent et reste encore au cœur des discussions. En effet, une des raisons pour expliquer l'absence de fractionnements clairement établis est que le fractionnement isotopique d'équilibre est supposé décroître lorsque la température augmente, les écarts de compositions isotopiques attendus sont donc dans les limites de détection des instruments (Schauble, 2004).

A. PROCESSUS DE FRACTIONNEMENTS ABIOTIQUES

De nombreux processus abiotiques peuvent conduire à un fractionnement isotopique du fer et notamment les processus d'oxydoréduction, de dissolution, de précipitation, d'adsorption ou encore de

diffusion qui seront présentés dans cette partie. Les fractionnements correspondant à l'ensemble de ces processus sont résumés dans le tableau 1.

1. Réactions d'oxydoréduction

Les fractionnements isotopiques les plus importants ont généralement lieu lors des réactions d'oxydoréduction *i.e.* entre des espèces oxydées et réduites du fer (Polyakov & Mineev, 2000; Schauble *et al.*, 2001).

Le facteur de fractionnement le plus documenté est celui concernant l'oxydation de Fe(II) en solutions aqueuses. Schauble *et al.* (2001) ont déterminé, à partir des fréquences de vibration et d'un modèle empirique de champs de force (MUBFF, Modified Urey-Bradley Force Field), une valeur théorique de $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)aq-Fe(II)aq}}$ pour la réaction d'équilibre entre les complexes aqueux de Fe(II) et Fe(III) (c'est-à-dire entre $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$) de +6‰ à 25 °C et de +1,5‰ à 250 °C. Anbar *et al.* (2005) ont, quant à eux, utilisé la théorie de densité fonctionnelle (DFT, Density Functional Theory), qui est une approche de chimie quantique permettant l'estimation de tous les modes et fréquences de vibration des complexes et des effets de la substitution isotopique, et obtenu des valeurs de $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)aq-Fe(II)aq}}$ de +3,2‰ et +1,2‰ (à 25 °C et 250 °C respectivement) pour la même réaction d'équilibre. Le fractionnement isotopique entre des complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cl}_x(\text{H}_2\text{O})_{6-x}^{(3-x)+}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ est de même sens mais l'intensité diminue avec la substitution par rapport aux complexes exclusivement aqueux. Ainsi, le fer dans le complexe FeCl_2 est plus léger d'environ 2‰ par rapport au fer dans le complexe hexaaqueux à 25 °C et de 1‰ à 250 °C (Schauble *et al.*, 2001).

Le fractionnement isotopique d'équilibre déterminé expérimentalement, à température ambiante, entre $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)aq-Fe(II)aq}}$) est de +2,9‰ (Johnson *et al.*, 2002; Welch *et al.*, 2003), ce qui est parfaitement en accord avec la valeur théorique donnée par Anbar *et al.* (2005) et proche de celle déterminée par Balci *et al.* (2006) ($\Delta^{56}\text{Fe} = 3,4‰$). De plus, l'équilibre isotopique entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ en milieu acide et à température ambiante, est atteint au bout de 150 à 300 secondes (Johnson *et al.*, 2002; Welch *et al.*, 2003).

Les fractionnements isotopiques forts associés à l'oxydation et à la réduction du fer font de ce système un puissant traceur des changements redox dans les environnements aqueux.

2. Dissolution des minéraux

De nombreux facteurs entrent en jeu dans la dissolution de minéraux et il est difficile de départager les différents mécanismes responsables du fractionnement isotopique observé. La théorie sur les fractionnements d'isotopes du fer prévoit que le fractionnement d'équilibre enrichit l'environnement de liaison le plus fort en isotopes lourds (Schauble, 2004). Wiederhold *et al.* (2006) ont montré que suivant le type de dissolution, il peut y avoir fractionnement isotopique (dissolution

contrôlée par des ligands ou dissolution réductive) ou non (dissolution contrôlée par des protons) Ainsi, de manière générale, la dissolution des minéraux a tendance à enrichir le fluide en isotopes légers (Brantley *et al.*, 2001; Brantley *et al.*, 2004). L'intensité de cet effet dépend de l'affinité du fer avec les ligands présents dans le fluide.

Plusieurs auteurs ont étudié le fractionnement cinétique résultant de la dissolution de l'hornblende, de l'hématite (Skulan *et al.*, 2002) et de la goethite (Wiederhold *et al.*, 2006) en milieu acide. Ainsi, la dissolution partielle d'hématite en milieu HCl concentré ne produit pas de fractionnement significatif, alors que dans le cas de l'hornblende, le lixiviat est enrichi en isotopes légers de 0,1 à 0,2‰ et ce fractionnement est un fractionnement cinétique (Brantley *et al.*, 2004). En revanche, la dissolution de goethite contrôlée par la présence de ligands ou la dissolution réductive ont conduit à un fractionnement significatif d'isotopes du fer, les fractions dissoutes de début d'expérience présentant un enrichissement important en isotopes légers ($\Delta^{56}\text{Fe} = -1,2\text{‰}$ et $-1,67\text{‰}$ respectivement) (Wiederhold *et al.*, 2006).

Ces résultats sont parfaitement en accord avec la détermination théorique du facteur de fractionnement isotopique de $-1,7\text{‰}$ par ces mêmes auteurs (Wiederhold *et al.*, 2006).

3. Précipitation des minéraux

Les facteurs de fractionnements d'équilibre théoriques ont été déterminés, en combinant les techniques de la DFT (Anbar *et al.*, 2005) et Mössbauer (Polyakov, 1997), pour plusieurs minéraux et notamment la formation d'hématite (Fe_2O_3), de goethite ($\text{FeO}(\text{OH})$), de pyrite (FeS_2) ainsi que de sidérite (FeCO_3) à partir de $\text{Fe}(\text{III})_{\text{aq}}$. Le facteur de fractionnement pour l'hématite est de $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{hématite-Fe}(\text{III})_{\text{aq}}} = -1,8\text{‰}$ à 25 °C et de $-0,6\text{‰}$ à 250 °C (Anbar *et al.*, 2005). Pour la goethite, la pyrite et la sidérite, les fractionnements isotopiques sont $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{goethite-Fe}(\text{III})_{\text{aq}}} = -3,5\text{‰}$ et $-1,3\text{‰}$, $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{pyrite-Fe}(\text{III})_{\text{aq}}} = +1,8\text{‰}$ et $+0,7\text{‰}$ et $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{sidérite-Fe}(\text{III})_{\text{aq}}} = -4,9\text{‰}$ et $-1,8\text{‰}$ à respectivement 25 °C et 250 °C .

En ce qui concerne la précipitation de sidérite à partir de $\text{Fe}(\text{II})_{\text{aq}}$, les prédictions à partir des données spectroscopiques indiquent un facteur de fractionnement, $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{sidérite-Fe}(\text{II})_{\text{aq}}} = -1,5\text{‰}$, ce qui signifie que la sidérite formée est plus légère de $1,5\text{‰}$ que $\text{Fe}(\text{II})_{\text{aq}}$ de départ (Polyakov & Mineev, 2000; Schauble *et al.*, 2001).

Des expériences de précipitation d'hématite (Fe_2O_3) à partir de $\text{Fe}(\text{III})_{\text{aq}}$, montrent un fractionnement isotopique différent selon s'il s'agit d'un fractionnement d'équilibre ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{hématite-Fe}(\text{III})_{\text{aq}}} = +0,1 \pm 0,2\text{‰}$) ou cinétique ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{hématite-Fe}(\text{III})_{\text{aq}}} = -1,32 \pm 0,12\text{‰}$) ((Skulan *et al.*, 2002), ce dernier étant semblable à la valeur théorique déterminée par Anbar *et al.* (2005). Le fractionnement cinétique tend donc à enrichir le précipité formé en isotopes légers par rapport au fluide.

En ce qui concerne la précipitation de sidérite à partir de $\text{Fe}(\text{II})_{\text{aq}}$, le fractionnement isotopique mesuré, $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{sidérite-Fe}(\text{II})_{\text{aq}}} = -0,5\text{‰}$, est légèrement plus faible en intensité que les prédictions théoriques qui donnent $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{sidérite-Fe}(\text{II})_{\text{aq}}} = -1,5\text{‰}$ (Wiesli *et al.*, 2004). Selon ces auteurs, lors de la précipitation

lente de sidérite, la composition isotopique du fer suit un fractionnement de Rayleigh ($10^3 \ln(\alpha_{\text{Fe(II)-sidérite}}) = +0,57 \pm 0,22\text{‰}$). Johnson *et al.* (2003) ont observé un fractionnement isotopique du fer uniquement lorsque la sidérite contient du Ca ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{sidérite-Fe(II)aq}} = -0,81\text{‰}$). Dans le cas d'une précipitation très rapide ou instantanée du fait d'une sursaturation importante, aucun fractionnement n'est observé que ce soit pour la formation de sidérite (Wiesli *et al.*, 2004) ou d'hématite (Skulan *et al.*, 2002).

L'ensemble des compositions isotopiques des minéraux sulfurés est repris dans le tableau 3. Les sulfures de fer issus de la précipitation de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ ont une composition isotopique du fer de $\delta^{56}\text{Fe} = -0,48\text{‰}$ à $\delta^{56}\text{Fe} = +0,21\text{‰}$. L'enrichissement initial en isotopes légers du précipité, comparativement au fluide, est supposé être le résultat d'un effet cinétique associé à un échange de ligands entre $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ et les complexes aqueux de sulfures (Butler *et al.*, 2005). L'établissement d'un équilibre au cours du temps conduit à une homogénéisation des compositions isotopiques du fer du précipité et du fluide. Dans d'autres conditions, la précipitation de sulfures de fer (pyrrhotite) à partir d'un fluide magmatique (pour des températures comprises entre 800 et 1000 °C et pressions élevées) conduit à des compositions isotopiques du fer dans le solide beaucoup plus faibles ($\delta^{56}\text{Fe} = -1,08$ à $-0,35\text{‰}$, (Schuessler *et al.*, 2007)).

L'oxydation et la précipitation sont souvent des processus couplés. Ainsi, l'oxydation abiotique de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ en ferrihydrite lors de la réaction avec une solution oxygénée conduit à un fractionnement $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)OOH-Fe(II)aq}}$ de $+0,9\text{‰}$ (Bullen *et al.*, 2001) qui peut être la combinaison d'un fractionnement d'équilibre de $-2,9\text{‰}$ entre $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ et $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, et d'un fractionnement cinétique de $+2,0\text{‰}$ entre $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ et la ferrihydrite lors de la précipitation (Markl *et al.*, 2006). Ce dernier fractionnement est supposé et n'a pas été mesuré expérimentalement. Si les expériences de Bullen *et al.* (2001) reflètent en partie un fractionnement cinétique de $+2,0\text{‰}$ entre $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ et ferrihydrite, ces résultats sont alors comparables au fractionnement cinétique résultant de la précipitation d'hématite à partir de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (Skulan *et al.*, 2002).

4. Adsorption

Le fractionnement isotopique du fer lors de l'adsorption de Fe(II) sur des (hydr)oxydes de Fe(III) a été étudié à plusieurs reprises (Brantley *et al.*, 2004; Icopini *et al.*, 2004; Johnson & Beard, 2004a; Johnson *et al.*, 2005). L'ensemble des travaux montre que les isotopes lourds sont préférentiellement adsorbés à la surface des oxydes, entraînant ainsi un enrichissement en isotopes légers dans le fer dissous. Selon les auteurs, le fractionnement isotopique produit est soit un fractionnement d'équilibre, comme c'est le cas entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(II)}_{\text{sorbé}}$ lors de l'adsorption de Fe(II) sur la goethite dans des conditions anoxiques (Icopini *et al.*, 2004) ou lors de la dissolution de l'hornblende et de la goethite (Brantley *et al.*, 2004) ; soit un fractionnement cinétique dans le cas de l'adsorption rapide de Fe(II) lors de la réduction dissimilaire d'oxydes ferriques (Johnson *et al.*, 2005).

Un fractionnement isotopique $\Delta_{\text{Fe(II)ads-Fe(II)aq}}$ de 0,3‰ a été observé pour Fe(II) adsorbé à la surface d'oxyhydroxydes de Fe(III) dans des eaux souterraines (Teutsch *et al.*, 2005), ce qui est proche de la valeur estimée par Crosby *et al.* (2005) ($\Delta_{\text{Fe(II)ads-Fe(II)aq}} = +0,38 \pm 0,1\text{‰}$ pour l'hématite et $+0,86 \pm 0,17\text{‰}$ pour la goethite).

5. Diffusion

Lors de la diffusion, les atomes légers ont tendance à se déplacer plus rapidement que les lourds et la région à partir de laquelle les atomes vont diffuser sera enrichie en isotopes lourds, comparativement à la région de destination (Rodushkin *et al.*, 2004). L'enrichissement en isotopes lourds du fer métallique issu de météorites avec l'augmentation des teneurs en fer (Poitrasson & Freydier, 2005) traduit donc un fractionnement isotopique cinétique lors de la diffusion puisque les isotopes légers sont préférentiellement déplacés. *A contrario*, le fractionnement isotopique observé entre les sulfures et le fer dans des météorites, ou entre les minéraux et les roches du manteau résulte d'un effet d'équilibre lors de phénomènes de mélange au cours de la formation des phases solides (Berger & von Blanckenburg, 2001; Zhu *et al.*, 2002; Beard & Johnson, 2004; Williams *et al.*, 2004; Poitrasson & Freydier, 2005; Poitrasson *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Résumé des fractionnements isotopiques abiotiques entre les espèces du fer

Espèces	$\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{A-B}}$	Références
Oxydoréduction		
$\text{Fe(III)}_{\text{aq}} - \text{Fe(II)}_{\text{aq}}$	$+2,9 \pm 0,2 \text{ ‰}$	Johnson <i>et al.</i> (2002) ; Welch <i>et al.</i> (2003)
Dissolution		
Fe_{aq} - goethite : réductive ligands théorique	-1,67‰ -1,20‰ -1,70‰	Wiederhold <i>et al.</i> (2006)
Fe_{aq} - hornblende (milieu acide)	-0,2 à -0,1‰	Skulan <i>et al.</i> (2002)
Fe_{aq} - hématite (milieu acide)	0‰	Skulan <i>et al.</i> (2002)
Précipitation		
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(III)}$ oxyde	$-0,9 \pm 0,2 \text{ ‰}$	Bullen <i>et al.</i> (2001)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Hématite}$	$-3,0 \pm 0,3 \text{ ‰}$	Skulan <i>et al.</i> (2002) ; Johnson <i>et al.</i> (2002) ; Welch <i>et al.</i> (2003)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Sidérite}$	+0,81‰ $+0,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$	Johnson <i>et al.</i> (2003) Wiesli <i>et al.</i> (2004)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Ferrihydrite}$	-0,9‰	Bullen <i>et al.</i> (2001)
$\text{Fe(III)}_{\text{aq}} - \text{Hématite}$ (98°C) (équilibre) (cinétique)	+1,3‰ $-0,1 \pm 0,2 \text{ ‰}$ $-1,32 \pm 0,12 \text{ ‰}$	Polyakov and Mineev, (2000) Skulan <i>et al.</i> (2002) Skulan <i>et al.</i> (2002)
Adsorption		
$\text{Fe(II)}_{\text{sorbé}} - \text{Fe(II)}_{\text{aq}}$: goethite goethite hématite hydroxyde de fer	+1,5‰ $+0,86 \pm 0,17 \text{ ‰}$ $+0,38 \pm 0,10 \text{ ‰}$ +0,3‰ +2‰	Icopini <i>et al.</i> (2004) Crosby <i>et al.</i> (2005) Crosby <i>et al.</i> (2005) Teutsch <i>et al.</i> (2005) Johnson <i>et al.</i> (2005)

Tous les résultats ont été obtenus pour des expériences menées à température ambiante (20 °C) sauf pour $\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Hématite}$ qui a été faite à 98 °C et $\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{FeS}$ qui ont été faites entre 2 et 40 °C.

B. PROCESSUS DE FRACTIONNEMENT BIOLOGIQUE

L'ensemble des processus biologiques d'oxydoréduction et de précipitation de minéraux de fer peut conduire à des fractionnements isotopiques.

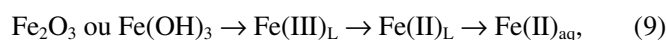
1. Réduction Dissimilaire du Fer (DIR)

Parmi l'ensemble des processus biologiques au cours desquels le fer peut être modifié, l'étude expérimentale de la réduction dissimilaire de Fe(III) , qui sera noté DIR par la suite, est celle qui a reçu la plus grande attention. De plus, ce processus semble être primordial dans l'histoire de la Terre et des formations minérales de fer puisque la DIR pourrait être une des formes de respiration primaire à la surface de la Terre (Yamaguchi *et al.*, 2005).

Selon les expériences de Johnson *et al.* (2004), le fractionnement des isotopes du fer lors de la réduction de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ est opposé à celui de l'oxydation du fer, mais d'intensité similaire. Ces résultats sont cohérents avec les observations générales sur les réactions redox qui produisent les fractionnements les plus importants sur les isotopes du fer et qui peuvent être réversibles (Polyakov & Mineev, 2000; Schauble *et al.*, 2001).

a. Mécanisme de la DIR

On entend par DIR un ensemble de plusieurs réactions conduisant à un nouveau produit solide à partir d'un solide de départ. Ainsi la DIR se compose d'une phase de dissolution, d'une phase de réduction et enfin d'une phase de précipitation regroupées dans la réaction (9) :



$\text{Fe(III)}_{\text{L}}$ et Fe(II)_{L} étant des espèces de fer complexées à des ligands. Les fractionnements isotopiques du fer peuvent donc avoir lieu lors de chacune de ces étapes et des phénomènes tels que la sorption d'espèces aqueuses sur les solides peuvent aussi être envisagés.

Selon Johnson *et al.* (2004), le fractionnement isotopique du fer peut se produire pendant la DIR tout d'abord lors de la dissolution (Δ_1 , Figure 4), puis lors de la réduction (Δ_2 , Figure 4). Il est aussi possible que le fractionnement isotopique se produise entre $\text{Fe(III)}_{\text{L}}$ et le substrat de Fe(III) (Δ_3 , Figure 4), bien que l'échange isotopique avec les solides à basses températures soit relativement lent. Enfin, le fractionnement isotopique peut avoir lieu entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et Fe(II) adsorbé à la surface du substrat ferrique (Δ_4 , Figure 4), puis entre les espèces de Fe(II) adsorbées à la surface du solide et les particules de Fe(III) réactives sur cette même surface (Δ_5 , Figure 4).

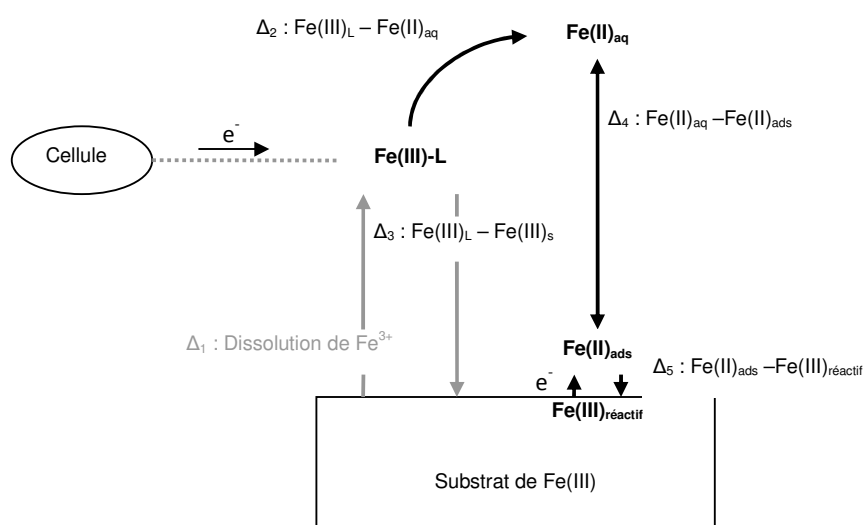


Figure 4 : Schéma du fractionnement isotopique du fer pendant la DIR (d'après Crosby *et al.*, 2005).

b. Produits solides issus de la DIR

Dans leurs premières études, Beard *et al.* (1999) ont mentionné des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ de Fe(II) dissous produit par les bactéries réductrices du fer fractionnées d'environ -1,3‰ par rapport au substrat de ferrihydrite. Ces résultats ont ensuite été étendus à différentes bactéries de DIR, conditions de croissance et substrats (Beard *et al.*, 2003a; Icopini *et al.*, 2004; Crosby *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005). Johnson *et al.* (2005), ont notamment montré que pour des vitesses de réactions élevées, le Fe(II) produit présente des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ qui sont inférieures à celles du substrat ferrique de plus de 2,6‰. Des fractionnements significatifs ont été rapportés entre Fe(II) dissous et magnétite ou sidérite, produites par des bactéries réduisant le fer (Johnson *et al.*, 2005).

Le fractionnement isotopique du fer entre le Fe(II)_{aq} et la magnétite, la goethite ou les carbonates de fer calculés et mesurés, varient entre -2,4‰ et +3,5‰ selon les auteurs, et jusqu'à -4‰ pour les prédictions théoriques, ce qui représente une gamme de variations importantes par rapport à ce qui a été vu jusqu'à présent pour les précipitations abiotiques de sédiments.

Le fractionnement isotopique d'équilibre mesuré pour l'hématite pendant la DIR ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}-\text{magnétite}} = -1,3‰$, Johnson *et al.*, 2005), est relativement semblable au facteur de fractionnement isotopique déterminé à partir des échantillons naturels ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}-\text{magnétite}} = -2,4‰$, Johnson *et al.*, 2003) mais diffère cependant du fractionnement mesuré avec les bactéries magnétotactiques (cf. § III.B.3.). Le fractionnement isotopique existant entre Fe(II) et la goethite ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}-\text{goethite}} = -0,93‰$, Crosby *et al.*, 2005) est moins important que pour la magnétite. De même, ce fractionnement est relativement faible dans des sols naturels ($\Delta^{56}\text{Fe} = -0,37‰$, (Thompson *et al.*, 2007)) et reflète, selon ces auteurs, une reprécipitation du fer et une complexation organique du fer dans ces sols riches en matière organique.

Les fractionnements isotopiques existant pendant la DIR entre Fe(II)_{aq} et les carbonates de fer déterminés d'après les prévisions et les données naturelles, s'étendent sur une large gamme de valeurs, de $\Delta^{56}\text{Fe} = -0,7‰$ à $\Delta^{56}\text{Fe} = +3,5‰$ (Polyakov & Mineev, 2000; Schauble *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003). Ainsi, le fractionnement d'équilibre $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-sidérite}}$ est proche de zéro pour la sidérite pure formée en présence de bactéries (Johnson *et al.*, 2005) alors que Wiesli *et al.* (2004) ont estimé ce fractionnement à +0,5‰ dans les systèmes abiotiques. En revanche, les fractionnements cinétiques $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-sidérite}}$ produits pendant la DIR sont supérieurs d'environ 1‰ aux fractionnements d'équilibre (Johnson *et al.*, 2005). Ceci suggère que les changements de liaisons et les distorsions peuvent produire des effets significatifs sur les isotopes du fer.

En plus de la formation pendant la DIR de magnétite et sidérite biogéniques contenant du Fe(II), des solides intermédiaires de Fe(II) non magnétiques et non carbonatés (notés Fe(II)-NMNC dans la littérature et par la suite) (Fredrickson *et al.*, 1998; Roden *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2005) peuvent aussi être produits et avoir une influence forte sur les compositions isotopiques de Fe(II)_{aq}. En effet, le fractionnement cinétique résultant de la formation de ces phases intermédiaires est de l'ordre

de $\Delta_{\text{Fe(II)aq-Fe(II)-NMNC}} = +1\text{‰}$. En revanche, le fractionnement d'équilibre entre Fe(II)-NMNC solide et Fe(II)_{aq} est proche de zéro (Johnson *et al.*, 2005).

Certains oxydes de fer formés selon un processus de DIR et présentant des similarités structurales avec des échantillons de Mars ont une composition isotopique comprise entre $\delta^{56}\text{Fe} = +0,9\text{‰}$ et $\delta^{56}\text{Fe} = -2,0\text{‰}$ (Chan *et al.*, 2006; Severmann *et al.*, 2006). Ces valeurs seraient le résultat d'une activité bactérienne et non d'un procédé de Rayleigh, comme le suggérait initialement Balci *et al.* (2006).

c. Effets de la sorption

La sorption de Fe(II)_{aq}, qu'elle se produise à la surface des bactéries ou sur les solides, peut conduire à un fractionnement isotopique du fer (Johnson *et al.*, 2004 et références citées). Ainsi, la sorption rapide de Fe(II)_{aq} dans les premières étapes de la DIR est accompagnée par un fractionnement cinétique significatif (de l'ordre de 2‰), qui tend vers un équilibre isotopique au cours du temps (Icopini *et al.*, 2004 ; Johnson *et al.*, 2004). Néanmoins, Crosby *et al.* (2005) ont montré un faible fractionnement isotopique entre Fe(II) adsorbé à la surface des oxydes et Fe(II)_{aq} ($\Delta^{56}\text{Fe} = -0,38 \pm 0,10\text{‰}$).

La minéralogie semble aussi jouer un rôle important dans les fractionnements isotopiques du fer puisque l'adsorption peut conduire à un fractionnement isotopique de -1,5 à -0,3‰ entre Fe(II)_{aq} et Fe(II)_{sorbé} en fonction de l'hydroxyde de fer considéré (Icopini *et al.*, 2004; Crosby *et al.*, 2005). Quelle que soit la phase solide, le fer adsorbé à sa surface est systématiquement enrichi en isotopes lourds, mais le fractionnement isotopique est plus faible pour l'hématite ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-Fe(II)ads}} = -0,38 \pm 0,10\text{‰}$, Crosby *et al.*, 2005) que pour la goéthite ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-Fe(II)ads}} = -1,5$ à $-0,69\text{‰}$, Icopini *et al.*, 2004 et Crosby *et al.*, 2005).

La DIR résulte donc en la perte préférentielle d'isotopes légers de fer pour un système ouvert (Thompson *et al.*, 2007).

2. Oxydation bactérienne du fer

Bien que l'oxydation chimique de Fe(II) soit thermodynamiquement favorisée lors de l'interaction de fluides réduits avec des eaux oxygénées, l'oxydation bactérienne de Fe(II) peut dominer dans des environnements microaérés ou anoxiques (Dauphas & Rouxel, 2006). A la différence de la DIR, les recherches sur le fractionnement isotopique produit par l'oxydation bactérienne du fer, aussi appelée oxydation photosynthétique anaérobie de Fe(II) (APIO, de l'anglais Anaerobic Photosynthetic Iron Oxidation) sont bien moins nombreuses que pour la DIR. Le processus de cette oxydation peut être décrit par la réaction suivante :



Bien que le processus global puisse paraître similaire à l'oxydation abiotique de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$, il est important de remarquer que dans le premier cas la réaction a lieu en l'absence d' O_2 et met en jeu des sites de liaison biologiques, alors que dans le second cas, il s'agit d'une oxydation inorganique de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ par l'oxygène. Dans le cas présent, Fe(II) et Fe(III) sont solubles pendant l'oxydation qui a lieu dans la membrane externe ou à la surface des bactéries. Les environnements de liaison peuvent donc être suffisamment distincts par rapport à une simple solution aqueuse de Fe(II) et Fe(III) , augmentant la possibilité qu'un fractionnement isotopique produit pendant l'APIO soit différent de ceux mesurés entre $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ dans les solutions abiotiques.

Les fractionnements possibles du fer lors de l'APIO sont représentés sur la Figure 5 (Croal *et al.*, 2004, complété par Johnson *et al.*, 2004). Le fractionnement isotopique peut se produire lors de l'oxydation du fer entre $\text{Fe(III)}_{\text{L}}$ et Fe(II)_{L} (Δ_1 , Figure 5), du fait du fractionnement important qui a lieu entre les couples d'oxydoréduction. La formation des (hydr)oxydes de Fe(III) comme produit de réaction peut aussi être accompagnée d'un fractionnement isotopique du fer (Δ_2 , Figure 5). Enfin, il est possible qu'un échange isotopique se produise entre les précipités d'hydroxyde ferrique et $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ (Δ_3 , Figure 5). Un tel échange étant probablement facilité si le précipité est sous une forme faiblement cristallisée, par exemple la ferrihydrite, et dont les cristaux sont relativement petits, du fait des faibles vitesses d'échanges isotopiques entre le fer aqueux et les oxydes à basses températures (Poulson & John, 2003).

Les fractionnements isotopiques entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{ppt}}$ observés lors de l'APIO sont de l'ordre de $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-Fe(III)ppt}} = -1,5 \pm 0,2\text{‰}$ (Croal *et al.*, 2004). Ce fractionnement a deux interprétations possibles (Johnson *et al.*, 2004) : (1) il peut traduire un fractionnement isotopique du fer entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ de $-1,5\text{‰}$ si $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)aq-Fe(III)ppt}}$ est nul, (2) un processus en deux étapes, où le fractionnement de $-2,9\text{‰}$ se produit entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$, accompagné d'un fractionnement de $+1,4\text{‰}$ entre $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{ppt}}$, ce qui donne un fractionnement global de $-1,5\text{‰}$. Ceci serait relativement cohérent avec le fractionnement isotopique de Rayleigh de $-2,2\text{‰}$ déterminé pour l'oxydation de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ en $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ par Balci *et al.* (2006).

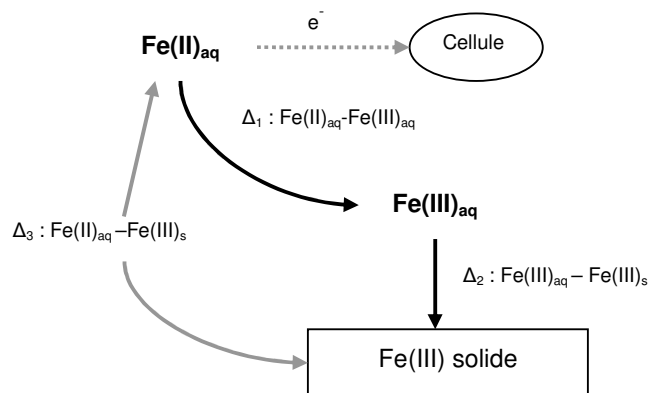


Figure 5 : Schéma du fractionnement isotopique du fer pendant l'APIO (d'après Johnson *et al.*, 2004)

L'oxydation bactérienne de Fe(II) , produit donc un (hydr)oxyde de Fe(III) enrichi en isotopes lourds par rapport à $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$, ce qui est cohérent avec un fractionnement d'équilibre entre Fe(II) et Fe(III) (Welch *et al.*, 2003), même si le facteur de fractionnement est plus élevé que pour l'oxydation abiotique de Fe(II) (Bullen *et al.*, 2001) et plus faible que pour un fractionnement d'équilibre entre espèces dissoutes $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ (Welch *et al.*, 2003 ; Anbar *et al.*, 2005). Ceci peut provenir des effets cinétiques lors de la précipitation d'oxyhydroxydes de Fe(III) (notés $\text{Fe(III)}_{\text{ppt}}$). Ainsi, Balci *et al.* (2006), comme Welch *et al.* (2003) et Johnson *et al.* (2002) avant eux, confirment que le fractionnement isotopique entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ est principalement contrôlé par l'équilibre qui existe entre les espèces aqueuses ($\text{Fe}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_{6-x}(\text{OH})_x^{(3-x)+}$).

Les fractionnements entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{ppt}}$ observés lors de l'oxydation de Fe(II) par des bactéries acidophiles (Balci *et al.*, 2006), l'oxydation de Fe(II) par des bactéries photoautotrophes anaérobies (Croal *et al.*, 2004) et la réduction dissimilaire de Fe(III) par des bactéries anaérobies (Beard *et al.*, 2003a) sont semblables à ceux produit par l'oxydation abiotique de Fe(II) en présence d'oxygène à des pH proches de la neutralité (Bullen *et al.*, 2001). Les isotopes du fer seuls ne permettent donc pas de jouer le rôle de biosignature. De plus, lorsque l'oxydation microbienne est faible, elle peut être masquée par un équilibre isotopique rapide et ne plus être visible. Il devient alors difficile d'identifier une biosignature du fer du fait de son recouvrement possible par des processus abiotiques.

3. Bactéries magnétotactiques

Les bactéries magnétotactiques sont des procaryotes anaérobies qui participent à la transformation chimique d'espèces de Fe et S par des processus redox et de précipitation de minéraux. Ces microorganismes précipitent, dans leur cytoplasme, des oxydes de fer ferromagnétiques (magnétite) ou des minéraux sulfurés de fer (greigite) qui leur permettent de se diriger en suivant les champs magnétiques terrestres. Les premières études sur les isotopes du fer dans la magnétite formée par ces bactéries ont montré qu'il n'y avait pas de fractionnement détectable que la source soit Fe(II) ou Fe(III) (Mandernack *et al.*, 1999). Ces résultats ne sont pas du tout en accord avec les travaux expérimentaux récents sur le fractionnement isotopique du fer lors de la formation de magnétite couplée à la réduction dissimilaire d'hydroxyde de Fe(III), selon lesquels il existe un fractionnement important entre le fer de la magnétite et celui du fluide (Johnson *et al.*, 2005). Cependant ceci n'exclut pas qu'il y ait un effet causé par les bactéries magnétotactiques puisque seulement un petit nombre d'expériences a été fait à ce jour ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-magnétite}} = -0,1 \text{ à } +0,2\text{‰}$, Mandernack *et al.*, 1999).

4. Action indirecte des bactéries : dissolution en présence de ligands organiques

Un fractionnement isotopique du fer significatif peut être produit lors de la dissolution de minéraux en présence de ligands organiques. Ainsi, lors de la dissolution de minéraux de fer en présence de sidérophores, le fractionnement isotopique entre Fe(II)_{aq} et Fe(III)_{ppt} est compris entre $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-Fe(III)ppt}} = -1,6$ et $-0,37\text{‰}$, en fonction du type de solide considéré (Brantley *et al.*, 2001) et peuvent atteindre des valeurs de fractionnement de $11,7\text{‰}$ entre des complexes de Fe(II) et Fe(III) pour certains ligands organiques (Matthews *et al.*, 2001).

La dissolution de l'hornblende produit un fractionnement de l'ordre de $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-Fe(III)ppt}} = -0,56 \pm 0,19\text{‰}$, alors qu'il atteint $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-Fe(III)ppt}} = -1,44 \pm 0,16\text{‰}$ dans le cas de la goéthite (Brantley *et al.*, 2001). Le fractionnement isotopique du fer observé lors de la dissolution de minéraux avec des ligands organiques est attribué à la rétention préférentielle des isotopes lourds sur une couche de surface altérée. La précipitation de solides résultant de l'altération et enrichis en isotopes lourds, peut aussi expliquer le fractionnement observé (Brantley *et al.*, 2004).

Des données expérimentales sur les fractionnements isotopiques du fer lors de la complexation du fer avec des ligands organiques confirment que la chimie de coordination du fer exerce un contrôle puissant sur son comportement isotopique et peut jouer un rôle primordial dans les systèmes naturels.

Tableau 2 : Résumé des fractionnements isotopiques pendant la formation biologique d'un minéral

Espèces	Cinétique Δ _{A-B}	Equilibre Δ _{A-B}	Références
Réduction dissimilaire de Fe(III) (DIR)			
Fe(II) _{aq} - FeCO ₃ (sidérite)	+1,2‰	+0,0‰	Johnson <i>et al.</i> (2005)
	+1,3‰	-0,1‰	Skulan <i>et al.</i> (2002)
	+0,5‰		Wiesli <i>et al.</i> (2004)
Fe(II) _{aq} - Ca _{0,15} Fe _{0,85} CO ₃	+2,2‰	+0,9‰	Johnson <i>et al.</i> (2005)
Fe(II) _{aq} - Fe ₃ CO ₄		-1,3‰	Johnson <i>et al.</i> (2005)
Fe(II) _{aq} - (hydr)oxyde de Fe(III)	-2,6‰	-1,3‰	Beard <i>et al.</i> (1999, 2003a) ; Johnson <i>et al.</i> (2005)
Fe(II) _{aq} - NMNC Fe(II) _(s)	+0,8‰	≈0‰	Johnson <i>et al.</i> (2005)
Fe(II) _{aq} - Fe(II) [HFO]	-2,1‰	≈0‰	Icopini <i>et al.</i> (2004) ; Johnson <i>et al.</i> (2005)
Fe(II) _{aq} – FeO(OH) (goethite)	-0,93‰		Crosby <i>et al.</i> (2005)
Fe(II) _{aq} - Fe ₃ O ₄ (magnétite)	-2,4‰ -1,3‰	-4,2‰	Johnson <i>et al.</i> (2003) Johnson <i>et al.</i> (2005)
Fe(III) _{aq} - Fe ₃ O ₄ (magnétite)	+1,7‰		Johnson <i>et al.</i> (2005)
Fe ₃ CO ₄ - FeCO ₃	+3,5‰	+1,3‰	Johnson <i>et al.</i> (2005)
Fe ₃ CO ₄ - Ca _{0,15} Fe _{0,85} CO ₃	+4,5‰	+2,2‰	Johnson <i>et al.</i> (2005)
Oxydation photosynthétique anaérobie de Fe(II) (APIO)			
Fe(II) _{aq} - ferrihydrite	-1,5‰		Croal <i>et al.</i> (2004)
Fe(II) _{aq} - ferrihydrite	-0,9‰		Bullen <i>et al.</i> (2001)
Bactéries magnétotactiques			
Fe(II) _{aq} - magnétite	-0,1‰		Mandernack <i>et al.</i> (1999)
Fe(III) _{aq} - magnétite	+0,2‰		Mandernack <i>et al.</i> (1999)

III. FRACTIONNEMENTS DES ISOTOPES DU FER DANS LES ENVIRONNEMENTS AQUEUX MODERNES

Dans ce qui précède, nous avons vu que le fer, 4^{ème} élément en abondance de la croûte terrestre, peut-être utilisé comme donneur ou accepteur d'électron par un certain nombre de microorganismes. Il peut également être utilisé par les bactéries photosynthétiques ce qui conduit à la production d'oxygène. D'importants dépôts de fer, sous forme de dépôts rubanés, les « Banded Iron Formations » (BIF's) datant de l'Archéen, attestent d'un cycle du fer et de son oxydation à une époque où l'atmosphère terrestre était dépourvue d'oxygène. La problématique de l'apparition de la vie et de l'oxygène sur terre renvoie donc à une meilleure compréhension du cycle du fer et à l'identification de biosignatures. La possibilité d'utiliser les isotopes stables du fer pour identifier ces biosignatures (Beard *et al.*, 1999) a suscité de nombreuses études dans les roches sédimentaires anciennes notamment celles où les fossiles ont été perdus par suite de processus métamorphiques. Dans le cadre de cette thèse, seuls les environnements aqueux modernes et plus particulièrement les drainages miniers acides ont été étudiés, mais un rapide aperçu des études faites dans le domaine des environnements actuels est fait dans la suite. Une revue de ces études dans les paléo-environnements aqueux qui sont hors du champ de cette thèse, est présentée par Rouxel *et al.* (2006).

Le fer est un élément réactif vis à vis des particules, présent à de très faibles concentrations (<1 nm) dans les eaux de surface océaniques. Les sources principales de Fe aux océans sont le dépôt atmosphérique sec et humide, l'apport par les rivières, les apports en provenance des sédiments sur le plateau continental et les sources hydrothermales. Le fer est un micronutriment qui joue un rôle clé dans la limitation de la production primaire océanique. Cela lui confère un rôle direct dans le contrôle de l'assimilation du CO₂ par le phytoplancton (Martin & Fitzwater, 1988; Martin *et al.*, 1990; Coale *et al.*, 1996). Les isotopes stables du fer peuvent permettre de mieux contraindre le cycle du fer en milieu océanique et mieux évaluer l'importance relative des sources d'apport en fonction de la localisation. Il faut signaler que la composition isotopique du fer dans les eaux océaniques est très peu documentée à ce jour, en raison de problèmes analytiques. Quelques données sur des mesures d'isotopes du fer dans l'océan ont récemment été publiée (Lacan *et al.*, 2008; Rouxel *et al.*, 2008). Cette revue de la composition isotopique du fer dans les principales sources d'apports aux océans (sources hydrothermales, sédiments, fleuves) s'inspire largement de celle publiée par Dauphas et Rouxel (2006).

A. LES SYSTEMES HYDROTHERMAUX MARINS

Des études sur la composition isotopique du fer des fluides hydrothermaux (Sharma *et al.*, 2001; Beard *et al.*, 2003b; Severmann *et al.*, 2004), des cheminées hydrothermales (Rouxel *et al.*, 2004) et des basaltes altérés (Rouxel *et al.*, 2003) ont révélé que les isotopes du fer étaient fractionnés lors des processus hydrothermaux à haute et basse température, et pourraient être d'utiles traceurs géochimiques dans ces environnements.

Les systèmes hydrothermaux dans les dorsales océaniques se forment lorsque l'eau de mer, qui pénètre dans la croûte océanique, est chauffée et réagit avec la roche ($T > 375\text{ °C}$ et conditions fortement réductrices). Cette eau remonte ensuite dans l'océan où se produit alors une précipitation massive de sulfures. Lors de l'interaction de l'eau de mer avec les basaltes, des quantités importantes de fer sont lixiviées de la croûte océanique (Figure 6).

Les fluides hydrothermaux issus de ces systèmes (communément appelés fluides MOR, de l'anglais Mid-Ocean Ridge) présentent des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ comprises entre $-0,60\text{‰}$ et $-0,12\text{‰}$, que ce soit pour les vapeurs ou les eaux (Sharma *et al.*, 2001; Beard *et al.*, 2003b; Severmann *et al.*, 2004). Par contre, les particules en suspension collectées à proximité et les sédiments métallifères prélevés au-dessous des sources hydrothermales présentent des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ relativement élevées comparativement aux fluides ($\delta^{56}\text{Fe} > +1,29\text{‰}$, (Severmann *et al.*, 2003)). La croûte basaltique, quant à elle, présente une composition isotopique hétérogène ($\delta^{56}\text{Fe} = -1,7$ à $+2,05\text{‰}$) et lors de l'altération de cette croûte, les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ augmentent avec la quantité de fer libérée, traduisant des fractionnements isotopiques cinétiques associés au relargage du fer (Rouxel *et al.*, 2003). L'oxydation partielle des fluides hydrothermaux avec les eaux de surface oxydées entraîne la formation de $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ plus lourd d'environ 3‰ et $1,5\text{‰}$ à 25 °C et 250 °C respectivement, par rapport à l'IRMM-14 (Markl *et al.*, 2006).

Les dépôts hydrothermaux peuvent être des oxydes de fer (hématite, goethite, ...), des sulfures ou des roches carbonatées avec dans ce cas des teneurs relativement faibles en fer (100-4000 ppm). La gamme de variation de composition isotopique du fer des sulfures, qui varie de $\delta^{56}\text{Fe} = -2\text{‰}$ à $\delta^{56}\text{Fe} = +1,2\text{‰}$ (Graham *et al.*, 2004; Severmann *et al.*, 2004; Rouxel *et al.*, 2005), est beaucoup plus importante que celle des hydroxydes de Fe(III) primaires ou secondaires, pour lesquels $\delta^{56}\text{Fe} = -1,5$ à $+0,9\text{‰}$ (Markl *et al.*, 2006) et des roches carbonatées, où $\delta^{56}\text{Fe} = -1,25$ et $-0,07\text{‰}$ (dont $\delta^{56}\text{Fe} = -1,25$ à $-0,27\text{‰}$ pour le Fe(II) , (Dideriksen *et al.*, 2005)).

Cependant, il existe de grandes variations en fonction du type de dépôt. Par exemple, les cristaux d'hématite primaire présentent des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ de $-0,49\text{‰}$ à $+0,53\text{‰}$, alors que les cristaux d'hématite secondaire présentent une grande disparité selon qu'ils résultent d'une altération à haute ($\delta^{56}\text{Fe} = +0,81\text{‰}$ à $+0,9\text{‰}$) ou basse ($\delta^{56}\text{Fe} = -1,5\text{‰}$ à $-0,58\text{‰}$) température (Markl *et al.*, 2006).

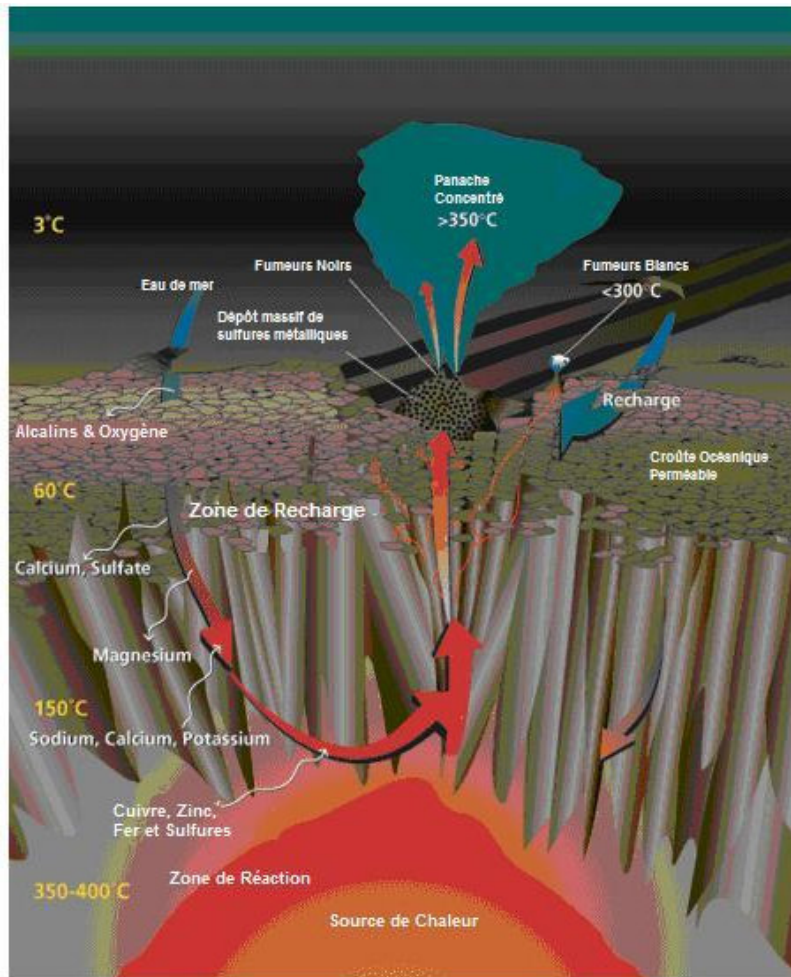


Figure 6 : Schéma de fonctionnement des systèmes hydrothermaux MOR (d'après (Humphris & McCollom, 1998))

Pour les sulfures hydrothermaux, des variations de minéralogie font apparaître des variations de composition isotopique, notamment entre la pyrite (FeS), et la chalcoppyrite (CuFeS_2) mais il n'y a pas de tendance générale pour discriminer les différentes phases solides. En effet, Rouxel *et al.* (2004) ont analysé des échantillons de pyrite ($\delta^{56}\text{Fe} = -2$ à -1‰), prélevés dans l'Océan Atlantique (système hydrothermal de Lucky Strike, $T > 100^\circ\text{C}$), beaucoup plus légers que ceux de chalcoppyrite ($\delta^{56}\text{Fe} = -0,8$ à $+0,4\text{‰}$) alors que la pyrite et la chalcoppyrite associées aux minerais hydrothermaux Cu-Au issus de dépôts de Nouvelle-Guinée montrent des résultats contraires ; les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ pour la pyrite ($\delta^{56}\text{Fe} = -0,25$ à $+1,2\text{‰}$) sont plus élevées que pour la chalcoppyrite ($\delta^{56}\text{Fe} = -2,0$ à $-0,3\text{‰}$) (Graham *et al.*, 2004).

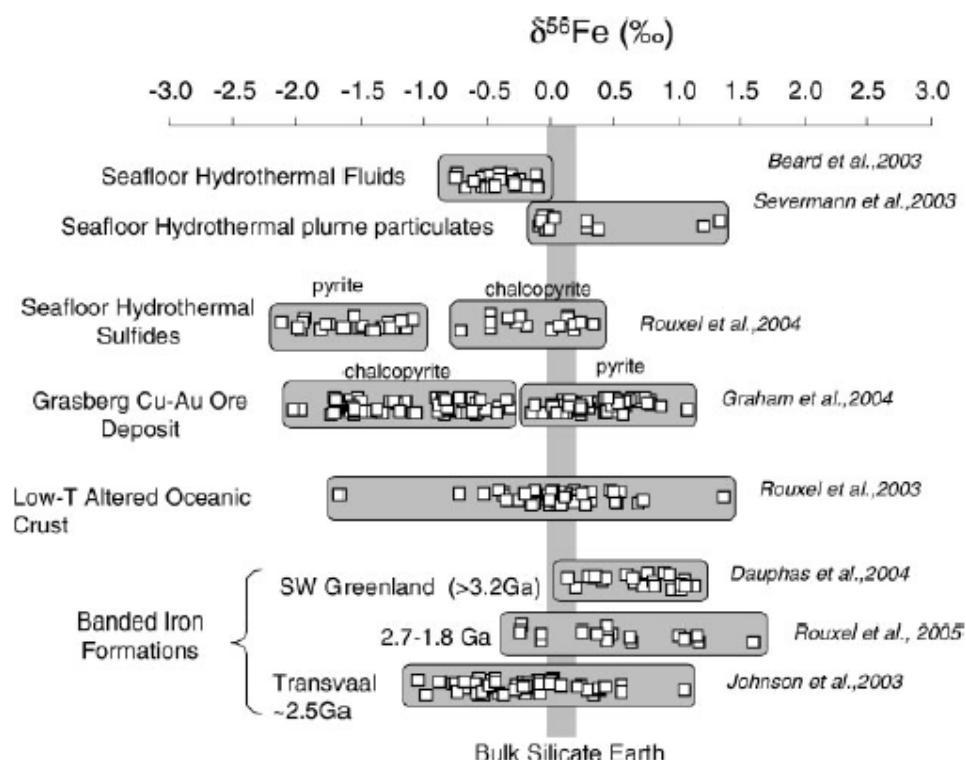


Figure 7 : Résumé des compositions isotopiques du fer dans les systèmes hydrothermaux, les roches océaniques et les BIF (d'après Dauphas et Rouxel, 2006)

B. LES SEDIMENTS ET DEPOTS MARINS

Les sédiments marins (tels que les argiles pélagiques) ont des compositions isotopiques relativement homogènes, proches de celles des roches ignées et des loëss ou des aérosols (Figure 7), avec des variations ne dépassant pas 0,3‰. Ceci suggère que l'altération continentale, le transport et le dépôt ne modifient pas la composition isotopique de la phase solide de manière significative.

Des compositions variables sont observées dans les croûtes et les nodules de ferromanganèse (notés par la suite Fe-Mn) avec $\delta^{56}\text{Fe} = -1,4$ à $+0,7\text{‰}$ par rapport à l'IRMM-14 (Zhu *et al.*, 2000; Rouxel *et al.*, 2003; Levasseur *et al.*, 2004). Cette composition hétérogène pourrait refléter une variabilité de la composition des sources de fer aux océans au cours du temps. Beard *et al.* (2003b) ont suggéré que ces valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ étaient contrôlées par les flux de fer provenant des particules d'aérosols en suspension ($\delta^{56}\text{Fe}$ autour de 0‰) et de fluides hydrothermaux issus des arêtes océaniques ($\delta^{56}\text{Fe}$ autour de -0,5 à -1‰). Cependant, les observations de Levasseur *et al.* (2004), sur les variations de compositions isotopiques des croûtes Fe-Mn pour un même site d'échantillonnage, ne présentent pas de tendance générale, discréditant l'hypothèse d'un contrôle par les contributions relatives des sources de fer. Les variations observées seraient donc plutôt dues à des effets locaux tels

que remobilisation du fer lors de la diagenèse et/ou effets cinétiques lors de la précipitation de ces solides de Fe-Mn (Levasseur *et al.*, 2004).

Dans les environnements marins anoxiques ou faiblement oxiqes, la réduction de sulfates ou de Fe(III) par des voies bactériennes sont les voies dominantes pour l'oxydation de la matière organique (Dauphas & Rouxel, 2006). Dans ces sédiments, les fluides diagénétiques de Fe(II) apparaissent très enrichis en isotopes légers ($\delta^{56}\text{Fe} < -2\text{‰}$, (Severmann *et al.*, 2004)). Dans les eaux interstitielles des sédiments du plateau continental Amazonien, les compositions isotopiques sont en moyenne de $\delta^{56}\text{Fe} = -0,08\text{‰}$, mais des valeurs plus négatives ($\delta^{56}\text{Fe} = -1,27\text{‰}$) sont parfois observées (Bergquist & Boyle, 2006).

Les compositions isotopiques en fer d'échantillons de roche et notamment de la pyrite présentent une gamme importante de variation. La pyrite issue de sédiments riches en matière organique, présente des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ allant de 0 à -1‰ (Beard, 2003; Matthews *et al.*, 2004), voire de $+1$ à $-3,5\text{‰}$ pour la pyrite de l'Archéen, du Paléoprotérozoïque (Rouxel *et al.*, 2005; Fehr *et al.*, 2008) et de la roche mère (Yamaguchi *et al.*, 2005), ou de $\delta^{56}\text{Fe} = -1,1 \pm 0,2\text{‰}$ pour des échantillons de pyrite issus de sédiments de la Mer Baltique (Fehr *et al.*, 2008). Ces valeurs sont proches des valeurs déterminées dans les sédiments réduits de la marge continentale Californienne par Severmann *et al.* (2006) ($\delta^{56}\text{Fe} = -0,8 \pm 0,2\text{‰}$).

C. APPORT FLUVIAL

Il est attendu que les processus d'altération conduisent à l'enrichissement des eaux de rivières en isotopes légers. En effet, le fer issu de la fraction échangeable des sols (Fantle & DePaolo, 2004), d'une lixiviation organique ou d'une dissolution microbienne est enrichi en isotopes légers par rapport au minéral de départ (Brantley *et al.*, 2001; Brantley *et al.*, 2004; Icopini *et al.*, 2004). Dans les rivières, une variabilité importante des compositions isotopiques des eaux et des particules en suspensions est observée (Figure 8). Les compositions isotopiques sont comprises, pour les eaux, entre $\delta^{56}\text{Fe} = -1$ et $+0,44\text{‰}$ et entre $\delta^{56}\text{Fe} = -1$ et $-0,21\text{‰}$ pour les sédiments.

Les résultats obtenus sur l'Amazone et le Rio Negro par Berquist et Boyle (2006) suggèrent un rôle important de la matière organique et des colloïdes dans les fractionnements isotopiques. Qu'il soit dissous ou particulaire, le fer est indifféremment enrichi en isotopes légers ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}} = -0,35$ à $-0,08\text{‰}$ par rapport à l'IRMM-14) dans les eaux de l'Amazone. Ceci est interprété par une contribution importante dans la phase dissoute de colloïdes (oxydes de Fe, argiles) présentant des signatures isotopiques comparables à celles de la phase particulaire. A l'inverse, dans le Rio Negro caractérisé par des eaux riches en carbone organique dissous, des pH comparativement plus faibles et une faible concentration en particules, les fractions dissoutes et particulaires présentent des compositions isotopiques différentes ($\delta^{56}\text{Fe} = +0,3\text{‰}$ pour le dissous et $\delta^{56}\text{Fe} = -1\text{‰}$ pour le particulaire). De même,

dans les rivières drainant des roches sédimentaires et volcaniques des Etats-Unis et du Canada, les eaux ont une composition isotopique comprise entre 0 et -1‰ par rapport aux roches ignées, alors que les sédiments ne sont pas ou peu fractionnés par rapport à ces roches ($\delta^{56}\text{Fe} = 0 \pm 0,3\text{‰}$) (Beard *et al.*, 2003b ; Fantle and DePaolo, 2004). Dans le Rio Negro, Bergquist et Boyle (2006) attribuent les différences observées à un fractionnement entre le Fe complexé par la matière organique en solution et celui associé à la matière organique particulaire.

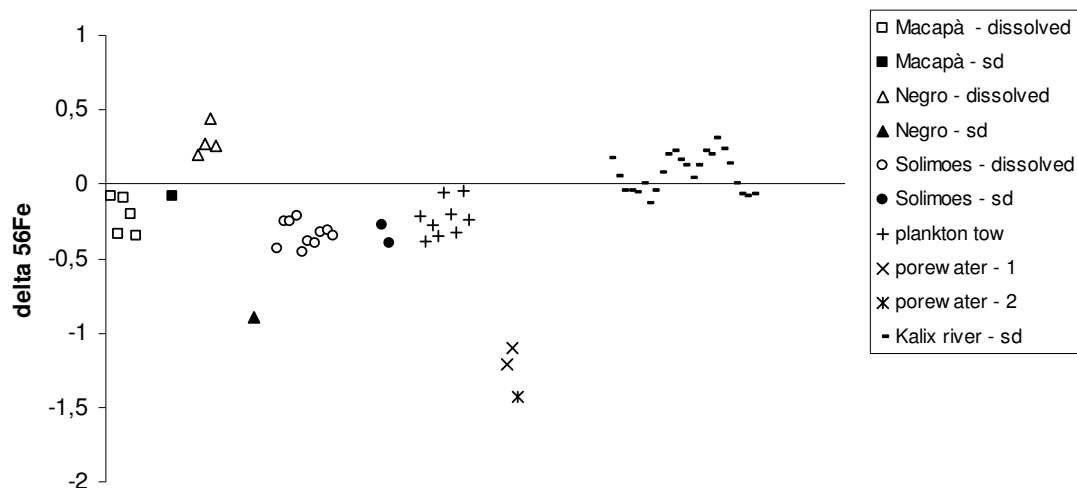


Figure 8 : Résumé des compositions isotopiques du fer dans les rivières. (d'après Bergquist and Boyle, 2006 pour l'Amazone et Ingri *et al.*, 2006 pour la Kalix river)

Dans les rivières boréales, une hétérogénéité de la composition isotopique des colloïdes ($0,13\text{‰} < \delta^{56}\text{Fe} \leq +0,31\text{‰}$) a été mise en évidence par (Ingri *et al.*, 2006). Elle est expliquée par la présence dans des proportions variables d'hydroxydes de Fe et de colloïdes organiques de Fe, ces derniers ayant des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ négatives. Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux de Brantley *et al.* (2001 ; 2004) qui suggèrent que le fer organique est en général plus léger que le fer inorganique de la phase particulaire et que le fer de la fraction échangeable est plus léger que le fer des oxydes de fer ($\Delta^{56}\text{Fe} \approx 0,6$ à 1‰).

En milieu estuarien, une floculation des oxyhydroxydes de Fe et généralement observée (Boyle *et al.*, 1977). Dans l'estuaire de l'Amazone, un appauvrissement de la phase dissoute en isotopes lourds est apparente (Bergquist & Boyle, 2006) ce qui traduit l'influence des colloïdes sur les signatures isotopiques de la fraction "dissoute".

En conclusion, comme le soulignent Rouxel & Dauphas (2006), même s'il est relativement mal contraint, l'apport de fer dissous aux océans est très probablement caractérisé par des $\delta^{56}\text{Fe}$ inférieurs à ceux de la croûte continentale moyenne.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des compositions isotopiques des minéraux sulfurés

Nature de l'échantillon	Composition isotopique	Référence	Source
Fluides hydrothermaux MOR – vapeurs et eaux	$\delta^{56}\text{Fe} = -0,39 \pm 0,13\text{‰}$	Roches Ignées	Sharma <i>et al.</i> , 2001, Beard <i>et al.</i> , 2003a
Dépôts de sulfures de MOR	$\delta^{56}\text{Fe} = -2,0 \text{ à } +0,2\text{‰}$	IRMM-14	Rouxel <i>et al.</i> , 2004
Particules en suspension de MOR	$\delta^{56}\text{Fe} > +1,2\text{‰}$	Roches Ignées	Severmann <i>et al.</i> , 2003
Pyrite (Mer Baltique)	$\delta^{56}\text{Fe} = -1,1 \pm 0,2\text{‰}$	IRMM-14	Fehr <i>et al.</i> , 2006
Pyrite (DIR)	$\delta^{56}\text{Fe} = -0,8 \pm 0,2\text{‰}$	Roches Ignées	Severmann <i>et al.</i> , 2006
Pyrite - Archéen	$\delta^{56}\text{Fe} = -3,5\text{‰}$	IRMM-14	Fehr <i>et al.</i> , 2006
Pyrite - Paléoproterozoïque	$\delta^{56}\text{Fe} = +1,2\text{‰}$	IRMM-14	Fehr <i>et al.</i> , 2006
Pyrite - BIF	$\delta^{56}\text{Fe} = -2,5 \text{ à } -1,4\text{‰}$	Roches Ignées	Johnson <i>et al.</i> , 2003a
Fer issu de BIF	$\delta^{56}\text{Fe} = -2,5 \text{ à } +1,1\text{‰}$	Roches Ignées	Johnson <i>et al.</i> , 2003a
Pyrite (Jurassique)	$\delta^{56}\text{Fe} = -0,21\text{‰} \text{ à } -0,30\text{‰}$	IRMM-14	Matthews <i>et al.</i> , 2004
Pyrite (BIF)	$\delta^{56}\text{Fe} = -1,3\text{‰} \text{ à } -2,43\text{‰}$	Roches Ignées	Johnson <i>et al.</i> , 2003
Pyrite (expérimental)	$\delta^{56}\text{Fe} = -0,48\text{‰} \text{ à } +0,21\text{‰}$	IRMM-14	Butler <i>et al.</i> (2005)
Pyrrhotite (magmatique)	$\delta^{56}\text{Fe} = -0,35\text{‰} \text{ à } -1,08\text{‰}$	IRMM-14	Schuessler <i>et al.</i> , 2007
Pyrite (anoxique) Chalcopryrite (anoxique)	$\delta^{56}\text{Fe} = -0,01\text{‰} \text{ à } -0,30\text{‰}$ $\delta^{56}\text{Fe} = -0,3 \text{‰}$	IRMM-14	Dauphas <i>et al.</i> , 2006
Pyrite (MOR) Chalcopryrite (MOR)	$\delta^{56}\text{Fe} = -1,0 \text{ à } -2,0\text{‰}$ $\delta^{56}\text{Fe} = -0,8 \text{ à } +0,4\text{‰}$	IRMM-14	Rouxel <i>et al.</i> , 2004
Pyrite (Minerai Cu-Au) Chalcopryrite (Minerai Cu-Au)	$\delta^{56}\text{Fe} = -0,25 \text{ à } +1,2\text{‰}$ $\delta^{56}\text{Fe} = -0,3 \text{ à } -2,0\text{‰}$	IRMM-14	Graham <i>et al.</i> , 2004
Chondrules (silicates de fer)	$\delta^{57}\text{Fe} = +0,9 \text{ à } -2,0\text{‰}$	IRMM-14	Cohen <i>et al.</i> , 2006

PARTIE 2 :
BIOGEOCHIMIE DU
FER ET DE L'ARSENIC
DANS LES DMA

INTRODUCTION

Cette partie est consacrée à l'étude des processus biogéochimiques mettant en jeu le fer et l'arsenic dans les DMA.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les drainages miniers acides (DMA) sont des milieux extrêmes très acides qui présentent des concentrations particulièrement élevées en fer, mais aussi en métaux et métalloïdes toxiques tels que l'arsenic. Il a été mis en évidence à de nombreuses reprises que les microorganismes jouent un rôle capital dans ces milieux, notamment pour leur contribution dans les processus de remédiation naturelle.

Dans cette partie nous nous intéressons plus particulièrement au cas du Reigous (Gard, France), sur lequel nous avons effectué un suivi mensuel sur plusieurs années. Il s'agit d'un DMA émergeant d'un stock de déchets riche en pyrite, formé suite à l'exploitation d'une mine d'extraction de plomb et de zinc. Ce DMA présente, au niveau de sa source, des concentrations élevées en fer (de l'ordre de 2 g/l) principalement présent sous forme de Fe(II), en sulfates (jusqu'à 4 g/l) et en arsenic (environ 300 mg/l). Du fait des conditions particulières que l'on rencontre sur ce site, un minéral rare précipite dans le ruisseau : la tooéléite. Il s'agit d'un oxyhydroxysulfate de fer riche en As(III) de formule $\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dont une seule autre occurrence a été reportée dans le monde (Cesbron & Williams, 1992). Cette étude *in situ* est couplée à des expériences en réacteurs fermés. Ces expériences permettent de distinguer la contribution des différentes souches bactériennes et leur influence sur l'oxydation et la précipitation du fer.

Une étude plus complète du système a été menée en parallèle. L'impact du DMA sur une rivière alcaline est présenté en Annexe 1. De même que l'étude des populations bactériennes présentes sur ce site particulier est en cours. Quelques données sur la diversité des populations d'*Archaea* dans ce DMA sont déjà disponibles (cf. Annexe 2).

Cette partie est divisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre donne un aperçu de l'atténuation naturelle des concentrations en arsenic dans le Reigous. Des études préliminaires avaient montré une diminution des teneurs en arsenic dans ce ruisseau (Casiot *et al.*, 2003). Cette étude a permis de vérifier cette remédiation passive partielle de la contamination en arsenic mais aussi de mettre en évidence une saisonnalité des variations de concentrations en fer et arsenic observée à la fois dans les eaux mais aussi dans les solides qui précipitent dans le lit du Reigous. Les variations à grande échelle (sur l'année) dans les teneurs en fer et arsenic de la phase dissoute sont accompagnées de variations à plus petite échelle. Une variation de ces concentrations a aussi été mise en

évidence en relation avec les cycles jour-nuit. L'ensemble des résultats sont présentés sous forme d'un article soumis à *Journal of Environmental Monitoring*.

- Le deuxième chapitre s'intéresse à l'influence des cinétiques de réaction sur la formation de la tooéléite, de la schwertmannite et de la jarosite, qui sont des phases communément rencontrées sur notre site d'étude. Cette étude a été menée sur plusieurs séries d'expériences réalisées en réacteurs fermés avec des eaux prélevées *in situ* mais filtrées et inoculées avec différentes souches bactériennes du genre *Acidithiobacillus ferrooxidans* et différentes tailles d'inoculum. L'ensemble des résultats est présenté sous forme d'un article soumis à *Chemical Geology*.

**Chapitre 3 : L'atténuation naturelle des
concentrations en arsenic dans le Reigous
(Article n°1)**

Article n°1

Un aperçu actualisé de l'atténuation naturelle des concentrations en As dans le Reigous (Gard, France)

Marion Egal⁽¹⁾, Corinne Casiot⁽¹⁾, Guillaume Morin⁽²⁾, Françoise Elbaz-Poulichet⁽¹⁾, Marie-Ange Cordier⁽¹⁾, Odile Bruneel⁽¹⁾

Article soumis à Journal of Environmental Monitoring

RESUME

Les concentrations en Fe et As dans la phase dissoute et la phase particulaire ont été suivies sur une période de 4 ans le long du ruisseau Reigous, un drainage minier acide issu d'une ancienne mine d'exploitation de minerais de plomb et de zinc. Dans la phase dissoute, les concentrations en Fe (12-25 mmol/l), As (0,9-3,5 mmol/l) et SO_4^{2-} (10-70 mmol/l) présentent des variations saisonnières en relation avec les pluies, avec une augmentation des valeurs durant les mois les plus secs. Près de 30% de l'arsenic initialement présent en solution sous forme d'arsénite est coprécipité avec le fer dans les 30 premiers mètres du Reigous. La vitesse de piégeage de l'arsenic correspondante est de l'ordre de $3,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La composition minéralogique des précipités correspondants est caractérisée par des variations spatiales et saisonnières. Dans les 30 premiers mètres, il se forme un mélange de phase amorphe d'As(V)-Fe(III) et de tooéélite. Les sédiments déposés dans le lit du ruisseau proche de la source sont composés de ces deux phases. Les concrétions laminées, qui sont constituées de précipités autour de structures bactériennes, contiennent principalement de la tooéélite. Plus en aval, les oxydes de fer précédemment décrits sont remplacés par de la schwertmannite et de la ferrihydrite.

Les concentrations en Fe et As dissous varient de près de 10% pendant la journée du fait de la photoréduction des oxydes de fer.

An updated insight into the natural attenuation of As concentrations in Reigous Creek (southern France)

Marion Egal⁽¹⁾, Corinne Casiot⁽¹⁾, Guillaume Morin⁽²⁾, Françoise Elbaz-Poulichet⁽¹⁾, Marie-Ange Cordier⁽¹⁾, Odile Bruneel⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratoire HydroSciences, UMR 5569, Université Montpellier 1 & 2, CNRS-IRD, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France

⁽²⁾ Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés, UMR 7590, CNRS.Université Pierre et Marie Curie.Université Denis Diderot.IPGP, 140 rue de Lourmel, 75015 Paris, France

Abstract

Dissolved and particulate concentrations of Fe and As were monitored over a four-year period along Reigous creek, an acid mine drainage draining a former Pb-Zn mine. Dissolved concentrations of Fe (12-25 mmol/l), As (0.9-3.5 mmol/l) and SO_4^{2-} (10-70 mmol/l) exhibited seasonal variations related to rainfall with a increase during the driest months. About 30% of the As initially present in solution as arsenite was coprecipitated with Fe-oxides in the first 30 m of Reigous Creek. The corresponding As removal rate was $3.58 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

The mineralogy of corresponding precipitates was characterized by spatial and seasonal variations. In the first 30 m, amorphous As(V)-Fe(III) and tooeleite, were formed. Sediments deposited in the bed of the Creek close to the spring contained both types of solid phases. Laminated concretions, which consist of precipitates around bacterial structures, were mainly constituted of tooeleite. Further downstream, former Fe-oxide phases were replaced by schwertmannite and ferrihydrite.

Concentrations of dissolved Fe and As have been shown to vary up to 10% during the day as a result of photoreduction of Fe-oxide phases.

Introduction

Arsenic is a highly toxic element that is released into water by natural processes as well as by human activity (Smedley & Kinniburgh, 2002). The biogeochemical processes controlling the fate of As in water have consequently been widely studied in the past decade. These studies showed that As mobility is limited by its ability to bind to solid oxide phases such as Fe oxides and to a lesser extent to Al hydroxides (Masue *et al.*, 2007) and references therein).

In water, inorganic As occurs as arsenate (As(V)) and arsenite (As(III)). The adsorption of As onto Fe oxides depends on pH and on As speciation. Arsenate adsorbs strongly to iron-oxide surfaces in acidic and near-neutral-pH water (Dzombak & Morel, 1990; Waychunas *et al.*, 1993). Adsorption experiments by Raven *et al.* (1998) also indicated greater adsorption of arsenate than of arsenite at pH values below 6-7.5 with a relatively low initial As/Fe molar ratio (0.024-0.071). With a higher initial As/Fe ratio (1.18), arsenite adsorption is maximum at approximately pH 9 and greater than that of arsenate, which decreases continuously from pH 3 to 11.

Other parameters such as concentrations of the major ions and the nature of the Fe mineral phases also influence As sorption on Fe oxides (Raven *et al.*, 1998; Jain *et al.*, 1999; Pedersen, 2006; Banerjee *et al.*, 2008).

Mining of metal ores is a major source of As in water. Mining results in large quantities of sulphide-rich wastes that often contain high concentrations of As. The oxidation of these wastes by meteoric water generates As-rich acid mine drainage (AMD).

In AMD, the precipitation of Fe oxide phases occurs in the following sequence: jarosite $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, schwertmannite $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4$, ferrihydrite $\text{Fe}_5(\text{OH})_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, goethite $\alpha\text{-FeOOH}$, or lepidocrocite $\gamma\text{-FeOOH}$, as a function of rising pH (Bigham *et al.*, 1996a). These iron oxides are efficient in scavenging As by adsorption (Fukushi *et al.*, 2003b; Fukushi *et al.*, 2004; Jönsson & Sherman, 2008) or by coprecipitation (Carlson *et al.*, 2002; Morin *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2006). The reduction of Fe-oxides can release As into solution. In AMD surface water, conditions are generally oxidizing. However when the light energy reaches 7 W/m^2 (Karlsson *et al.*, 1995; Tate *et al.*, 1995) in natural water, iron photoreduction can take place, thereby promoting diel variations in dissolved arsenic concentrations (Fuller & Davis, 1989; Nimick *et al.*, 2005).

In Reigous Creek, which drains the tailing stock of the Carnoulès mine, intense removal of As through coprecipitation with Fe-oxides linked to bacterial activity was reported (Bruneel *et al.*, 2003; Casiot *et al.*, 2003; Duquesne *et al.*, 2003). Depending on the location, precipitation of Fe(III)-As(III) (tooeleite) nano-crystals and/or amorphous Fe(III)-As(V) was observed (Casiot *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2003). Based on one-year monitoring of water, these studies provided evidence for seasonal variations in As coprecipitation with Fe oxides, the highest As removal being recorded in winter.

In Mediterranean regions, hydrological conditions vary drastically from season to season and from year to year linked to climatic variability.

The present study was undertaken to better characterize the variability of dissolved As concentrations in Reigous Creek at different timescales and to gain more insight than was previously possible into the processes that control As removal in Reigous Creek.

To this end, the concentrations of As(III), As(V), total dissolved As (As_T), Fe(II) and total dissolved Fe (Fe_T) together with the main physicochemical parameters (temperature, rainfall, redox potential, light intensity, dissolved oxygen, SO_4^{2-}) were determined at different time scales (diurnal, seasonal, interannual). The concentrations of particulate As and Fe and the mineralogy of solid phases were also analysed.

Site description

The Carnoulès lead-zinc mine is located in southern France in the drainage basin of the Gardon d'Anduze, a tributary of the Rhône River (Fig. 1). The mine, which was abandoned in 1963, produced 1.2 MT of spoil material containing quartz, sulphide minerals, heavy metals (Pb, Zn, Tl) and As. The material was deposited behind a dam.

The hydrogeological and biogeochemical conditions of the Carnoulès spoil heaps that generate As-rich AMD have been characterized in several studies (Casiot *et al.*, 2003; Koffi *et al.*, 2003; Bruneel *et al.*, 2005). AMD is generated at the base of the tailings stock where oxygen-rich water that drains from the surroundings penetrates during rainfall events. The groundwater of the tailing stock is characterized by exceptionally high arsenic concentrations of up to 1 g/l.

The water emerges at the bottom of the dam forming the source of Reigous Creek, at a flow rate of 0.8 to 1.7 l s⁻¹. The water is acid (pH 2 – 3) and rich in dissolved iron and arsenic ([Fe] = 0.5 – 1 g l⁻¹; [As] = 50 – 350 mg l⁻¹) predominantly in the reduced forms, Fe(II) and As(III) (Casiot *et al.*, 2003). In the first 30 meters of the AMD, large amounts of Fe and As precipitate forming laminated orange to yellow concretions that accumulate around bacterial structures and contain up to 20% wt of As (Leblanc *et al.*, 1996).

Up to a distance of 30 m from the source (between station S and G), the addition of seepage water is negligible. At a distance of 150 m from its source, the Reigous receives water from a small Fe-rich tributary, the Ru Gal. Before the confluence with the Amous River 1.5 km downstream from its source, Reigous Creek also receives inputs from quarries and mine galleries.

Material and methods

The location of sampling stations in the Reigous Creek is shown in Figure 1. During the long term monitoring programme, water samples were taken monthly from November 2004 to 2008 at five stations located along Reigous Creek.

Precipitates were sampled over a period of 18 months between May 2006 and February 2008. Three different types of precipitates were collected: sediments (fine particles deposited at the bottom of the stream), laminated concretions made of sediments precipitated around bacterial structures, and

sediments that undergo periods of drying when they are temporarily out of the water during low flow periods.

Hourly variations in water physico-chemistry over a diurnal cycle were monitored during a 36 hr survey that was conducted at G station, on the 9th and 10th of May 2007.

The pH, temperature, conductivity and redox potential (Eh) were measured in the field with an Ultrameter™ model 6P (Myron L Company, Camlab, Cambridge). Dissolved oxygen (DO) was measured with CHEMets® tests (CHEMetrics, Calverton, USA) based on colorimetric detection after reaction of DO with indigo carmine for the 0-12 µg.g⁻¹ range and with rhodazine D for 0-1 µg.g⁻¹ range.

Water samples were filtered immediately after collection through 0.22 µm Millipore polycarbonate membranes fitted on Sartorius polycarbonate filter holders. One aliquot was immediately acidified to pH 1 with HNO₃ Merck Suprapur and stored at 4°C for the determination of total dissolved Fe (Fe_T). Another aliquot was taken for determination of Fe(II). It was buffered to pH 4.5 with an ammonium acetate/acetic acid buffer immediately after filtration and Fe(II) was complexed by adding 1 ml of a 0.5% (w/w) 1,10-phenanthroline chloride solution to 10 ml of sample (Rodier *et al.*, 1996). Samples for As speciation were preserved with 5% EDTA 0.25 M, as recommended by (Bednar *et al.*, 2002), and deep frozen until analysis. The samples for the determination of SO₄²⁻ were also deep frozen.

Total Fe was determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). Fe(II) concentrations were determined using spectrophotometry at 510 nm, and Fe(III) was calculated by the difference between total Fe and Fe(II).

Total arsenic was determined by Inductively Coupled Mass Plasma Spectrometry (ICP-MS, PQ 2+, VG-elemental, Fisons or X Series, Thermo). The elevated As concentrations required a dilution factor of 1000, and no interference due to ArCl was detected. ICP-MS was calibrated by calibrating peak intensity, acquired in peak jump mode, with standard solutions. ¹¹⁵In was used as internal standard to correct for changes in peak intensities due to instrumental drift.

Inorganic arsenic speciation analyses were carried out using anion-exchange chromatography (25 cm × 4.1 mm i.d. Hamilton PRP-X100 column with Varian ProStar gradient solvent delivery system) coupled to Hydride Generation (HG) (VGS 200, FISON, France) with Atomic Fluorescence Spectrometry (AFS) detector (Excalibur, PSA analytical, GB) (Casiot *et al.*, 2005). The detection limit was 0.17 µg/l for As(III) and 0.46 µg/l for As(V) with a precision of ≥ 5%.

Sulphate concentrations were determined after precipitation with BaCl₂ and stabilisation with polyvinyl-pyrrolidone by nephelometry with a spectrophotometer at 650 nm (Rodier, 1959).

The precipitates were dried under vacuum. They were then dissolved in a microwave oven using 10 ml of HNO₃ (Merck Suprapur) for 50 mg of SPM following the 3051 EPA protocol with slight modifications. The microwave oven programme consisted of two steps: increasing the temperature for 15 min from ambient to 500°C followed by a 15 minutes at 500°C. Total arsenic and Fe concentrations were determined by ICP-MS as described for the aqueous phase.

The mineralogical composition of the solid samples was determined by X-Ray powder diffraction (XRD) using Co K α radiation. Data were recorded over a 2θ range of $5 - 85^\circ$ with a step size of 0.03° . Samples were analyzed in continuous mode using a Panalytical X'Pert Pro MPD diffractometer equipped with an X'Celerator detector, counting 2 hours per sample.

Results

Monthly variations in water chemistry. The variations in the main physicochemical parameters (rainfall, pH, dissolved oxygen (DO), temperature (T), and SO_4^{2-} along the Reigous Creek are presented in Figure 2.

The mean annual rainfall in the Reigous basin during the study period was 660 mm. The distribution of monthly rainfall was typical of the Mediterranean climate, including long drought periods in summer and intense rainfall events especially in autumn (September to November) and to a lesser extent in spring (May).

The temperature of the water at the source of the Reigous varied slightly ($15.1 \pm 2.6^\circ\text{C}$). In Reigous Creek, the water temperature is affected by the air temperature resulting in a larger range of values.

Except at Reigous UC station, the Reigous water was generally acidic with mean values between 3.65 (station G) and 3.98 (station Gal). The variance of pH values was below 25%. At Reigous UC station, greater pH variations were observed, with pH values comprised between 2.82 and 8.35, the highest values being encountered during the driest months. This pattern of pH variations attests to the negligible contribution of AMD during the dry period due to evaporation between the source and Reigous UC station. It also indicates that the input of water is not contaminated by AMD.

DO concentrations in the water at Reigous source ranged from below the detection limit (0.1mg/l) to 2.7 mg/l, the highest values being observed after rainfall events. Dissolved oxygen increased sharply between S and G stations, indicating rapid oxygenation.

Sulphate concentrations ranged from 10 to 70 mmol/l in the water at the source. Concentrations decreased gradually along Reigous Creek. At Reigous UC station, they ranged between 0.001 and 0.016 mol/l. Seasonal variations were also observed with an increase in concentrations during the driest months.

The variations in dissolved Fe and As in Reigous Creek are presented in Figure 3. The variations in the concentrations of the two elements confirm those reported by Casiot et al. (2003). Dissolved Fe concentrations ranged from 12 to 25 mmol/l in water at the source. Concentrations decreased from the source to Reigous UC station where Fe concentrations were always below 0.84 mmol/l. Fe was mainly present in the reduced form with proportions of Fe(II) to total Fe varying from 70% to 90%. The Reigous UC station generally displayed higher proportions of Fe(III) than the other stations. Fe concentrations generally increased during the driest months and decreased as a result of intense rainfall events except at Reigous UC station where the reverse pattern was observed (*i.e.* lower values during the driest months).

In the water at the source, the concentrations of dissolved As ranged from 0.9 to 3.5 mmol/l. Arsenic concentrations decreased with distance from the source to values below 25 $\mu\text{mol/l}$ at Reigous UC station. Generally higher concentrations were observed during the driest months except at Reigous UC station, which displayed higher concentrations during the wet season.

The proportion of Fe(III) was generally negligible in Reigous Creek except at Reigous UC station where it reached 30%. In spring water, As(III) was generally predominant reaching 95% during dry periods (50% during rainy periods). In the first 150 m of the creek, the main As species was also As(III). Further downstream the proportion of As(V) increased to reach 70% at Reigous UC station.

Solid phase mineralogy and chemistry. Results of XRD analyses are presented in Figure 5. At station 1 and G, they indicate the presence of generally amorphous precipitates probably made of Fe(III)-As(V) (Morin *et al.*, 2003) except in July at S station where very small quantities of tooeleite were encountered. The structure of this Fe(III)-As(III) mineral has been described by (Morin *et al.*, 2007). At G station, our data revealed the presence of significant proportions of tooeleite throughout the year. These results are generally in good agreement with those reported by Morin *et al.* (2003). At the same stations, sediments sampled out of water were generally more crystallized than other sediments suggesting that ageing and/or dehydration of precipitates favour the formation of tooeleite. At Gal and Reigous UC stations, the presence of schwertmannite was observed, in agreement with the results of Casiot *et al.* (2005).

The mean chemical composition of precipitates is presented in Table 1. The mean proportion of As ranged between 2 and 20%, and that of Fe between 13 and 35%. As/Fe molar ratios at upstream stations (S, G and E) varied from 0.20 to 0.94 with an average of 0.61. The data did not indicate any influence of phase crystallinity and/or the speciation of As on the As/Fe ratio. Between S and G stations, the precipitates displayed significantly higher As/Fe ratios than the As/Fe ratio calculated using the quantities of As and Fe that disappeared from the aqueous phase, which were between 0.045 and 0.14 (Table 1). One explanation for this discrepancy is related to granulometric sorting of phases with different As/Fe ratios during sedimentation. At Gal and Reigous UC stations, the As/Fe ratios were generally lower than those upstream.

Diel variations in the main physicochemical parameters and As and Fe concentrations. The variations in the main physicochemical characteristics of water (pH, DO and T) over a 36-hr period are presented in Figure 6 together with light intensity data.

Diel variations in As and Fe concentrations were also evidenced in Reigous Creek, with an increase in Fe and As concentrations during the day and a decrease during the evening and the night (Fig. 6). The maximum difference in the concentrations of both elements between 12 am and 12 pm was around 10%. Between 30 and 50% of As was in the form of As(III). Interestingly, maximum As(III)/As(V) ratios were observed between 2 pm and 4 pm.

Discussion

In the first 30 m of the creek, the concentrations of dissolved As and Fe decreased sharply with an increase in the distance from the source. In this section of the creek, which receives negligible quantities of water from other sources, this decrease is due to Fe oxidation and As coprecipitation with Fe-oxides. The saturation indices of the water at the source as a function of pH are presented in Figure 7. The water was supersaturated with respect to all iron hydroxides studied. According to these calculations, jarosite precipitation would be expected to be below pH 3 whereas schwertmannite should form at pH>3 as generally observed in AMD (Bigham *et al.*, 1996a; Regenspurg *et al.*, 2004; Sanchez-España *et al.*, 2007a). However, our field observations did not conform to these calculations. In agreement with the previous observations of Morin *et al.* (2003), our study showed the precipitation of amorphous As(V)-Fe(III) or As(III)-Fe(III) solid phases and tooeleite in the first 40 m downstream from the source of Reigous Creek. This may be explained by the presence of high quantities of As, which prevent the formation of classical crystalline phases, as suggested by (Langmuir *et al.*, 2006). Bacteria that mediate redox reactions involving As and Fe in the system could also play a major role in determining the nature of the solid phase, as demonstrated by Duquesne *et al.*, (2003) and Egal *et al.* (submitted).

Beyond 30 m, Reigous Creek receives water from seepage and small tributaries, which are not influenced by AMD. This process results in the dilution of As. Unlike the phenomenon observed in the first 30 m of the creek, the formation of more common As-Fe phases such as As-rich schwertmannite and ferrihydrite was observed here.

At G station, concomitant diel variations in As and Fe in solution were observed. An increase in concentration characterized by a maximum at 12 am was observed, likely due to photoreduction of Fe-oxides phases which releases Fe(II) as reported elsewhere in acidic waters (Collienne, 1983; Sullivan *et al.*, 1998; McKnight *et al.*, 2001; Butler & Seitz, 2006; Gammons *et al.*, 2008). The maximum As(V)/As(III) ratio observed during the decreasing phase of As concentrations between 2 and 4 pm suggests that As(III) has a more rapid recombination (coprecipitation or adsorption) kinetic with Fe-oxides than As(V). This corroborates the results of Raven *et al.* (1998) who showed more rapid adsorption of As(III) on ferrihydrite in acidic (pH=4.6) water with a high (As/Fe molar ratio = 1.18) initial addition of As.

The quantity of As removed per litre of water in the first 40 m of Reigous Creek was calculated by the difference between the As concentrations at S and G stations. This quantity is proportional to the As concentration in the water at the source (Figure 8). The corresponding percentage of As removed from solution is constant (around 30%) over the year. This result, which was based on a longer observation period, does not corroborate the findings of Casiot *et al.* (2003) who showed a higher percentage of As removed from solution in the first 40 m of Reigous Creek in winter 2001 than in summer.

The mean rate of Fe(II) oxidation in the first 30 m between S and G stations was estimated giving the following equation:

$$r_{ox} = \Delta[\text{Fe(II)}] / \Delta t = ([\text{Fe(II)}]_{\text{Source}} - [\text{Fe(II)}]_{\text{COWG}}) / t \quad (3)$$

where r_{ox} is the oxidation rate and t is the travel time of the water (1080 s) between the two stations. The values found for r_{ox} ($3.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ on July 2008) are in good agreement with the value ($8 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$) reported by Sanchez-España *et al.* (2007) in a similar environment.

The precipitation rate of Fe(III) was identical to the Fe(II) oxidation rate since there was not build-up of Fe(III) in solution. Using a mean discharge at the source of 0.6 l/s, the corresponding quantity of Fe precipitated was 4 kg yr^{-1} . The mean rate of As removal between the two stations calculated in the same manner was $0.55 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$ yielding a quantity of As removed of 1.2 kg yr^{-1} .

Between Gal and Reigous UC stations, dilution processes added to coprecipitation contribute to a further decrease in the dissolved concentrations of As. At Reigous UC station, the dissolved As concentration was between 0.4 and 2.3% of that measured at the source of Reigous Creek.

Conclusion

The four year period of monthly monitoring of both As and Fe concentrations and the main physicochemical parameters in Reigous Creek which drains the tailings stock of the former Pb-Zn mine of Carnoulès evidenced an increase in As concentration in the AMD source during the dry season.

In the first 30 m of the creek, monitoring confirmed previous results obtained during a shorter observation period, which showed intense removal of As by coprecipitation with Fe-oxides. However unlike previous observations, results of the present study showed that the percentage of As removed from solution was constant at around 30%. The corresponding rate of As removal rate was $3.58 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

The As-Fe rich precipitates that are deposited in the bed of this section of Reigous Creek consist of tooeleite As(III)-Fe(III) and/or amorphous As(V)-Fe(III). Seasonal variations in sediments were observed with the appearance of tooeleite during the coldest months. Laminated concretions were mainly made up of this tooeleite whatever the period of the year.

Diel cycles of dissolved As and Fe concentrations were linked to photoreduction of Fe-oxides. Fluctuations in dissolved As concentrations between midday and night were about 10%.

Beyond 30 m, the combination of both dilution and adsorption/coprecipitation processes led to a further decrease in As concentrations. The formation of more conventional Fe-oxide phases such as schwertmannite and ferrihydrite was observed. Upstream from the confluence with the Amous River the concentrations were between 0.4 to 2.4% of those observed at the source of Reigous Creek.

This study also showed that the decrease in the concentration of As was significant in AMD impacted water. Nevertheless a significant quantity of highly contaminated sediments was produced and transported downstream during floods.

Acknowledgements

This study benefited from the financial support of the INSU through the ECODYN and EC2CO programmes. The publication is a contribution of the OSU-OREME.

Figure captions

Figure 1: Location of the study area and of sampling stations along Reigous Creek

Figure 2: Monthly variations in the main physicochemical parameters (a) Daily rainfall over the tailing stock, (b) Temperature of Reigous water (T), (c) pH, (d) dissolved oxygen (DO), (e) concentrations of dissolved sulphate

Figure 3: Monthly variations in As and Fe concentrations in Reigous Creek (a) total dissolved Fe, (b) total concentrations of dissolved As, (c) total concentrations of dissolved Fe and As at Reigous UC station

Figure 4: Monthly variations in the proportion of (a) Fe(III) and (b) As(III) in Reigous Creek

Figure 5: XRD spectrum of Reigous Creek precipitates

Figure 6: Diel variations in (a) Light Intensity (LI), Dissolved Oxygen (DO) and Temperature (T); (b) Dissolved Fe and As; (c) As(V)/As(III)

Figure 7: Saturation indices of main Fe-minerals as a function of pH in the water at the source of Reigous Creek. The saturation indices for all Fe-containing minerals were adjusted to one Fe atom per formula unit (Gammons *et al.*, 2008). The following stability constants were used:

H-jarosite, $\log K = -5.39$ (Sarmiento, 2007)

H-jarosite, $\log K = 12.1$ (Sarmiento, 2007)

Ferrihydrite, $\log K = 4.89$ (Bigham *et al.*, 1996a)

Schwertmannite1, $\log K = 18$ (Bigham *et al.*, 1996b)

Schwertmannite2, $\log K = 10.5$ (Yu *et al.*, 1999)

Arsenical schwertmannite, $\log K = 13.5$ (Regenspurg, 2002)

Figure 8: Quantity of As removed from solution between S and G stations (Asppt) as a function of the total concentration of dissolved As at S station (Asaq).

Sampling stations	Faciès	% As			% Fe			As/Fe			Mineralogy
		mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	
S	sediments	15	12	19	23	20	30	0,58	0,54	0,69	Am As(III)- Fe(III) / Am- As(V)-Fe(III)
	laminated concretions	16	12	19	28	24	33	0,62	0,49	0,71	
	<i>out-of-water sediments</i>	6	4	7	12,6			0,25	0,20	0,34	
E	SEM										
	sediments	15	13	17	26	21	32	0,57	0,39	0,71	Too
	laminated concretions	15	11	23	27	24	33	0,56	0,43	0,82	Too
	out-of-water sediments	17	11	22	22	16	29	0,74	0,45	0,90	Too
G	sediments	15	11	21	21	13	29	0,74	0,60	0,92	Am As(V)- Fe(III)
	out-of-water sediments	20	14	23	23	18	27	0,83	0,70	0,94	Too
GAL	sediments	12	7	18	31	20	37	0,35	0,18	0,39	Schw
ReigousUC	sediments	2	0	3	35	24	43	0,05	0,02	0,10	Schw / Fh

Table 1: Mean chemical composition and mineralogy of different precipitates recovered in the bed of the Reigous Creek.

Figure 1

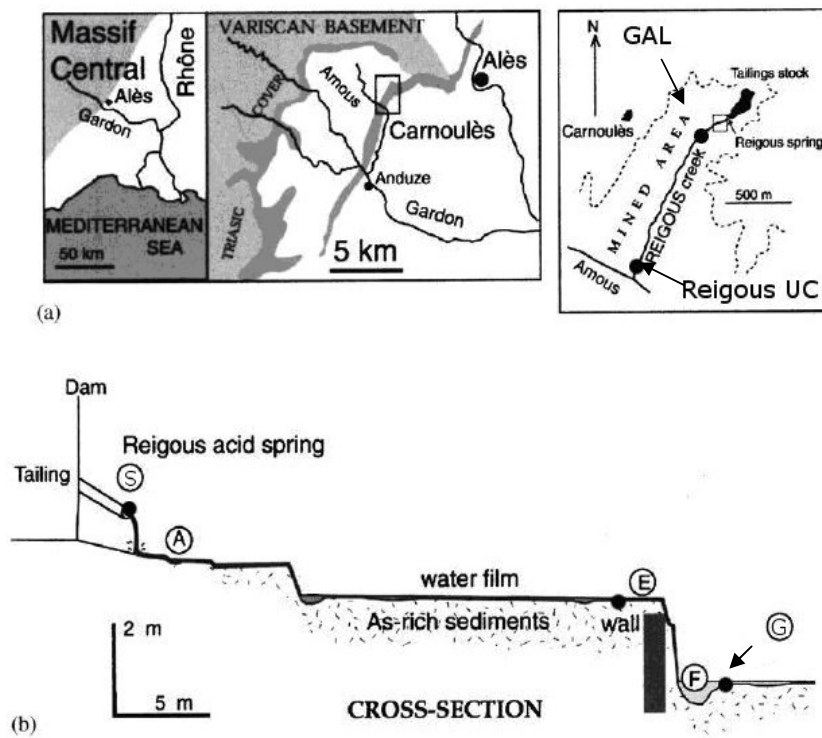
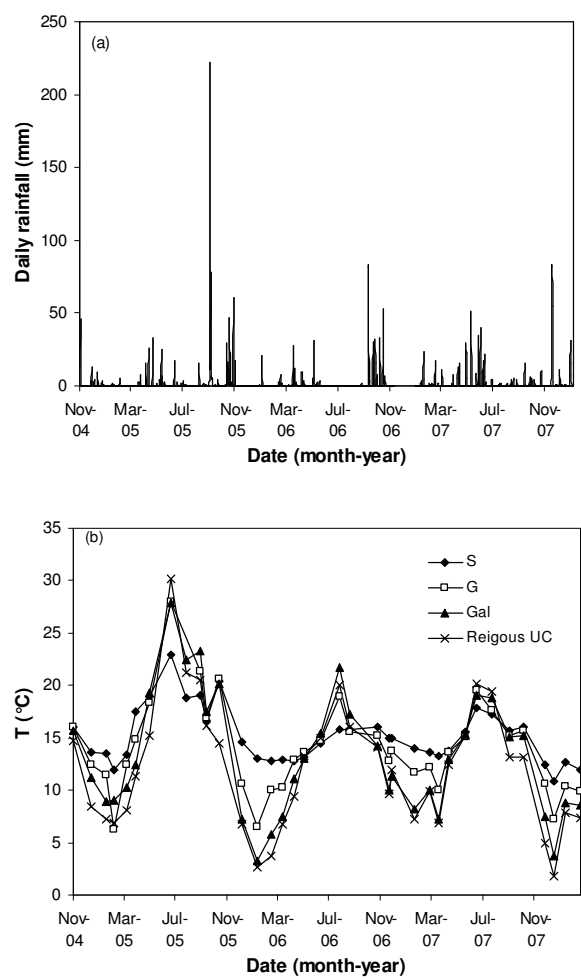


Figure 2



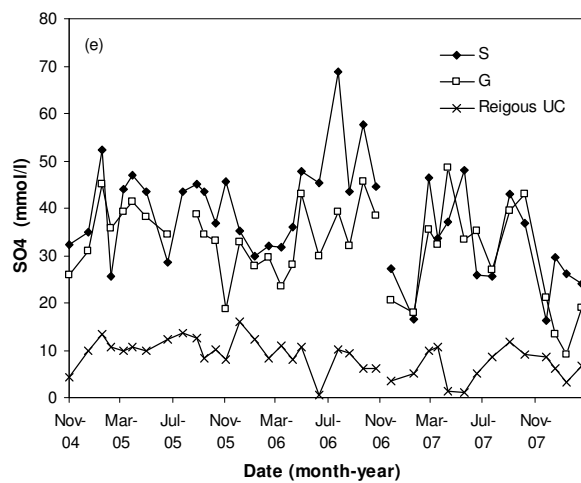
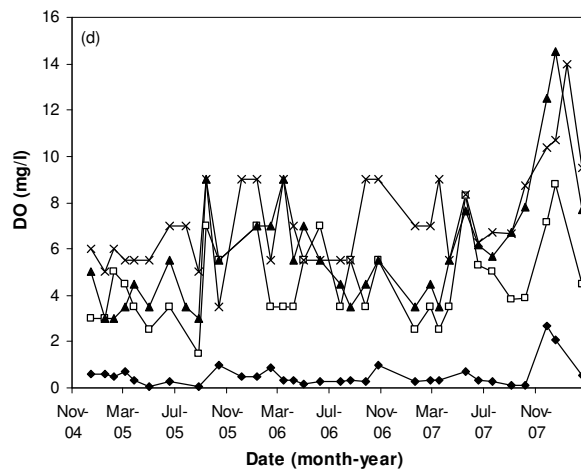
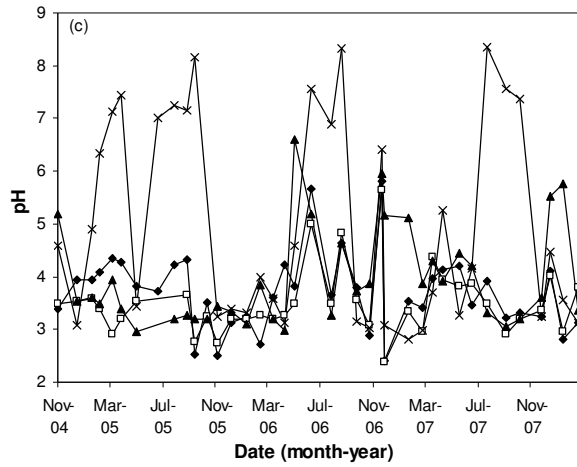


Figure 3

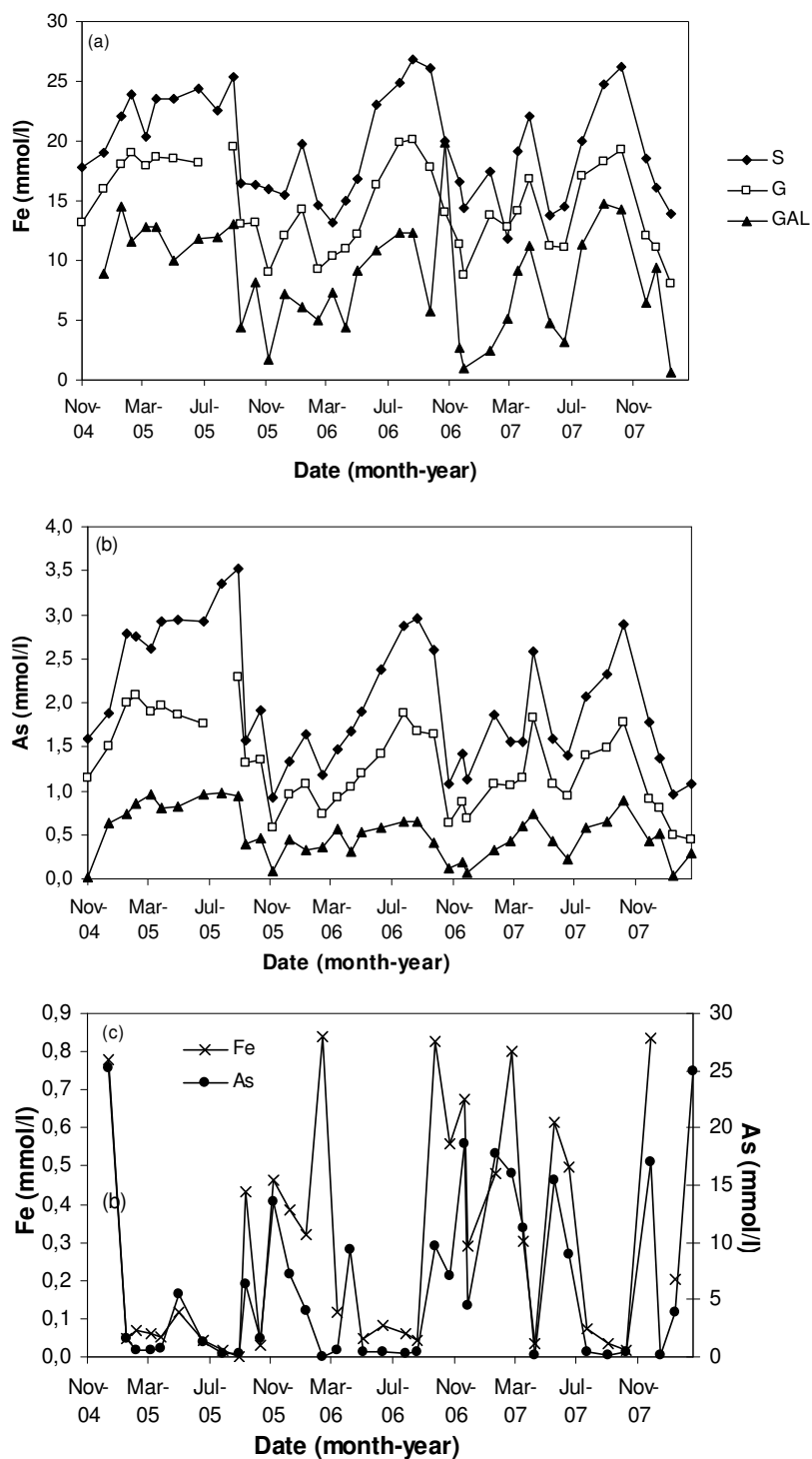


Figure 4

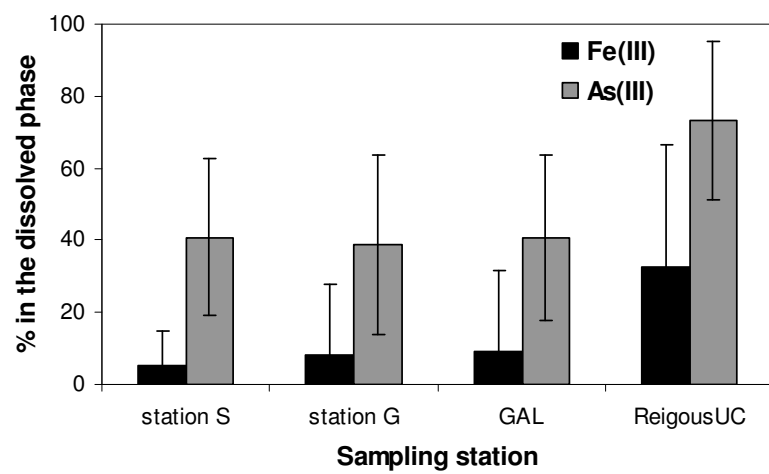


Figure 5

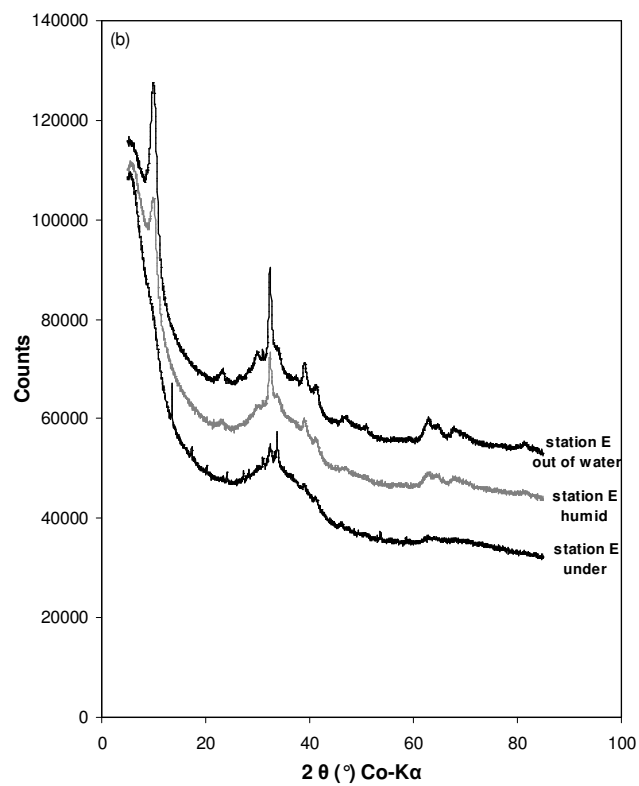
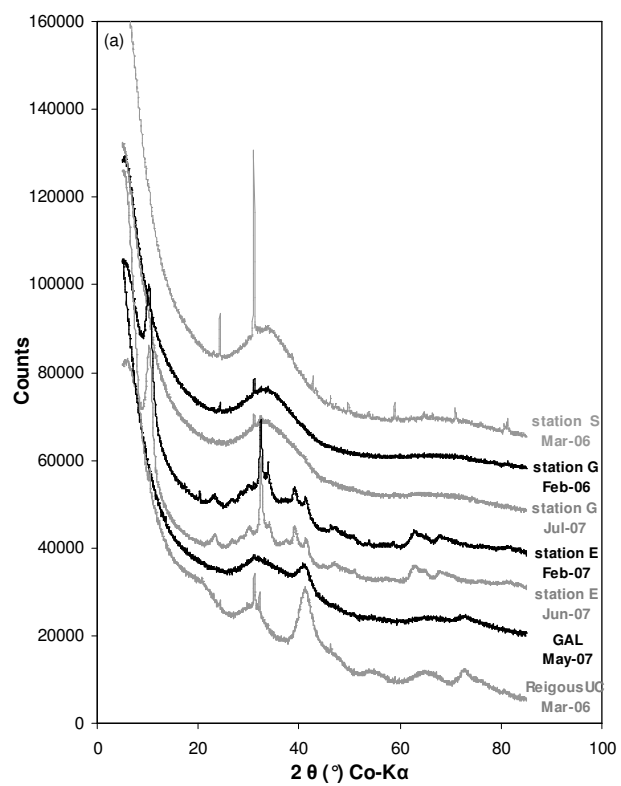


Figure 6

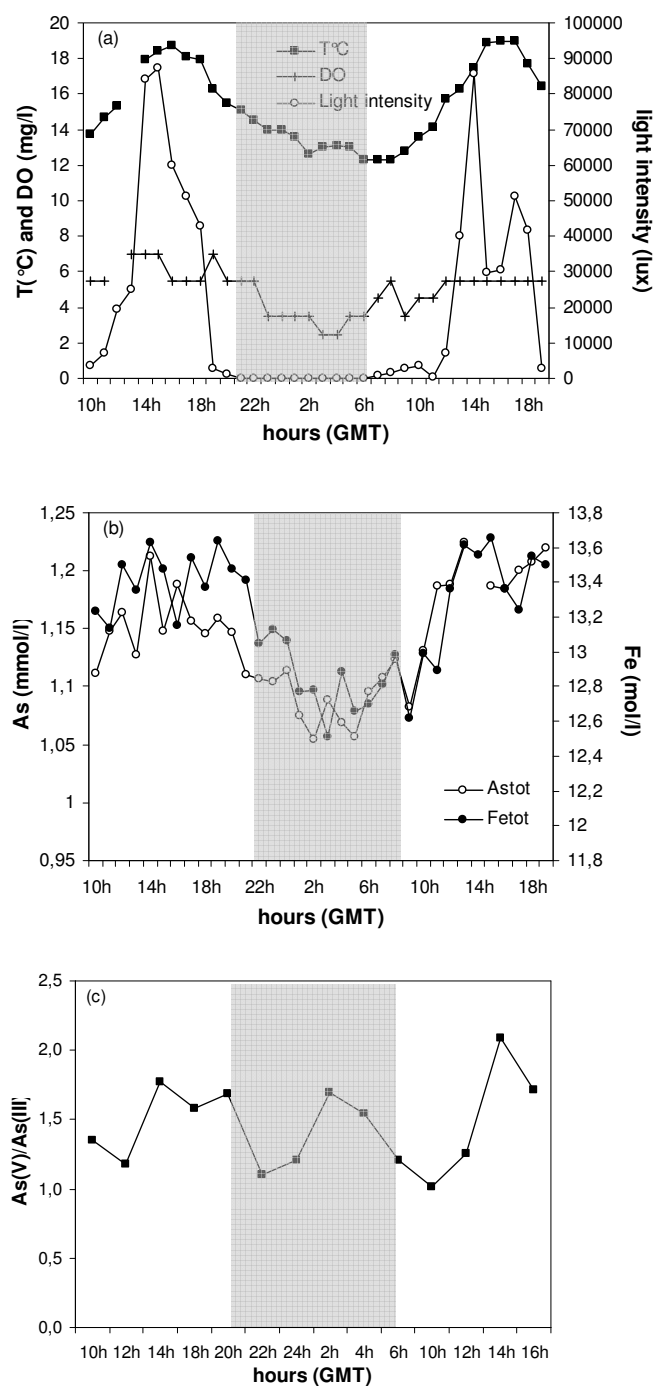


Figure 7

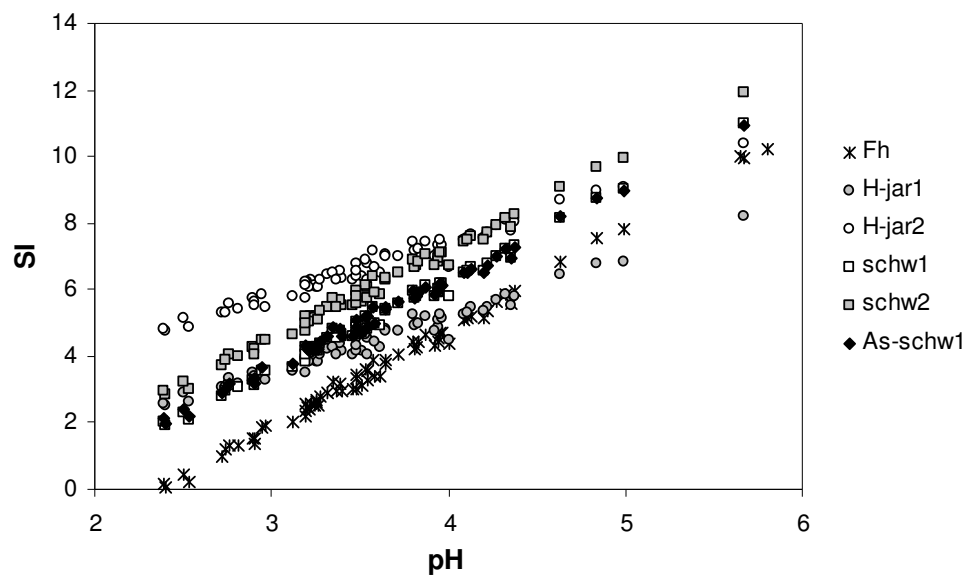
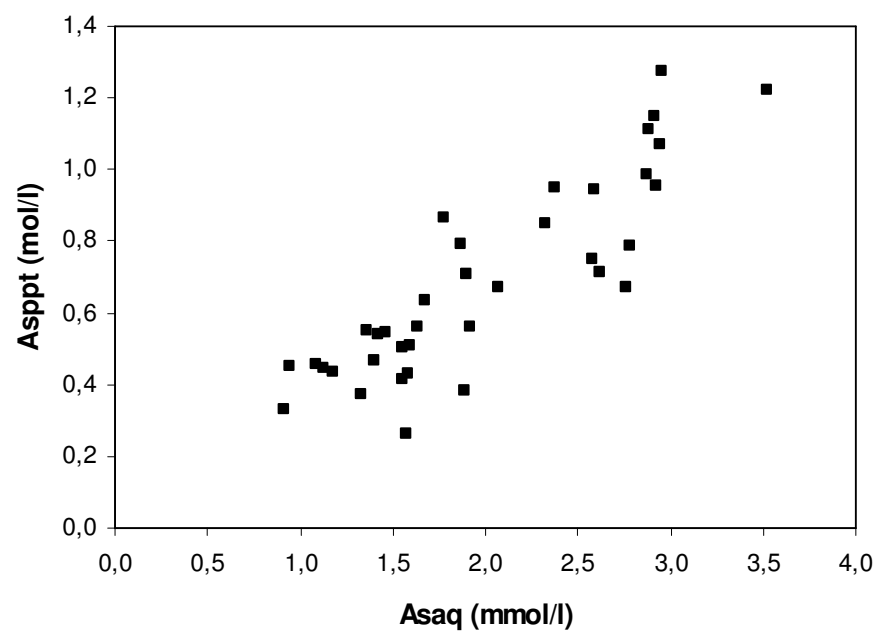


Figure 8



**Chapitre 4 : Influence de la cinétique sur
la minéralogie des précipités formés dans
les DMA (Article n°2)**

Article n°2

Contrôle cinétique sur la formation de tooéélite, schwertmannite et jarosite par des souches d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* dans une eau acide minière riche en As(III)

Marion Egal, Corinne Casiot, Guillaume Morin, Sophie Lebrun, Françoise Elbaz-Poulichet

Article soumis à Chemical Geology

RESUME

Le piégeage de l'arsenic par des minéraux de Fe(III) pendant l'oxydation de Fe(II) a été étudié avec plusieurs cultures de souches bactériennes d'*Acidithiobacillus ferrooxidans*. Chaque souche, connue pour son incapacité à oxyder As(III), a été inoculée dans une eau de drainage minier acide stérilisée contenant quelques centaines de milligrammes par litre de Fe(II) et quelques dizaines de milligrammes par litre d'arsenic, principalement sous forme d'As(III). La spéciation du fer et de l'arsenic a été suivie dans la phase dissoute, et les produits de l'oxydation microbienne de Fe(II) ont été identifiés par spectroscopie EXAFS et par Diffraction aux Rayons X (DRX). Il a été montré que l'arsénite coprécipitait avec des phases amorphes, de la schwertmannite, et/ou pouvait être incorporé à la tooéélite ($\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). La précipitation de jarosite pauvre en arsenic a été observée en fin d'expérience. La nature, la proportion et la séquence des biominéraux formés diffèrent d'une souche à une autre et en fonction de la taille de l'inoculum. Ces variations sont liées à la cinétique de précipitation du fer en début d'expérience. De la schwertmannite riche en As(III) se forme lorsque la phase de latence est inférieure à un jour, alors que la tooéélite se forme lors d'une phase de latence plus longue (supérieure à 9 jours). Après plus de 15 jours, la jarosite précipite après oxydation complète de Fe(II), probablement du fait de la décroissance du pH à une valeur de $2,15 \pm 0,06$. Ce minéral ne piège pas de quantités significatives d'As(III). La tooéélite comme la schwertmannite ne se forment pas en l'absence de bactéries dans l'eau de DMA étudiée.

Kinetic control on the formation of tooeleite, schwertmannite and jarosite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains in an As(III)-rich acid mine water.

Marion Egal⁽¹⁾, Corinne Casiot⁽¹⁾, Guillaume Morin⁽²⁾, Odile Bruneel⁽¹⁾, Sophie Lebrun⁽²⁾, Françoise Elbaz-Poulichet⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire Hydrosociences Montpellier, UMR 5569 CNRS-IRD-UM1&2, Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, Case MSE, 34095 Montpellier cedex 05, France.

⁽²⁾ Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie, UMR CNRS 7590, Universités Paris 6 et 7, et IPGP, 4 Place Jussieu 75252 Paris Cedex 05, France.

Abstract

Trapping of arsenic(III) by Fe(III)-minerals during microbial Fe(II) oxidation was investigated in cultures of various *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains. Each strain, known to be unable to oxidize As(III), was inoculated in sterilized acid mine drainage water containing hundreds of mg per litre of Fe(II) and tens mg per litre levels of arsenic, mainly in the As(III) form. Iron and arsenic speciation were followed in the dissolved phase, and microbial Fe(II) oxidation products were identified using XRD and EXAFS spectroscopy. Arsenite was found to coprecipitate with amorphous phases, with schwertmannite, and/or to be incorporated in tooeleite ($\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Precipitation of As-poor jarosite also occurred at the end of the experiments. The nature, proportion and sequence of the biominerals differed from one strain to another and as a function of the inoculum size. This appeared to be related to the kinetic of Fe precipitation during the early stage of incubation. As(III)-rich schwertmannite formed when the lag period was lower than one day, while tooeleite formed during extended (≥ 9 days) lag period. After more than 15 days, jarosite precipitated upon complete Fe(II) oxidation, likely because the pH decreased to 2.15 ± 0.06 . This mineral did not trap significant amounts of As(III). Neither tooeleite nor As(III)-rich schwertmannite formed without bacteria in the AMD water used in this study.

Keywords : *Acidithiobacillus ferrooxidans*, acid mine drainage (AMD), arsenic, tooeleite.

Introduction

The weathering of tailings originating from the mining of metallic sulphide ores results in the formation of acid effluents called acid mine drainage (AMD). They contain extremely high concentrations of dissolved iron, sulphate and toxic elements such as arsenic (Lopez-Archilla et al., 2001; Olías et al., 2006). Ochre sediments in these systems consist of a variety of iron (oxyhydr)oxides and hydroxysulfates such as jarosite ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$), schwertmannite $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4$, ferrihydrite ($\text{Fe}_5(\text{OH})_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$) and lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$), which precipitate as the pH rises (Bigham et al., 1996b). These sediments are able to immobilize arsenic by sorption or coprecipitation reactions (Morin & Calas, 2006). The formation of these minerals is enhanced by the metabolic activity of bacteria such as *Acidithiobacillus ferrooxidans* that catalyze the oxidation of Fe(II) into Fe(III) by dissolved O_2 . A strain of *A. ferrooxidans* was shown to promote the formation of tooeleite, an As(III)-Fe(III) mineral ($\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) which has been identified as the main constituent of stromatolite-like deposits in the exceptionally As(III)-rich Carnoulès AMD (Gard, France) (Morin *et al.*, 2003; Morin & Calas, 2006). The formation of this phase decreases drastically the concentration of As(III) that reaches the Amous river downstream the Carnoulès mine (Casiot et al., 2003; Casiot et al., 2005).

In the present work, we investigated biological factors that may control tooeleite formation. Different strains of *A. ferrooxidans* were grown in monoxenic cultures in the Carnoulès AMD water. The rate of Fe and As precipitation and the mineralogy of the neoformed solid phases were monitored for one month. The results of this study could be useful for the implementation of bioremediation processes applied to As(III)-contaminated acidic waters.

Materials and Experimental

Bacterial strains and culture conditions. Experiments were performed with four *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains. Three of them (B20, B5, CC1) were autochthonous, i.e., isolated from the Carnoulès AMD water, and one (ATCC 23270) was obtained from the American Type Culture Collection (accession number AJ278718). In a previous study, strain B5 was shown to promote the formation of tooeleite after six days of cultivation in the Carnoulès AMD water (Morin *et al.*, 2003). In another previous study, strains CC1 and ATCC 23270 were shown to promote the formation of As(III)-bearing schwertmannite in a synthetic medium similar to the Carnoulès AMD water (Duquesne *et al.*, 2003). Strain B20 was newly isolated for the present study. The isolation of *A. ferrooxidans* CC1 (accession number AJ457804) and B5 (accession number AJ879996) strains was described previously in Duquesne et al. (2003) and Bruneel et al. (2003) respectively. Strain B20 (accession number soon available) was isolated and identified using the same procedure than for strain B5. Strains ATCC 23270 and CC1 were grown at 30°C with vigorous shaking in the liquid Fe(II) medium which consists of 3.5% (wt/vol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ adjusted to pH 2.2 with H_2SO_4 , and 25%

(vol/vol) solution for basal salts containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g.l⁻¹; K_2HPO_4 , 0.4 g.l⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g.l⁻¹, and trisodium citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.3 g.l⁻¹, adjusted to pH 3 with H_2SO_4 . Strains B20 and B5 were grown at 30°C for 5 days and then at room temperature without shaking. Their liquid culture medium was composed of 0.2% (wt/vol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ adjusted to pH 2.2 with H_2SO_4 and sterilized by filtration, 0.5% (wt/vol) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sterilized by filtration and 7% (vol/vol) solution for basal salts containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 g.l⁻¹; KCl , 1.66 g.l⁻¹; K_2HPO_4 , 0.833 g.l⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.33 g.l⁻¹; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.24 g.l⁻¹ adjusted to pH 3.5 with H_2SO_4 and autoclaved.

Bioassays. Two series of bioassays were performed. The first one was designed to investigate the influence of the different bacterial strains on the nature of the As-bearing minerals that form during Fe(II) oxidation in the Carnoulès AMD water. Strains B5, B20, ATCC and CC1 were grown separately in the Carnoulès AMD water. 5 ml of suspension of pure *A. ferrooxidans* strain was inoculated in 500 ml of filter-sterilized Carnoulès AMD water. A control experiment without bacteria was prepared by inoculation of 5ml of sterile culture medium in filter-sterilized Carnoulès AMD water. This water contained 1130 mg.l⁻¹ of Fe, 3100 mg.l⁻¹ of sulphate, 205 mg.l⁻¹ of As (91 % of As(III)) and had a pH of 3.4. It was sterilized immediately after sampling by filtering through 0.22 µm pore size membranes.

The second bioassay was designed to investigate the influence of the initial bacterial cell concentration on the nature of the As-bearing minerals that form in the Carnoulès AMD water. Strain B5 was inoculated at concentrations of 0.4 10⁶, 1.2 10⁶ and 4.8 10⁶ cells.ml⁻¹ in the Carnoulès AMD water. The initial composition of the Carnoulès AMD water was 812 mg.l⁻¹ of Fe, 97.5 mg.l⁻¹ of As (81 % of As(III)), 4656 mg.l⁻¹ of SO_4 and the pH value was 3.2.

Reactors were covered with an aluminium cap in order to limit the evaporation and they were stored at 30°C and stirred continuously on an agitation table. All reactors were prepared in duplicates. An aliquot of 10 ml of each solution was taken after 1, 2, 5, 9, 16 and 30 days for the first bioassay and after 1, 3, 8, 10, 13, 17, 20, 23, 27, 36 and 44 days for the second bioassay. Each aliquot was centrifuged. The supernatant was filtered through 0.22 µm disposable filter and seringue. A subsample was acidified (1:1000 v/v) with Suprapur HNO_3 (Merck) and analysed for total As and total Fe. Another subsample was preserved with 0.0125 M EDTA for As speciation and analyzed within 24h. Fe(II) was analyzed immediately after complexation with phenanthroline chloride solution. The solid recovered in the centrifugation vial was then dried under vacuum to prevent oxidation. In the second bioassay, As species (As(III), As(V)), Fe(II), bacterial cells concentration and pH were also monitored.

Chemical and Mineralogical Analyses. Iron and arsenic concentrations in the aqueous phase were determined by atomic absorption spectrometry (AAS) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ICP-MS respectively. Sulphate concentration was determined by nephelometry with a

spectrophotometer at 650nm. Fe(II) was analyzed using a spectrophotometer at the wavelength of 510nm. Arsenic speciation was carried out using HPLC coupled to Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry as described previously (Casiot *et al.*, 2005). Bacterial cell concentration was determined by counting using Thoma cells. pH was measured with an ultrameter CAMLAB.

The mineralogical composition of the solid samples was determined by X-Ray powder diffraction (XRD) using Co K α radiation. Data were recorded over a 2 θ range of 3 – 85° with a step size of 0.03°. The first bioassay samples were analyzed using a Phillips PW1710 diffractometer equipped with a graphite back-mounted monochromator, counting 6 to 80s per step depending on the sample amount. The second bioassay samples were analyzed in continuous mode using a Panalytical X'Pert Pro MPD diffractometer equipped with an X'Celerator detector, counting 2 hours per sample.

X-ray absorption spectroscopy. X-ray absorption spectra were collected on the bioassay samples at the As K-edge over the energy range 11630 -12630 eV on the wiggler beamline 11-2 at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL, Stanford, California, USA). Energy was calibrated with scorodite (FeAs^VO₄·2H₂O), placed after the second ion chamber, with the maximum absorption point chosen to be 11875 eV. EXAFS data were extracted using the XAFS program (Winterer, 1997) following the procedure detailed previously (Ona-Nguema *et al.*, 2005). Unfiltered k^3 -weighted EXAFS data were fit by linear combination of EXAFS spectra selected among a large set of reference spectra of As(III)- and As(V)-sorbed or coprecipitated schwertmannite and ferrihydrite samples with As/Fe molar ratio varying within the 0.09 to 0.8 range, obtained from biotic and abiotic experiments (Lebrun, 2005). This set especially includes the CC1 – 5 days sample corresponding to As(III)-coprecipitated schwertmannite (As/Fe 0.3 mol/mol), and also includes the well crystallized Utah tooeleite sample (Cesbron & Williams, 1992; Morin *et al.*, 2007). All model compounds spectra were recorded at a temperature of 10K using liquid He cryostat at the bending-magnet beamline BM30B (FAME) at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) or on the D44 beamline at the LURE synchrotron (Orsay). All beamlines were equipped with Si(220) double-crystal monochromators, except on D44 where Si(111) crystals were used. EXAFS data were acquired in transmission mode after sample dilution in appropriate amounts of cellulose for As/Fe molar ratio above 0.2, and in fluorescence detection mode using CANBERRA Ge-30 elements array detector for lower arsenic concentrations (Lebrun, 2005).

Results

Removal of iron and arsenic by the various *A. ferrooxidans* strains studied. In the first bioassay, the concentration of dissolved Fe and As decreased dramatically at the beginning of the incubation for strains CC1 and ATCC 23270, showing that arsenic and iron simultaneously precipitated (Figure 1). After ten days, arsenic precipitation stopped and iron precipitation slowed down. In the same bioassay (Figure 1), for strains B5 and B20, Fe and As concentrations decreased slightly at the beginning of the

incubation and decreased markedly after a lag time of nine days for B20 and sixteen days for B5. Corresponding first order Fe precipitation rate constants ($-0,050$ and $-0,043 \text{ day}^{-1}$ respectively) were similar than in the early CC1 ($-0,048 \text{ day}^{-1}$) and ATCC 23270 ($-0,046 \text{ day}^{-1}$) incubation experiments. Total iron remaining in solution at the end of the experiment was quite similar whatever the inoculated strain. Conversely, the amount of arsenic remaining in solution after thirty days varied markedly from one strain to another; strains B5 and B20 appeared to be the most efficient to remove arsenic. Comparatively, the control experiment showed little decrease of iron concentration after 30 days while As concentration decreased by 15 %.

Mineralogy of the solid phases. In the control experiment (Figure 2a), the solid phase that formed during the first nine days was mainly amorphous. Traces of gypsum and melanterite are also detected. Jarosite appeared after 16 days. With strains CC1 (Figure 2b) and ATCC 23270 (Figure 2c), the solid phase that first precipitated was poorly ordered schwertmannite with As/Fe molar ratio of 0.3 and 0,5 respectively (calculated from Figure 1 data). XRD peaks characteristic of tooeleite appeared after 5 days for ATCC 23270 and were not visible in the diffractograms of strain CC1 before 30 days. The crystallization of jarosite began after nine days for both strains. With strains B20 or B5 (Figure 2d and e), an amorphous phase precipitated during the lag period. Tooeleite formed after nine days and sixteen days respectively. Jarosite was present for both strains in the late precipitate. Finally, B5 and B20 clearly promoted the formation of tooeleite while CC1 promoted the formation of poorly-ordered schwertmannite. ATCC 23270 exhibited an intermediate behavior and promoted the precipitation of both schwertmannite and tooeleite.

Arsenic speciation and distribution in the solid phases. The redox state of arsenic and its distribution among the mineral species identified by XRD (Figure 2) was determined using X-ray absorption spectroscopy analysis of the first bioassay samples after 30 days of incubation. XANES data (Figure 3) indicated that arsenic is dominantly present as As(III) in the biotic samples, and as a mixture of As(III) and As(V) in the abiotic control sample. These results indicate that As(III) which was the predominant form (91%) of arsenic in the inoculated AMD water did not significantly oxidize during the biotic precipitation process. In contrast the presence of a large fraction of As(V) in the abiotic control sample indicates that, although the total amount of precipitated arsenic in this experiment is much lower than in the biotic ones, As(V) was preferentially incorporated in the abiotic precipitate.

EXAFS spectra of B5 and B20 samples are close to that of tooeleite, while the spectra of ATCC 23270 and CC1 samples are less structured (Figure 4). Accordingly, best fits were obtained with linear combination of the spectra of As(III)-coprecipitated schwertmannite sample (CC1- 5days; As/Fe = 0.3 mol/mol), Utah tooeleite, and an As(V)-component (Table 1; Figures 4c). This fitting procedure indicated that the proportion of arsenic present as As(III)-coprecipitated schwertmannite increases

from 49 % for sample B20 to 89 % for sample CC1, while the proportion of arsenic present as As(III) in tooeleite decreases from 36 % in sample B20 to 6% in sample CC1. Actually, the exact nature of the non-tooeleite As(III) component could not be unequivocally determined from such an EXAFS fitting procedure, because EXAFS spectra of As(III)-coprecipitated, -sorbed schwertmannite and ferrihydrite samples exhibit strong similarities (Lebrun, 2005). However the As(III)-coprecipitated schwertmannite component in the present fit is in agreement with the dominant presence of schwertmannite in association with tooeleite in the samples studied, as determined by XRD.

The proportion of the As(V)-component did not exceed 10 % in all biotic samples of the first bioassay that were studied by EXAFS, in agreement with XANES data, which indicate that As(V) is minor in these samples (Figure 3). Consequently, the nature of this As(V) component could not be reliably determined from the fitting of the biotic samples, and several As(V)-sorption and coprecipitation model compounds spectra yield reasonable fits. The choice of the As(V) component was based on the fit of the control sample spectrum, for which the best fits were obtained by combining a dominant (~ 60 %) component of As(V)-sorbed (or coprecipitated) schwertmannite (with As/Fe molar ratio ~ 0.1), to a minor As(III)-component that could not be unequivocally determined (Figure 4; Table 1). It is known from previous studies on As(V)-doped schwertmannite (Waychunas *et al.*, 1995) and ferrihydrites (Waychunas *et al.*, 1993; Cancès *et al.*, 2005; Cancès *et al.*, 2008; Paktunc *et al.*, 2008) that, more than the preparation method (coprecipitation or sorption), the increase of the As/Fe ratio influence the shape of the As-EXAFS spectrum of such compounds. Indeed, these studies reported that the amplitude of the As-Fe pair contributions increases as the As/Fe ratio increases. In the present study, we observed that As(V)-sorbed (or coprecipitated) schwertmannite with As/Fe = 0.09 better match the control sample than sorption or coprecipitation compounds with As/Fe ratio higher than 0.1 (Cancès *et al.*, 2005; Lebrun, 2005; Cancès *et al.*, 2008).

Influence of bacterial cell concentration on mineral formation: Owing to the differences observed between the results obtained with the various strains in the first bioassay, we hypothesized that bacterial cell concentration may control the mineralogy of biogenic Fe(III) products. In the second bioassay, when B5 strain was inoculated at concentration levels of $0.4 \cdot 10^6$, $1.2 \cdot 10^6$ and $4.8 \cdot 10^6$ cells/ml, the lag period decreased from 10 to 3 days (Fig. 5a). This lag phase duration was shorter than in the first series of bioassays carried out with strain B5 whose initial cell concentration (not determined) was probably lower. After the lag phase, Fe(II) concentration decreased drastically and Fe(II) oxidation reached completion after 13 to 20 days (Fig. 5a). Figure 5b shows the increase of the number of *A. ferrooxidans* cells as a function of time. These growth curves confirmed that *A. ferrooxidans* was in exponential growth phase between 10 and 20 days. However, it should be noted that the microbial viable counts are only representative of microorganisms in suspension, and not of those attached to surfaces of precipitates or glass, leading to cell concentrations that were largely underestimated as observed in the study of (Yu *et al.*, 2001). This bias may explain why no significant

difference in cell counts is observed between the $0.4 \cdot 10^6$, $1.2 \cdot 10^6$ and $4.8 \cdot 10^6$ cells/ml experiments. Fe(III)_s concentration increased in the early stage of Fe(II) oxidation (Fig. 5c) while Fe(III)_{aq} appeared 8 to 13 days later (Fig. 5d). The rate of Fe precipitation during exponential growth phase was similar for the three cell concentration levels and averaged $-0.046 \pm 0.003 \text{ day}^{-1}$, similarly to the rate in the first series of bioassays. After exponential growth phase, cell concentration decreased (Fig. 5b) but Fe(III)_s concentration still increased in relation with a decrease of Fe(III)_{aq} . The pH decreased from 3.26 ± 0.06 to 2.14 ± 0.06 in relation with the precipitation of Fe(III)_s (dotted lines Fig. 5c).

Arsenic concentration decreased markedly in the first 15 days of incubation (Figure 6a), corresponding to the end of the lag period for Fe(II) oxidation. Both As(III) and As(V) concentrations decreased (Fig. 6b, c); however, As(V) was removed more efficiently than As(III) since residual concentrations remaining in solution after 20 days represented less than 10 % of initial concentration for As(V) and about 50% for As(III) . Moreover, As(III) concentrations in the dissolved phase rose again after 20 days (Fig. 6b).

According to thermodynamic data reported in Bigham et al. (1996), Yu et al. (1999), and (Parkhurst & Appelo, 1999), the water reached supersaturation with respect to schwertmannite (Fig. 7a,b) and jarosite (Fig. 7c) as soon as significant concentrations of Fe^{3+} ($\geq 50 \text{ mg/l}$) appeared in solution and oversaturation was maintained during the course of the experiment whatever initial cell concentration. These thermodynamic predictions are in agreement with our mineralogical data from $1.2 \cdot 10^6$ and $4.8 \cdot 10^6$ experiments, which indicate that both phases formed in these experiments (Figure 8). Indeed, schwertmannite formed after 20 days of incubation and jarosite appeared after extended incubation (≥ 36 days). XRD peaks characteristic of tooeleite were also present but this mineral was less abundant than in the first bioassay (Fig. 8a). Furthermore, after 20 day incubation, tooeleite was less abundant in the $4.8 \cdot 10^6$ cells/ml experiment than in the $1.2 \cdot 10^6$ cells/ml one (Figure 8a). This result agreed with previous observations from the first bioassay which lead to invoke a kinetic factor in the formation of tooeleite.

Discussion

Mechanism of formation of tooeleite, As-rich schwertmannite and jarosite

We observed in a previous study (Morin *et al.*, 2003) that aging of As(III) -rich Carnoulès AMD water inoculated with bacterial strain B5 lead to the precipitation of tooeleite after 6 days incubation whereas another *A. ferrooxidans* strain B4 did not lead to tooeleite formation. In the present experiments, we demonstrated that the formation of tooeleite was not inferred only to strain B5. The formation of this mineral also occurred when the Carnoulès AMD water was inoculated with two other strains CC1 and B20 originating from this As-rich mining site but also with another non-autochtoneous strain ATCC 23270. Thus, the formation of tooeleite was not related to a phenotypic peculiarity of strain B5 or to *A. ferrooxidans* strains originating from the Carnoulès mining site. However, the nature, proportion and

sequence of the mineral forming during the incubation period differed from one strain to another. Tooeleite appeared sooner in experiments with strains B5 and B20 and represented the major As-bearing mineral in the final precipitate. The formation of this phase appeared to be favoured during extended lag period during which Fe(II) was slightly oxidized but at slower rate than during exponential growth phase. Conversely, when the lag phase was extremely short, in experiments with strains CC1 and ATCC 23270, the first mineral phase that formed in the early stage of Fe precipitation was As(III)-rich schwertmannite and this mineral was predominant in the final precipitate. Thus, Fe(II) oxidation rate appeared to control the relative amounts of tooeleite and schwertmannite forming in our biotic experiments. This was confirmed in the second series of bioassays where increased cell concentration lead to shorter lag period and lower amount of tooeleite relatively to schwertmannite after 20 day incubation. Such influence of microbial Fe(II) oxidation rate on the mineralogy of the Fe(III) biominerals was for instance observed by (Senko *et al.*, 2005) in nitrate-dependent Fe(II) oxidation experiments at neutral pH. These authors demonstrated that when Fe(II) oxidation rates slowed, a stronger goethite signal was observed by XRD and a larger proportion of Fe(III) was in the crystalline fraction.

The pattern of the curves representing the amount of As versus Fe removed for each strain exhibited a similar slope in the early stage of Fe precipitation for strains ATCC 23270, CC1 and B20, which corresponded to an arsenic retention yield of $0.44 \pm 0.08 \text{ mol}_{\text{As}} \cdot \text{mol}_{\text{Fe}}^{-1}$ (Fig. 9). Such As/Fe ratio in the precipitate reflected the contribution of tooeleite with As/Fe ratio of 0.67 (Morin *et al.*, 2007) and As(III)-schwertmannite, whose As/Fe ratio was 0.3-0.5; these ratios were determined from the early (2-5 days) CC1 and ATCC 23270 precipitates which only contained schwertmannite as evidenced by XRD spectra. Such arsenic load in schwertmannite should have disrupted the crystallisation of this mineral according to (Carlson *et al.*, 2002). Indeed, these authors found that schwertmannite precipitated from As(V)-rich AMD was replaced by an amorphous phase at high As(V) levels corresponding to As/Fe mole ratios higher than 0.15. The persistence of disordered and nanocrystalline schwertmannite at such high arsenic loading in our experiments is likely related to the fact that arsenic is present as As(III) and not as As(V) as it was the case in the study of Carlson *et al.* (2002). It may thus be inferred that the poisoning role of As(III) for schwertmannite formation is less pronounced than that of As(V). Further study of the detailed nature of the As(III)-schwertmannite interactions at the molecular level would be needed to confirm this hypothesis.

Slow abiotic Fe(II) oxidation in our control experiment did not lead to the formation of tooeleite but to an amorphous phase. That may be explained by an undersaturation with respect to tooeleite because Fe(II) oxidized very slowly in acidic conditions without bacteria. Indeed, the solubility product of tooeleite (formulated as $\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ by Morin *et al.* (2007)) was estimated to $\log K \approx 23$ from dissolved Fe and As concentrations measured at the end of synthesis experiments carried out by (Nishimura & Robins, 2008); this value suggests that this phase is more soluble than schwertmannite ($\log K = 10.5$ from (Yu *et al.*, 1999); $\log K = 18$ from Bigham *et al.*, 1996) and

amorphous ferric arsenate phases ($\log K = -23$ according to (Langmuir *et al.*, 2006)). From this solubility product value it appears that the Fe(III) concentration required to reach the saturation with respect to tooeleite in the Carnoulès water that contain 187 mg l^{-1} of As(III) is $\sim 30 \text{ mg l}^{-1}$, whereas the concentration of Fe(III) in the abiotic experiment reached only 10 mg l^{-1} after 30 days. Thus, the amount of Fe(III) produced by abiotic oxidation is probably too low to initiate the precipitation of tooeleite, whereas it is probably sufficient to reach oversaturation with respect to As(V)-rich Fe(III) precipitate. Such precipitation would scavenge Fe(III) as soon as it is produced and would hinder the oversaturation to increase enough to initiate the precipitation of tooeleite. Thus, saturation relatively to tooeleite appears to be only reached via active microbial oxidation of Fe(II) in our experimental conditions. Consequently, although the role of bacterial surfaces in the crystallisation of minerals has been documented in several studies (Fortin *et al.*, 1998; Warren & Ferris, 1998; Kasama & Murakami, 2001; Jones & Renaut, 2007), it is not necessary to invoke such processes to explain the specific formation of tooeleite in our biotic experiments and not in the abiotic control. Indeed, Nishimura and Robins (2008) recently synthesized tooeleite via abiotic pathway at room temperature using Fe(III) and As(III) initial concentration of 5.6 and 7.5 g l^{-1} respectively.

From the solubility product of schwertmannite ($\log K = 18$, Bigham *et al.* (1996)), it appears that the Fe(III) concentration required to reach the saturation with respect to this mineral in the Carnoulès water is 0.03 mg l^{-1} . This value is reached sooner in experiments characterized by faster Fe(II) oxidation ; consequently, the large oversaturation with respect to schwertmannite kinetically favours this (meta)less stable mineral instead of tooeleite.

The formation of jarosite occurred after long term incubation in all biotic and abiotic experiments. This suggests that jarosite was not precipitated directly upon bacterial iron oxidation as opposed to tooeleite and As-rich schwertmannite. According to the second series of bioassays, the formation of this phase was favoured after complete Fe(II) oxidation, as Fe precipitation still proceeded after 20 days in a pH window ($\sim 1 \leq \text{pH} \leq \sim 3$) corresponding to the stability field of jarosite (Bigham *et al.*, 1996). However, we cannot exclude the possibility that schwertmannite which is a metastable phase transform to jarosite upon increasing the aging time. Indeed, in experiments of (Wang *et al.*, 2006), schwertmannite produced by biological oxidation of ferrous iron in sulphate solutions has been shown to spontaneously transform to jarosite in the pH range 1.9-2.1 upon increasing the aging time from 19 to 40 days. Such a pH window corresponds to the conditions of our second series of bioassays (2.15 ± 0.06) which can provide the conditions of such transformation (Figure 5c).

The behaviour of As(V) and As(III) differed markedly while jarosite precipitation proceeded in the second stage of aging experiments (after 20 days in the second series of bioassays); As(V) remained immobilized in the precipitate whereas As(III) was released into solution (Figure 6b, c). Thus, jarosite, which appears to be favoured at the expenses of tooeleite and As(III)-schwertmannite due to pH decrease upon increasing the aging time, is not an efficient sink for As(III) although it is known to incorporate As(V) to some extent (Paktunc & Dutrizac, 2003; Savage *et al.*, 2005; Acero *et al.*, 2006).

Consequences for in-situ formation of As-bearing phases at the Carnoulès mining site

The results of this study allow improving our knowledge on natural arsenic attenuation processes at the Carnoulès mining site evidenced in previous studies (Bruneel *et al.*, 2003; Casiot *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2003). *A. ferrooxidans*, together with other iron oxidizers such as *Gallionella ferruginea* (Bruneel *et al.*, 2006) promoted the oxidation of Fe(II), which was entirely in the reduced form at the spring of the Reigous creek (Casiot *et al.*, 2003). Fe(II)-oxidation products identified in the field were predominantly amorphous Fe(III)-As(V) oxyhydroxides during the dry season (Morin *et al.*, 2003). These phases represented no more than 10% of the As-bearing compounds in the first series of bioassays made with an AMD water that contained predominantly As(III). This result confirmed that the formation of amorphous Fe(III)-As(V) oxyhydroxides involved the activity of bacterial strains able to oxidize As(III), which was not an ability of *A. ferrooxidans*. However, when As(V) was present in the spring water in the second series of bioassays, it was removed more efficiently than As(III) during Fe(II) oxidation. Thus, the rate of As(III) oxidation likely exert a strong influence on the mineralogy of As-rich Fe(II) oxidation products in the field.

During the wet season, the solid phases identified in the field were amorphous As(III)-Fe(III) oxyhydroxides and tooeleite (Morin *et al.*, 2003) at the acidic spring and As-coprecipitated schwertmannite few hundreds meters downstream (Casiot *et al.*, 2005). These observations contrasted with the results of the present laboratory study. We may hypothesize that the formation of tooeleite in the field is favoured after dissolution of an amorphous As(III)-Fe(III) phase precursor in microbialites. Further research is needed to test this hypothesis.

Conclusion

Several bacterial strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* have been evidenced to remove Fe and As efficiently from AMD water by coprecipitation of both elements in the form of As(III)-rich precipitates. The precipitates that formed in our batch experiments are composed of As(III)-Fe(III) amorphous phase, schwertmannite, jarosite and tooeleite, however the succession of the mineral phases that formed through time differed from one strain to another. It has been evidenced that several strains can favour the formation of tooeleite and its occurrence seems to be due to kinetic factors. Indeed, slow kinetic rates lead to tooeleite precipitation whereas more rapid ones rather favour the precipitation of schwertmannite, both resulting from bacterial activity. Conversely, jarosite precipitates without the need for bacteria at the end of the experiments. Tooeleite is a very efficient scavenger for arsenic, particularly for As(III), and exhibits As/Fe molar ratio higher than 0.5. Thus favouring the formation of this phase could represent an interesting alternative for As(III) removal from AMD waters.

Acknowledgements

This work was financed by the EC2CO program from the Institut des Sciences de l'Univers (INSU-France) and ANR (project "RARE").

Table 1. Arsenic speciation in the solids sampled after 30 days of incubation, as determined by linear least-square fitting of their room temperature (RT) EXAFS spectra, using experimental data from three relevant model compounds: i) Utah tooeleite $\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; ii) poorly ordered As(III) schwertmannite corresponding to sample CC1 after 5 days of incubation ($\text{As/Fe} = 0.3 \text{ mol/mol}$); and, iii) synthetic As(V) sorbed schwertmannite ($\text{As/Fe} = 0.09 \text{ mol/mol}$).

Sample	As(III) tooeleite (%)	As(III)-coprecipitated schwertmannite (%)	As(V) sorbed schwertmannite (%)	Sum (%)	σ ($\text{\AA}^2$)	Rf
B20	36	49	10	94	0.01(1)	0.03
B5	35	51	9	94	0.01(1)	0.02
23270	21	69	3	94	0.01(1)	0.01
CC1	6	89	8	100	0.04(2)	0.03
abiotic	0	32	58	98	0.04(2)	0.02

Note: A Debye-Waller term σ ($\text{\AA}^2$) is fitted in order to adjust the RT data to the model compounds data, which were recorded at 10K. Estimated standard deviation on the fitted components is 10% and components below 5% are not significant. The fit quality is estimated by a R factor with the following form $\text{Rf} = \sum (\text{exp} - \text{fit})^2 / \sum (\text{exp})^2$.

Figure Captions

Figure 1 – Changes in Fe (a) and As (b) concentrations in the aqueous phase during experimental incubation of AMD water inoculated with various *A. ferrooxidans* strains (first bioassay). The initial solution chemistry is : 1130 mg.l⁻¹ Fe, 3100 mg.l⁻¹ SO₄²⁻, 205 mg.l⁻¹ As (91 % As(III)), pH 3.4.

Figure 2 - X-ray powder diffraction patterns of the first bioassay samples as a function of incubation time for abiotic (a), CC1 (b), ATCC 23270 (c), B5 (d) and B20 (e) experiments. To: tooeleite; Ja: jarosite; Gy: gypsum; Ml: melanterite; Sch: schwertmannite.

Figure 3 - XANES data of the solid samples from the first bioassay after 30 days of incubation.

Figure 4 - Unfiltered k^3 -weighted EXAFS spectra at the As K-edge (a) and Fourier-transformed EXAFS spectra (b) of the solid samples from the first bioassay after 30 days of incubation. Experimental spectra and least-squares linear combination fits are displayed as dotted and solid lines, respectively. An example of linear combination with model compounds spectra is also displayed below for ATCC 23270 sample (c).

Figure 5 – Changes in aqueous Fe(II) concentration (a), cell concentration (b) pH and solid Fe(III) concentration (c) and aqueous Fe(III) concentration (d) during experimental incubation of AMD water inoculated with *A. ferrooxidans* strain B5 at various initial cell concentration (second bioassay). The initial solution chemistry is : 812 mg.l⁻¹ Fe, 97.5 mg.l⁻¹ As (81 % As(III)), 4656 mg.l⁻¹ SO₄²⁻, pH 3.2.

Figure 6 – Changes in total As concentration (a) and ratio of As(III) (b) and As(V) (c) concentrations at the incubation time (suffix “t”) to their initial concentration (suffix “0”) during experimental incubation of AMD water inoculated with *A. ferrooxidans* strain B5 at various initial cell concentration (second bioassay).

Figure 7 – Plot of log (Fe(III)_{aq}) versus (log([SO₄²⁻]^{1.8/8}/[H⁺]^{20.4/8})) (a), (log([SO₄²⁻]^{1.6/8}/[H⁺]^{20.8/8})) (b) and (log([SO₄²⁻]/[H⁺]³)) for the waters from the second bioassay in contact with schwertmannite and jarosite showing the solubility lines for log K = 10,5 (a), 18 (b) (schwertmannite) and log K = -14,8 (c) (jarosite) according to thermodynamic data from Yu et al. (1999), Bigham et al. (1996) and Parkhurst and Appelo (1999).

Figure 8 - Comparison between the X-ray powder diffraction patterns of the first and second bioassay samples. a) after 26-20 days incubation; b) after 30-36 days incubation. To: tooeleite; Ja: jarosite; Gy: gypsum; Ml: melanterite; Schw: schwertmannite. Since the amount of analyzed material varied from

sample to sample, all data have been normalized to the first tooeleite peak intensity to facilitate qualitative comparison of the relative amount of the various phases in mixture in each sample.

Figure 9 – Plots of cumulated concentration of precipitated As versus precipitated Fe for the different *A. ferrooxidans* strains in the first bioassay.

Figure 1 :

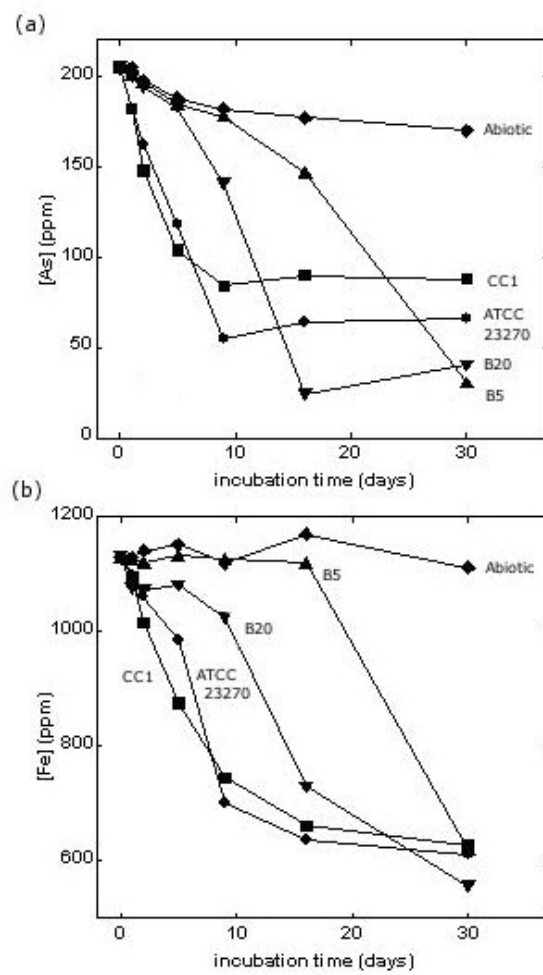


Figure 2:

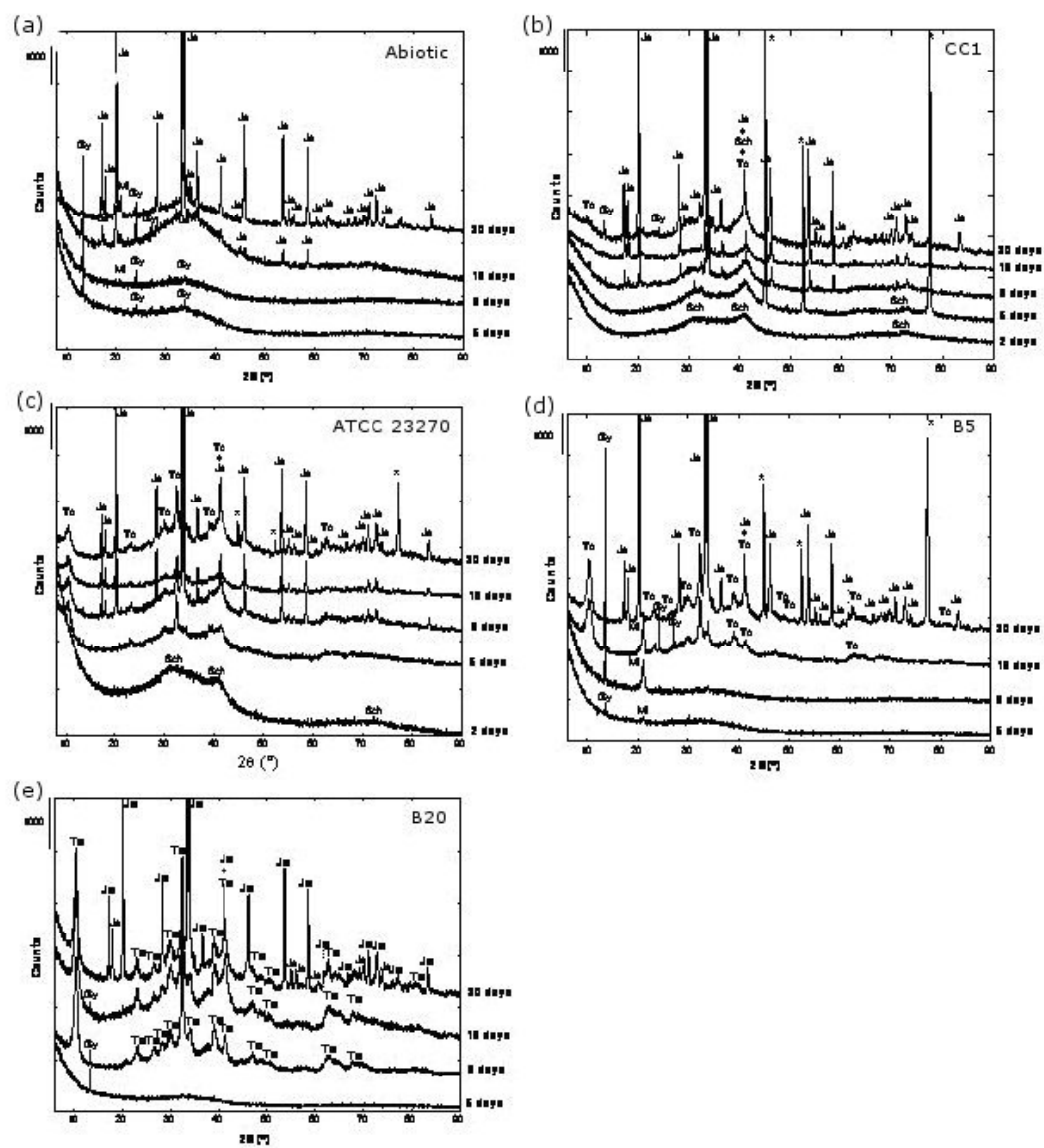


Figure 3:

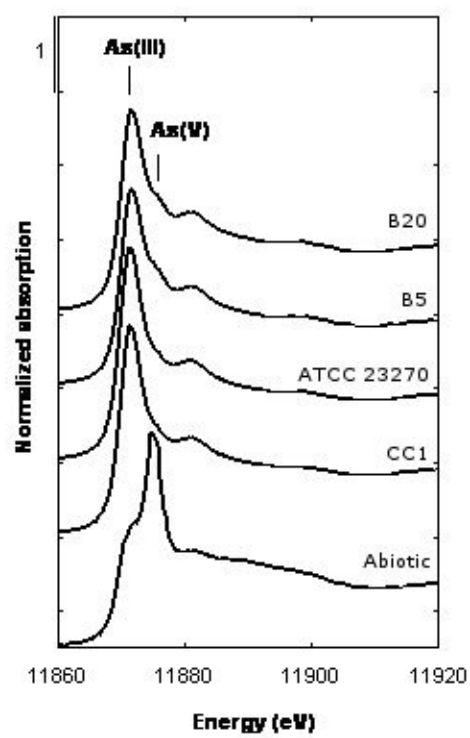


Figure 4:

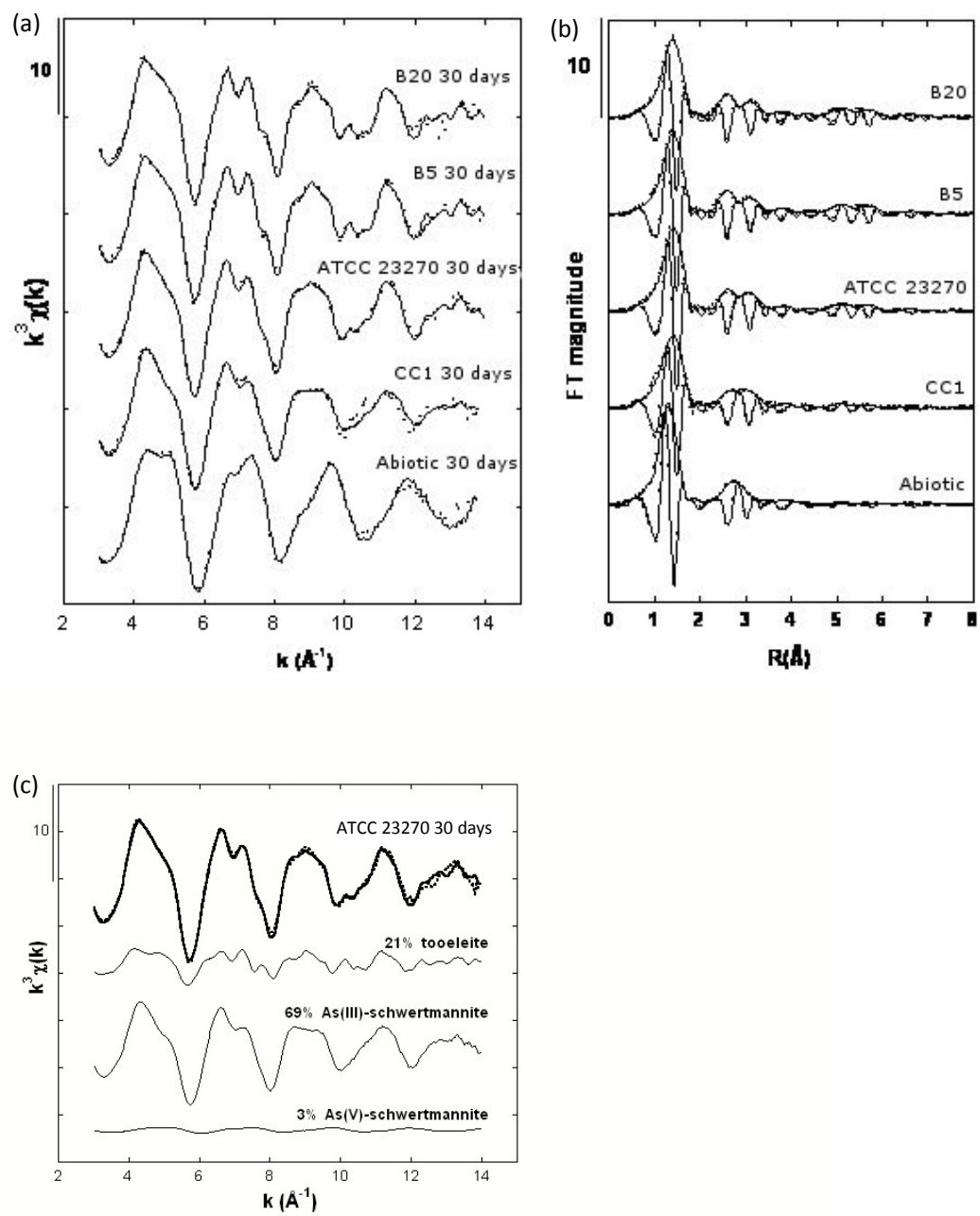


Figure 5 :

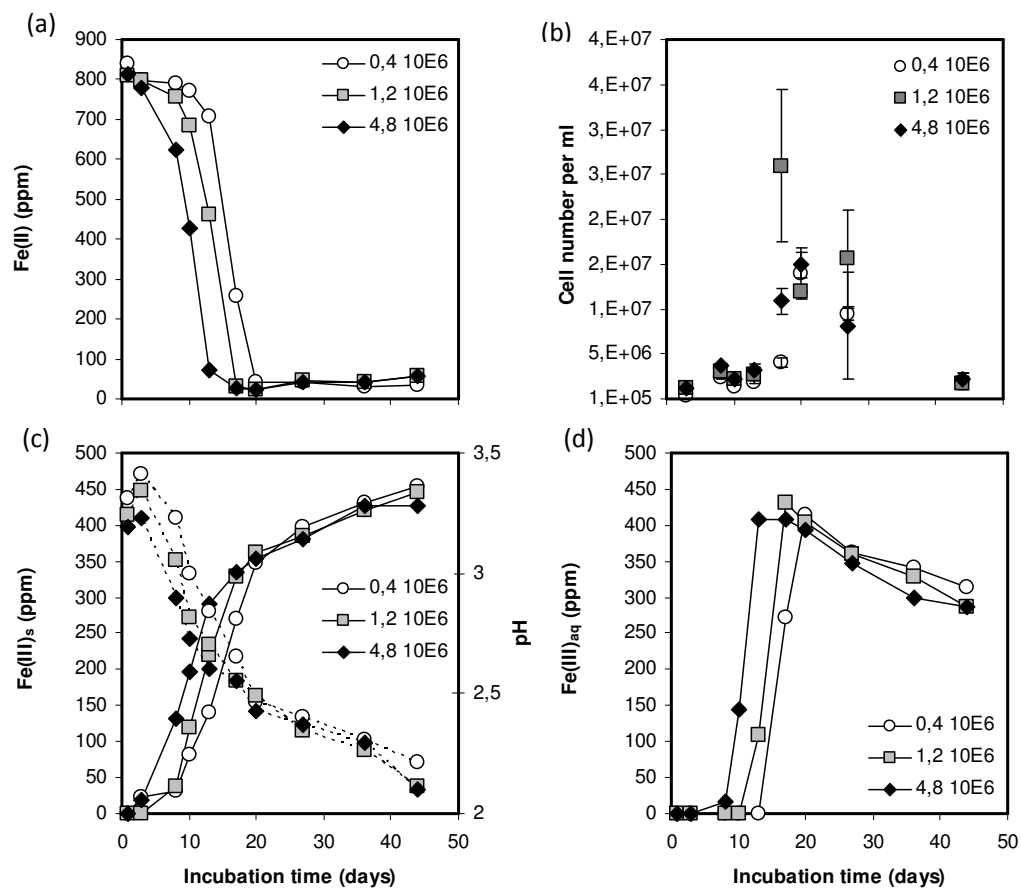


Figure 6:

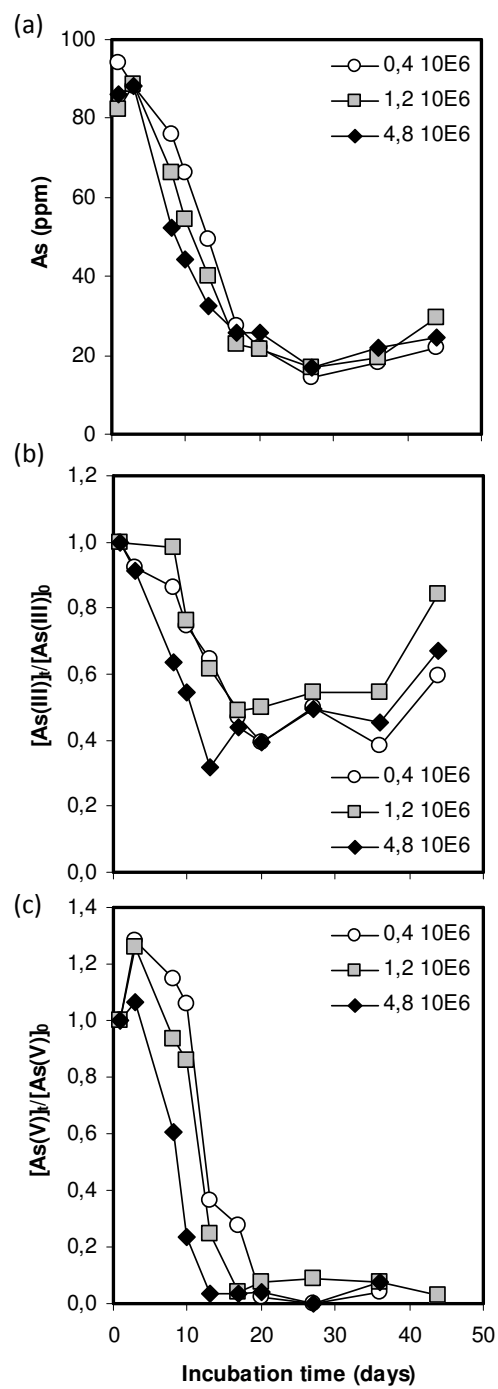


Figure 7 :

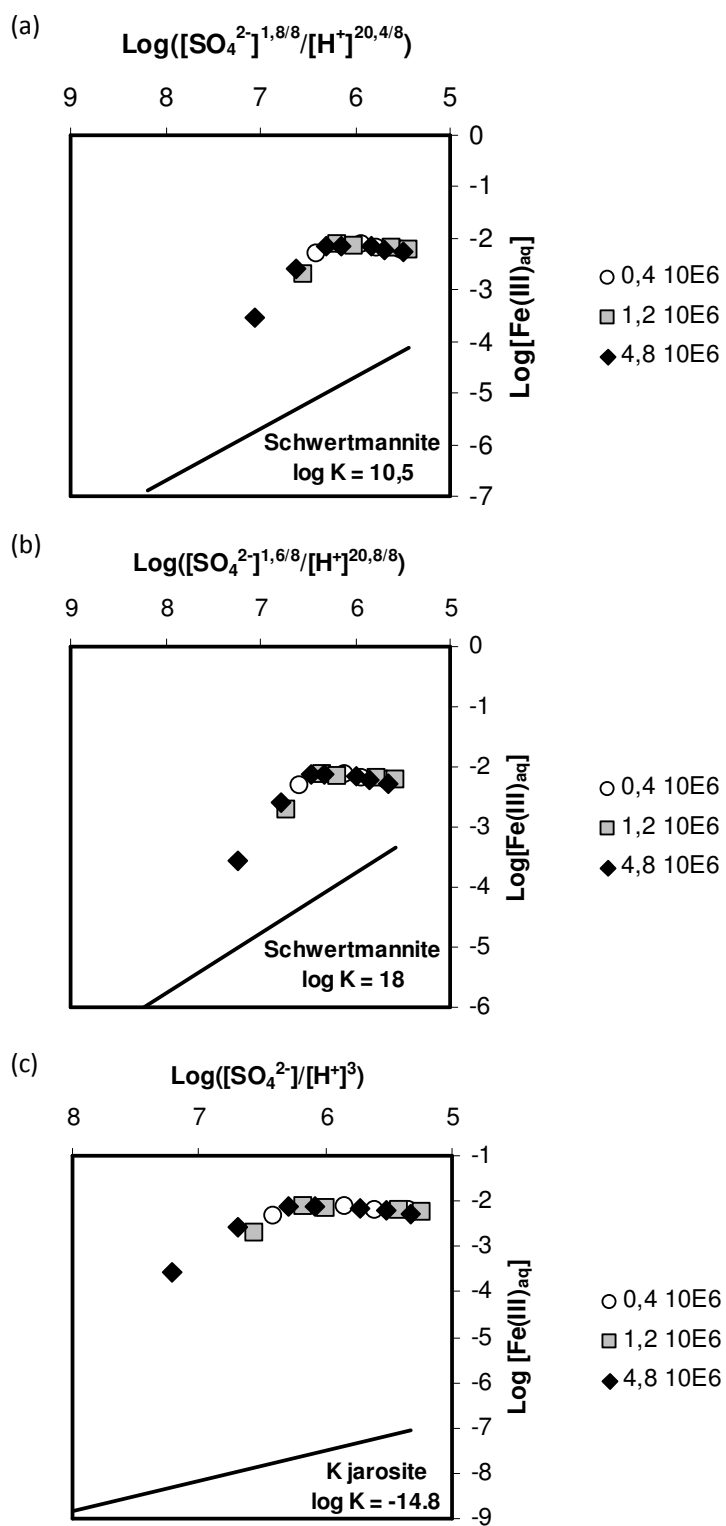


Figure 8 :

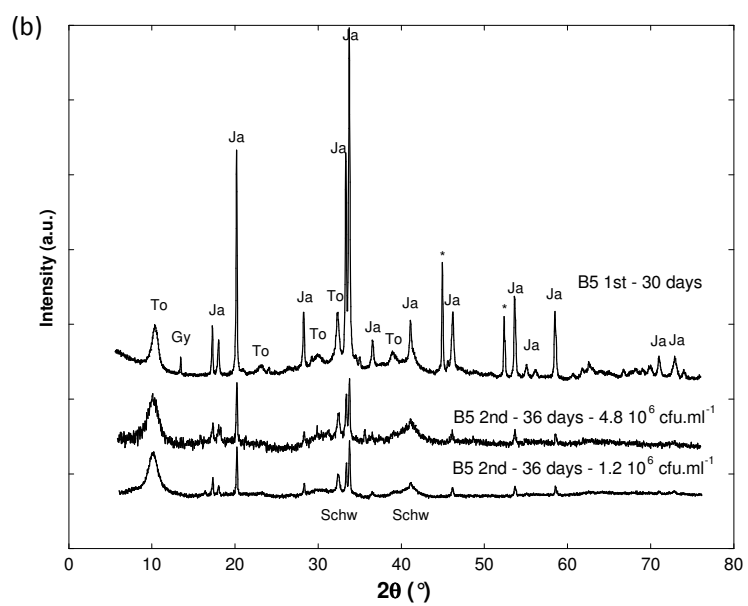
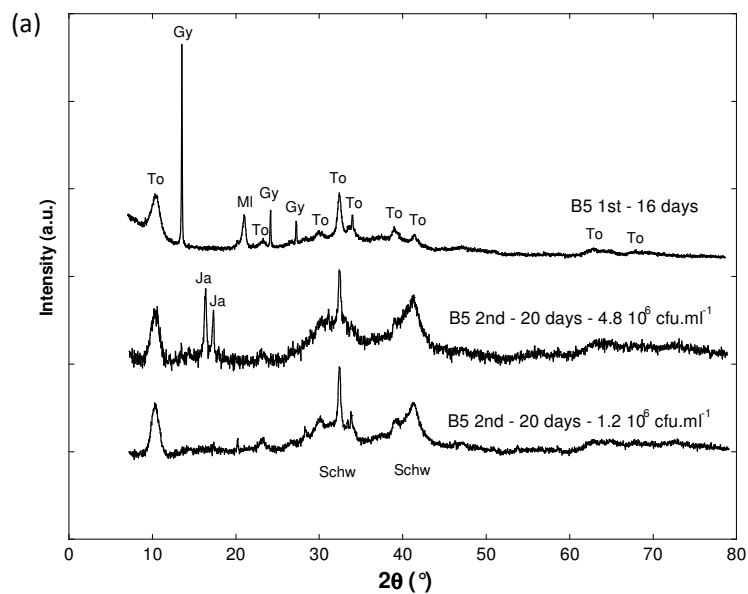
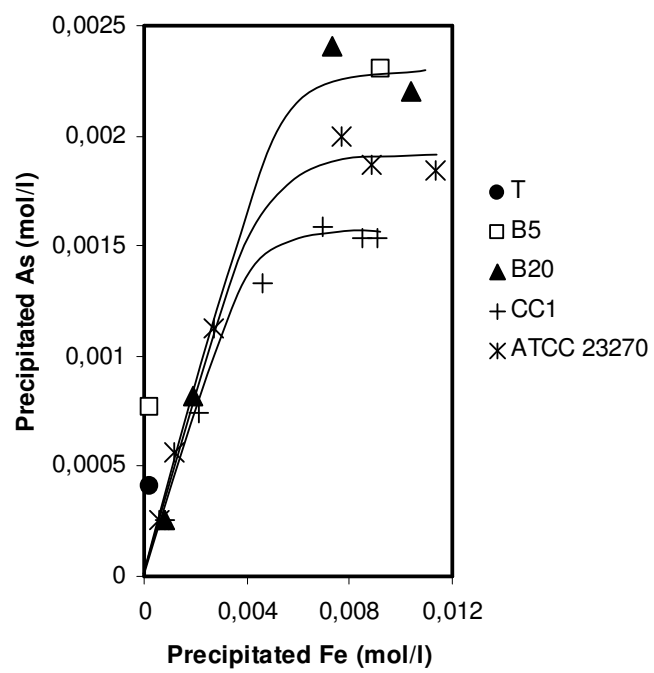


Figure 9 :



PARTIE 3 :
FRACTIONNEMENT
ISOTOPIQUE DU FER
DANS LES DMA

INTRODUCTION

Cette troisième partie est consacrée à l'étude des isotopes du fer dans les DMA.

De nombreux processus naturels ont la capacité de fractionner les isotopes du fer mais l'intensité des fractionnements varie fortement d'un processus à un autre. Depuis plusieurs années, l'intérêt des isotopes du fer pour la mise en évidence de fractionnements spécifiques de l'activité bactérienne a conduit à une lutte effrénée entre les partisans et les détracteurs de l'existence d'une biosignature isotopique. Certains avancent l'idée que l'activité bactérienne conduit effectivement à des fractionnements isotopiques particuliers (Beard et al., 1999 ; Johnson et al., 2008), quand d'autres démontrent que ces mêmes fractionnements peuvent tout aussi bien être obtenus par des mécanismes abiotiques (Bullen et al., 2001 ; Rouxel et al., 2005). Bien qu'aucune biosignature isotopique n'ait été mise à jour pour l'instant, les isotopes du fer peuvent avoir d'autres applications et ils peuvent notamment être utilisés en tant que traceurs des processus physico-chimiques mettant en jeu le cycle du fer.

Parmi les processus qui fractionnent le fer de manière importante on trouve en haut du tableau les processus d'oxydo-réduction (mécanismes abiotiques). L'intensité des fractionnements obtenus pour de tels processus est de l'ordre de 3 ‰. Il a été montré que des mécanismes biologiques pouvaient fractionner le fer de manière tout aussi importante. En effet, Crosby et al. (2007) ont récemment reporté que les processus de réduction dissimilaire du fer (appelés DIR en anglais) pouvaient aussi conduire à des fractionnements de l'ordre de 3 ‰.

Les DMA sont des milieux extrêmes où le fer tient une place importante du fait des concentrations particulièrement élevées que l'on y trouve. Les bactéries tiennent aussi une place très importante dans ces environnements puisqu'elles jouent le rôle de catalyseurs des réactions d'oxydoréduction mettant en jeu le fer. Elles sont donc au premier rang pour une éventuelle influence qu'elles pourraient avoir sur l'élément fer et sur son cycle. Cependant, très peu d'études se sont intéressées à la composition isotopique du fer dans les DMA et aux fractionnements isotopiques que l'on peut rencontrer dans ces milieux. Herbert & Schieppers (2008) sont les seuls à avoir étudié le fractionnement d'isotopes du fer dans un stérile minier. Des études réalisées en laboratoire sur des eaux semblables aux eaux de DMA ont permis de donner un premier aperçu des processus mis en jeu dans ces environnements extrêmes (Balci et al., 2006).

Notre étude représente la première source de données de compositions isotopiques et de fractionnement isotopique du fer dans les eaux et les solides que l'on rencontre dans les DMA. Dans le cadre de ce travail, deux types de DMA ont été étudiés *via* des prélèvements d'échantillons *in situ* (système ouvert), et une série d'expériences réalisées en laboratoire (système fermé).

Le premier type de DMA étudié est celui du **Rio Tinto**. Les mesures ont été effectuées sur deux fleuves impactés par les DMA : le Rio Tinto et l'Odiel, situés en Andalousie dans le Sud-ouest de l'Espagne. Ces fleuves prennent leur source au cœur de la ceinture ibérique de pyrite où de nombreuses exploitations minières sont répertoriées. Ce site d'étude est remarquable puisqu'il s'agit d'un cas de contamination à grande échelle. D'autre part, le Rio Tinto est particulièrement intéressant du fait des teneurs en fer tout à fait exceptionnelles qu'il présente (jusqu'à 22 g/l) mais aussi du fait de la spéciation du fer dans ses eaux : le fer est généralement présent sous forme de Fe(III) dissous (à plus de 95% dans certains drainages) (cf. Annexe 3)

Un deuxième type de DMA a été étudié : le **Reigous** (Gard, France). Comparativement au cas du Rio Tinto, le Reigous est un DMA dont l'étendue géographique est limitée (1,5km de long contre plusieurs dizaines pour les fleuves espagnols) et la contamination métallique bien plus récente (une cinquantaine d'années contre plusieurs centaines d'années pour le Rio Tinto, cf. Annexe 3). Les concentrations en fer sont aussi plus faibles même si elles restent relativement élevées (de l'ordre de 2 g/l) et le fer est principalement présent sous forme de Fe(II). Ce DMA présente par contre des concentrations élevées en arsenic (environ 300 mg/l) et des minéraux particuliers y précipitent comme c'est le cas de la tooéléite qui est un oxyhydroxysulfate de fer riche en As(III) de formule $\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dont une seule autre occurrence a été reportée dans le monde (Cesbron and Williams, 1992). Il est alors intéressant de pouvoir comparer ces deux sites d'étude.

Dans un deuxième temps des expériences en laboratoire ont été réalisées afin de préciser les conditions de formation de la tooéléite. Ces expériences ont aussi permis d'étudier l'influence de la cinétique des réactions sur le fractionnement isotopique du fer lors de l'oxydation et de la précipitation du fer. De telles expériences permettent de découpler les processus mis en jeu. Ainsi, au cours de ces expériences, deux phases distinctes ont été mises en évidence ; tout d'abord l'oxydation et la précipitation conjointe du fer puis lorsque la totalité du fer a été oxydée, la précipitation devient le seul processus de mobilisation du fer.

Cette partie est donc divisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre présente la composition isotopique du fer dans les eaux et les solides rencontrés sur le site du Rio Tinto et de l'Odiel ; un système dominé par du fer présent sous forme de Fe(III). Les résultats ont fait l'objet d'un article publié dans *Chemical Geology*.
- Le deuxième chapitre traite de l'oxydation et de la précipitation du fer dans le Reigous, un DMA dominé par du fer sous forme de Fe(II). Une comparaison du fractionnement isotopique du fer en système ouvert et fermé est ajoutée à l'étude de l'influence de la cinétique de réaction sur le fractionnement isotopique du fer. Article en préparation.

**Chapitre 5 : Les isotopes du fer dans les
eaux et les solides du bassin Tinto-Odiel
(Sud-ouest de l’Espagne) (Article n°3)**

Article n°3

Les isotopes du fer dans les eaux acides minières et les solides riches en fer du bassin Tinto-Odiel (Ceinture Ibérique de Pyrite, Sud-Ouest de l'Espagne)

Marion Egal, Françoise Elbaz-Poulichet, Corinne Casiot, Michael Motelica-Heino, Philippe Négrel, Odile Bruneel, Aguasanta Miguel Sarmiento, Jose Miguel Nieto

Article publié dans Chemical Geology, 253 (3-4), 162-171.

RESUME

La composition isotopique du fer a été déterminée dans les eaux, les oxydes de fer et les sulfures des bassins du Rio Tinto et de l'Odiel (situés dans le Sud-ouest de l'Espagne). En conséquence de l'oxydation des sulfures dans les stériles miniers, les deux fleuves présentent des eaux acides ($1,45 < \text{pH} < 3,85$) et des concentrations élevées en fer dissous (jusqu'à 420 mmol/l) et sulfates (jusqu'à 1190 mmol/l).

Les valeurs de composition isotopique du fer ($\delta^{56}\text{Fe}$) dans les échantillons riches en pyrite du Rio Tinto et de la mine de Tharsis (située dans le bassin de l'Odiel) sont comprises entre $-0,56 \pm 0,08\text{‰}$ et $0,25 \pm 0,1\text{‰}$. Les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ des précipités d'oxydes de fer qui se forment couramment dans le lit de la rivière varient entre $-1,98 \pm 0,1\text{‰}$ et $1,57 \pm 0,08\text{‰}$. En comparaison, des gammes plus étroites de valeurs (de $-0,18 \pm 0,08$ et $0,21 \pm 0,14\text{‰}$) ont été observées pour leurs analogues fossiles datés du Pliocène-Pléistocène et dans les échantillons issus du Gossan (la couche oxydée qui se forme suite à l'exposition des dépôts de sulfures massifs à l'oxygène) (de $-0,36 \pm 0,12\text{‰}$ à $0,82 \pm 0,07\text{‰}$). Dans les eaux, les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ sont comprises entre $-1,76 \pm 0,1\text{‰}$ et $0,43 \pm 0,05\text{‰}$.

A la source du Rio Tinto, le fractionnement entre le Fe(III) aqueux et la pyrite issue des stériles est plus faible que ce qui pourrait être attendu pour un simple processus d'oxydation de la pyrite. De la même façon, la composition isotopique des oxydes formés à partir du Gossan et de la pyrite est différente de ce qui est généralement attendu pour l'oxydation de la pyrite. Dans les deux fleuves, la précipitation des oxydes de fer (principalement sous forme de jarosite et de schwertmannite et dans une moindre mesure sous forme de goethite) à partir d'eau contenant principalement (plus de 99%) du Fe(III) avec des concentrations allant jusqu'à 372 mmol/l conduit à des fractionnements variables entre les solides et la phase aqueuse ($-0,98\text{‰} < \Delta^{56}\text{Fe}_{\text{solide-eau}} < 2,25\text{‰}$). L'intensité significative des facteurs de fractionnements positifs observés dans plusieurs eaux riches en Fe(III) peut être liée à la précipitation de phases contenant des sulfates de Fe(III).



Iron isotopes in acid mine waters and iron-rich solids from the Tinto–Odiel Basin (Iberian Pyrite Belt, Southwest Spain)

M. Egal^a, F. Elbaz-Poulichet^{a,*}, C. Casiot^a, M. Motelica-Heino^b, P. Négrel^b, O. Bruneel^a, A.M. Sarmiento^c, J.M. Nieto^c

^a Laboratoire Hydrosclences, UMR 5569, Université Montpellier 1 & 2, CNRS-IRD, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France

^b BRGM, Orléans, France

^c Departamento de Geología, Universidad de Huelva. Av. Fuerzas Armadas s/n 21071 Huelva, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2008

Received in revised form 29 April 2008

Accepted 13 May 2008

Editor: D. Rickard

Keywords:

Fe isotopes

Acid mine drainage

Iberian Pyrite Belt

ABSTRACT

The isotopic composition of Fe was determined in water, Fe-oxides and sulfides from the Tinto and Odiel Basins (South West Spain). As a consequence of sulfide oxidation in mine tailings both rivers are acidic ($1.45 < \text{pH} < 3.85$) and display high concentrations of dissolved Fe (up to 420 mmol l^{-1}) and sulphates (up to 1190 mmol l^{-1}).

The $\delta^{56}\text{Fe}$ of pyrite-rich samples from the Rio Tinto and from the Tharsis mine ranged from $-0.56 \pm 0.08\text{‰}$ to $+0.25 \pm 0.1\text{‰}$. $\delta^{56}\text{Fe}$ values for Fe-oxides precipitates that currently form in the riverbed varied from $-1.98 \pm 0.10\text{‰}$ to $1.57 \pm 0.08\text{‰}$. Comparatively narrower ranges of values ($-0.18 \pm 0.08\text{‰}$ and $+0.21 \pm 0.14\text{‰}$) were observed in their fossil analogues from the Pliocene–Pleistocene and in samples from the Gossan (the oxidized layer that formed through exposure to oxygen of the massive sulfide deposits) ($-0.36 \pm 0.12\text{‰}$ to $0.82 \pm 0.07\text{‰}$). In water, $\delta^{56}\text{Fe}$ values ranged from $-1.76 \pm 0.10\text{‰}$ to $+0.43 \pm 0.05\text{‰}$.

At the source of the Tinto River, fractionation between aqueous Fe(III) and pyrite from the tailings was less than would be expected from a simple pyrite oxidation process. Similarly, the isotopic composition of Gossan oxides and that of pyrite was different from what would be expected from pyrite oxidation. In rivers, the precipitation of Fe-oxides (mainly jarosite and schwertmannite and lesser amounts of goethite) from water containing mainly (more than 99%) Fe(III) with concentrations up to 372 mmol l^{-1} causes variable fractionation between the solid and the aqueous phase ($-0.98\text{‰} < \Delta^{56}\text{Fe}_{\text{solid-water}} < 2.25\text{‰}$). The significant magnitude of the positive fractionation factor observed in several Fe(III) dominated water may be related to the precipitation of Fe(III) sulphates containing phases.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fe is the fourth most abundant element on Earth. It is an essential element for most living organisms. It is used as an electron donor or acceptor in numerous microbiological metabolisms especially those involving acidophilic organisms (Ehrlich, 1996; Amils et al., 2007). Fe is also a key micronutrient in the limitation of oceanic production and thus plays a direct role in the control of CO_2 assimilation by phytoplankton (Martin and Fitzwater, 1988; Martin, 1990; Coale et al., 1996).

Fe isotopes are a good tool to improve our understanding of Fe-cycling and have been used in many scientific fields as reported in the review of Dauphas and Rouxel (2006). Non redox reactions can fractionate Fe isotopes (Anbar et al., 2000), but major effects are due to redox processes (Johnson et al., 2002; Schauble et al., 2001). Fractionation can be predicted theoretically (Polyakov and Mineev,

2000; Schauble et al., 2001; Anbar et al., 2005; Polyakov et al., 2007). The theoretical approach of Anbar et al. (2005), based on the density functional theory, predicts a fractionation of 3‰ at 25 °C for the equilibrium fractionation between $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ and $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, Fe (III) being isotopically heavier than Fe(II), which is in good agreement with the experimental data of Johnson et al. (2002) and Welch et al. (2003).

The possible fractionation of Fe isotopes during biologically mediated reactions and the observation of rather homogeneous isotopic composition in low C and S clastic rocks compared to that of chemically precipitated sediments (Beard and Johnson, 1999; Beard and Johnson, 2004) paved the way for Fe biosignatures, though the picture was shown to be more complex than originally thought (Anbar et al., 2000; Anbar, 2004). With the exception of magnetotactic bacterial oxidation (Mandernack et al., 1999), Fe isotope fractionation has been experimentally demonstrated for all biologically mediated Fe reactions including extracellular reductive dissolution of hematite (Beard et al., 2003), extracellular dissolution of ferrihydrite (Beard and Johnson, 1999; Beard et al., 2003), anoxygenic photosynthesis of

* Corresponding author. Tel.: +33 467143931; fax: +33 467144774.

E-mail address: felbaz@univ-montp2.fr (F. Elbaz-Poulichet).

ferrihydrite by photoautotrophic bacteria (Croal et al., 2004), dissolution of hornblende in presence of bacteria (Brantley et al., 2004). However, Fe isotope fractionation has also been observed during abiotic processes such as abiotic Fe(II) oxidation (Bullen et al., 2001), isotopic exchange between Fe(II) and Fe(III) (Skulan et al., 2002; Welch et al., 2003), Fe(III) precipitation (Bullen et al., 2001; Skulan et al., 2002; Beard and Johnson, 2004; Balci et al., 2006), Fe(III) dissolution (Brantley et al., 2004).

Most Fe isotope data for natural environments concern solid samples including meteorites and lunar samples (Beard and Johnson, 1999; Poitrasson et al., 2004; Poitrasson and Freydisier, 2005). Particular attention has been paid to the Fe isotope composition of Banded Iron Formations (BIFs) (Johnson et al., 2003; Dauphas et al., 2004, 2007; Yamaguchi et al., 2005), black shales (Rouxel et al., 2005), oceanic crust (Rouxel et al., 2003), ferromanganese crust and nodules (Levasseur et al., 2004; Chu et al., 2006), hydrothermal deposits (Markl et al., 2006; Dideriksen et al., 2006).

An increasing number of studies are now considering the fractionation between water and solids in natural environments such as oceanic hydrothermal systems (Sharma et al., 2001; Severmann et al., 2004; Dauphas and Rouxel, 2006), shelf sediments and porewaters (Severmann et al., 2006), rivers and sediments (Fantle and DePaolo, 2004; Berquist and Boyle, 2006). However the number of data on the Fe isotope composition of natural waters remains limited. Yet this knowledge is important to better understand the biogeochemical processes that fractionate Fe isotopes in nature.

Fe-rich acidic water also called acid mine drainage (AMD) is produced upon oxidation of pyrite in mining residues. The formation of iron stromatolite-like structures is common in AMD (Brake et al., 2002, 2004; Morin et al., 2003) and is linked to microbial activity, which plays a major role in the oxidation of Fe and in the precipitation of the Fe-rich solids (Ferris et al., 2004). These modern stromatolites are very similar to those of Late Archean–Early Proterozoic BIFs. AMD may thus be studied as a model for early Earth and extraterrestrial environments (Fang et al., 2007). With the exception of the study of Herbert and Schippers (2008), few data on the isotopic composition of Fe in acid mine environments have been reported to date.

The Tinto and Odiel Rivers drain the central and eastern part of the Iberian Pyrite Belt, which has the largest known concentration of massive sulfide deposits in the world. Pyrite oxidation is still taking place in the huge mining spoil heaps that resulted from a long history (5000 years) of mining (Leblanc et al., 2000). As a consequence, the waters of both rivers are strongly affected by AMD and display extremely high Fe concentrations (up to a few hundreds of mmol l^{-1}) and low pH values (2.5 to 3.5) from the mining area to the estuary (ca. 50 km) (Braungardt et al., 2003). The system is currently being studied as a terrestrial analogue for the planet Mars because of the abundance of Fe and the occurrence of jarosite which resembles that at the Martian Meridiani Planum site (Fairen et al., 2004; Fernandez-Remollar et al., 2005; Amils et al., 2007).

The objective of this study was to assess the variability of Fe isotope composition in relation to the main processes affecting Fe cycling in this Fe(II)–Fe(III)–pyrite–sulphates-rich system.

Iron isotope composition was determined in the water of the Tinto and Odiel Rivers, in the Fe sulfides of the mining wastes, in the Fe-rich solids that are currently being precipitated from the water, and in similar Fe-oxide precipitates that have been preserved in the Pliocene–Pleistocene river terraces. In parallel, dissolved Fe concentrations (including total, Fe(II) and Fe(III)) were determined. The mineralogical composition of the Fe-rich solids in this system was also analysed.

2. Site description

The Iberian Pyrite Belt (IPB) forms part of the South Portuguese Zone, which comprises the southernmost zone of the Iberian Variscan

Belt. The IPB has been reported as one of the largest massive sulfide provinces in the world (Leistel et al., 1998; Sáez et al., 1999; Tornos, 2006), containing more than one hundred individual massive sulfide deposits with original reserves being estimated to exceed 1700 million tons scattered over an area about 250 km in length and 40 km in width extending from Seville (Spain) to south of Lisbon (Portugal) (Fig. 1). Two contrasting styles of mineralization can be recognized in the IPB suggesting two different geological settings: shale-hosted exhalative deposits in the southern part of the area, and volcanic-hosted deposits in the northern part formed by stratabound replacement of felsic volcanic rocks. Most of the deposits formed over a short time span, from the Late Devonian to the Early Carboniferous. Some of the sulfide deposits have been exposed at the surface at least since the Miocene, and have consequently undergone extensive oxidation processes, developing a thick cover of iron oxides and hydroxides known as “Gossan”, (Pomiès et al., 1998; Nieto et al., 2003).

The metallic ore, which consists of massive bodies of iron and copper sulphides, has been mined since the Third Millennium BC (Leblanc et al., 2000; Nocete et al., 2005), leaving numerous abandoned mining wastes that contain mainly pyrite.

The area is drained by the Tinto and Odiel Rivers. The Odiel River (length: 140 km, surface of the basin: 2300 km^2) has an average annual flow of about 460 $\text{Mm}^3 \text{yr}^{-1}$. The Tinto River (length: 100 km, surface of the basin: 720 km^2) has an average annual flow of 90 $\text{Mm}^3 \text{yr}^{-1}$. Except for the upper Odiel River, which is located upstream from the mines, all the water bodies in the area are acidic (pH=1.45–3.85) and contain extremely high concentrations of Fe and associated heavy metals and sulphate (Olias et al., 2004; Ferris et al., 2004; Sanchez-Espana et al., 2005).

Despite such extreme conditions, the Tinto and Odiel waters are host to a diverse biota of eukaryotes and prokaryotes (Lopez-Archilla et al., 2001; Zettler et al., 2002; Sabater et al., 2003; Gonzalez-Toril et al., 2003; Aguilera et al., 2006). These organisms probably promote the precipitation of the Fe-rich solids that are ubiquitously encountered in the riverbeds around biological remains (Fernandez-Remollar et al., 2005). In the Pliocene (>500,000 years) terraces of the Tinto River, similar structures are observed that can be considered as fossil analogues of modern stromatolites (Amils et al., 2007).

3. Materials and methods

3.1. Sample collection

Four surveys were carried out from 2003 to 2006. Samples for Fe isotope analysis were taken in July 2003 and July 2006. The locations of the sampling stations are shown in Fig. 1. Water samples were taken in several acid streams rising in the vicinity of former mining areas and in the mainstream of the Tinto and Odiel Rivers. Three samples (TP-1, TP-2, TP-3) were taken in what is generally considered as the source region of the Tinto River. TP-2 was taken immediately (less than 1 m) below the outlet of the pyrite tailings stock. TP-1 was taken in another branch of the river at a few hundred meters approximately from the source and has already undergone geochemical modification relative to the source water. TP-3 was sampled downstream from the junction of the TP-1 and TP-2 streams.

Solid samples representing the major types of iron-rich material found in the Tinto and Odiel basins were also collected. Ferruginous solids from old river terraces were taken near Nerva, and at stations ISL and PC (Fig. 1); samples of pyrite were collected in the Tharsis mining district, and from Peña del Hierro mine (Rio Tinto mining district), and Gossan samples were collected in the Tharsis mining district. Different facies of recent sediments – laminated concretions, ferruginous crust and gel-like precipitates – were sampled in the effluents flowing from mine galleries or spoil heaps, and in the mainstream of the Tinto and Odiel Rivers.

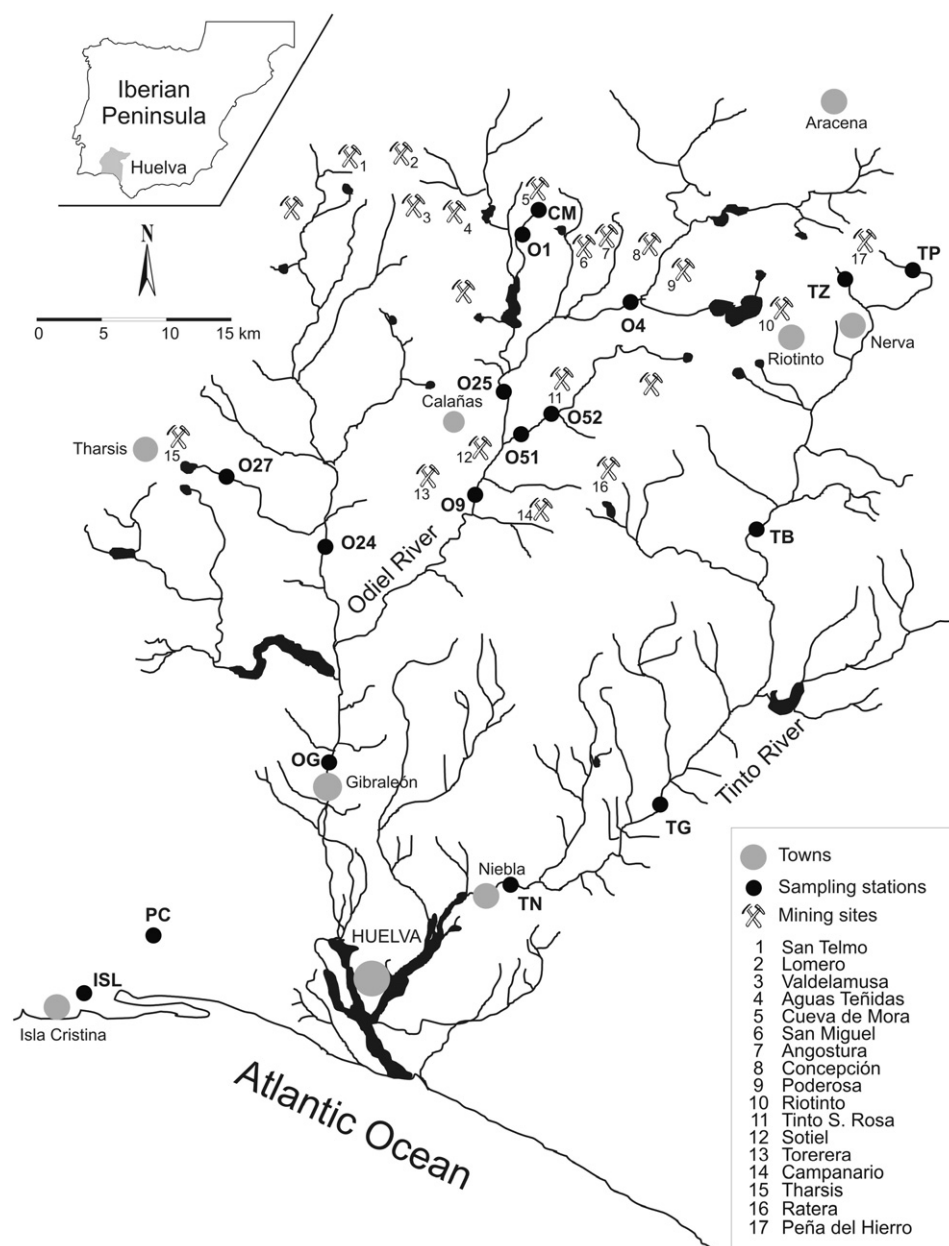


Fig. 1. Map of the study area showing the main mines and the sampling stations in the Tinto and Odiel watersheds.

3.2. Determination of physicochemical parameters of the water and solids

The pH, temperature and the redox potential (Eh) were measured in the field with an Ultrameter™, Model 6P (Myron L Company, Camlab, Cambridge) equipped with a pH sensor. Dissolved oxygen (O_{2d}) was measured with CHEMets® tests (CHEMetrics, Calverton, USA) based on colorimetric detection after reaction of O_{2d} with indigo carmine for the range 0–12 $\mu\text{g g}^{-1}$ and with rhodazine D for 0–1 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Water samples were filtered in the field through 0.22 μm Millipore membranes mounted on Sartorius polycarbonate filter holders. One aliquot was immediately acidified to pH 1 with HNO_3 (14.5 M) and stored at 4 °C for the determination of total dissolved Fe (Fe_T). Another aliquot was taken for determination of Fe(II). It was buffered to pH 4.5 with an ammonium acetate/acetic acid buffer immediately after filtration and Fe(II) was complexed by adding 1 ml of a 0.5% (w/w) 1,10-phenanthroline chloride solution to 10 ml of sample (Rodier

et al., 1996). Fe(II) was analysed using spectrophotometry at 510 nm. The detection limit was 0.2 mg l^{-1} and precision was better than 5%.

Fe_T was determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). Dissolved Fe(III) was calculated by difference between Fe_T and Fe(II).

The main mineralogy of solid samples was determined at the Central Research Services of the University of Huelva using a Bruker D8 Advance X-ray diffractometer. The pulverized samples were irradiated with $\text{CuK}\alpha$ radiation at 40 kV and 30 mA, scanning between 2° and 70° with a step interval of 0.05 (2 θ).

3.3. Isotope measurements

In the first step, solid samples were completely dissolved with HCl/HF (5:1) on a hot plate (80 °C, 24 h) followed by $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (5:1) (80 °C, 24 h), evaporated to dryness and resuspended in 10 ml of HNO_3 (3%). The purification procedure used for water and dissolved solids is similar to that described by Balci et al. (2006). After oxidation with a

Table 1

Main physicochemical parameters, temperature (*T*), pH, redox potential (*Eh*), conductivity (*C*), total dissolved SO_4^{2-} , Fe (Fe_T), concentrations of aqueous Fe(III) and Fe, and isotope composition in water, laminated concretions (LC) and gel-like precipitates (GL) from the Tinto and Odiel basin

	Date	T °C	pH	C $\mu\text{S cm}^{-1}$	SO ₄ ²⁻ mmol l ⁻¹	Eh V	O ₂ ppm	Fe _T mmol l ⁻¹	Fe(II) mmol l ⁻¹	Fe(III) mmol l ⁻¹	Water Mean±2SD	δ ⁵⁶ Fe (‰) LC Mean±2SD	GL Mean±2SD	Main Fe mineral				
Odiel Basin																		
Cueva de la Mora mine																		
CM	01/07/03	27.6	3.14	4576	43	0.62	10	5.49	0.48	5.01	-1.12	0.07	1.12	0.05	0.78	0.12	Sh	
CM	01/07/04	28.6	3.04	4575				10	4.59	0.13	4.46	-1.11	0.10			-0.68*		0.13
CM	01/07/06	29.3	2.89	3400			0.69	>12	2.13	2.98	0.02	-1.76	0.10					
Monte Romero mine																		
O1	01/07/03	25.6	2.9	4542	89	0.71		3.09	0.33	2.76								
O4	01/07/03	23.8	2.76	5710			0.72	8	2.66	0.29	2.37							
O4	01/07/04	34.2	2.39	8006				12	3.80	0.04	3.76							
O4	01/10/05	21.9	2.75	4376			0.72	11	1.86	1.21	0.64							
O4	01/07/06	29.3	2.72	4650			0.78	>12	2.29	0.66	1.63	-1.71	0.14			-1.98	0.10	
Odiel River																		
O25		29.2	2.82	3956		0.74	8	0.31	0.13	0.18								
Santa Rosa mine																		
O51	01/07/03	23.8	2.82	2906	31	0.77	8	0.3	0.08	0.17								
O52-1	01/07/03	24.1	3.32	3853			0.60	8	11.0	0.57	10.4	-1.03	0.09	1.10	0.07	1.22	0.14	
O52-1	01/07/04	21.8	3.17	3543				3.5	12.2	0.34	11.9							
O52-1	01/07/06	22.4	3.3	3280			0.57	3.5	16.9	13.6	3.27	-1.49	0.10					
O52-2	01/07/03	21.3	3.5	3812			0.50	3.5	11.2	0.57	10.6			1.57	0.08			Sh, Gt
O52-2	01/07/06	29.3	3.08	3810			0.60	7	15.6	13.2	2.39					0.68	0.10	
Sothiel mine																		
O9	01/07/03	32.1	2.94	3243		0.73	8	0.19	0.11	0.08								
O9	01/07/04	25.4	2.17	3049			10	0.20	0.20	0.01								
O9	01/10/05	19.7	2.97	3544		0.75	9	0.48	0.34	0.14								
Tharsis mine																		
O27-1	01/07/03	33.5	3.1	8077	225	0.70	>12	0.17	0.02	0.15			0.79	0.08	0.41	0.14	Sh, Jt, Gt	
O27-1	01/07/04	32.5	2.38	15490				9	28.6	0.12	28.5							
O27-1	01/10/05	19.9	2.57	10260			0.71	>12	19.5	4.68	14.8							
O27-1	01/07/06	25	2.47	11900			0.69	>12	26.0	25.0	1.02	-1.70	0.10					
O27-2	01/07/03	32.1	2.56	16150			0.71		31.8	1.36	30.4	-0.96	0.07	-0.16	0.09			
Oraque River																		
O24	01/07/03	29.6	2.85	2245		0.70	_	0.11	0.11	0.00	-0.31	0.13			-1.30	0.02	Sh	
O24	01/10/05	18	2.84	4115		0.75	9	0.80	0.32	0.48								
O24	01/07/06	24.3	2.93	1319		0.76	7	0.27	0.14	0.13	-1.28	0.10						
San Telmo																		
O29	01/10/05	19.4	2.6	12010		0.73		17	3.04	13.5								
O29	01/07/06	30.76	2.44	15080		0.68	>12	33	28.3	5.09	-1.74	0.10	-1.03	0.10	-0.84	0.10		
O29	01/07/06	30.76	2.44	15080		0.68	>12	33	28.3	5.09			-0.98	0.10				
Gibraleon OG																		
OG	01/07/04	30.1	3.24	1588	9		6	0.04	0.03	0.01								
Tinto Basin																		
Pena de Hierro																		
TP-1	01/07/04	35.5	2.43	9558	99		10	20.5	0.47	20.02	-0.37	0.12			-0.69	0.15	Jt	
TP-1	01/10/05	22.8	3.2	8121		0.60	9	16.9	16.1	0.77								
TP-1	01/07/06	22.7	2.75	7570		0.68	>12	16.9	10.3	6.63	-0.76	0.10						
TP-2	01/07/04	35	1.45	26980	1191		11	372	0.24	372	0.43	0.05						
TP-2	01/10/05	20.6	1.81	27020		0.74		420	26.3	394								
TP-2	01/07/06		1.64			0.77					-0.23	0.10						
TP-3	01/10/05	23.3	2.12	18060		0.72		177	18.84	158								
TP-3	01/07/04	34	1.81	20670	616		11	226	0.39	226								
Zarandas																		
TZ	01/07/04	33.9	2.26	13110	17		12	60	0.73	59.4	-0.72	0.06	1.14	0.10			Jt, Hy Jt	
TZ	01/10/05	23.9	2.77	11350		0.61	11	54	6.53	47.4								
TZ	01/07/06	27.2	2.72	8340		0.66	>12	39	30.9	7.68	-0.88	0.10						
Berrocal																		
TB	01/07/03	29.6	2.43	9605	139	0.84	_	36.7	1.04	35.7								
TB	01/07/04	27.8	2.07	9508				>12	39.2	0.02	39.1	-0.36	0.07					
TB	01/10/05	18.3	2.55	2690			0.70	>12	6.0	2.73	3.30							
TB	01/07/06	23.3	2.48	5180			0.85	>12	17.7	0.29	17.4	-1.15	0.10			-1.16	0.10	
Gadea																		
TG	01/07/04	26.9	2.15	3318	17		>12	1.36	0.35	1.01	-0.19	0.12	-0.71	0.07	-0.97	0.10	Jt, Gt	
TG	01/10/05	17.9	2.38	3710		0.76	>12	9.78	0.89	8.89								
TG	01/07/06	29.4	2.64	1508		0.80	11	2.21	0.12	2.10								
Niebla																		
TN	01/07/03	31.8	2.66	3320	10	0.77		1.63	0.13	1.49								
TN	01/07/04	26	2.74	2228					0.14	0.14								
TN	01/10/05	18	2.55	3828			0.79	>12	9.06	0.30	8.77							
TN	01/07/06	24.8	2.69	1259			0.78	>12	1.80	0.19	1.62							

Sh=Schwertmannite; Gt=Goethite; Jt=Jarosite; Hy Jt=hydronian jarosite.

SD: standard deviation, number of replicate analysis *n*=40.

*Crust sample.

The location of sampling station is given in Fig. 1. Samples are identified by a station number (example: O27). The numbers (1, 2, 3) separated by a dash from station numbers indicate different seepages.

few drops of concentrated H_2O_2 , the sample was purified using 2 ml of resin (RE Spec resin Eichrom Technologies Inc., IL, USA). Around 10 ml of the sample (diluted to an average of $5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Fe}$) was loaded on a column with the resin. Sample matrix was removed and eluted with 10 ml of HNO_3 (8 N) and the Fe was eluted with 10 ml of HNO_3 (3%). Iron isotopes (^{54}Fe , ^{56}Fe) were measured with a Neptune double focusing sector field multiple collector ICP-MS (Thermo-Finnigan, Bremen, Germany). This high resolution enables iron isotopes to be measured without isobaric interferences from polyatomic species with the peak-shoulder method developed by Weyer and Schwieters (2003).

The determination of isotopic ratios of samples was made with external calibration using the reference material IRMM-14 (IRMM, Geel, Belgium), after internal normalisation with Cu isotopes (spiked at 1 mg l^{-1} in the samples and standards). The external precision was evaluated by analysing the reference material IRMM-14 with external calibration with IRMM-14. The external reproducibility was 0.06% $\delta^{56}\text{Fe}$ (2 standard deviations). It was similar to what obtained by double-spiking (Balci et al., 2006). The accuracy of the method was determined similarly. The 2-SD for individual samples was determined from the raw data. Each measurement consisted of 4 blocks of 10 cycles of 4 s duration. Thus the number of replicate was 40 per sample.

$\delta^{56}\text{Fe}$ is defined by the following equation:

$$\delta^{56}\text{Fe} = [({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe}_{\text{sample}})/({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe}_{\text{IRMM}}) - 1] \times 1000 \quad (1)$$

4. Results

4.1. Aqueous chemistry

Data are listed in Table 1. The temperature of water ranged from 17.9 to 35.5°C (21.3 to 35.5°C in the waters analysed for Fe isotopes). The dissolved oxygen content ranged from 3.5 to 12 mg l^{-1} , reflecting oxic conditions. All water samples were acidic with pH values ranging from 1.45 for the water emerging from the pyrite wastes (TP-2 station) to 3.24 at the OG station located at the entry of the estuary.

The highest SO_4^{2-} (up to 1190 mmol l^{-1}) and Fe_T concentrations (up to 420 mmol l^{-1}) and the lowest pH values (down to 1.45) were observed at the TP2 station in water seeping from the pyrite-rich

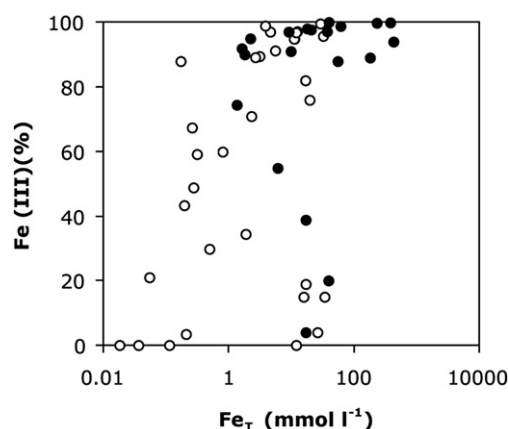


Fig. 3. Percentage of Fe(III) in solution as a function of total dissolved Fe (Fe_T). Samples analysed for Fe isotopes are in black.

tailings stock at Peña de Hierro (Table 1). The concentrations of Fe_T and Fe(III) generally decreased with an increase in pH (Fig. 2). The percentage of Fe(III) in solution reached nearly 100% in the water emerging from the pyrite waste (TP-2 station) and dropped to 0% at the entry to the river estuary (OG and TN stations, Fig. 1). It decreased with decreasing Fe_T concentrations (Fig. 3). Only a few samples from the 2006 survey did not follow this pattern but had a lower percentage of Fe(III) than that observed in previous surveys.

The water was supersaturated with regards to both jarosite and schwertmannite (Fig. 2) in agreement with previous results obtained by Acero et al. (2006). According to Sanchez-Espana et al. (2007) supersaturation is due to high oxidation rates of Fe (5.5×10^{-6} to $4 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and comparatively low precipitation rates of Fe-oxides (1.7×10^{-6} to $10^{-7} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Results of speciation calculations using the thermodynamic equilibrium calculation program CHESS (van der Lee and de Windt, 2002) for three representative qualities of water are shown in Table 2. In the source water (TP2 station) characterized by low pH (1.45), and high SO_4^{2-} (1191 mmol l^{-1}) and Fe_T (372 mmol l^{-1}) concentrations, Fe occurred predominantly (about 67%) as Fe(III)-sulphatocomplexes. At the TZ station, which displayed slightly higher pH (2.26) and lower SO_4^{2-} (17 mmol l^{-1}) and Fe_T (60 mmol l^{-1}) concentrations, the majority of Fe was in the form of Fe(III)-hydroxocomplexes. At the O29 station (pH=2.6; $[\text{Fe}^{2+}] = 3.04 \text{ mmol l}^{-1}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 13.5 \text{ mmol l}^{-1}$), most of the Fe (about 69%) was in the form of Fe(II)-sulphatocomplexes.

4.2. Characteristics of stream bed sediments

Fe-rich precipitates were ubiquitous in the riverbeds except at the TP-2 station. They contained an average of 40% Fe. Three different

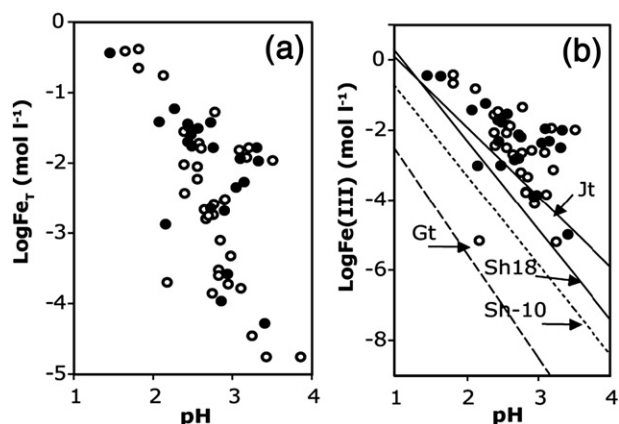


Fig. 2. Concentrations of total dissolved Fe (Fe_T) (a) and Fe(III) (b) versus pH. Samples analysed for Fe isotopes are in black. Theoretical solubility lines for schwertmannite (Sh), goethite (Gt) and jarosite (Jt) are also represented. The following reactions and constants are used: Schwertmannite (Sh-10): $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{4.4}(\text{SO}_4)_{1.8} + 20.4 \text{ H}^+ = 8 \text{ Fe}^{3+} + 1.8 \text{ SO}_4^{2-} + 12.4 \text{ H}_2\text{O}$; $\text{LogKs} = 10.5$, Yu et al. (1999). Schwertmannite (Sh-18): $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{4.8}(\text{SO}_4)_{1.6} + 20.8 \text{ H}^+ = 8 \text{ Fe}^{3+} + 1.6 \text{ SO}_4^{2-} + 12.8 \text{ H}_2\text{O}$; $\text{LogKs} = 18$, Bigham et al. (1996). Goethite (Gt): $\text{FeOOH} + 3 \text{ H}^+ = \text{Fe}^{3+} + 2 \text{ H}_2\text{O}$; $\text{LogKs} = 0.5$, Parkhurst and Appelo (1999). Jarosite (Jt): $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6 + 6 \text{ H}^+ = \text{K}^+ + 3 \text{ Fe}^{3+} + 2 \text{ SO}_4^{2-} + 6 \text{ H}_2\text{O}$; -14.8 , Parkhurst and Appelo (1999). *Calculation have been made for $\text{Log}(\text{SO}_4^{2-}) = -2.74$, which represents a bottom limit for SO_4^{2-} activity in AMD (higher SO_4^{2-} activities would shift down the solubility lines).

Table 2
Typical speciation of Fe in water from the Tinto and Odriel basins

TP2 (07/2004)	mol%	O29 (10/2005)	mol%	TZ (07/2004)	mol%
Fe(III)		Fe(III)		Fe(III)	
$[\text{Fe}(\text{SO}_4)]^{2-}$	52.5	$[\text{Fe}]^{3+}$	8	$[\text{Fe}]^{3+}$	37
$[\text{Fe}]^{3+}$	28.5	$[\text{Fe}(\text{OH})]^{2+}$	6.3	$[\text{Fe}(\text{OH})]^{2+}$	34
$[\text{Fe}(\text{SO}_4)]^+$	15	$[\text{Fe}_3(\text{OH})_4]^{5+}$	0.3	$[\text{Fe}_3(\text{OH})_4]^{5+}$	17
$[\text{Fe}(\text{OH})_2]^{2+}$	2.8	$[\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$	0.2	$[\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$	9.4
$[\text{Fe}(\text{OH})]^{2+}$	1.1	$[\text{Fe}(\text{SO}_4)]^+$	0.2	$[\text{FeSO}_4]^+$	0.7
				$[\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$	0.7
				$[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]^-$	0.1
		Fe(II)		Fe(II)	
		$[\text{Fe}]^{2+}$	69.5	$[\text{Fe}]^{2+}$	1
		$[\text{FeSO}_4]$	16	$[\text{FeSO}_4]$	0.2

The values used for calculations are listed in Table 1 (at the O29 station, the concentration of SO_4^{2-} was estimated from the relationship between conductivity and SO_4^{2-}).

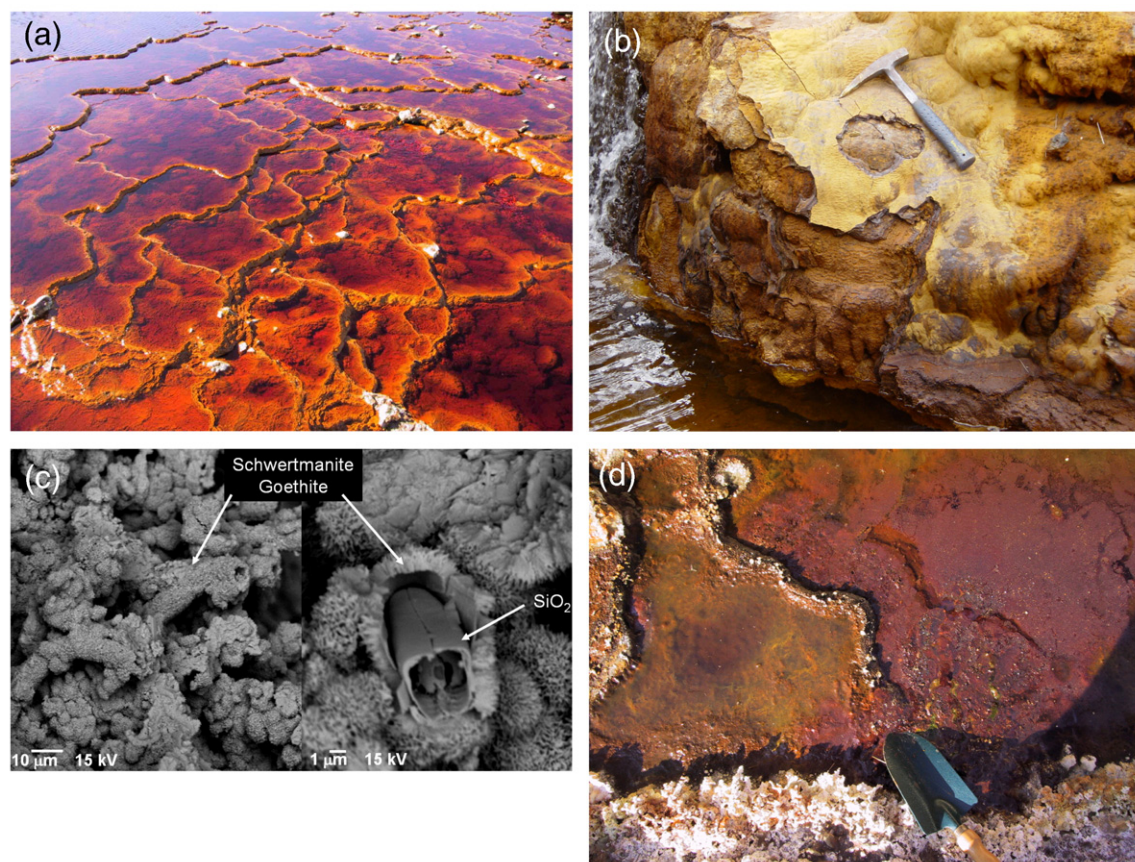


Fig. 4. Photographs showing the different facies of the present-day iron precipitates: laminated concretions in formation (a) and dried (b); SEM view of bacteria and diatoms in the laminated concretions (c); ferruginous crust at the surface of standing water (d).

facies of precipitates could be distinguished. Some concretions were laminated (Fig. 4a, b). Scanning electron photographs show dead or living biological debris such as diatoms encrusted in the precipitates (Fig. 4c). Gel-like precipitates are fine ochres that, unlike laminated concretions, do not agglomerate. The third type of precipitate facies was recovered in the biofilm formed at the surface of stagnant water (Fig. 4d).

As expected from CHESS calculations and in agreement with previous observations in this system (Sanchez-Espana et al., 2005), XRD analysis confirmed the presence of schwertmannite, jarosite, goethite in the precipitates (Table 1).

The different facies did not correspond to systematic mineralogical differences and in some samples more than one mineral was identified. These samples were mainly “laminated concretions”, in which the upper part of the sample (up to the first 1 cm) was schwertmannite (mainly in the Odiel basin) or jarosite (mainly in the Tinto basin) whereas goethite is observed at greater depths. The mineral transformation can clearly be seen in Fig. 4b (Tinto-Santa Rosa), where the upper, yellow, part of the concretion is schwertmannite that is transformed into goethite forming the dark part of the sediment below the yellow material. In the laboratory, this alteration takes a few months (Acero et al., 2006).

In Gossan samples, Fe minerals consisted mainly in either hematite or goethite. The facies of the iron-rich deposits from the old river terraces strongly resembled the laminated concretions that form nowadays. They can therefore be considered as their fossil equivalents. They displayed different mineralogy characterized by the presence of a goethite matrix with quartz, K-feldspar and rock clasts. This may reflect recrystallisation after deposition.

4.3. Iron isotope ratios in solids and waters

The $\delta^{56}\text{Fe}$ values of river water and precipitates are presented in Table 1. The isotope composition of other solids is presented in Table 3. A summary of the data obtained for these solids and comparison with data from the literature are presented in Fig. 5.

Table 3

Fe content, main Fe mineral and iron isotope ratios of source rocks and ancient precipitates from the Tinto–Odiel basin

Sample name	Date	Location	Fe	$\delta^{56}\text{Fe}$		Main iron minerals
			% dry wt.	‰		
				Mean	$\pm 2\text{SD}$	
<i>Pyrite ore body</i>						
P-Py	07/03	Pena de Hierro	18	0.25	0.1	Py
FS-SM1	07/03	Tharsis mine southern vein	11	−0.56	0.08	Py
FN-SM2	07/03	Tharsis mine northern vein	10	−0.47	0.1	Py
<i>Fe-oxides from the Gossan</i>						
FS8	07/03	Tharsis mine southern vein		−0.29	0.02	Gt
FS11	07/03	Tharsis mine southern vein		0.29	0.03	Ht
FN8	07/03	Tharsis mine northern vein		0.82	0.07	Gt
FN10	07/03	Tharsis mine northern vein		0.37	0.02	Ht
TG	07/03	Nerva (transported Gossan)	53	−0.36	0.12	
<i>Fossilized laminated concretions</i>						
PC	07/04	Pinares de Cartaya	15	0.21	0.14	Gt
ISL	07/04	Islantilla	18	−0.18	0.08	Gt

Py = pyrite; Gt = goethite; Ht = hematite.

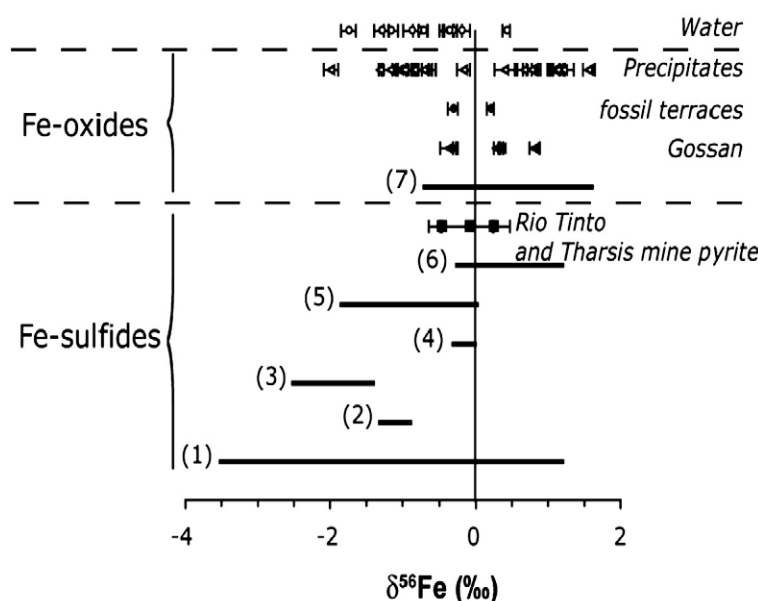


Fig. 5. Summary of $\delta^{56}\text{Fe}$ in the system studied and comparison with relevant data from the literature. (1) Pyrite from Black Shales, Rouxel et al. (2005); (2) Diagenetic pyrite from the Baltic Sea, Fehr et al. (2008); (3) BIF (whole rock), Johnson et al. (2002); (4) BIF (pyrite), Dauphas et al. (2004); (5) Hydrothermal sulfides, Sharma et al. (2001); (6) Hydrothermal pyrite, Graham et al. (2004); (7) Fe-oxides from BIF, Johnson et al. (2003), Rouxel et al. (2005).

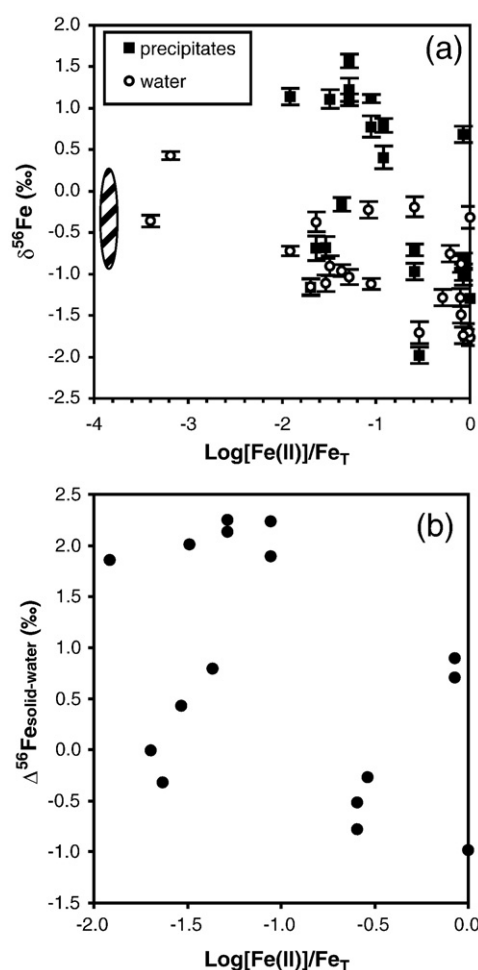


Fig. 6. Fe isotope composition ($\delta^{56}\text{Fe}$) of precipitates and water (a) and fractionation factor between water and precipitates ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{solid-water}}$) (b) versus the logarithm of the aqueous Fe(II) fraction ($\text{Log}[\text{Fe(II)}]/\text{Fe}_T$). The hatched area represents the range of $\delta^{56}\text{Fe}$ values in the fossil laminated concretions.

The Fe isotope composition of pyrite, which is the main primary source of Fe in the system, ranged from $-0.56 \pm 0.08\text{‰}$ to $0.25 \pm 0.10\text{‰}$. As shown in Fig. 5, the range of Fe isotopic compositions reported in the literature for pyrite is quite large. The values observed in this study compare well with those reported for the massive volcanogenic sulfide deposit of the Grasberg Igneous Complex (Graham et al., 2004).

The river precipitates displayed the largest range of isotopic composition with $\delta^{56}\text{Fe}$ values ranging from $-1.98 \pm 0.10\text{‰}$ (station O4) to $1.57 \pm 0.08\text{‰}$ (station O52-2). Comparatively narrow variations in $\delta^{56}\text{Fe}$ values were encountered in their fossil analogues from river terraces ($-0.18 \pm 0.08\text{‰}$ to $+0.21 \pm 0.14\text{‰}$) and in the iron oxides from the Gossan ($-0.36 \pm 0.12\text{‰}$ to $0.82 \pm 0.07\text{‰}$). These values are within the ranges observed for Fe-oxides from BIFs (Johnson et al., 2003; Rouxel et al., 2005).

The range of $\delta^{56}\text{Fe}$ in gel-like sediments ($-1.98 \pm 0.1\text{‰}$ to $0.68 \pm 0.1\text{‰}$) was slightly larger than in laminated concretions ($-0.98 \pm 0.1\text{‰}$ to $1.57 \pm 0.08\text{‰}$). The data from the CM station showed that at the same location, the three different sediment facies can have significantly different isotope compositions. However, the whole data set did not provide any evidence for systematic variation in the isotopic composition in relation to the sediment facies.

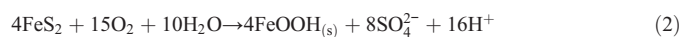
In water, $\delta^{56}\text{Fe}$ ranged from $-1.76 \pm 0.1\text{‰}$ to $0.43 \pm 0.05\text{‰}$. The values were generally negative except at the TP-2 station.

When plotted as a function of the logarithm of the Fe(II) fraction in solution ($\text{Log}[\text{Fe(II)}]/\text{Fe}_T$), the distribution of isotopic ratios was somewhat scattered. Nevertheless, general trends can be distinguished in the evolution of $\delta^{56}\text{Fe}$ values. In both water and sediments, the Fe isotope ratios tend to decrease with an increase in the Fe(II) fraction in water (Fig. 6). Significant fractionation (up to 2.25‰) between the sediments and the water, favouring the heavier isotope in the solid, was observed generally in Fe(III) dominated water ($\text{Log}[\text{Fe(II)}]/\text{Fe}_T < -1$, Fig. 6).

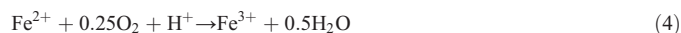
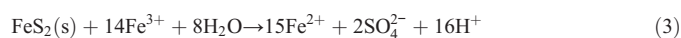
5. Discussion

The isotopic composition at the TP-2 station located at the outlet of the tailing stock (less than 1 m downstream) can be used to assess Fe fractionation during the generation of AMD in the mine tailings. AMD formation is mainly driven by the oxidation process of sulfide-containing solids amongst which pyrite is the most abundant at the

study site. The overall reaction for the oxidation of pyrite has the following form:



In this form, the reaction does not reflect the importance of Fe(III) that has been shown to be a much more efficient electron acceptor than oxygen (Moses et al., 1987). Indeed the reaction proceeds stepwise according to:



At low pH, abiotic oxidation of Fe is slow (Stumm and Morgan, 1981), and reaction (4), which is the rate-limiting step determining the availability of Fe(III) (Evangelou, 1995), requires mediation that is generally ensured by acidophilic bacteria that play a central role in the process of pyrite degradation through the oxidation of Fe^{2+} (Johnson and Hallberg, 2003).

Eventually, Fe(III) can precipitate according to:



The data of Polyakov et al. (2007) for pyrite, and of Anbar et al. (2005) for $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, yields a theoretical fractionation factor $\Delta_{\text{Pyrite-Fe(III)}}$ of 1.95‰ at 25 °C, pyrite being isotopically heavier. Significantly lower values (−0.18‰ in 2004 and 0.48‰ in 2006) were obtained at the TP-2 station from the isotopic composition of pyrite (P-py, Table 3), and water. The difference can be explained by the presence of an iron source depleted in ^{56}Fe compared to pyrite. Alternatively, the precipitation of Fe oxides according to Eq. (5) could favour the enrichment of the aqueous phase in the heavy isotope as suggested by the Fe(III) precipitation experiments of Balci et al. (2006) in an acidic sulphates-rich medium or those of Skulan et al. (2002) showing that rapid precipitation of hematite from Fe(III) results in an increase in the $\delta^{56}\text{Fe}$ of Fe(III).

The isotopic composition of oxides (hematite or goethite) from the Gossan samples of the Tharsis mine ranged from −0.29‰ to 0.82‰ (Table 3). In all cases these values are higher than those observed at the same site for pyrite (−0.56‰ < $\delta^{56}\text{Fe}$ < −0.47‰), which can be considered as the precursor of the Gossan oxides. This observation of higher $\delta^{56}\text{Fe}$ values in oxides compared to pyrite which is ubiquitous in the rock record (Beard and Johnson, 2004) is rather surprising given the pyrite beta values of Polyakov and Mineev (2000) and Polyakov et al. (2007) which predict a ^{56}Fe depletion of oxides relative to pyrite ($\Delta_{\text{hematite-pyrite}} = -3.62\text{‰}$, $\Delta_{\text{goethite-pyrite}} = -5.69\text{‰}$ at 25 °C).

The fractionation factors between water and Fe-oxide precipitates vary in a large range (−0.98‰ < $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{solid-water}} < 2.25\text{‰}$) as shown in Fig. 6. The observation of negative or slightly positive factors between Fe(III) in the solid and in the solution is not surprising. It corroborates the results of the experimental studies. For example, the fractionations reported by Balci et al. (2006) for the precipitation of Fe(III) from an acidic (pH ≤ 3.54) synthetic solution of Fe(III)-sulphates ranged from −0.04‰ to −1.46‰, favouring the lighter isotope in the solid phase. According to Skulan et al. (2002), the precipitation of hematite from Fe(III) over 12 h yielded a kinetic fractionation factor $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{hematite-Fe(III)}}$ of −1.3‰ whereas at slow precipitation rates, slightly positive $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{hematite-Fe(III)}}$ values (0.1‰) corresponding to equilibrium fractionation were observed. The observation of significantly positive fractionation factors between Fe(III) in the several precipitates from Fe(III) dominated water is more striking. Fractionation factors of the same order of magnitude (1‰) with preferential incorporation of the heavier isotope have been reported by Bergquist and Boyle (2006) during the coagulation of Fe(III) colloids in the Amazon estuary but this was in water having very different physicochemical conditions compared to the AMD of this study.

In our system, the large range of fractionation may be attributed to Fe-mineral discrimination. To confirm this hypothesis further studies of Fe(III) fractionation during the precipitation of pure Fe(III) oxyhydroxysulphates solids including both crystallized phases such as jarosite and schwertmannite and amorphous phases are necessary.

The isotopic composition of the fossil stromatolites is coherent with that of their modern analogues (Fig. 6). Nevertheless, the wide range of isotopic composition encountered in the modern Fe(III) precipitates does not enable accurate assessment of the physicochemical conditions that prevailed in the water when the fossil stromatolites formed.

6. Conclusion

This study investigated the isotopic fractionations in an acidic (1.4 < pH < 3.2) Fe- and sulphur rich system, the Tinto–Odiel River basin.

The isotopic composition of pyrite-rich solids, which are the ultimate source of Fe in the system, ranges from −0.56 ± 0.08‰ in the Tharsis massive sulphide deposit to 0.25 ± 0.1‰ in the Rio Tinto massive sulphide deposit. The isotopic composition of the Fe-oxides from the Gossan ranged from −0.29 ± 0.02‰ to 0.82 ± 0.07‰.

The fractionation factor between pyrite and oxidized Fe either as aqueous Fe(III) or in the mineral (goethite or hematite) from the Gossan appears to be systematically lower than what would be expected from theoretical values.

The $\delta^{56}\text{Fe}$ values in the Fe-rich oxides that precipitate from the river water ranged from −1.98 ± 0.10‰ to 1.57 ± 0.08‰. In water, the range of $\delta^{56}\text{Fe}$ values (from −1.76 ± 0.10‰ to +0.43 ± 0.05‰) was smaller.

The fractionation factors between the precipitates and the water vary in a large range (−0.98‰ < $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{solid-water}} < 2.25\text{‰}$), the highest values being observed in Fe(III) dominated waters. The large range of fractionation factors may reflect a discrimination due to the formation of different Fe-oxides/sulphates minerals. However, analyses of experimentally and naturally produced Fe-oxyhydroxysulphates solids, including pure minerals phases must be carried out in order to confirm this hypothesis.

An Fe isotope fingerprint in fossil stromatolites was unfortunately not identified which would have enabled us to trace the physicochemical conditions that prevailed at the time of their deposition.

Acknowledgements

This study was financed by the CNRS (PICS no.2430), the ECODYN and EC2CO programmes (French Ministry of Research, Institut National des Sciences de l'Univers).

References

- Acero, P., Ayora, C., Torrentó, C., Nieto, J.M., 2006. The behavior of trace elements during schwertmannite precipitation and subsequent transformation into goethite and jarosite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 4130–4139.
- Aguilera, A., Manrubia, S.C., Gómez, F., Rodríguez, N., Amils, R., 2006. Eukaryotic community distribution and its relationship to water physicochemical parameters in an extreme acidic environment, Río Tinto (Southwestern Spain). *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5325–5330.
- Anbar, A.D., 2004. Iron stable isotopes: beyond biosignatures. *Earth Planet. Sci. Lett.* 217, 223–236.
- Anbar, A.D., Roe, J.E., Barling, J., Nealson, K.H., 2000. Non biological fractionation of iron isotopes. *Science* 288, 126–128.
- Anbar, A.D., Jarzecki, A.A., Spiro, T.G., 2005. Theoretical investigation of iron isotope fractionation between $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ and $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$: implication for iron stable isotope geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 825–837.
- Amils, R., Gonzales-Toril, E., Fernandez-Remollar, D., Gomez, F., Aguilera, A., Rodriguez, N., Malki, M., Garcia-Moyano, A., Fairen, A., de la Fuente, V., Sanz, J.L., 2007. Extreme environments as Mars terrestrial analogs: the Rio Tinto case. *Planet. Space Sci.* 55, 370–381.
- Balci, N., Bullen, T., Witte-Lien, K., Shanks, W., Motelica, M., Mandernack, K., 2006. Iron isotope fractionation during microbially stimulated Fe(II) oxidation and Fe(III) precipitation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 622–639.
- Beard, B.L., Johnson, C.M., 1999. High precision iron isotope measurements of terrestrial and lunar material. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 1653–1660.

- Beard, B., Johnson, C., 2004. Fe isotope variations in the modern and ancient Earth and other planetary bodies. In: Rosso, J.J. (Ed.), *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, vol. 55, pp. 319–353.
- Beard, B.L., Johnson, C.M., Skulan, J.L., Nealson, K.H., Cox, L., Sun, H., 2003. Application of Fe isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe. *Chem. Geol.* 285, 87–117.
- Bergquist, B.A., Boyle, E.A., 2006. Iron isotopes in the Amazon River system: weathering and transport signatures. *Earth Planet. Sci. Lett.* 248, 54–68.
- Bigham, J.M., Schwertmann, U., Traina, S.J., Winland, R.L., Wolf, M., 1996. Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulphates waters. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 60, 2111–2121.
- Brake, S.S., Hasiotis, S.T., Dannelly, H.K., Connors, K.A., 2002. Eukaryotic stromatolite builders in acid mine drainage: implications for Precambrian iron formations and oxygenation of the atmosphere? *Geology* 30, 599–602.
- Brake, S.S., Hasiotis, S.R., Dannelly, H.K., 2004. Diatoms in acid mine drainage and their role in the formation of iron-rich stromatolites. *Geomicrobiol. J.* 21, 331–340.
- Braungardt, C., Achterberg, E., Elbaz-Poulichet, F., Morley, N.H., 2003. Metal biogeochemistry in an acidic mine polluted estuarine system in south-west Spain. *Appl. Geochem.* 18, 1757–1871.
- Brantley, S., Liermann, L., Guynn, R., Anbar, A., Icopini, G., Barling, J., 2004. Fe isotopic fractionation during mineral dissolution with and without bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 3189–3204.
- Bullen, T.D., White, A.F., Childs, C.W., Vivit, D.V., Schulz, M.S., 2001. Demonstration of significant abiotic iron isotope fractionation in nature. *Geology* 29 (8), 699–702.
- Chu, N.-C., Johnson, C., Beard, B., German, C., Nesbitt, R., Frank, M., Bohn, M., Kubik, P., Usui, A., Graham, I., 2006. Evidence for hydrothermal venting in Fe isotope compositions of the deep Pacific Ocean through time. *Earth Planet. Sci. Lett.* 245, 202–217.
- Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S., Gordon, M., Taner, S., Chavez, F., Ferioli, L., Sakamoto, C., Rogers, P., Millero, F., Steinberg, P., Nightingale, P., Cooper, D., Cochland, W., Landry, M., Constantinou, J., Rollwagen, G., Trasvina, A., Kudela, R., 1996. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. *Nature* 383, 495–501.
- Croal, L.R., Johnson, C.M., Beard, B.L., Newman, D.K., 2004. Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68 (6), 1227–1242.
- Dauphas, N., Rouxel, N., 2006. Mass spectrometry and natural variations of iron isotopes. *Mass Spectrometry Reviews* 25, 515–550.
- Dauphas, N., Zuilen, M., Wadhwa, M., Davis, A., Marty, B., Janney, P., 2004. Clues from Fe isotope variations on the origin of Early Archean BIFs from Greenland. *Science* 306, 2077–2080.
- Dauphas, N., Cates, N., Mojzsis, S., Busigny, V., 2007. Identification of chemical sedimentary protoliths using iron isotopes in the >3750 Nuvvuagittuq supracrustal belt, Canada. *Earth Planet. Sci. Lett.* 254, 358–376.
- Dideriksen, K., Baker, J.A., Stipp, S.L., 2006. Iron isotopes in natural carbonate minerals determined by MC-ICP-MS with a ^{58}Fe – ^{54}Fe double spike. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70 1, 118–132.
- Evangelou, V.P., 1995. Pyrite oxidation and its control. CRC Press, New York. 275 pp.
- Ehrlich, H., L., 1996. In *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, New York. 719pp.
- Fairen, A.G., Fernandez-Remolar, D., Dohm, J.M., Baker, V.R., Amils, R., 2004. Inhibition of carbonate synthesis in acidic oceans on early Mars. *Nature* 431, 423–426.
- Fang, J., Hasiotis, S., Das Gupta, S., Brake, S., Bazylinski, D., 2007. Microbial biomass and community structure of a stromatolite from an acid mine drainage system as determined by lipid analysis. *Chem. Geol.* 243, 191–204.
- Fantle, M., DePaolo, D., 2004. Iron isotopic fractionation during continental weathering. *Earth Planet. Sci. Lett.* 228, 547–562.
- Fehr, M., Andersson, P., Hälenius, U., Mörtz, C.-M., 2008. Iron isotope variations in Holocene sediments of the Gotland Deep, Baltic Sea. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 807–826.
- Fernandez-Remolar, D., Moris, R., Gruener, J., Amils, R., Knoll, A., 2005. The Rio Tinto Basin, Spain: mineralogy, sedimentary geobiology, and implications for interpretation of outcrop rocks at Meridiani Planum, Mars. *Earth Planet. Sci. Lett.* 240, 149–167.
- Ferris, F.G., Hallbeck, L., Kennedy, C.B., Pedersen, K., 2004. Geochemistry of acidic Rio Tinto headwaters and role of bacteria in solid phase metal partitioning. *Chem. Geol.* 212 (3–4), 291–300.
- Gonzalez-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R., Amils, R., 2003. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.* 6, 4853–4865.
- Graham, S., Pearson, N., Jackson, S., Griffin, W., O'Reilly, S.Y., 2004. Tracing Cu and Fe from source to porphyry: in situ determination of Cu and Fe isotopes ratios in sulfides from the Grasberg Cu–Au deposit. *Chem. Geol.* 207, 147–169.
- Herbert Jr., R.B., Schippers, A., 2008. Iron isotope fractionation by biogeochemical processes in mine tailings. *Environ. Sci. Technol.* 1117–1122.
- Johnson, D., Hallberg, K., 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* 154, 466–473.
- Johnson, C.M., Skulan, J.K., Beard, N.J., Sun, H., Nealson, K.H., Braterman, P.S., 2002. Isotopic fractionation between Fe(III) and Fe(II) in aqueous solution. *Earth Planet. Sci. Lett.* 195, 141–153.
- Johnson, C., Beard, B., Beukes, N., Klein, C., O'Leary, J., 2003. Ancient geochemical cycling in the Earth as inferred from Fe isotope studies of banded iron formations from the Transvaal Craton. *Contrib. Mineral. Petrol.* 144, 523–547.
- Leblanc, M., Morales, J.A., Borrego, J., Elbaz-Poulichet, F., 2000. A 4500 years old mining pollution in Spain. *Econ. Geol.* 95, 655–662.
- Leistel, J.M., Marcoux, E., Thiéblemont, D., Quesada, C., Sánchez, A., Almodóvar, G.R., Pascual, E., Sáez, R., 1998. The volcanic-hosted massive sulfide deposits of the Iberian Pyrite Belt. *Mineralium Deposita* 33, 2–30.
- Levasseur, S., Frank, M., Hein, J.R., Halliday, A.N., 2004. The global variation in the iron isotope composition of marine hydrogenetic ferromanganese deposits: implications for seawater chemistry? *Earth Planet. Sci. Lett.* 224, 91–105.
- Lopez-Archilla, A.I., Marin, I., Amils, R., 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microb. Ecol.* 41 (1), 20–35.
- Mandernack, K.W., Bazylinski, D.A., Shanks, W.C., Bullen, T.D., 1999. Oxygen and iron isotopes studies of magnetite produced by magnetotactic bacteria. *Science* 285, 1892–1896.
- Markl, G., von Blanckenburg, F., Wagner, T., 2006. Iron isotope fractionation during hydrothermal ore deposition and alteration. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 3011–3030.
- Martin, J.H., 1990. Glacial-interglacial CO₂ change: the iron hypothesis. *Paleoceanogr.* 5, 1–13.
- Martin, J.H., Fitzwater, S.E., 1988. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the North-East Pacific subarctic. *Nature* 331, 341–343.
- Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.C., Elbaz-Poulichet, F., Leblanc, M., Ildefonse, P., Calas, G., 2003. Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France): XANES and XRD evidence of As(V)– or As(III)–Fe(III) gels and tooelete. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1705–1712.
- Moses, C.O., Nordstrom, D.K., Herman, J.S., Mills, A.L., 1987. Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochim. Cosmochim. Acta* 51, 1561–1571.
- Nieto, J.M., Capitán, M.A., Sáez, R., Almodóvar, G.R., 2003. Beudantite: a natural sink for As and Pb in sulfide oxidation processes. *Appl. Earth Sci.* 112, 293–296.
- Nocete, F., Álex, E., Nieto, J.M., Sáez, R., Bayona, M.R., 2005. An archaeological approach to regional environmental pollution in the South-Western Iberian Peninsula related to Third Millennium BC mining and metallurgy. *J. Archaeol. Sci.* 32, 1566–1576.
- Olias, M., Nieto, J.M., Sarmiento, A.M., Ceron, J.C., Canovas, C.R., 2004. Seasonal water quality variations in a river affected by acid mine drainage: the Odiel River (South West Spain). *Sci. Tot. Env.* 333 (1–3), 267–281.
- Parkhurst, D.L., Appelo, C.A.J., 1999. User's Guide to PHREEQC (Version 2) – a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations. U.S. Geological Survey Water-Resources Investigation Report 99-4259. Denver, Co., U.S.A., p. 312.
- Poitras, F., Frey, R., 2005. Heavy iron isotope composition of granites determined by high resolution MC-ICP-MS. *Chem. Geol.* 222, 132–147.
- Poitras, F., Halliday, A., Lee, D.C., Levasseur, S., Teutsch, N., 2004. Iron isotope differences between Earth, Moon, Mars and Vesta as possible records of contrasted accretion mechanisms. *Earth Planet. Sci. Lett.* 223, 253–266.
- Polyakov, V.B., Mineev, S.D., 2000. The use of Mössbauer spectroscopy in stable isotope geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 849–865.
- Polyakov, V.B., Clayton, R.N., Mineev, S.D., 2007. Equilibrium fractionation factors of minerals: reevaluation from data of nuclear inelastic resonant X-ray scattering and Mössbauer spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 3833–3846.
- Pomies, C., Cocherie, A., Guerrot, C., Marcoux, E., Lancelot, J., 1998. Assessment of the precision and accuracy of lead-isotope ratios measured by TIMS for geochemical applications: example of massive sulfide deposits (Rio Tinto, Spain). *Chem. Geol.* 144, 137–149.
- Rodier, J., Broutin, J.P., Chambon, P., Champsaur, H., Rodi, L., 1996. L'analyse de l'eau. Dunod, Paris. 1383 pp.
- Rouxel, O., Döbel, N., Ludden, J., Fouquet, Y., 2003. Iron isotope fractionation during oceanic crust alteration. *Chem. Geol.* 202, 155–182.
- Rouxel, O., Bekker, A., Edwards, K., 2005. Iron isotope constraints on the Archean and Paleoproterozoic ocean redox state. *Science* 307, 1088–1091.
- Sabater, S., Buchaca, T., Cambra, I., Catalán, I., Guasch, H., Ivorra, N., Muñoz, I., Navarro, E., Real, M., Román, A., 2003. Structure and function of benthic algal communities in an extremely acid river. *J. Phycol.* 39, 481–489.
- Sáez, R., Pascual, E., Toscano, M., Almodóvar, G.R., 1999. The Iberian type of volcano-sedimentary massive sulfide deposits. *Mineralium Deposita* 34, 549–570.
- Sanchez-Espana, J., Lopez Pamo, E., Santofimia, E., Aduvire, O., Reyes, J., Baretino, D., 2005. Acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt (Odiel river watershed, Huelva, SW Spain): Geochemistry, mineralogy and environmental implications. *Appl. Geochem.* 20, 1320–1356.
- Sanchez-Espana, J., Lopez Pamo, E., Pastor, E., 2007. The oxidation of ferrous iron in acidic mine effluents from the Iberian Pyrite Belt (Odiel Basin, Huelva, Spain): field and laboratory rates. *J. Geochem. Explor.* 92, 120–132.
- Severmann, S., Johnson, C., Beard, B., German, C., Edmonds, H., Chiba, H., Green, D., 2004. The effect of plume processes on the Fe isotope composition of hydrothermally derived Fe in the deep ocean as inferred from the Rainbow vent site, Mid-Atlantic Ridge, 36°14'N. *Earth Planet. Sci. Lett.* 225, 63–76.
- Severmann, S., Johnson, C., Beard, B., McManus, J., 2006. The effect of early diagenesis on the Fe isotope compositions of porewaters and authigenic minerals in continental margin sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 2006–2022.
- Schauble, E.A., Rossman, G.R., Taylor, H.P., 2001. Theoretical estimates of equilibrium Fe-isotope fractionation from vibrational spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 2487–2497.
- Sharma, M., Polizzotto, M., Anbar, A.D., 2001. Iron isotopes in hot springs along the Juan de Fuca Ridge. *Earth Planet. Sci. Lett.* 194, 39–51.
- Skulan, J.L., Beard, B.L., Johnson, C.M., 2002. Kinetic and equilibrium fractionation between aqueous Fe(III) and hematite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 2995–3015.
- Stumm, W., Morgan, J.J., 1981. *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. Wiley, New York. pp. 780.
- Tornos, F., 2006. Environment of formation and styles of volcanogenic massive sulfides: the Iberian Pyrite Belt. *Ore Geology Reviews* 28, 259–307.

- Van der Lee, J., De Windt, L., 2002. CHESSTutorial and Cookbook. Updated for version 3.0. Users manual Nr. LHM/RD/02/13. Ecole des Mines de Paris. Fontainebleau, France. pp. 112.
- Welch, S.A., Beard, B.L., Johnson, C.M., Braterman, P.S., 2003. Kinetic and equilibrium Fe isotope fractionation between aqueous Fe(II) and Fe(III). *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 4231–4250.
- Weyer, S., Schwieters, J., 2003. High precision Fe isotope measurements with high mass resolution MC-ICP-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* 226, 355–368.
- Yu, J.-Y., Heo, B., Choi, I.-K., Cho, J.-P., Ho-Wan Chang, H.-W., 1999. Apparent solubilities of schwertmannite and ferrihydrite in natural stream waters polluted by mine drainage. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 3407–3416.
- Yamaguchi, K., Johnson, C., Beard, B., Ohmoto, H., 2005. Biogeochemical cycling of iron in the Archean–Paleoproterozoic Earth: constraints from iron isotope variations in sedimentary rocks from the Kaapvaal and Pilbara Cratons. *Chem. Geol.* 218, 135–169.
- Zettler, L.A., Gómez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R., Sogin, M.L., 2002. Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature* 417, 137.

Chapitre 6 : Fractionnement isotopique du fer lors des processus d'oxydation et de précipitation dans un DMA

I. INTRODUCTION

L'analyse des isotopes du fer a connu une avancée fulgurante au cours de ces dernières années avec le développement de la spectrométrie de masse (MC-ICP-MS). Le fractionnement possible des isotopes du fer au cours des réactions catalysées par l'activité bactérienne a lancé l'idée d'une éventuelle biosignature isotopique qui permettrait de prouver la présence d'une vie passée dans des environnements hostiles tels que Mars (Chan et al., 2006). Cependant, il s'est avéré que la tâche serait plus complexe que ce qui était attendu. De nombreuses études ont permis de montrer que l'activité bactérienne pouvait effectivement fractionner les isotopes du fer (Croal *et al.*, 2004; Icopini *et al.*, 2004; Johnson & Beard, 2005; Balci *et al.*, 2006) mais le fractionnement obtenu ne peut pas être distingué d'un fractionnement produit par des processus abiotiques (Anbar et al., 2000; Bullen et al., 2001; Chan et al., 2006; Chapman et al., 2006). Cependant, les isotopes du fer restent un outil puissant pour le traçage du cycle de cet élément dans l'environnement.

Plusieurs études s'accordent à dire que les processus qui fractionnent les isotopes du fer de manière la plus importante sont les processus mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Bullen et al., 2001; Johnson et al., 2002; Skulan et al., 2002), bien que d'autres réactions telles que la précipitation de Fe(III) (Butler et al., 2005; Balci et al., 2006), la dissolution (Brantley et al., 2004) ou la sorption (Teutsch et al., 2005) fractionnent aussi les isotopes du fer de manière quantitative.

Bien que les processus redox semblent dominer les autres processus dans le fractionnement global des isotopes du fer, des variations de cinétiques de réaction peuvent moduler l'intensité du fractionnement apparent. Les expériences menées en réacteurs fermés avec des eaux semblables aux DMA par Balci et al. (2006) ont démontré que le fractionnement isotopique du fer pendant l'oxydation de Fe(II)_{aq} en Fe(III)_{aq} par *A. ferrooxidans* était contrôlé par des facteurs cinétiques et d'équilibre non biologiques. Ces auteurs se sont aussi intéressés à l'influence de la cinétique de réaction sur le fractionnement isotopique du fer mais les différentes vitesses de réactions ont été obtenues par modification du pH ce qui peut être contestable (Chan et al., 2006).

L'exploitation minière laisse de nombreux stocks de déchet riches en pyrite dont l'oxydation par les eaux météoriques et de surface génère des eaux de drainage de mine acides (DMA). Dans ces eaux qui contiennent des concentrations élevées en Fer (jusqu'à 20 g.l⁻¹ par exemple dans le Rio Tinto (Egal *et al.*, 2008) les réactions d'oxydoréduction du fer sont généralement biocatalysées. Les DMA apparaissent donc comme un lieu privilégié pour observer le fractionnement isotopique du fer dans des environnements qui présentent certaines similitudes avec ceux rencontrés sur la planète Mars (Fernández-Remolar *et al.*, 2004; Amils *et al.*, 2007) rappellent ceux de la planète Mars. Cependant seules deux études sur le fractionnement isotopique du fer dans les DMA ont été publiées à ce jour (Herbert et al., 2008 ; Egal et al., 2008).

Le site de l'ancienne mine Pb-Zn de Carnoulès (Sud de la France) a servi de cadre à notre

étude. Sur ce site l'activité minière a laissée un stock de déchet qui génère un ruisseau acide caractérisé par des eaux acides (pH=2-3) et riches en fer (jusqu'à 2 g.l⁻¹) principalement sous forme de Fe(II).

L'objectif de l'étude était d'identifier le fractionnement isotopique du fer lors de son oxydation et de sa précipitation en milieu acide et l'influence de la cinétique de précipitation. Pour ce faire des analyses isotopiques ont été réalisées sur des échantillons naturels d'eau et de sédiments. En parallèle, des expériences d'oxydation et de précipitation du fer ont été réalisées en réacteurs fermés.

II. PRESENTATION DU SITE D'ETUDE

L'ancienne mine d'exploitation plomb-zinc de Carnoulès est située dans le sud de la France, sur le bassin versant du Gardon d'Anduze, un affluent du Rhône (Figure1). L'extraction minière a cessé en 1963 et a produit 1,2 millions de tonnes de déchets miniers riches en quartz, minéraux sulfurés, éléments traces métalliques (Pb, Zn, Tl) et As. Plusieurs études ont permis de déterminer les conditions hydrologiques et biogéochimiques responsables de la production du drainage minier acide riche en arsenic (Casiot *et al.*, 2003; Koffi *et al.*, 2003; Bruneel *et al.*, 2005).

L'eau émergeant à la base de la digue qui retient le stock de déchets forme la source du Reigous dont le débit est de l'ordre de 0,8 à 1,7 l.s⁻¹. L'eau est acide (pH 2-3) et présente des concentrations élevées en fer (jusqu'à 2 g.l⁻¹) et arsenic (jusqu'à 300 mg.l⁻¹) majoritairement sous forme réduite : Fe(II) et As(III) (Casiot *et al.*, 2003). Dans les 30 premiers mètres du DMA, une proportion importante de fer et d'arsenic précipite sous forme de sédiments et de concrétions laminées (*i.e.* précipité formé autour de structures bactériennes) contenant jusqu'à 20% en masse d'arsenic (Leblanc *et al.*, 1996).

Les sédiments sont majoritairement constitués de phase amorphe d'As-Fe(III) dans les 30 premiers mètres (entre la source et le point de prélèvement COW G, figure 1) alors que les concrétions laminées contiennent des proportions importantes de tooéléite (Morin *et al.*, 2003) ; Egal *et al.*, soumis). A partir de 150m en aval de la source et jusqu'à la confluence du Reigous avec les eaux alcalines de l'Amous (à 1,5km de la source), la schwertmannite précipite au dépend des phases amorphes.

III. MATERIELS ET METHODES

A. PRELEVEMENT D'ECHANTILLONS

Les prélèvements ont été réalisés en février 2008. Les stations de prélèvement d'eau et de sédiments sur le site de Carnoulès sont reportées sur la Figure 9. A la station S5 le prélèvement

s'effectue à l'intérieur d'un piézomètre qui donne accès à la nappe drainant le stock de déchet à 12 mètres de profondeur. Au niveau de la source du Reigous, un système venturi a été installé afin de mesurer le débit ; le prélèvement d'eau se fait en sortie du dispositif et les précipités sont prélevés juste après la source, en amont du point noté A sur la Figure 1. La station de prélèvement COW E (ou E) est situé à environ 25 mètres de la source, au niveau du mur recouvert de structures laminées. A ce niveau, l'eau s'écoule en formant une lame mince ce qui permet une bonne oxygénation du milieu. En aval de ce mur se trouve une vasque ; le point d'échantillonnage COW G (ou G) est situé à l'extrémité aval de la vasque, à environ 30 mètres de la source. A 150 mètres de la source, juste après la confluence du Reigous avec un petit ruisseau riche en fer et bactéries de type *Gallionella ferruginea* (Ru GAL) se trouve le point de prélèvement noté GAL. Enfin, la dernière station de prélèvement (noté Reigous UC) est située à environ 1,5 km de la source, sur le Reigous, en amont de la confluence de celui-ci avec la rivière Amous.

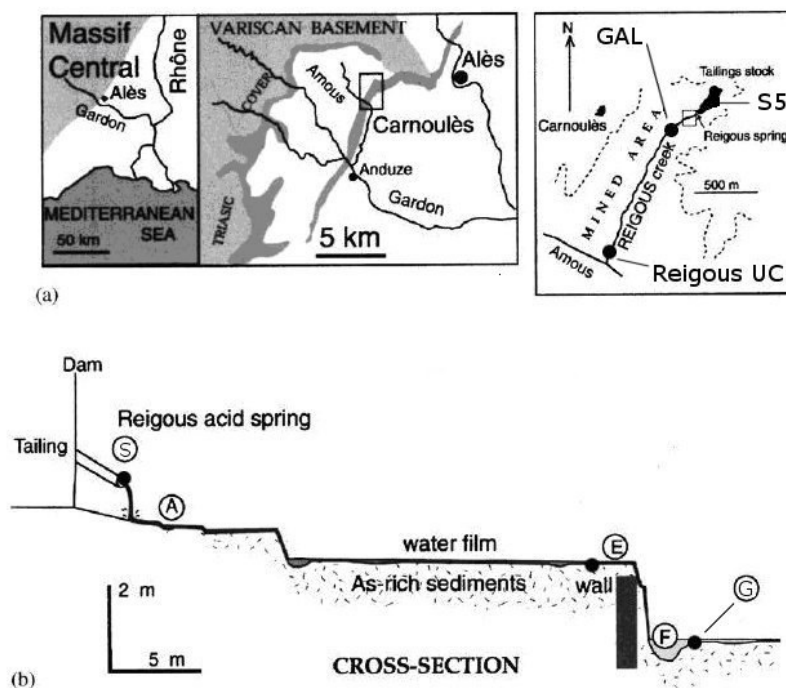


Figure 9 : Localisation du site de Carnoulès et des points de prélèvement

Le pH, la température, la conductivité et le potentiel rédox (Eh) ont été mesurés sur le terrain avec un UltrameterTM model 6P (Myron L Company, Camlab, Cambridge). L'oxygène dissous (DO) a été mesuré en utilisant des tests CHEMets[®] (CHEMetrics, Calverton, USA) basés sur une détermination colorimétrique de DO avec le rouge indigo pour la gamme de variations $1 < DO < 12 \mu\text{g.g}^{-1}$ et avec la rhodazine D pour $DO < 1 \mu\text{g.g}^{-1}$.

Les échantillons d'eau ont été immédiatement filtrés sur une unité de filtration en polycarbonate (Sartorius) équipée d'un filtre Millipore en polycarbonate d'une porosité de 0,22µm. Le filtrat est immédiatement acidifié à pH=1 avec HNO₃ Merck Suprapur et conservé à 4°C pour la détermination du fer total dissous (Fe_T). Ce même échantillon est utilisé pour la détermination de la composition isotopique du fer. Un autre échantillon est utilisé pour la détermination de Fe(II). Cet échantillon est tamponné à pH=4,5 avec une solution tampon d'acide acétique/acétate d'ammonium immédiatement après filtration et Fe(II) est complexé en ajoutant 1 ml d'une solution de chlorure de 1,10-phénanthroline à 0,5% massique à 10 ml d'échantillon (Rodier *et al.*, 1996).

La concentration en fer total est déterminée par spectrométrie d'absorption atomique en mode flamme. Les concentrations en Fe(II) sont déterminées par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 510 nm et les concentrations en Fe(III) sont calculées par différences entre les concentrations en fer total et Fe(II).

Le filtre est séché puis conservé pour l'analyse des matières en suspension (MES). Les sédiments (notés sd) et les concrétions laminées (ou stromatolithes, notées st) ont séchés sous vide et conservés jusqu'à l'analyse.

B. EXPERIENCES DE CINETIQUES EN REACTEURS FERMES

Différentes quantités d'une même souche bactérienne pure ont été inoculées dans 250ml d'eau prélevée au niveau de la source du Reigous, et préalablement stérilisée par filtration sur filtre nucleopore 0.22µm. La souche utilisée est la souche B5 (nombre d'accession AJ879996), du genre *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolée du site de Carnoulès (Duquesne et al., 2003). Les quantités de bactéries inoculées initialement sont de l'ordre de 1,2.10⁶ ufc¹/ml (expérience 1) et 4,8.10⁶ ufc/ml (expérience 2).

En suivant l'évolution des concentrations en Fe(II) et en Fe(III) dissous, Egal et al., (soumis) ont montré qu'après une phase de latence de 8 jours pour l'expérience 1 et de 3 jours pour l'expérience 2, la réaction procédait par étape (Figure 2). La première étape (jusqu'à t=17 jours) correspond à l'oxydation progressive de Fe(II) simultanément à la précipitation de Fe(III) formé. La deuxième étape correspond uniquement à la précipitation de Fe(III)_{aq} (20 à 44 jours), la totalité du fer ayant été oxydée au cours de la première étape.

Egal et al. (soumis) ont également montré que plus faible inoculum bactérien (1,2.10⁶ ufc/ml) favorisait la précipitation de tooéélite pendant les 8 premiers jours de l'expérience précédant l'oxydation massive du fer puis de schwertmanite pendant les 9 jours suivants alors que le second inoculum (4,8.10⁶ ufc/ml) conduisait à la précipitation de schwertmannite dès le début de la précipitation du fer. Dans les deux expériences la jarosite apparaît au cours de la seconde phase.

¹ ufc = unité formant colonie

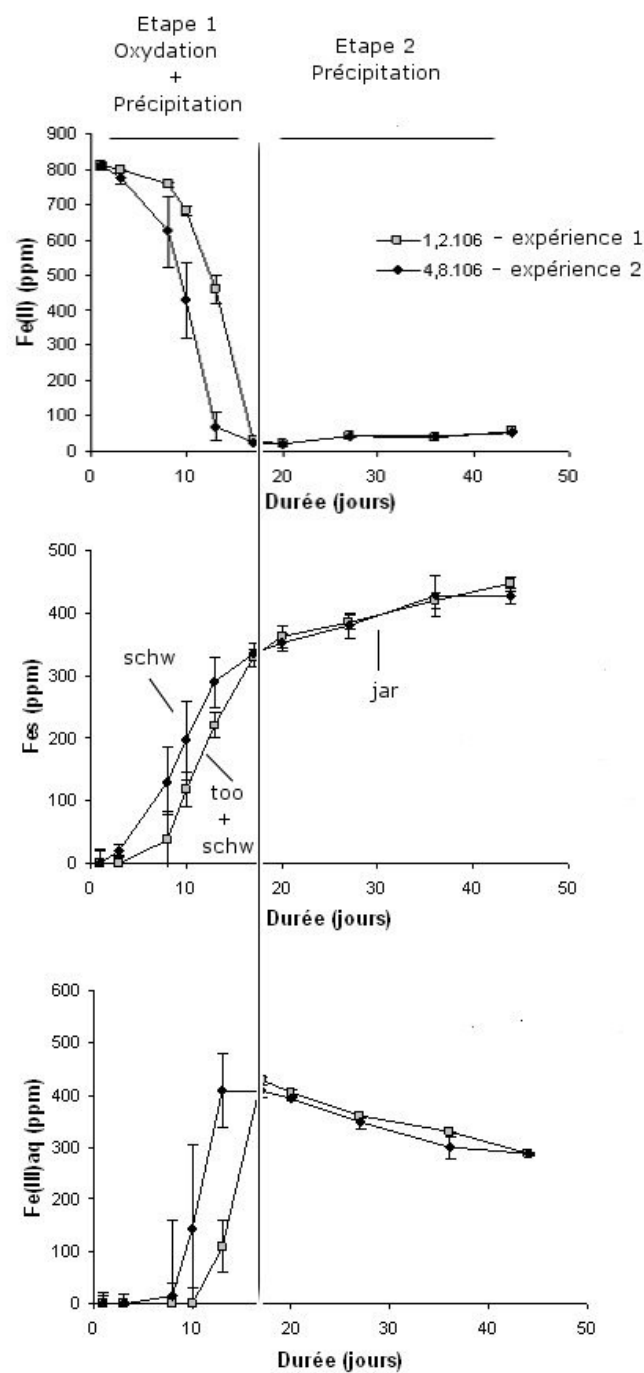


Figure 10 : Evolution des concentrations en fer en solution (a) Fe(II), (b) Fer total et (c) Fe(III). Les phases minérales précipitées sont reportées pour chaque étape et pour chaque expérience (b).

C. ANALYSES CHIMIQUES, MINÉRALOGIQUES ET ISOTOPIQUES

1. Minéralisation des échantillons solides

Les échantillons solides préalablement séchés sous vide ont été minéralisés pour la détermination de la composition chimique et/ou isotopique. La minéralisation a été effectuée au micro-onde (Milestone, ETHOS) selon la procédure 3051 de l'EPA (Environmental Protection Agency), adaptée pour nos échantillons : 10ml de HNO_3 65% (suprapur, MERCK) est ajouté à 0,05g d'échantillon préalablement broyé jusqu'à obtention d'une fine poudre homogène. Le programme de minéralisation utilisé comporte deux étapes. Lors de la première, la température augmente pendant 15 minutes pour atteindre 500°C et une puissance de 1000W. Il s'en suit une étape de 15 minutes de maintien à température et puissance constantes (500°C-1000W). Après le cycle de minéralisation au micro-onde, la solution obtenue est diluée dans de l'eau milli-Q puis conservée à 4°C jusqu'à l'analyse.

2. Mesures d'isotopes du fer

Avant d'être analysés pour la détermination de la composition isotopique du fer, les échantillons, doivent être purifiés afin d'éliminer le plus d'impuretés du fer possible.

La purification de nos échantillons est similaire à la procédure présentée par Balci et al. (2006). Après oxydation totale du fer par ajout de quelques gouttes d'eau oxygénée concentrée, 1ml d'échantillon est purifié par passage à travers environ 2ml d'une résine échangeuse d'anions (résine RE Spec, Eichrom Technologies Inc., IL, USA) préalablement conditionnée avec 10ml de HNO_3 8N (préparé à partir de HNO_3 suprapur, MERCK). La matrice de l'échantillon est ensuite éluée avec 15ml de HNO_3 8N puis le fer est élué avec 15ml de HNO_3 3% (préparé à partir de HNO_3 suprapur, MERCK).

Les mesures d'isotopes du fer ont été faites à l'aide d'un spectromètre de masse multi-collecteur couplé à un plasma inductif (MC-ICP-MS) Neptune. Ces analyses ont été effectuées au laboratoire ALS Scandinavia (Luleå, Suède).

Ce type de spectromètres de masse est équipé d'un système haute-résolution qui permet une mesure des isotopes du fer en limitant les interférences avec les espèces polyatomiques (interférences isobariques) selon la méthode développée par Weyer & Schwieters (2003). Le biais de masse instrumental est corrigé en utilisant les isotopes de Ni comme standard interne. Cette méthode permet de discriminer la déviation du signal en mesurant simultanément l'échantillon et la solution standard de Ni (Malinovsky et al., 2003). La technique dite de "sample-standard bracketing" est aussi utilisée pour corriger la déviation de masse instrumentale : le standard (ici IRMM-14) est analysé avant et après chaque échantillon. Les rapports isotopiques du fer de l'échantillon sont normalisés par la

moyenne des compositions isotopiques du fer mesurées dans le standard (Rouxel et al., 2008). La précision interne des mesures est donnée pour un intervalle de confiance de 95%.

La composition isotopique du fer, exprimée en ‰, est reportée par rapport au standard de référence IRMM-14 comme suit:

$$\delta^{56}\text{Fe} = [({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe}_{\text{échantillon}})/({}^{56}\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe}_{\text{IRMM-14}})-1] \times 1000$$

Le fractionnement isotopique du fer entre la phase particulaire et la phase dissoute est exprimé (en ‰) comme suit :

$$\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}} = \delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt}} - \delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}}$$

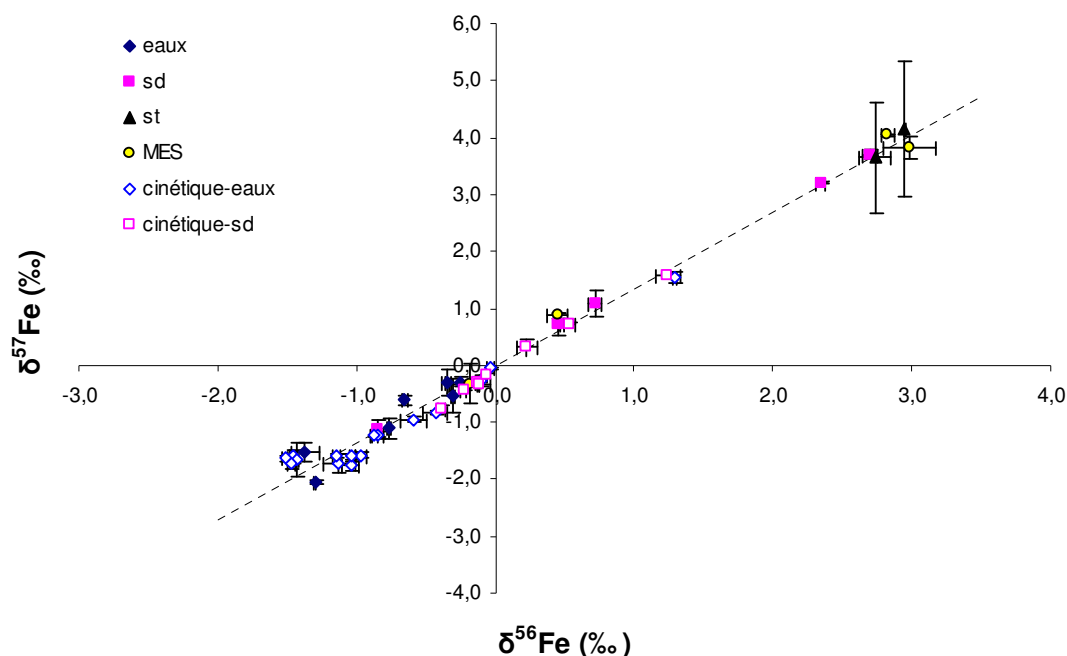


Figure 11 : Représentation de $\delta^{57}\text{Fe}$ en fonction de $\delta^{56}\text{Fe}$ dans les échantillons prélevés *in situ* en réacteur fermé. La ligne en pointillés indique le fractionnement dépendant de la masse théorique entre $\delta^{57}\text{Fe}$ et $\delta^{56}\text{Fe}$. Les barres d'erreur correspondent à 2 σ et sont calculées à partir de 2 ou 3 répliques.

L'ensemble des valeurs de composition isotopique en ^{57}Fe et ^{56}Fe des échantillons prélevés *in situ* et en réacteur fermé est corrélé avec la droite théorique $\delta^{57}\text{Fe} = 1,35 \delta^{56}\text{Fe}$ (Figure X). Ceci témoigne du fait que les interférences isobariques n'affectent pas nos analyses de manière significative (Thompson et al., 2007). Seules les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ seront reportées par la suite.

IV. RESULTATS

A. VARIATION DE LA COMPOSITION ISOTOPIQUE DU FER *IN-SITU*

Les valeurs de composition isotopique du fer ($\delta^{56}\text{Fe}$) dans les eaux et les sédiments prélevés dans le Reigous sont reportées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Composition isotopique et fractionnement isotopique du fer dans les échantillons prélevés *in situ*

		pH	DO (mg/l)	$\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}}$ (‰)	2 SD (‰)	$\delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt}}$ (‰)	2 SD (‰)	$\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}}$ (‰)	2 SD (‰)	Fetot _{aq} (mmol/l)	% Fe(II)
Source	eau st	3,13	0,37	-0,353	0,069	2,739	0,227	3,092	0,295	16,49	≈ 100
COW E	eau	3,14	8,16	-0,302	0,034					10,63	≈ 100
	MES					2,828	0,101	3,130	0,135		
	sd					2,698	0,110	3,001	0,144		
COW G	eau					2,947	0,014	3,249	0,048		
	MES	3,8	3,99	-0,651	0,052	2,984	0,376	3,635	0,428	7,86	≈ 100
	sd					2,342	0,065	2,993	0,116		
GAL	eau sd	3,36	9,2	-0,767	0,026	0,717	0,085	1,484	0,111	4,69	90
RaC	eau	3,12	10,82	-1,373	0,199					0,78	34
	MES sd					0,449	0,151	1,822	0,350		
						-0,850	0,023	0,523	0,222		

Dans le ruisseau Reigous, la composition isotopique du fer dissous ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}}$) varie entre $-0,30 \pm 0,04\text{‰}$ et $-1,37 \pm 0,2\text{‰}$, le fer en solution (Fe_{aq}) étant de plus en plus léger de la source à l'aval. Les précipités (sédiments et concrétions laminées) présentent une large gamme de variations de compositions isotopiques avec des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt}}$ comprises entre $-0,85 \pm 0,02\text{‰}$ et $2,95 \pm 0,01\text{‰}$. Ces valeurs qui indiquent un enrichissement en isotope léger de la phase aqueuse par rapport à la phase particulaire décroissent aussi de l'amont vers l'aval.

Les matières en suspension (MES) présentent des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ comprises entre $0,45 \pm 0,15\text{‰}$ et $2,98 \pm 0,38\text{‰}$. Elles sont généralement enrichies en isotopes lourds par rapport aux sédiments prélevés à la même station. Les variations de composition sont moins marquées que celle des eaux. Comme pour les eaux, une diminution de $\delta^{56}\text{Fe}$ entre la source et l'aval est observée. Le fractionnement isotopique entre l'eau et les MES ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{MES-Feaq}}$) est compris entre $3,64 \pm 0,43\text{‰}$ et $1,82 \pm 0,35\text{‰}$ (Tableau 4). Ce fractionnement décroît de la source à l'aval en liaison avec la composition isotopique de Fe_{aq} , la concentration en Fe_{aq} et la proportion de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$.

Le fractionnement isotopique du fer entre les sédiments et la phase aqueuse ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}}$) déterminé entre la source et la confluence (Tableau 4) est de l'ordre de $3,00 \pm 0,25\text{‰}$ dans les 30 premiers mètres du ruisseau. Il décroît ensuite pour atteindre des valeurs de l'ordre de $0,52 \pm 0,22\text{‰}$ à la station Reigous UC.

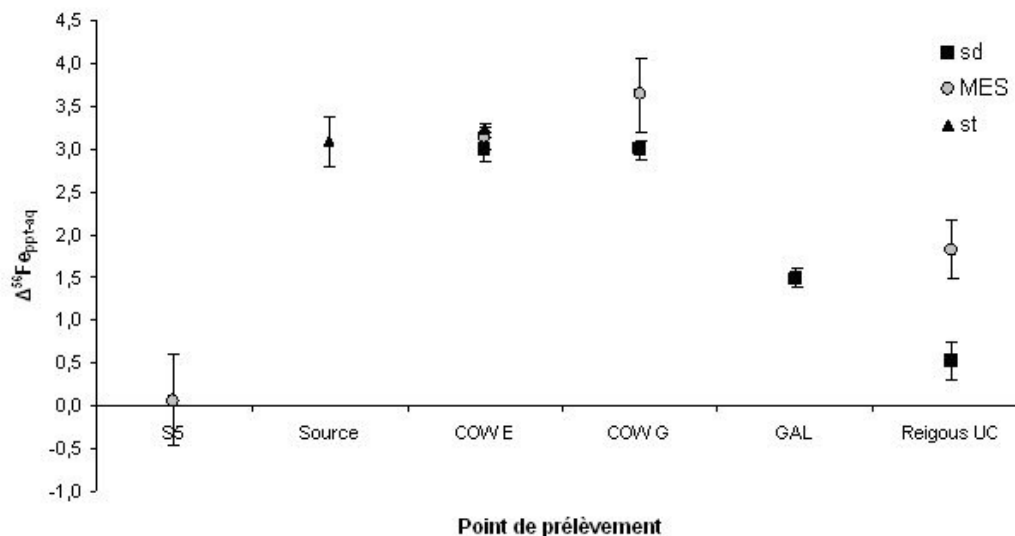


Figure 12 : Evolution du fractionnement isotopique entre la phase particulaire et la phase dissoute en fonction du point de prélèvement. Les sédiments (sd) sont représentés par des carrés noirs, les concrétions laminées (st) par des triangles noirs et les matières en suspension (MES) par des ronds gris.

B. VARIATION DE LA COMPOSITION ISOTOPIQUE DU FER EN REACTEUR FERME

L'évolution de la composition isotopique du fer, $\delta^{56}\text{Fe}$, dans les eaux et les précipités en fonction du temps dans les réacteurs fermés est reportée Figure 13.

L'eau présente une composition isotopique négative (de $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}} = -1,46 \pm 0,06\text{‰}$ à $-0,03 \pm 0,06\text{‰}$) contrairement aux précipités qui présentent généralement des valeurs plus élevées de $\delta^{56}\text{Fe}$ ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt}} = -0,39 \pm 0,05\text{‰}$ à $1,24 \pm 0,18\text{‰}$). L'évolution de la composition isotopique du fer au cours du temps suit les deux étapes décrites par Egal et al., (Figure 4). La décroissance des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}}$ lors de l'étape 1 (oxydation + précipitation), souligne un appauvrissement en isotopes lourds de la phase aqueuse. L'étape 2 (précipitation d'oxydes de Fer) est caractérisée par un enrichissement progressif en isotopes lourds de la phase aqueuse (de $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}} = -1,46 \pm 0,06\text{‰}$ à $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}} = -0,07 \pm 0,04\text{‰}$ pour l'expérience 1 (correspondant à la précipitation de tooéélite et schwertmannite) et de $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}} = -1,18 \pm 0,02\text{‰}$ à $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}} = -0,07 \pm 0,04\text{‰}$ pour l'expérience 2 (correspondant à la précipitation de schwertmannite) et une forte diminution des valeurs de la composition isotopique du fer dans les précipités ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt}} = -0,32 \pm 0,12\text{‰}$ après 44 jours), ces précipités étant plus légers que l'eau en fin d'expérience.

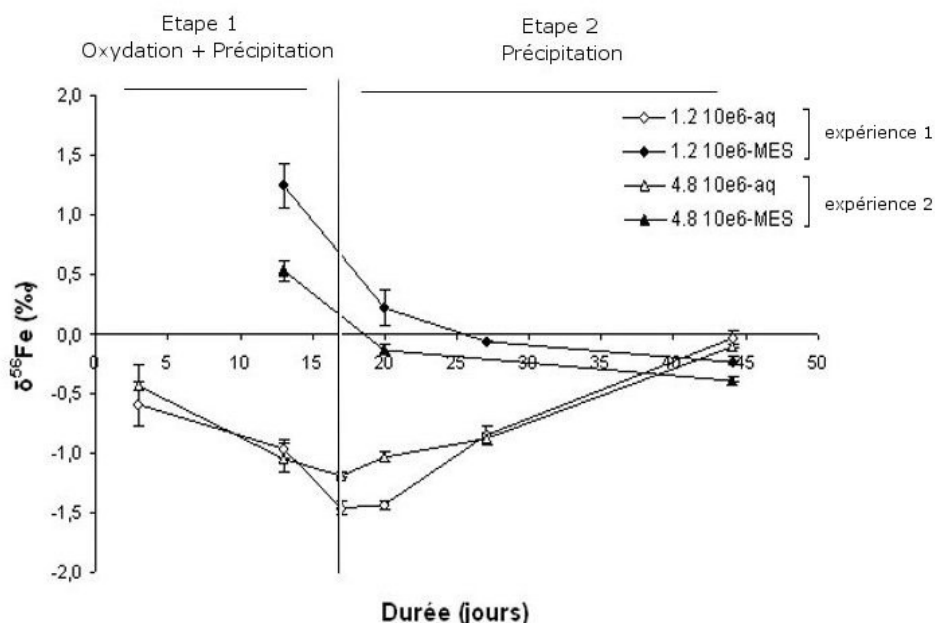


Figure 13 : Evolution de la composition isotopique du fer dans la phase dissoute (symboles blancs) et dans la phase particulaire (symboles noirs) au cours du temps dans les expériences en réacteurs fermés. Les étapes de la réaction correspondent à celles décrites dans (Egal et al., soumis).

L'évolution de la composition isotopique du fer dans la phase dissoute ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}}$) en fonction du pourcentage de fer total (Fe_{tot}) restant en solution est présentée sur la Figure 6. Cette représentation permet de s'affranchir d'une différence de fractionnement liée à l'avancement de la réaction. La composition isotopique de la phase aqueuse suit la même tendance pour les deux expériences bien qu'un léger décalage dans les compositions isotopiques de l'ordre de $0,26 \pm 0,06\text{‰}$, soit visible dans l'étape 1 entre les deux expériences. Dans l'expérience 1, les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}}$ sont plus faibles que lors l'expérience 2, ce qui traduit un appauvrissement en ^{56}Fe dans la phase aqueuse plus faible lors de précipitation de schwertmannite (expérience 2) comparée à la précipitation du mélange contenant de la tooéélite (expérience 1). Contrairement à ce qui est observé dans l'étape 1, l'étape 2 ne met pas en évidence d'écart de composition isotopique entre les deux expériences.

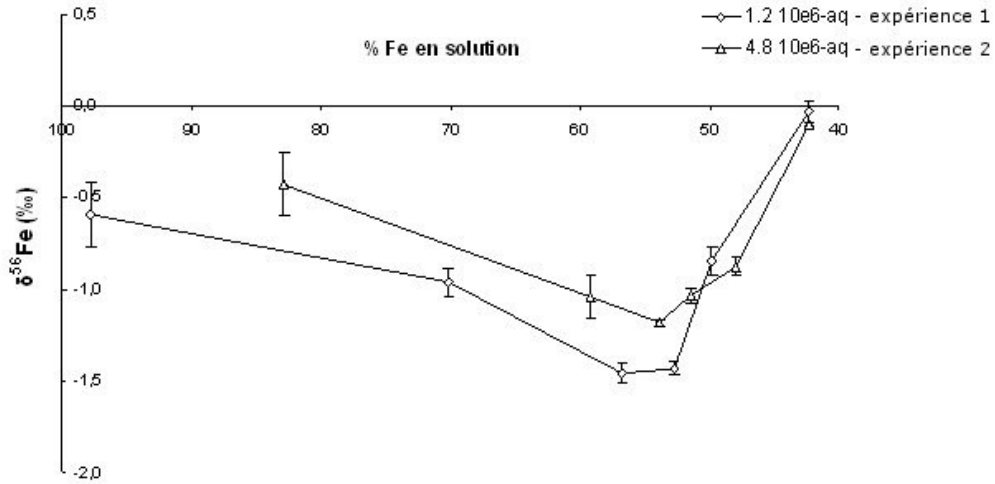


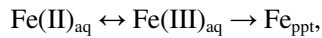
Figure 14 : Evolution de la composition isotopique du fer dans la phase dissoute en fonction du pourcentage de fer restant en solution pour les expériences en réacteurs fermés.

Dans la phase particulaire, les valeurs de composition isotopique du fer (Figure 5) montrent que l'échantillon contenant de la tooéélite (expérience 1) est enrichi en ^{56}Fe ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{too}} = 1,24 \pm 0,18\text{‰}$) par rapport à celui contenant de la schwertmannite (expérience 2) ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{schw}} = 0,53 \pm 0,08\text{‰}$).

V. DISCUSSION

A. IMPORTANCE DE L'OXYDATION DANS LE FRACTIONNEMENT GLOBAL

L'enchaînement de réactions correspondant à la précipitation d'oxydes de fer peut se simplifier de la manière suivante :



où $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ sont les espèces en solution et Fe_{ppt} représente les précipités d'hydroxydes de fer. Le fractionnement global entre le fer précipité et le Fe(II) aqueux est donc constitué de la contribution du fractionnement lié à chaque étape de la réaction précédente, ce qui correspond alors à :

$$\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)ppt-Fe(II)aq}} = \Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)aq-Fe(II)aq}} + \Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)ppt-Fe(III)aq}}$$

Cette représentation ne prend pas en compte le fractionnement qui pourrait être induit par la sorption de Fe(II) à la surface des oxydes de fer fraîchement précipités, de l'ordre de quelques ‰ selon les estimations indirectes de plusieurs auteurs (Icopini et al., 2004; Teutsch et al., 2005; Balci et al., 2006), beaucoup plus faibles d'après les mesures Crosby et al. (2005). Ces derniers ont en effet mesuré un très faible fractionnement lors de la sorption de Fe(II) sur de l'hématite ($-0,3\text{‰}$) ou de la goethite ($-0,8\text{‰}$). Dans notre cas, il semble d'autant plus légitime de négliger le fractionnement

isotopique du fer lié à la sorption que très peu de Fe(II) s'adsorbe à la surface des oxydes de fer dans des conditions acides (Chan et al., 2006).

On considère alors que le fractionnement global est composé du fractionnement d'équilibre entre Fe(II)_{aq} et Fe(III)_{aq} ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)-Fe(II)}} = 2,9\text{‰}$; Johnson et al., 2002) et du fractionnement dû à la précipitation des hydroxydes de fer. Le fractionnement d'équilibre entre Fe(II)_{aq} et Fe(III)_{aq} conduit à un enrichissement de Fe(III)_{aq} en ^{56}Fe ; les oxydes de fer qui précipitent à partir de ce Fe(III)_{aq} enrichi en isotopes lourds incorporent donc préférentiellement des isotopes lourds par rapport à la phase aqueuse. Ceci conduit à un appauvrissement en ^{56}Fe de la phase aqueuse et donc à une diminution des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{aq}}$ ce qui est concordant avec nos données expérimentales et de terrain. Plusieurs études rapportent des résultats similaires (Bullen et al., 2001; Croal et al., 2004; Balci et al., 2006; Herbert & Schippers, 2008; Rouxel et al., 2008).

Certaines études ont montré un fractionnement isotopique relativement important pendant la précipitation des oxydes et oxyhydroxydes de Fe(III), de l'ordre de 1,32‰ pour la précipitation d'hématite par exemple (Skulan et al., 2002). Cependant, nos données suggèrent que ce n'est pas le cas sur le site de Carnoulès. En effet, la valeur de fractionnement isotopique mise en évidence entre l'eau et les précipités prélevés sur le terrain dans les 30 premiers mètres du ruisseau ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}} \approx 3\text{‰}$) est très proche des valeurs proposées par Johnson et al. (2002) et Balci et al. (2006) pour l'oxydation de Fe(II)_{aq} en Fe(III)_{aq} ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)aq-Fe(II)aq}} = 2,9\text{‰}$). De plus dans les 30 premiers mètres du DMA, la composition isotopique de Fe_{aq} reste relativement constante malgré la précipitation sous forme de phase amorphe d'As-Fe(III) de près de 35% du fer présent en solution. Le fractionnement isotopique correspondant reste, lui aussi, relativement constant ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}} = 3 \pm 0.02\text{‰}$), de même que la proportion de Fe(II)_{aq} (proche de 100%). Ces deux paramètres présentent la même évolution. Ceci suggère que la précipitation d'oxydes de fer sur le site de Carnoulès ne fractionne pas les isotopes de fer de manière significative. Le fractionnement isotopique du fer dans le Reigous serait donc dominé par le processus d'oxydation, ce qui va dans le sens des observations de Balci et al. (2006) (études *in-vitro*) et de Herbert & Schieppers (2008) (études *in-situ*). Ces résultats sont concordant avec les résultats des modèles de Polyakov & Mineev (2000) et Schauble (2004) qui prévoient que les fractionnements les plus importants sont dominés par les processus d'oxydoréduction et non pas par la précipitation d'oxydes de fer.

Parmi les espèces qui précipitent dans le Reigous, les sédiments ont été différenciés des matières en suspension, ces dernières étant enrichies en isotopes lourds. Bien que le processus d'oxydation domine le fractionnement isotopique, il semblerait qu'un autre processus qui puisse expliquer les différences observées entre en jeu. Le fractionnement est en effet moins important entre l'eau et les sédiments qu'entre l'eau et les MES. Les sédiments, qui sont une accumulation de MES déposées au cours du temps, sont appauvri en isotopes lourds. Un équilibre d'échange isotopique entre l'eau et les sédiments peut expliquer un tel phénomène. Les MES reflètent alors la précipitation quasi instantanée de Fe(III) consécutivement à l'oxydation de Fe(II).

B. IMPORTANCE RELATIVE DE LA PRECIPITATION DANS LE FRACTIONNEMENT

Les expériences in vitro permettent de mieux caractériser l'importance relative de l'oxydation et de la précipitation d'oxydes sur le fractionnement isotopique du fer. L'évolution du fractionnement isotopique entre le précipité et l'eau en fonction de la fraction de fer précipitée dans les expériences 1 et 2 est présentée sur la figure 7.

Bien que les fractionnements observés lors de la précipitation d'oxydes de Fer soient souvent décrits par un fractionnement de Rayleigh (Wiesli et al., 2004; Balci et al., 2006), les variations de composition isotopique du fer observées en système fermé lors de l'étape 1 ne reflètent pas un tel processus. Dans ce modèle, l'oxyde formé est isolé du reste du système, du point de vue de l'échange isotopique, immédiatement après sa formation. Dans ce cas, les variations de composition isotopique du fer dans la phase aqueuse et la phase particulaire suivent la même tendance. Ce n'est pas ce qui est observé dans notre expérience, l'étape 1 se caractérise par une diminution du fractionnement entre la phase aqueuse et la phase solide (Figure 6) reflétant plus probablement un fractionnement d'équilibre. Lors de l'étape 1, quelle que soit la nature de la phase minérale précipitée, l'intensité du fractionnement diminue en accord avec les observations de Balci et al. (2006) dans des milieux similaires. Les valeurs de fractionnement obtenues pour l'étape 1 sont les suivantes : $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}} = 2,21 \pm 0,3\text{‰}$ et $1,58 \pm 0,2\text{‰}$ pour les expériences 1 et 2 respectivement. Elle nous permettent de calculer une valeur du facteur de fractionnement lors de la précipitation de la tooéélite, de la schwertmannite et de la jarosite ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-Fe(III)aq}}$). Ce fractionnement est de $-0,63 \pm 0,4\text{‰}$ pour la tooéélite, $-1,58 \pm 0,2\text{‰}$ pour la schwertmannite et $-0,84 \pm 0,6\text{‰}$ pour la jarosite. Compte tenu du fait que le premier prélèvement effectué lors des expériences ne contenait pas suffisamment de précipités pour l'analyse, il ne s'agit que de valeurs de fractionnement minimales. Elles sont en accord avec celles généralement observées pour la précipitation d'oxydes de fer à partir de $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$, notamment pour la précipitation d'hématite (Skulan et al., 2002). Dans le Rio Tinto Egal et al. (2008) rapportent des fractionnements compris entre $(-0,98\text{‰} < \Delta^{56}\text{Fe}_{\text{solid-water}} < 2,25\text{‰})$ pour la précipitation d'oxydes de Fe à partir d'une phase aqueuse où le Fe(III) est généralement majoritaire.

Le fractionnement isotopique ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-Fe(II)aq}}$) déterminé lors de l'oxydation bactérienne de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ en $\text{Fe(III)}_{\text{ppt}}$ est alors de $1,83 \pm 0,36\text{‰}$ pour l'expérience 1 et de $0,97 \pm 0,25\text{‰}$ pour l'expérience 2. Ces valeurs de fractionnement entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{ppt}}$ sont proches de celles proposées par Croal et al. (2004) pour l'oxydation bactérienne du fer en conditions anaérobies ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-Fe(II)aq}} = 1,5 \pm 0,2\text{‰}$).

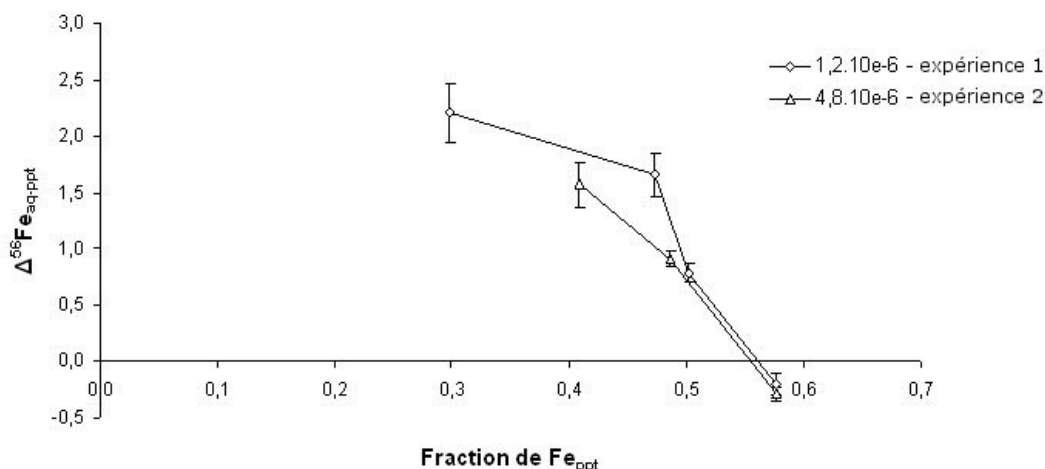


Figure 15 : Evolution du fractionnement isotopique du fer entre la phase particulaire et la phase dissoute en fonction de la fraction de fer précipitée pour les expériences en réacteurs fermés

Lors de l'étape 2 en système fermé, le Fe_{aq} est exclusivement sous forme de Fe(III)_{aq}, le fractionnement observé est lié uniquement à la précipitation d'oxydes sous forme de jarosite. La diminution des valeurs de δ⁵⁶Fe_{ppt} est corrélée à une augmentation des valeurs de δ⁵⁶Fe_{aq}, ce qui indique que la formation de jarosite est le résultat de l'incorporation préférentielle d'isotopes légers ; ceci pourrait être interprété comme un fractionnement cinétique. Cependant, l'augmentation des valeurs de δ⁵⁶Fe_{aq} et la décroissance des valeurs de Δ⁵⁶Fe semblent plutôt indiquer une progression lente vers un fractionnement d'équilibre lié à un échange isotopique, comme proposé par Butler et al. (2005) lors de la précipitation de FeS à pH acide. A la différence de l'équilibre isotopique entre espèces aqueuses qui peut se produire en quelques secondes (300s entre Fe(II)_{aq} et Fe(III)_{aq} (Welch et al., 2003), l'équilibre isotopique entre un fluide et un solide est difficilement atteint à température ambiante sauf lorsque la phase solide résulte de processus successifs de dissolution puis reprécipitation (Welch et al., 2003; Butler et al., 2005) ce qui est le cas dans nos expériences puisque la jarosite résulte au moins partiellement de la transformation de la schwertmannite (Egal et al., soumis). Dans ce cas, la composition isotopique du solide formé est proche de l'équilibre avec la solution en accord avec nos résultats.

C. INFLUENCE DE LA MINERALOGIE ET DES CINETIQUES DE REACTION SUR LE FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE DU FER

Dans les expériences en système fermé, des différences de composition isotopique apparaissent entre la schwertmannite et la tooéléite, cette dernière présentant un Δ⁵⁶Fe_{eau-ppt} plus important en valeur absolue que la schwertmannite. Ces différences peuvent être liées à des cinétiques de réaction différentes. En effet selon Balci et al., (2006) le fractionnement entre la phase aqueuse et la

phase particulière diminue lorsque la vitesse de précipitation augmente en accord avec nos observations.

Les vitesses d'oxydation et de précipitation du fer sont relativement faibles dans les expériences en réacteur fermé comparativement aux vitesses d'oxydation et précipitation *in situ*. Dans le premier cas, les vitesses sont de l'ordre de $2,29 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $6,62 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour l'oxydation et la précipitation respectivement. Dans le DMA de Carnoulès, dans les 30 premiers mètres, la vitesse d'oxydation est très largement supérieure ($3,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et la totalité du fer oxydé précipite. En comparaison d'études précédentes (Johnson et al., 2002; Wiesli et al., 2004), il apparaît que les cinétiques de nos expériences sont lentes, ce qui ne favorise pas un fractionnement cinétique des isotopes du fer, confirmant ainsi la prédominance d'un fractionnement d'équilibre. Cependant, malgré la prédominance d'un fractionnement d'équilibre, des différences sont visibles entre les fractionnements observés *in situ* et ceux obtenus *in vitro*. Dans les expériences en réacteurs fermés, l'oxydation du fer est limitée et diminue au cours de l'avancement de la réaction. L'influence de ce processus sur le fractionnement global diminue donc progressivement, ce qui laisse la possibilité aux fractionnements liés à des processus tels que la précipitation ou l'échange isotopique d'être visibles. Ceci n'est pas applicable *in situ* du fait de l'apport continu d'eau riche en Fe(II). L'oxydation reste donc le processus dominant, masquant ainsi tout autre fractionnement.

VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les drainages miniers acides (DMA) sont un lieu privilégié pour l'étude du fractionnement isotopique du fer étant données les concentrations élevées de cet élément tant dans la phase dissoute que particulière et le rôle primordial joué par les bactéries dans ce type d'environnement. Les microorganismes participent activement au cycle du fer en catalysant notamment l'oxydation de Fe(II) en Fe(III) au sein de la phase dissoute.

Ce travail a permis de déterminer les fractionnements isotopiques dans une eau de drainage de mines lors de l'oxydation du Fe(II) pour former différentes phases solides (tooéélite, schwertmannite, jarosite et des oxyhydroxysulfates amorphes de Fe(III)-As(V)).

Dans le ruisseau le Reigous, le fractionnement est de $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}} = 3 \text{ ‰}$ dans les 30 premiers mètres et décroît ensuite pour être de l'ordre de 0,5 ‰ 1,5 km en aval. Dans le système fermé, le fractionnement ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}}$) décroît continuellement au cours de la réaction à partir de 2 ‰ pour atteindre une valeur proche de zéro (-0,2 ‰).

Contrairement à de nombreuses études, l'oxydation et la précipitation du fer ne peuvent pas être décrites par un fractionnement de Rayleigh. Lorsqu'il y a oxydation du fer (et donc précipitation du Fe(III) formé), le fractionnement isotopique apparent est dominé par le fractionnement d'équilibre

isotopique entre $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$. Etant données la rapidité d'établissement de cet équilibre et l'intensité du fractionnement correspondant, les autres processus susceptibles de fractionner le fer ne sont pas visibles.

Dans le cas où la précipitation du fer prédomine, un fractionnement cinétique apparaît ; celui-ci étant dépendant de la vitesse de réaction. Cependant, les expériences en réacteur fermé ont montré que le fractionnement cinétique évoluait rapidement vers un fractionnement d'équilibre suite à un échange isotopique entre la phase dissoute et la phase particulaire.

Il a été montré dans ce travail que le fractionnement isotopique du fer est fortement contrôlé par la cinétique de précipitation et non par la minéralogie du précipité formé. Ainsi, le fractionnement est d'autant plus important que la cinétique de réaction est lente. Les facteurs de fractionnement isotopique ($\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{ppt-aq}}$) ont été estimés à $-0,63 \pm 0,4\text{‰}$ pour la tooéélite, $-1,58 \pm 0,2\text{‰}$ pour la schwertmannite et $-0,84 \pm 0,6\text{‰}$ pour la jarosite.

Bien que les bactéries jouent un rôle incontestable dans les réactions d'oxydation et de précipitation du fer dans les DMA et notamment dans la formation de minéraux particuliers tels que la tooéélite, aucun fractionnement isotopique directement attribuable à l'activité bactérienne (biosignature isotopique) n'a pu être mis en évidence dans cette étude. Le fractionnement global observé sur le terrain ou en laboratoire est directement dominé par un fractionnement abiotique, le fractionnement d'équilibre entre les espèces aqueuses du fer.

Des analyses complémentaires seraient nécessaires afin d'éclaircir les processus mis en jeu et de préciser les valeurs de fractionnement isotopique correspondant à la formation de chaque phase minérale. Il serait intéressant de faire des mesures de composition isotopique de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ et $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ indépendamment l'un de l'autre comme cela a été fait par Balci et al. (2006) afin de vérifier l'intensité du fractionnement produit par la précipitation de $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ en $\text{Fe(III)}_{\text{ppt}}$.

Dans ce travail, l'effet de la sorption du $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ à la surface des oxydes de fer fraîchement précipités a été négligée. Il pourrait être intéressant de vérifier cette hypothèse par une mesure directe du fractionnement induit par ce processus même si celui-ci est *a priori* négligeable dans les DMA. La formation d'espèces complexées en solution n'a pas non plus été prise en compte dans cette étude.

CONCLUSION

GENERALE

Les objectifs de ce travail étaient d'identifier les signatures chimiques de l'activité bactérienne dans les drainages miniers acides (DMA), c'est-à-dire d'identifier les empreintes laissées par les bactéries témoignant de leur rôle dans les réactions qui contrôlent les transferts de polluants dans ces milieux. Ces signatures sont aussi bien des changements de spéciation, la formation de biominéraux ou encore un fractionnement isotopique.

L'étude menée tout au long de ces 3 années de thèse a permis de mieux comprendre le rôle des bactéries dans la formation de minéraux de fer dans les DMA et les fractionnements isotopiques associés aux processus d'oxydation et de précipitation de Fe dans ces systèmes. Indirectement, notre travail a également porté sur l'étude des processus d'atténuation naturelle des concentrations d'arsenic dans ces eaux, le devenir de cet élément étant intimement lié au cycle du fer dans les DMA.

Dans un premier temps nous avons cherché à identifier les processus couplés chimiques et biologiques qui contrôlent les réactions du fer et de l'arsenic *in situ* aboutissant à un abattement de 95% des concentrations en arsenic. Pour cela, un suivi spatio-temporel des paramètres physico-chimiques des eaux et des solides du Reigous a été effectué ; le Reigous étant un ruisseau acide minier riche en fer, arsenic et autres métaux qui draine l'ancienne mine Pb-Zn de Carnoulès (Gard, France).

Dans les 30 premiers mètres du ruisseau, nos résultats ont confirmés ceux obtenus précédemment sur une plus courte période d'observation (Casiot *et al.*, 2003), environ 30% de l'arsenic est copécipité avec le fer conduisant ainsi à la disparition de 1 kg d'As pour 4kg de Fe par an. Les précipités de Fe-As qui se forment dans les premiers mètres du Reigous sont principalement constitués de phases amorphes de As-Fe(III) et de tooéélite (un hydroxysulfate de As(III)-Fe(III)). Plus en aval du DMA, quand les concentrations en Fe et As du ruisseau ont sensiblement diminué, en liaison avec les processus de précipitation et de dilution des eaux par d'autres sources, on observe la formation de phases minérales plus conventionnelles comme la schwertmannite et la ferrihydrite. Après 1,5 km, les concentrations en As dans le Reigous représentent moins de 2,4% de celles observées à la source (300mg/l) indiquant une atténuation significative des concentrations en As dissous. Néanmoins une quantité importante de sédiments contaminés est produite dont la présence constitue encore une menace pour l'écosystème en aval.

Une variation temporelle des concentrations en fer et arsenic dans la phase dissoute a été mise en évidence à plusieurs échelles de temps. A l'échelle journalière, l'étude a montré l'importance des processus de photoréduction qui entraînent la remise en solution de près de 10% du fer et de l'arsenic précipités. A l'échelle annuelle, d'importantes variations saisonnières des concentrations en fer et arsenic en solution ont été mises en évidence, en relation avec les épisodes pluvieux. Cette saisonnalité marquée n'est toutefois pas retrouvée dans l'abattement des concentrations en arsenic, qui reste homogène dans le temps avec plus de 95% d'As éliminé de la phase aqueuse le long du DMA et près de 30% éliminé dans les 30 premiers mètres du cours d'eau. Des variations saisonnières dans la nature des précipités formés dans le DMA sont aussi observées, comme cela avait été démontré

précédemment (Morin *et al.*, 2003), avec l'apparition préférentielle de tooéélite dans ces précipités pendant les mois les plus froids. Par contre, les concrétions laminées qui se forment autour de structures bactériennes restent toujours constituées essentiellement de tooéélite quelle que soit la période de l'année. Cette phase minérale est très efficace pour le stockage de l'arsenic ; elle est d'autant plus intéressante qu'elle permet une immobilisation du métalloïde sous sa forme la plus toxique et la plus mobile, As(III).

La présence de tooéélite dans le DMA et ses qualités pour le « stockage » de l'arsenic nous ont amené à nous intéresser plus particulièrement à ce minéral afin de déterminer les conditions favorables à sa formation qui pourraient par la suite être utilisées dans des procédés de traitement d'eaux impactées par des DMA et riches en arsenic.

Des expériences en laboratoire (bioessais) ont été mises en place afin de mieux comprendre les conditions de formation des phases solides observées dans les 30 premiers mètres du ruisseau acide et en particulier l'importance des facteurs biotiques (identité des souches bactériennes présentes et concentration cellulaire) dans la précipitation de ces phases. Ces expériences ont permis de mettre en évidence que la formation de tooéélite n'est pas l'exclusivité d'une souche particulière d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* mais que plusieurs d'entre elles permettent sa précipitation. Elles ont aussi permis de montrer que la succession des phases précipitées (tooéélite, schwertmannite, jarosite) varie selon la souche considérée, en liaison avec la cinétique d'oxydation de Fe(II). La formation de tooéélite apparaît favorisée lorsque la cinétique d'oxydation du fer est lente. La formation de jarosite n'est pas liée à un processus biologique mais plutôt à la recristallisation de la schwertmannite. Cette dernière phase incorpore bien moins d'As que les deux précédentes, toutes deux formées en conditions biotiques.

Etant donné l'importance de l'activité des microorganismes dans le cycle du fer dans les DMA et notamment leur rôle dans la catalyse des réactions d'oxydation du fer, nous nous sommes intéressés à l'influence que pouvait avoir l'activité bactérienne sur le fractionnement isotopique du fer. L'étude des processus qui fractionnent le fer dans les DMA a été réalisée sur deux sites où la spéciation du fer en solution est différente avec majoritairement du Fe(II) dans le Reigous et du Fe(III) dans le Rio Tinto et l'Odiel.

Sur le site du Rio Tinto, la composition isotopique des oxydes de fer qui précipitent à partir de l'eau de la rivière est comprise entre $-1,98 \pm 0,10\text{‰}$ et $1,57 \pm 0,08\text{‰}$. Dans l'eau, la gamme de variation observée est plus faible (de $-1,76 \pm 0,10\text{‰}$ à $+0,43 \pm 0,05\text{‰}$). Le fractionnement isotopique entre les précipités et l'eau varie de manière importante ($-0,98\text{‰} < \Delta^{56}\text{Fe}_{\text{solid-water}} < 2,25\text{‰}$), les valeurs les plus fortes étant rencontrées dans les eaux où Fe(III) est largement dominant. Ces variations pourraient refléter une discrimination due à la formation de différents hydroxysulfates de fer. Cette hypothèse devra être validée par des expériences *in vitro* et d'autres observations sur le terrain.

L'étude conduite sur le Reigous a également indiqué un enrichissement en isotopes lourds des précipités par rapport à la phase aqueuse. Comme sur le site du Rio Tinto, une large gamme de variation est observée dans la phase particulaire ($-0,85 \pm 0,02\text{‰} < \delta^{56}\text{Fe} < 2,98 \pm 0,38\text{‰}$) ; le fractionnement isotopique entre la phase dissoute et la phase particulaire augmentant lorsque la proportion de Fe(II) en solution diminue.

Les expériences en réacteurs fermés nous ont permis de discriminer les fractionnements liés à l'oxydation du fer d'une part et à la précipitation d'autre part. Les résultats montrent que la tooéélite est enrichie en isotopes lourds par rapport à la schwertmannite. Les différences ne semblent pas liées à la minéralogie mais plutôt à la cinétique des réactions, le fractionnement entre la phase aqueuse et la phase particulaire étant d'autant plus important que la cinétique de réaction est lente.

Bien que les expériences réalisées en laboratoire traduisent des conditions de réactions en système fermé, contrairement au terrain qui est un système ouvert, les résultats ont permis de mettre en évidence que dans les deux cas le fractionnement global du fer dans les DMA est dominé par un fractionnement d'équilibre. Dans le cas de l'étude *in situ* le fractionnement d'équilibre correspondant est celui ayant lieu entre Fe(II)_{aq} et Fe(III)_{aq} ($\Delta^{56}\text{Fe} = 2,9\text{‰}$). Dans le cadre des expériences en réacteurs fermés, le fractionnement global initial est marqué par un fractionnement cinétique qui évolue rapidement vers un fractionnement d'équilibre résultant d'un échange isotopique entre la phase dissoute et la phase particulaire.

Bien qu'aucune biosignature isotopique n'ait finalement été mise en évidence alors que cela constituait un des objectifs principaux de cette thèse, il apparaît cependant que l'activité bactérienne influence la composition isotopique du fer dans les précipités en augmentant la cinétique d'oxydation de Fe(II) et de précipitation de Fe(III).

PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a donc permis de montrer que l'atténuation naturelle des concentrations en fer et arsenic dans la phase dissoute pouvait être le résultat de l'activité de nombreuses souches bactériennes et conduisait à la précipitation de différentes phases minérales capables de piéger l'arsenic. Cependant ces phases minérales accumulées dans le DMA sont susceptibles d'être remises en solution lors d'événements pluvieux intenses. Ainsi, le traitement de la pollution métallique présente dans de tels milieux ne peut pas se limiter à une remédiation passive. La connaissance des mécanismes et des conditions nécessaires à la précipitation des phases minérales les plus aptes à l'immobilisation de quantités importantes d'arsenic est donc nécessaire et primordiale afin d'appliquer ces données à des procédés de traitement efficaces. L'étude de la stabilité de ces phases est tout aussi importante dans l'optique de trouver des méthodes de remédiation pérennes.

Le couplage des données physico-chimiques avec les données de microbiologie sont primordiales pour une meilleure compréhension des processus d'atténuation naturelle. Des études sont en cours notamment sur le suivi des populations bactériennes rencontrées dans les sédiments présents sur le site du Reigous (Gard, France). Ceci permettra d'identifier le rôle de chacune des souches dans la précipitation des phases minérales, notamment le rôle joué par les bactéries de type *Gallionella ferruginea* qui sont majoritaires dans le Reigous contrairement aux bactéries du type *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

La modélisation des processus couplés chimiques et biologiques permettrait de prévoir l'évolution à long terme de la pollution métallique dans les systèmes naturels en prenant en compte le facteur biologique dont l'impact sur la géochimie est très important. Les codes couplés microbiologie-transport sont, en effet, généralement peu développés (Parmentier, 2006).

En ce qui concerne l'étude des isotopes du fer, ce travail a permis de caractériser les fractionnements isotopiques du fer dans un système Fe(II)-Fe(III) riche en sulfates. Il serait intéressant de déterminer les fractionnements liés à la complexation du fer avec les sulfates dans la mesure où ceux-ci sont formés de manière quantitative. Il serait aussi intéressant de montrer quels sont les fractionnements liés à l'oxydation de FeS₂ dans le stock de déchets à proprement parlé.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraitis, P.K., Pattrick, R.A.D. & Vaughan, D.J. (2004). Variations in the compositional, textural and electrical properties of natural pyrite: a review International Journal of Mineral Processing **74**(1-4): 41-59.
- Acero, P., Ayora, C., Torrento, C. & Nieto, J.M. (2006). The behavior of trace elements during schwertmannite precipitation and subsequent transformation into goethite and jarosite Geochimica et Cosmochimica Acta **70**: 4130-4139.
- Akcil, A. & Koldas, S. (2006). Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies Journal of Cleaner Production **14**(12-13): 1139-1145.
- Albarède, F. & Beard, B.L. (2004). Analytical methods for non-traditional isotopes. Geochemistry of Non-traditional stable isotopes. Reviews in mineralogy and geochemistry. C. Johnson, Beard, BL, Albarede, F, editors. Washington DC, Mineralogical Society of America; Geochemical Society: 113-152.
- Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Aguilera, Á., Rodríguez, N., Malki, M., García-Moyano, A., Fairén, A.G., de la Fuente, V. & Luis Sanz, J. (2007). Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The Rio Tinto case Planetary and Space Science **55**(3): 370-381.
- Anbar, A.D. (2004). Iron stable isotopes: beyond biosignatures Earth and Planetary Science Letters **217**: 223-236.
- Anbar, A.D., Jarzecki, A.A. & Spiro, G. (2005). Theoretical investigation of iron isotope fractionation between $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ and $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$: Implications for iron stable isotope geochemistry Geochimica et Cosmochimica Acta **69**(4): 825-837.
- Anbar, A.D., Roe, J.E. & Nealson, K.H. (2000). Non biological Fractionation of Iron Isotopes Science **288**: 126-128.
- Baker, B.J. & Banfield, J.F. (2003). Microbial communities in acid mine drainage FEMS Microbiology Ecology **44**(2): 139-152.
- Balci, N., Bullen, T.D., Witte-Lien, K., Shanks, W.C., Motelica, M. & Mandernack, K.W. (2006). Iron isotope fractionation during microbially stimulated Fe(II) oxidation and Fe(III) precipitation Geochimica et Cosmochimica Acta **70**: 622-639.
- Banerjee, D., Amy, G.L., Prevost, M., Nour, S., Jekel, M., Gallagher, P.M. & Blumenschein, C.D. (2008). Kinetic and thermodynamic aspects of adsorption of arsenic onto granular ferric hydroxide (GFH) Water Research *In Press*.
- Beard, B.L., and Johnson, C.M. (2003). High and Low temperature Applications of Fe Isotope Geochemistry Newsletter of the Geochemical Society **117**: 8-13.
- Beard, B.L. & Johnson, C.M. (1999). High precision iron isotope measurements of terrestrial and lunar materials Geochimica et Cosmochimica Acta **63**(11/12): 1653–1660.
- Beard, B.L. & Johnson, C.M. (2004). Inter-mineral Fe isotope variations in mantle-derived rocks and implications for the Fe geochemical cycle Geochimica et Cosmochimica Acta **68**(22): 4727-4743.
- Beard, B.L., Johnson, C.M., Cox, L., Sun, H., Nealson, K.H. & Aguilar, C. (1999). Iron Isotope Biosignatures Science **285**: 1889-1892.
- Beard, B.L., Johnson, C.M., Skulan, J.L., Nealson, K.H., Cox, L. & Sun, H. (2003a). Application of Fe isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe Chemical Geology **195**: 87-117.
- Beard, B.L., Johnson, C.M., Von Damm, K.L. & Poulson, R.L. (2003b). Iron isotope constraints on Fe cycling and mass balance in oxygenated Earth oceans Geology **31**: 629-632.

- Bednar, A.J., Garbarino, J.R., Ranville, J.F. & Wildeman, T.R. (2002). Preserving the distribution of inorganic arsenic species in groundwater and acid mine drainage samples Environmental Science and Technology **36**(10): 2213-2218.
- Benzerara, K., Morin, G., Yoon, T.H., Miot, J., Tyliczszak, T., Casiot, C., Bruneel, O., Farges, F. & Brown Jr, G.E. (2008). Nanoscale study of As biomineralization in an acid mine drainage system Geochimica et Cosmochimica Acta **72**(16): 3949-3963.
- Berger, A. & von Blanckenburg, F. (2001). High-Temperature Fractionation of Fe Isotopes Eos Trans. AGU, Abstract V21A-0958 **82**(47).
- Bergquist, B.A. & Boyle, E.A. (2006). Iron isotopes in the Amazon River system: Weathering and transport signatures Earth and Planetary Science Letters **248**: 54-68.
- Bhattacharya, P., Welch, A.H., Stollenwerk, K.G., McLaughlin, M., Bundschuh, J. & Panaullah, G. (2007). Arsenic in the environment: Biology and Chemistry Science of the Total Environment **379**: 109-120.
- Bigham, J.M., Schwertmann, U. & Pfab, G. (1996a). Influence of pH on mineral speciation in a bioreactor simulating acid mine drainage Applied Geochemistry **11**: 845-849.
- Bigham, J.M., Schwertmann, U., Traina, S.J., Winland, R.L. & Wolf, M. (1996b). Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters Geochimica et Cosmochimica Acta **60**(12): 2111-2121.
- Blodau, C. (2006). A review of acidity generation and consumption in acidic coal mine lakes and their watersheds Science of The Total Environment **369**(1-3): 307-332.
- Boyle, E.A., Edmond, J.M. & Sholkovitz, E.R. (1977). The mechanism of iron removal in estuaries Geochimica et Cosmochimica Acta **41**(9): 1313-1324.
- Brake, S.S., Hasiotis, S.T. & Dannelly, H.K. (2004). Diatoms in Acid Mine Drainage and Their Role in the Formation of Iron-Rich Stromatolites Geomicrobiology Journal **21**(5): 331 - 340.
- Brantley, S.L., Liermann, L.J. & Bullen, T.D. (2001). Fractionation of Fe isotopes by soil microbes and organic acids Geology **29**(6): 535-538.
- Brantley, S.L., Liermann, L.J., Guynn, R.L., Anbar, A.D., Icopini, G.A. & Barling, J. (2004). Fe isotopic fractionation during mineral dissolution with and without bacteria Geochimica et Cosmochimica Acta **68**(15): 3189-3204.
- Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F. & Personné, J.-C. (2006). Diversity of Microorganisms in Fe-As-Rich Acid Mine Drainage Waters of Carnoulès, France Applied and Environmental Microbiology **72**(1): 551-556.
- Bruneel, O., Duran, R., Koffi, K., Casiot, C., Fourçans, A., Elbaz-Poulichet, F. & Personné, J.-C. (2005). Microbial Diversity in a Pyrite-Rich Tailings Impoundment (Carnoulès, France) Geomicrobiology Journal **22**: 249-257.
- Bruneel, O., Personne, J.-C., Casiot, C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Mahler, B.J., Le Fleche, A. & Grimont, P.A.D. (2003). Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France) Journal of Applied Microbiology **95**: 492-499.
- Bullen, T.D., White, A.F., Childs, C.W., Vivit, D.V. & Schulz, M.S. (2001). Demonstration of significant abiotic iron isotope fractionation in nature Geology **29**(8): 699-702.
- Burton, E.D., Bush, R.T., Sullivan, L.A. & Mitchell, D.R.G. (2008). Schwertmannite transformation to goethite via the Fe(II) pathway: Reaction rates and implications for iron-sulfide formation Geochimica et Cosmochimica Acta **In Press**.

- Butler, I.B., Archer, C., Vance, D., Oldroyd, A. & Rickard, D. (2005). Fe isotope fractionation on FeS formation in ambient aqueous solution Earth and Planetary Science Letters **236**: 430-442.
- Butler, I.B. & Seitz, J.C. (2006). Apparent seasonal variations in iron photoreduction in acidic discharge from a former pyrite mine, Oakland, California Applied Geochemistry **21**: 1109-1122.
- Cancès, B., Juillot, F., Morin, G., Laperche, V., Alvarez, L., Proux, O., Hazemann, J.L., Brown, G.E. & Calas, G. (2005). XAS Evidence of As(V) Association with Iron Oxyhydroxides in a Contaminated Soil at a Former Arsenical Pesticide Processing Plant Environ. Sci. Technol. **39**(24): 9398-9405.
- Cancès, B., Juillot, F., Morin, G., Laperche, V., Polya, D., Vaughan, D.J., Hazemann, J.L., Proux, O., Brown Jr, G.E. & Calas, G. (2008). Changes in arsenic speciation through a contaminated soil profile: A XAS based study Science of The Total Environment **397**(1-3): 178-189.
- Carlson, L., Bigham, J.M., Schwertmann, U., Kyek, A. & Wagner, F. (2002). Scavenging of As from Acid Mine Drainage by Schwertmannite and Ferrihydrite: A Comparison with Synthetic Analogues Environmental Science and Technology **36**: 1712-1719.
- Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Leblanc, M. & Elbaz-Poulitchet, F. (2004). Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoulès, France) Science of the Total Environment **320**: 259-267.
- Casiot, C., Lebrun, S., Morin, G., Bruneel, O., Personné, J.-C. & Elbaz-Poulitchet, F. (2005). Sorption and redox processes controlling arsenic fate and transport in a stream impacted by acid mine drainage Science of the Total Environment **347**: 122- 130.
- Casiot, C., Morin, G., Juillot, F., Bruneel, O., Personné, J.-C., Leblanc, M., Duquesne, K., Bonnefoy, V. & Elbaz-Poulitchet, F. (2003). Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France) Water Research **37**: 2929-2936.
- Cesbron, F.P. & Williams, S.A. (1992). Tooeleite, a new mineral from the U.S. Mine, Tooele County, Utah Mineralogical Magazine **56**: 71-73.
- Chan, M.A., Johnson, C.M., Beard, B.L., Bowman, J.R. & Parry, W.T. (2006). Iron isotopes constrain the pathways and formation mechanisms of terrestrial oxide concretions: A tool for tracing iron cycling on Mars? Geosphere **2**(7): 324-332.
- Chapman, J.B., Weiss, D.J., Coles, B.J. & Wilkinson, J.J. (2006). Iron isotope fractionation by abiotic mechanisms during ore genesis Goldschmidt Conference Abstract 2006 **106**.
- Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S., Chavez, F.P., Ferioli, L., Sakamoto, C., Rogers, P., Millero, F., Steinberg, P., Nightingale, P., Cooper, D., Cochlan, W.P., Landry, M.R., Constantinou, J., Rollwagen, G., Trasvina, A. & Kudela, R. (1996). A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean Nature **383**(6600): 495-501.
- Collienue, R. (1983). Photoreduction of iron in the epilimnion of acidic lakes Limnology and Oceanography **28**(1): 83-100.
- Croal, L.R., Johnson, C.M., Beard, B.L. & Newman, D.K. (2004). Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria Geochimica et Cosmochimica Acta **68**(6): 1227-1242.
- Crosby, H.A., Johnson, C.M., Roden, E.E. & Beard, B.L. (2005). Coupled Fe(II)-Fe(III) Electron and Atom Exchange as a Mechanism for Fe Isotope Fractionation during Dissimilatory Iron Oxide Reduction Environmental Science and Technology **39**: 6698-6704.

- Cruz, R., Làzaro, I., Gonàlez, I. & Monroy, M. (2005). Acid dissolution influences bacterial attachment and oxidation of arsenopyrite Minerals Engineering **18**: 1024-1031.
- Dauphas, N. & Rouxel, O. (2006). Mass spectrometry and natural variations of iron isotopes Mass Spectrometry Reviews **25**: 515-550.
- Dideriksen, K., Baker, J.A. & Stipp, S.L.S. (2005). Iron isotopes in natural carbonate minerals determined by MC-ICP-MS with a ^{58}Fe - ^{54}Fe double spike Geochimica et Cosmochimica Acta **In Press**.
- Dixit, S. & Hering, J.G. (2003). Comparison of Arsenic(V) and Arsenic(III) Sorption onto Iron Oxide Minerals: Implications for Arsenic Mobility Environmental Science and Technology **37**: 4182-4189.
- Duquesne, K., Lebrun, S., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Morin, G. & Bonnefoy, V. (2003). Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage Applied and Environmental Microbiology **60**(10): 6165-6173.
- Dzombak, D.A. & Morel, F.M.M. (1990). Surface complex modeling: hydrous ferric oxides.
- Egal, M., Elbaz-Poulichet, F., Casiot, C., Motelica-Heino, M., Négrel, P., Bruneel, O., Sarmiento, A.M. & Nieto, J.M. (2008). Iron isotopes in acid mine waters and iron-rich solids from the Tinto-Odiel Basin (Iberian Pyrite Belt, Southwest Spain) Chemical Geology **253**(3-4): 162-171.
- Elbaz-Poulichet, F., Braungardt, C., Achterberg, E., Morley, N., Cossa, D., Beckers, J.-M., Nomérange, P., Cruzado, A. & Leblanc, M. (2001). Metal biogeochemistry in the Tinto-Odiel rivers (Southern Spain) and in the Gulf of Cadiz: a synthesis of the results of TOROS project Continental Shelf Research **21**: 1961-1973.
- Evangelou, V.P. & Zhang, Y.L. (1995). A review: pyrite oxidation mechanisms and acid mine drainage prevention CRC Critical Reviews in Environmental Control ; VOL. 25 ; ISSUE: 2 ; PBD: 1995: pp. 141-199 ; PL:.
- Fang, J., Hasiotis, S.T., Gupta, S.D., Brake, S.S. & Bazylinski, D.A. (2007). Microbial biomass and community structure of a stromatolite from an acid mine drainage system as determined by lipid analysis Chemical Geology **243**(1-2): 191-204.
- Fantle, M.S. & DePaolo, D.J. (2004). Iron isotopic fractionation during continental weathering Earth and Planetary Science Letters **228**: 547-562.
- Fehr, M.A., Andersson, P.S., Hålenius, U. & Mörtz, C.-M. (2008). Iron isotope variations in Holocene sediments of the Gotland Deep, Baltic Sea Geochimica et Cosmochimica Acta **72**(3): 807-826.
- Fernández-Remolar, D., Gómez-Elvira, J., Gómez, F., Sebastian, E., Martín, J., Manfredi, J.A., Torres, J., González Kesler, C. & Amils, R. (2004). The Tinto River, an extreme acidic environment under control of iron, as an analog of the Terra Meridiani hematite site of Mars Planetary and Space Science **52**(1-3): 239-248.
- Fortin, D., Ferris, F.G. & Scott, S.D. (1998). Formation of Fe-silicates and Fe-oxides on bacterial surfaces in samples collected near hydrothermal vents on the Southern Explorer Ridge in the northeast Pacific Ocean American Mineralogist **83**: 1399-1408.
- Fortin, D. & Langley, S. (2005). Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals Earth-Science Reviews **72**(1-2): 1-19.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kennedy, D.W., Dong, H., Onstott, T.C., Hinman, N.W. & Li, S.-m. (1998). Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium Geochimica et Cosmochimica Acta **62**(19-20): 3239-3257.
- Fukushi, K., Sasaki, M., Sato, T., Yanase, N., Amano, H. & Ikeda, H. (2003a). A natural attenuation of arsenic in drainage from an abandoned arsenic mine dump Applied Geochemistry **18**: 1267-1278.

- Fukushi, K., Sato, T. & Yanase, N. (2003b). Solid-Solution Reactions in As(V) Sorption by Schwertmannite Environmental Science and Technology **37**: 3581-3586.
- Fukushi, K., Sato, T., Yanase, N., Minato, J. & Yamada, H. (2004). Arsenate sorption on schwertmannite American Mineralogist **89**: 1728-1734.
- Fuller, C.C. & Davis, J.A. (1989). Influence of coupling of sorption and photosynthetic processes on trace element cycles in natural waters Nature **340**: 52-54.
- Fuller, C.C., Davis, J.A. & Waychunas, G.A. (1993). Surface chemistry of ferrihydrite: Part 2. Kinetics of arsenate adsorption and coprecipitation Geochimica et Cosmochimica Acta **57**(10): 2271-2282.
- Gammons, C.H., Nimick, D.A., Parker, S.R., Snyder, D.M., McCleskey, R.B., Amils, R. & Poulson, S.R. (2008). Photoreduction fuels biogeochemical cycling of iron in Spain's acid rivers Chemical Geology *In Press*.
- Ghauri, M.A., Okibe, N. & Johnson, D.B. (2007). Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations Hydrometallurgy **85**: 72-80.
- Graham, S., Pearson, N., Jackson, S., Griffin, W. & O'Reilly, S.Y. (2004). Tracing Cu and Fe from source to porphyry: in situ determination of Cu and Fe isotope ratios in sulfides from the Grasberg Cu-Au deposit Chemical Geology **207**: 147-169.
- Herbert, R.B. & Schippers, A. (2008). Iron Isotope Fractionation by Biogeochemical Processes in Mine Tailings Environmental Science and Technology **42**: 1117-1122.
- Humphris, S.E. & McCollom, T. (1998). The Cauldron Beneath the Seafloor Oceanus **41**(2): 18-21.
- Icopini, G.A., Anbar, A.D., Ruebush, S.S., Tien, M. & Brantley, S.L. (2004). Iron isotope fractionation during microbial reduction of iron: The importance of adsorption Geology **32**(3): 205-208.
- Ingri, J., Malinovsky, D., Rodushkin, I., Baxter, D.C., Widerlund, A., Andersson, P., Gustafsson, Ö., Forsling, W. & Öhlander, B. (2006). Iron isotope fractionation in river colloidal matter Earth and Planetary Science Letters **245**: 792-798.
- Inskip, W.P., Macur, R.E., Harrison, G., Bostick, B.C. & Fendorf, S. (2004). Biomineralization of As(V)-hydrous ferric oxyhydroxide in microbial mats of an acid-sulfate-chloride geothermal spring, Yellowstone National Park Geochimica et Cosmochimica Acta **68**(15): 3141-3155.
- Jain, A., Raven, K.P. & Loeppert, R.H. (1999). Arsenite and Arsenate Adsorption on Ferrihydrite: Surface Charge Reduction and Net OH⁻ Release Stoichiometry Environmental Science and Technology **33**: 1179-1184.
- Jang, J.-H., Dempsey, B.A., Catchen, G.L. & Burgos, W.D. (2003). Effects of Zn(II), Cu(II), Mn(II), Fe(II), NO₃⁻, or SO₄²⁻ at pH 6.5 and 8.5 on transformations of hydrous ferric oxide (HFO) as evidenced by Mössbauer spectroscopy Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **221**: 55-68.
- Jia, Y., Xu, L. & Demopoulos, G.P. (2006). Observation of Surface Precipitation of Arsenate on Ferrihydrite Environmental Science and Technology **40**: 3248-3253.
- Jiang, L., Zhou, H., Peng, X. & Ding, Z. (2008). Bio-oxidation of galena particles by *Acidithiobacillus ferrooxidans* Particuology **6**: 99-105.
- Johnson, C. & Beard, B. (2004a). Fe isotope variations in the modern and ancient Earth and other planetary bodies. Geochemistry of Non-traditional stable isotopes. Reviews in mineralogy and geochemistry. C. M. Johnson, Beard, B.L., Albarede, F. editors. Washington DC, Mineralogical Society of America; Geochemical Society. **55**: 319-357.

- Johnson, C.M. & Beard, B.L. (2004b). Overview and General Concepts. Geochemistry of Non-traditional stable isotopes. Reviews in Mineralogy and geochemistry. Washington DC, Mineralogical Society of America; Geochemical Society. **55**: 1-24.
- Johnson, C.M. & Beard, B.L. (2005). Biogeochemical Cycling of Iron Isotopes Science **309**: 1025-1027.
- Johnson, C.M., Beard, B.L., Beukes, N.J., Klein, C. & O'Leary, J.M. (2003). Ancient geochemical cycling in the Earth as inferred from Fe isotope studies of banded iron formations from the Transvaal Craton Contrib. Mineral. Petrol. **144**: 523–547.
- Johnson, C.M., Beard, B.L. & Roden, E.E. (2008). The iron isotope fingerprints of redox and biogeochemical cycling in modern and ancient Earth Annual Review of Earth and Planetary Sciences **36**: 457-493.
- Johnson, C.M., Beard, B.L., Roden, E.E., Newman, D.K. & Nealon, K.H. (2004). Isotopic constraints on biogeochemical cycling of Fe. Geochemistry of Non-traditional stable isotopes. Reviews in mineralogy and geochemistry. Washington DC, Mineralogical Society of America; Geochemical Society. **55**: 359-408.
- Johnson, C.M., Roden, E.E., Welch, S.A. & Beard, B.L. (2005). Experimental constraints on Fe isotope fractionation during magnetite and Fe carbonate formation coupled to dissimilatory hydrous ferric oxide reduction Geochimica and Cosmochimica Acta **69**(4): 963-993.
- Johnson, C.M., Skulan, J.L., Beard, B.L., Sun, H., Nealon, K.H. & Braterman, P.S. (2002). Isotopic fractionation between Fe(III) and Fe(II) in aqueous solutions Earth and Planetary Science Letters **195**: 141-153.
- Johnson, D.B. (2006). Biohydrometallurgy and the environment: intimate and important interplay Hydrometallurgy **83**: 153-166.
- Johnson, D.B. & Hallberg, K.B. (2003). The microbiology of acidic mine waters Research in Microbiology **154**(7): 466-473.
- Jones, B. & Renaut, R.W. (2007). Selective mineralization of microbes in Fe-rich precipitates (jarosite, hydrous ferric oxides) from acid hot springs in the Waiotapu geothermal area, North Island, New Zealand Sedimentary Geology **194**: 77-98.
- Jönsson, J., Jönsson, J. & Lövgren, L. (2006). Precipitation of secondary Fe(III) minerals from acid mine drainage Applied Geochemistry **21**: 437-445.
- Jönsson, J. & Sherman, D.M. (2008). Sorption of As(III) and As(V) to siderite, green rust (fougerite) and magnetite: Implications for arsenic release in anoxic groundwaters Chemical Geology *In Press*.
- Kappler, A., Schink, B. & Newman, D.K. (2005). Fe(III) mineral formation and cell encrustation by the nitrate-dependent Fe(II)-oxidizer strain BoFeN1 Geobiology **3**(4): 235-245.
- Karlsson, S., Hakansson, K., Ledin, A. & Allard, B. (1995). Light induced changes of Fe(II) /Fe(III) and their implications for colloidal forms of Al, Mn, Cu, Zn and Cd in an acidic lake polluted with mine waste effluents Journal of Geochemical Exploration **52**: 145-159.
- Kasama, T. & Murakami, T. (2001). The effect of microorganisms on Fe precipitation rates at neutral pH Chemical Geology **180**: 117-128.
- Kawano, M. & Tomita, K. (2001). Geochemical modeling of bacterially induced mineralization of schwertmannite and jarosite in sulfuric acid spring water American Mineralogist **86**(10): 1156-1165.

- Koffi, K., Leblanc, M., Jourde, H., Casiot, C., Pistre, S., Gouze, P. & Elbaz-Poulichet, F. (2003). Reverse oxidation zoning in mine tailings generating arsenic-rich acidic waters (Carnoulès, France) Mine Water and the Environment **22**: 7-14.
- Konhauser, K.O. (1998). Diversity of bacterial iron mineralization Earth-Science Reviews **43**(3-4): 91-121.
- Lacan, F., Radic, A., Jeandel, C., Pradoux, C., Freydier, R., Poitrasson, F. & Sartou, G. (2008). Measurement of the isotopic composition of dissolved Fe in seawater Geochimica et Cosmochimica Acta **72**(12, Supplement 1): A510.
- Langmuir, D., Mahoney, J. & Rowson, J. (2006). Solubility products of amorphous ferric arsenate and crystalline scorodite ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and their application to arsenic behavior in buried mine tailings Geochimica et Cosmochimica Acta **70**: 2942-2956.
- Leblanc, M., Achard, B., Ben Othman, D. & Luck, J.M. (1996). Accumulation of arsenic from acidic mine waters by ferruginous bacterial accretions (stromatolites) Applied Geochemistry **11**: 541-554.
- Lebrun, S. (2005). Minéralogie des précipités hydratés Fe-As dans un drainage minier acide: Rôle des microorganismes acidophiles. Paris, France, Université Pierre et Marie Curie.
- Levasseur, S., Frank, M., Hein, J.R. & Halliday, A.N. (2004). The global variation in the iron isotope composition of marine hydrogenetic ferromanganese deposits: implications for seawater chemistry? Earth and Planetary Science Letters **224**: 91-105.
- Lopez-Archilla, A.I., Marín, I. & Amils, R. (2001). Microbial Community Composition and Ecology of an Acidic Aquatic Environment: The Tinto River, Spain Microbial Ecology **41**: 20-35.
- Malinovsky, D., Stenberg, A., Rodushkin, I., Andren, H., Ingri, J., Öhlander, B. & Baxter, D.C. (2003). Performance of high resolution MC-ICP-MS for Fe isotope ratio measurements in sedimentary geological materials Journal of Analytical Atomic Spectrometry **18**: 687-695.
- Mandernack, K.W., Bazylinski, D.A., Shanks, W.C., III & Bullen, T.D. (1999). Oxygen and Iron Isotope Studies of Magnetite Produced by Magnetotactic Bacteria Science **285**(5435): 1892-1896.
- Markl, G., Von Blankenburg, F. & Wagner, T. (2006). Iron isotope fractionation during hydrothermal ore deposition and alteration Geochimica et Cosmochimica Acta **70**: 3011-3030.
- Martin, J.H. & Fitzwater, S.E. (1988). Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic Nature **331**(6154): 341-343.
- Martin, J.H., Gordon, R.M. & Fitzwater, S.E. (1990). Iron in Antarctic waters Nature **345**(6271): 156-158.
- Masue, Y., Loeppert, R.H. & Kramer, T.A. (2007). Arsenate and Arsenite Adsorption and Desorption Behavior on Coprecipitated Aluminum:Iron Hydroxides Environmental Science and Technology **41**: 837-842.
- Matthews, A., Morgans-Bell, S.M., Emmanuel, S., Jenkyns, H.C., Erel, Y. & Halicz, L. (2004). Controls on iron-isotope fractionation in organic-rich sediments (Kimmeridge Clay, Upper Jurassic, southern England) Geochimica et Cosmochimica Acta **68**(14): 3107-3123.
- Matthews, A., Zhu, X.-K. & O'Nions, K. (2001). Kinetic iron stable isotope fractionation between iron (-II) and (-III) complexes in solution Earth and Planetary Science Letters **192**: 81-92.
- McKnight, D.M., Kimball, B.A. & Runkel, R.L. (2001). pH dependence of iron photoreduction in a rocky mountain stream affected by acid mine drainage Hydrological Processes **15**: 1979-1992.
- Morin, G. & Calas, G. (2006). Arsenic in soils, mine tailings, and former industrial sites Elements **2**(2): 97-101.

- Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Elbaz-Poulichet, F., Leblanc, M., Ildefonse, P. & Calas, G. (2003). Bacterial Formation of Tooeleite and Mixed Arsenic(III) or Arsenic(V)-Iron(III) Gels in the Carnoulès Acid Mine Drainage, France. A XANES, XRD, and SEM Study Environmental Science and Technology **37**: 1705-1712.
- Morin, G., Rousse, G. & Elkaim, E. (2007). Crystal structure of tooeleite, $\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, a new iron arsenite oxyhydroxysulfate mineral relevant to acid mine drainage American Mineralogist **92**: 193-197.
- Nimick, D.A., Cleasby, T.E. & McCleskey, R.B. (2005). Seasonality of diel cycles of dissolved trace-metal concentrations in a Rocky Mountain stream Environmental Geology **47**: 603-614.
- Nishimura, T. & Robins, R.G. (2008). Confirmation that *tooeleite* is a ferric arsenite sulfate hydrate, and is relevant to arsenic stabilisation Minerals Engineering **21**: 246-251.
- Olías, M., Cánovas, C.R., Nieto, J.M. & Sarmiento, A.M. (2006). Evaluation of the dissolved contaminant load transported by the Tinto and Odiel rivers (South West Spain) Applied Geochemistry **21**(10): 1733-1749.
- Ona-Nguema, G., Morin, G., Juillot, F., Calas, G. & Brown, G.E. (2005). EXAFS Analysis of Arsenite Adsorption onto Two-Line Ferrihydrite, Hematite, Goethite, and Lepidocrocite Environ. Sci. Technol. **39**(23): 9147-9155.
- Paktunc, D., Dutrizac, J. & Gertsman, V. (2008). Synthesis and phase transformations involving scorodite, ferric arsenate and arsenical ferrihydrite: Implications for arsenic mobility Geochimica et Cosmochimica Acta **72**: 2649-2672.
- Paktunc, D. & Dutrizac, J.E. (2003). Characterization of arsenate for sulfate substitution in synthetic jarosite using X-Ray diffraction and X-Ray absorption spectroscopy Can Mineral **41**(4): 905-919.
- Parkhurst, D.L. & Appelo, C.A.J. (1999). User's guide to PHREEQC (Version 2) - a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations. Water-Resources Investigations - Report 99-4259. Interior. Denver, Colorado, U.S. Geological Survey: 312p.
- Parmentier, M. (2006). Développement d'un module microbiologique dédié à la modélisation hydrobiogéochimique et applications à la mobilité de l'arsenic, Ecole des Mines de Paris: 184 pages.
- Pedersen, H.D. (2006). The transformation of Fe(III) oxides catalysed by Fe^{2+} and the fate of arsenate during transformation and reduction of Fe(III) oxides. Institute of Environment and Resources. Copenhagen, Technical University of Denmark. **PhD degree**: 55 pages.
- Pedersen, H.D., Postma, D. & Jakobsen, R. (2006). Release of arsenic associated with the reduction and transformation of iron oxides Geochimica et Cosmochimica Acta **70**: 4116-4129.
- Poitrasson, F. & Freydier, R. (2005). Heavy iron isotope composition of granites determined by high resolution MC-ICP-MS Chemical Geology **222**: 132-147.
- Poitrasson, F., Levasseur, S. & Teutsch, N. (2005). Significance of iron isotope mineral fractionation in pallasites and iron meteorites for the core-mantle differentiation of terrestrial planets Earth and Planetary Science Letters **234**: 151-164.
- Polyakov, V.B. (1997). Equilibrium fractionation of the iron isotopes: Estimation from Mössbauer spectroscopy data Geochimica et Cosmochimica Acta **61**(19): 4213-4217.
- Polyakov, V.B., Clayton, R.N., Horita, J. & Mineev, S.D. (2007). Equilibrium iron isotope fractionation factors of minerals: Reevaluation from the data of nuclear inelastic resonant X-ray scattering and Mössbauer spectroscopy Geochimica et Cosmochimica Acta **71**: 3833-3846.

- Polyakov, V.B. & Mineev, S.D. (2000). The use of Mössbauer spectroscopy in stable isotope geochemistry Geochimica et Cosmochimica Acta **64**(5): 849-865.
- Poulson, S.R. & John, B.E. (2003). Stable isotope and trace element geochemistry of the basal Bouse Formation carbonate, southwestern United States: Implications for the Pliocene uplift history of the Colorado Plateau Geol Soc Am Bull **115**(4): 434-444.
- Rancourt, D.G., Thibault, P.-J., Mavrocordatos, D. & Lamarche, G. (2005). Hydrous ferric oxide precipitation in the presence of nonmetabolizing bacteria: Constraints on the mechanism of a biotic effect Geochimica et Cosmochimica Acta **69**(3): 553-577.
- Raven, K.P., Jain, A. & Loeppert, R.H. (1998). Arsenite and Arsenate Adsorption on Ferrihydrite: Kinetics, Equilibrium, and Adsorption Envelopes Environment Science and Technology **32**: 344-349.
- Regenspurg, S. (2002). Characterisation of schwertmannite - Geochemical interactions with arsenate and chromate and significance in sediments of lignite opencast lakes: 125 pages.
- Regenspurg, S., Brand, A. & Peiffer, S. (2004). Formation and stability of schwertmannite in acidic mining lakes Geochimica et Cosmochimica Acta **68**(6): 1185-1197.
- Regenspurg, S. & Peiffer, S. (2005). Arsenate and chromate incorporation in schwertmannite Applied Geochemistry **20**: 1226-1239.
- Roden, E.E., Leonardo, M.R. & Ferris, F.G. (2002). Immobilization of strontium during iron biomineralization coupled to dissimilatory hydrous ferric oxide reduction Geochimica et Cosmochimica Acta **66**(16): 2823-2839.
- Rodier, J. (1959). L'analyse chimique et physicochimique de l'eau. Paris, DUNOD.
- Rodier, J., Broutin, J.P., Chambon, P., Champsaur, H. & Rodi, L. (1996). L'analyse de l'eau. Paris, Dunod.
- Rodushkin, I., Stenberg, A., Andrén, H., Malinovsky, D. & Baxter, D.C. (2004). Isotopic fractionation during diffusion of transition metal ions in solution Analytical Chemistry **76**: 2148-2151.
- Roe, J.E., Anbar, A.D. & Barling, J. (2003). Nonbiological fractionation of Fe isotopes: evidence of an equilibrium isotope effect Chemical Geology **195**: 69-85.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. & Sand, W. (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation Applied Microbiology and Biotechnology **63**: 239-248.
- Rouxel, O., Dobbek, N., Ludden, J.N. & Fouquet, Y. (2003). Iron isotope fractionation during oceanic crust alteration Chemical Geology **202**: 155-182.
- Rouxel, O., Sholkovitz, E., Charette, M. & Edwards, K.J. (2008). Iron isotope fractionation in subterranean estuaries Geochimica et Cosmochimica Acta **72**: 3413-3430.
- Rouxel, O.J., Bekker, A. & Edwards, K.J. (2005). Iron Isotope Constraints on the Archean and Paleoproterozoic Ocean Redox State Science **307**(5712): 1088-1091.
- Sampson, M.I., Philips, C.V. & Blake II, R.C. (2000). Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of minerals sulfides Minerals Engineering **13**(4): 373-389.
- Sanchez-España, J., Lopez-Pamo, E. & Santofimia-Pastor, E. (2007a). The oxidation of ferrous iron in acidic mine effluents from the Iberian Pyrite Belt (Odiel Basin, Huelva, Spain): Field and laboratory rates Journal of Geochemical Exploration **92**: 120-132.

- Sanchez-España, J., Santofimia-Pastor, E. & Lopez-Pamo, E. (2007b). Iron terraces in acid mine drainage systems: A discussion about the organic and inorganic factors involved in their formation through observations from the Tintillo acidic river (Riotinto mine, Huelva, Spain) Geosphere **3**(3).
- Sarmiento, A.M. (2007). Estudio de la contaminación por drenajes ácidos de minas de las aguas superficiales en la cuenca del río Odiel (SO España). Geology. Huelva, Facultad de Ciencias Experimentales.
- Savage, K.S., Bird, D.K. & O'Day, P.A. (2005). Arsenic speciation in synthetic jarosite Chemical Geology **215**: 473-498.
- Schauble, E.A., Rossman, G.R. & Taylor, H.P. (2001). Theoretical estimates of equilibrium Fe-isotope fractionations from vibrational spectroscopy Geochimica et Cosmochimica Acta **65**(15): 2487-2497.
- Schauble, R. (2004). Applying stable isotope fractionation theory to new systems. Geochemistry of Non-traditional stable isotopes. Reviews in mineralogy and geochemistry. B. B. Johnson CM, Albarede F, editors. Washington DC, Mineralogical Society of America; Geochemical Society. **55**: 65-111.
- Schuessler, J.A., Schoenberg, R., Behrens, H. & Von Blanckenburg, F. (2007). The experimental calibration of the iron isotope fractionation factor between pyrrhotite and peralkaline rhyolitic melt Geochimica et Cosmochimica Acta **71**: 417-433.
- Senko, J.M., Dewers, T.A. & Krumholz, L.R. (2005). Effect of Oxidation Rate and Fe(II) State on Microbial Nitrate-Dependent Fe(III) Mineral Formation Appl. Environ. Microbiol. **71**(11): 7172-7177.
- Severmann, S., Johnson, C.M., Beard, B.L., German, C.R., Edmonds, H.N., Chiba, H. & Green, D.R.H. (2004). The effect of plume processes on the Fe isotope composition of hydrothermally derived Fe in the deep ocean as inferred from the Rainbow vent site, Mid-Atlantic Ridge, 36°14'N Earth and Planetary Science Letters **225**: 63-76.
- Severmann, S., Johnson, C.M., Beard, B.L. & McManus, J. (2006). The effect of early diagenesis on the Fe isotope compositions of porewaters and authigenic minerals in continental margin sediments Geochimica et Cosmochimica Acta **70**: 2006-2022.
- Severmann, S., McManus, J., Johnson, C.M. & Beard, B.L. (2003). Iron isotope geochemistry in California margin sediments and porewaters Eos Trans. AGU **84**(52): Ocean Sci. Meet. Suppl., Abstract OS31L-09.
- Sharma, M., Polizzotto, M. & Anbar, A.D. (2001). Iron isotopes in hot springs along the Juan de Fuca Ridge Earth and Planetary Science Letters **194**: 39-51.
- Sigg, L., Behra, P. & Stumm, W. (2001). Chimie des milieux aquatiques - 3e édition.
- Skulan, J.L., Beard, B.L. & Johnson, C.M. (2002). Kinetic and equilibrium Fe isotope fractionation between aqueous Fe(III) and hematite Geochimica et Cosmochimica Acta **66**(17): 2995-3015.
- Smedley, P.L. & Kinniburgh, D.G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters Applied Geochemistry **17**: 517-568.
- Stenberg, A., Malinovsky, D., Öhlander, B., Andrén, H., Forsling, W., Engström, L.-M., Wahlin, A., Engström, E., Rodushkin, I. & Baxter, D.C. (2005). Measurement of iron and zinc isotopes in human whole blood: Preliminary application to the study of HFE genotypes Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **19**(1): 55-60.
- Stumm, W. & Morgan, J.J. (1981). Aquatic Chemistry, An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters. New York, Wiley.
- Sullivan, L.A., Drever, J.I. & McKnight, D.M. (1998). Diel variation in element concentrations, Peru Creek, Summit County, Colorado Journal of Geochemical Exploration **64**: 141-145.

- Tate, C.M., Broshears, R.E. & McKnight, D.M. (1995). Phosphate dynamics in an acidic mountain stream: Interactions involving algal uptake, sorption by iron oxide, and photoreduction Limnology and Oceanography **40**(5): 938-945.
- Teutsch, N., Von Gunten, U., Porcelli, D., Cirpka, O.A. & Halliday, A.N. (2005). Adsorption as a cause for iron isotope fractionation in reduced groundwater Geochimica et Cosmochimica Acta **69**(17): 4175-4185.
- Thompson, A., Ruiz, J., Chadwick, O.A., Titus, M. & Chorover, J. (2007). Rayleigh fractionation of iron isotopes during pedogenesis along a climate sequence of Hawaiian basalt Chemical Geology **238**(1-2): 72-83.
- Thoral, S. (2004). Etude des interactions fer-arsenic dans les eaux souterraines du Bangladesh: Approche physico-chimique et microbiologique. Geosciences de l'environnement. Aix-Marseille, Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille (Aix-Marseille III).
- Tufano, K.J. & Fendorf, S. (2008). Confounding Impacts of Iron Reduction on Arsenic Retention Environmental Science and Technology **42**: 4777-4783.
- Walczyk, T. & von Blanckenburg, F. (2002). Natural Iron Isotope Variations in Human Blood Science **295**(5562): 2065-2066.
- Walczyk, T. & von Blanckenburg, F. (2005). Deciphering the iron isotope message of the human body International Journal of Mass Spectrometry **242**: 117-134.
- Wang, H., Bigham, J.M. & Tuovinen, O.H. (2006). Formation of schwertmannite and its transformation to jarosite in the presence of acidophilic iron-oxidizing microorganisms Materials Science and Engineering C **26**: 588-592.
- Warren, L.A. & Ferris, F.G. (1998). Continuum between Sorption and Precipitation of Fe(III) on Microbial Surfaces Environmental Science and Technology **32**: 2331-2337.
- Waychunas, G.A., Fuller, C.C., Rea, B.A. & Davis, J.A. (1996). Wide angle X-ray scattering (WAXS) study of "two-line" ferrihydrite structure: Effect of arsenate sorption and counterion variation and comparison with EXAFS results Geochimica et Cosmochimica Acta **60**(10): 1765-1781.
- Waychunas, G.A., Rea, B.A., Fuller, C.C. & Davis, J.A. (1993). Surface chemistry of ferrihydrite: Part 1. EXAFS studies of the geometry of coprecipitated and adsorbed arsenate Geochimica et Cosmochimica Acta **57**(10): 2251-2269.
- Waychunas, G.A., Xu, N., Fuller, C.C., Davis, J.A. & Bigham, J.M. (1995). XAS study of AsO₄³⁻ and SeO₄²⁻ substituted schwertmannites Physica B: Condensed Matter **208-209**: 481-483.
- Welch, S.A., Beard, B.L., Johnson, C.M. & Bratermann, P.S. (2003). Kinetic and equilibrium Fe isotope fractionation between aqueous Fe(II) and Fe(III) Geochimica et Cosmochimica Acta **67**(22): 4231-4250.
- Wiederhold, J.G., Kraemer, S.M., Teutsch, N., Borer, P.M., Halliday, A.N. & Kretzschmar, R. (2006). Iron Isotope Fractionation during Proton-Promoted, Ligand-Controlled, and Reductive Dissolution of Goethite Environmental Science and Technology **40**(12): 3787-3793.
- Wiesli, R.A., Beard, B.L. & Johnson, C.M. (2004). Experimental determination of Fe isotope fractionation between aqueous Fe(II), siderite and bgreen rustQ in abiotic systems Chemical Geology **211**: 343-362.
- Williams, H.M., McCammon, C.A., Peslier, A.H., Halliday, A.N., Teutsch, N., Levasseur, S. & Burg, J.P. (2004). Iron isotope fractionation and the oxygen fugacity of the mantle Science **304**(5677): 1656-1659.
- Winterer, M. (1997). XAFS: a data analysis program for materialq science Journal de Physique IV **7**(C2): 243-244.

- Xia, L., Liu, X., Zeng, J., Yin, C., Gao, J., Liu, J. & Qiu, G. (2008). Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopyrite Hydrometallurgy **92**: 95-101.
- Yamaguchi, K.E., Johnson, C.M., Beard, B.L. & Ohmoto, H. (2005). Biogeochemical cycling of iron in the Archean–Paleoproterozoic Earth: Constraints from iron isotope variations in sedimentary rocks from the Kaapvaal and Pilbara Cratons Chemical Geology **218**: 135-169.
- Yu, J.-Y., Heo, B., Choi, I.-K., Cho, J.-P. & Chang, H.-W. (1999). Apparent solubilities of schwertmannite and ferrihydrite in natural stream waters polluted by mine drainage Geochimica et Cosmochimica Acta **63**(19/20): 3407-3416.
- Yu, J.-Y., McGenity, T.J. & Coleman, M.L. (2001). Solution chemistry during the lag phase and exponential phase of pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* Chemical Geology **175**(3-4): 307-317.
- Yunmei, Y., Yongxuan, Z., Williams-Jones, A.E., Zhenmin, G. & Dexian, L. (2004). A kinetic study of the oxidation of arsenopyrite in acidic solutions: implications for the environment Applied Geochemistry **19**: 435-444.
- Zhu, X.-K., O'Nions, R.K., Guo, Y. & Reynolds, B.C. (2000). Secular Variation of Iron Isotopes in North Atlantic Deep Water Science **287**(5460): 2000-2002.
- Zhu, X.K., Guo, Y., Williams, R.P.J., O'Nions, R.K., Matthews, A., Belshaw, N.S., Canters, G.W., de Waal, E.C., Weser, U., Burgess, B.K. & Salvato, B. (2002). Mass fractionation processes of transition metal isotopes Earth and Planetary Science Letters **200**: 47-62.

ANNEXES

**Annexe 1 : Impact du DMA du Reigous
sur l'hydrosystème aval**

**Hydrological and geochemical controls on metals and arsenic in a
Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous
River, France); preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus
cephalus*)**

**Corinne CASIOT¹, Marion EGAL¹, Odile BRUNEEL¹, Chrystèle BANCON-MONTIGNY¹,
Marie-Ange CORDIER¹, Elena GOMEZ¹, Catherine ALIAUME², Françoise ELBAZ-
POULICHET¹,**

¹ Hydrosiences UMR 5569, CNRS Universités Montpellier I & II IRD, Place Eugène
Bataillon, CC MSE, 34095 Montpellier cedex 5

² ECOLAG, UMR 5119 CNRS Université Montpellier II IFREMER, Place Eugène Bataillon,
CC 093, 34095 Montpellier cedex 5

Abstract

The dissolved and particulate concentrations of metals (Fe, Al, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Tl, Pb) and arsenic have been monitored over a four-year period in the Amous River downstream of its confluence with a creek severely affected by acid mine drainage (AMD) originating from a former Pb-Zn mine. Water pH ranges from 6.5 to 8.8. Average dissolved metal concentrations ($\mu\text{g/l}$) are 1 ± 4 (Fe), 69 ± 49 (Al), 140 ± 118 (Mn), 4 ± 3 Co, 6 ± 4 (Ni), 1.3 ± 0.8 (Cu), 126 ± 81 (Zn), 1.1 ± 0.7 (Cd), 0.9 ± 0.5 (Tl), 2 ± 3 (Pb). Arsenic concentrations range from 5 to $134\text{ }\mu\text{g/L}$ ($30\pm 23\text{ }\mu\text{g/l}$). Metals are predominantly in dissolved form except Fe. In the particulate phase, metals are generally associated to Al oxides whereas As is linked to Fe oxides. The variations of metal concentrations in dissolved and/or particulate phase are generally marked by higher concentrations during the wet season due to higher generation of AMD.

Metal concentrations are generally higher than the Maximum Allowed Concentrations in European surface water for priority substances (Ni, Cd and Pb) and higher than the

Environmental Quality Standards for other compounds. Most metals are DGT available. However, the concentrations in *Leuciscus cephalus* are below the maximum Pb and Cd concentrations allowed in fish muscle for human consumption. Amongst the elements studied, only As, Pb and Tl were shown to bioaccumulate in liver tissue (As, Pb) or otoliths (Tl). Metal or As biocaccumulation was not detected in muscle and for most elements *Leuciscus cephalus* has developed regulation mechanisms to regulate their internal metal concentrations.

Keywords: mine drainage, metal, arsenic, biogeochemistry, *Leuciscus cephalus*

Introduction

The weathering of sulphide-rich mining waste releases acid mine drainage (AMD). These effluents are characterised by low pH and contain significant quantities of sulphates, metals and metalloids including arsenic. AMD generation can persist hundreds of years after the mine has been closed, jeopardising water resources and causing deleterious effects on aquatic life. The scale of the pollution is difficult to assess accurately, but it is considered as a severe environmental problem worldwide (Johnson and Hallberg, 2005).

The transfer of acidity and toxic elements in river basins affected by AMD depends primarily on the geology, which exerts substantial control over the neutralising capacity of water. In some cases low pH values prevail over long distances, as in the Odiel and Tinto Rivers in Spain where the pollution persists over 50 km, all the way to the river mouth (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1999; Braungardt *et al.*, 2003).

A number of studies have examined the various physical and biogeochemical processes that affect the fate of mine-derived elements during transport away from the AMD source (Kimball *et al.*, 1994; Paulson and Balistrieri, 1999; Schemel *et al.*, 2000; Yu and Heo, 2001; Balistrieri *et al.*, 2007). In the transition zone between acidic and near-neutral pH water, rapid precipitation of Fe, Al, and Mn oxyhydroxides and removal of trace metals and metalloids by sorption and/or coprecipitation have generally been reported.

Despite these natural attenuation processes, adverse effects of mine pollution may occur further downstream in relation with changing physicochemical conditions. For example, Cd originating from a former Zn refining plant in the Lot River basin (France) is released into solution in the Gironde estuary through the formation of soluble Cd chlorocomplexes (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1987). The transfer to the dissolved phase increases Cd mobility in coastal waters and allows it to be transported by coastal currents along the Atlantic coast, where oyster contamination has been reported more than 400 km away from the Lot River (Boutier

et al., 2000; Baudrimont *et al.*, 2005).

Changes in redox conditions may also trigger the transfer of toxic elements from the particulate phase to the solution. This occurs mainly during summer, when the increase in temperature favours the development of anoxic or suboxic conditions in sediments and boosts bacterial activity. These conditions are propitious to the reduction of oxide phases and to the mobilisation of associated metals and metalloids. This process has been proposed to explain the release into solution of As during summer in the Garonne-Dordogne basin (Masson *et al.*, 2007).

According to several authors (Mok and Wai, 1990; Nimick *et al.*, 2003; Gammons *et al.*, 2007), changes in other physicochemical parameters such as an increase in temperature and/or pH also favour metalloid desorption in AMD-affected alkaline water.

The metals stemming from AMD are potentially toxic for the aquatic ecosystem. The toxicity of divalent metals is related to free ion activity. The toxic metal fraction can be assessed using models such as the free ion activity model (Morel, 1983) or the biotic ligand model (Di Toro *et al.*, 2001). These models work relatively well in simple systems, but obtaining accurate predictions of metal toxicity in natural water remains a challenge (Unsworth *et al.*, 2006). Numerous operational techniques are available for evaluation of the bioavailable/toxic metal fraction. Among them, the Diffusion Gradient in Thin Film (DGT) technique, which avoids artefacts during sampling and sample handling (Sigg *et al.*, 2006), has been demonstrated to provide a good approximation for the bioavailable metal fraction (Tusseau-Villemin *et al.*, 2004).

The southern edge of the Massif Central in France hosts several metal or coal ores, which were mined intensively during the first half of the 20th century. The mines are closed now but tailings stocks have been left, some of them releasing AMD. In many cases, systematic inventories of environmental impacts have not been carried out. As pointed out by

UNEP (2000), such a situation is not conducive to rehabilitation because the problem is ignored. This study was partially designed to fill this gap. It seeks to decipher the processes that control the dissolved and particulate concentrations of heavy metals and arsenic in water and the potential toxicity and the potential toxicity.

The study was carried out in the Amous River, which receives AMD from the former Pb-Zn mine of Carnoulès. The AMD contains up to 300 mg/l of As(III) and several mg/l concentrations of heavy metals such Pb, Cd and Zn which are released at a rate of about 1l/s.

Metal (Al, Fe, Mn, Ni, Co, Cu, Zn, Cd, Tl and Pb) and arsenic concentrations in the dissolved phase were monitored monthly over a four-year period. Occasionally particulate metal concentrations were also analysed. The DGT technique was used to assess the toxic metal fraction during selected surveys. The metal and arsenic concentrations in fish (*Leuciscus cephalus*) tissues (muscle, liver, otolith) were also quantified.

Site description

The Amous River is located in the basin of the Rhone River, which is the main river discharging in the Mediterranean Sea (Fig.1). The Amous River drains a mineralised area on the south-eastern flank of the Massif Central.

The surface of Amous River watershed averages 20 km². Mean annual rainfall is 1100 mm, with a seasonal distribution typical of the Mediterranean climate, including long drought periods and intense precipitation events, especially in spring and autumn. The Amous River regime is characterised by high flow conditions sustained by rainfall in winter, receding flow in spring and base flow conditions in summer. Intense rainfall events, which are especially common in autumn on the southern edge of the Massif Central, induce dramatic flash floods, as in September 2002 when the Amous watershed received over 600 mm of rain in 48 hours.

The corresponding peak discharge in the river was evaluated at 400 m³/s (19 m³/s.km²) by Gaume and Bouvier (2004).

The Carnoulès orebody (2.5 Mt containing 3.5% Pb and 0.8% Zn) was mainly worked as an opencast operation for 40 years; the Carnoulès mine was closed in 1962. The waste remnant from the recovery process (about 1.5 Mt), still containing 0.7% Pb, 10% Fe sulphide and 0.2 % As, was stored behind a dam built upon the uppermost course of Reigous Creek. The source of Reigous Creek is acid (2<pH<3) and rich in dissolved iron, arsenic and sulphate ([Fe] = 0.5-1 g/l; [As] = 50-350 mg/l; [SO₄²⁻] = 2.0-7.7g/l), predominantly in the reduced forms As(III) and Fe(II) (Leblanc *et al.*, 1996; Casiot *et al.*, 2003). The rapid oxygenation of water in the Reigous facilitates the microbiologically mediated oxidation of Fe(II) and the precipitation of Fe-As yellow to ochre precipitates consisting mainly of amorphous gels of As-rich Fe oxyhydroxysulphates, minor quantities of schwertmannite and tooeleite, a Fe(III)-As(III) mineral (Morin *et al.*, 2003; Casiot *et al.*, 2003; Bruneel *et al.*, 2006). Reigous Creek also collects acidic seepage waters from the surrounding quarries before joining the Amous River 1.5 km downstream.

It is difficult to routinely monitor the discharge of the Amous and Reigous because of the clogging of the sills of gauging stations during floods and the legal prohibition on dredging polluted material. At the confluence with the Amous River (Fig.1), the Reigous discharge is estimated at 0.6-20 l/s. The Amous discharge is much higher (50 to 150 l/s). At the junction of the two streams, the Reigous water is neutralised, leading to the precipitation of large amounts of Fe in the form of Fe oxyhydroxides, and significant amounts of As are removed through coprecipitation (Casiot *et al.*, 2005). The fish population disappears over a stretch of a few hundred meters in the Amous River downstream of the confluence.

Sampling

Fifty surveys were carried out from March 2002 to October 2007, with a monthly periodicity since November 2004. The location of sampling stations is presented in Fig.1. Water samples were collected in the Amous River 1200 m downstream from the confluence with Reigous Creek (Amous DC station), and at the same time in Reigous Creek at a station situated a few meters upstream from the confluence with the Amous River (Reigous station). Water from an unpolluted reference site located in Amous River 1500 m upstream from the confluence (Amous UC station) with Reigous Creek was collected occasionally.

The pH and temperature were measured in the field. Water samples were filtered immediately through 0.22 μm Millipore membranes fitted on Sartorius polycarbonate filter holders. Samples for metal and metalloid determination were acidified to pH=1 with HNO_3 (14.5 M) and stored at 4°C in polyethylene bottles until analysis. The samples for SO_4^{2-} determination were frozen once returned to the laboratory. Samples for As speciation were preserved with 5% EDTA 0.25 M, as recommended by Bednar *et al.* (2002), and analysed within 48 hours. Suspended particulate matter (SPM) recovered from the filtration of 500 ml of water sample through a 0.22 μm filter was air-dried until constant weight for subsequent mineralisation. Owing to the generally low SPM concentration in the Amous River (a few mg/l), it was not possible to routinely report the metal or metalloid concentrations in mass unit of element per mass unit of SPM. We have therefore chosen to report the particulate concentrations in mass unit of element per volume of water.

DGT probes were deployed in Amous River in June 2003, March, April and June 2004. Commercial DGT devices were purchased from DGT Research (Lancaster, UK). They consisted of a layer of polyacrylamide hydrogel backed by a layer of chelating resin (Chelex

100). The assembly was packed in a plastic holder separated from the sample solution by a filter membrane. We used open pore and restricted diffusive gels (thickness=0.8 mm).

The procedure was similar to that described by Tusseau-Vuillemin *et al.* (2007). Three open pore devices and three restricted gel devices were deployed simultaneously for 24, 48 and 72 hours in Amous River. The three different deployment durations enabled us to check that metal accumulation on the gel was linear through time. Water temperature was monitored continuously to estimate the range of values of diffusion coefficients to be used in calculations and the subsequent error in calculated concentrations. After retrieval of the system, the resins were eluted in 10 ml of 1 M nitric acid (Merck 65% Suprapur). Zn, Cu, Ni and Cd were analysed in the eluates by ICP-MS. The mass of metal accumulated on the resin (M) was calculated using an elution yield of 80% (Zhang and Davison, 1995). The DGT available concentration C_{DGT} , which can be taken as a first approximation of the bioavailable metal fraction (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2004), was calculated according to equation (1) (Davison and Zhang, 1994):

$$C_{DGT} = (M\Delta g)/(tAD), (1)$$

where t is the immersion time, Δg the diffusive gel thickness (0.8 mm), A the exposure area (3.14 cm²) and D the diffusion coefficient of the metal. The diffusion coefficients used for open pore probes in this study are those given by the supplier of the DGT probes (www.dgtresearch.com). For restricted gels, we used the diffusion coefficients published in Zhang and Davison (1999, 2000), Zhang (2004) and Scally *et al.*, (2006).

Fish specimens (*Leuciscus cephalus*) were collected using electrofishing in June 2003 in the Amous River upstream (reference site) and downstream of the confluence with Reigous Creek (polluted site). The polluted site was located along a 2 km river transect centred on the Amous DC station. The reference site was located in a small basin 1.5 km upstream from the Amous UC station. The fish populations of the polluted site and the reference site cannot mix.

Migration of live fish from one site to the other has never been observed due to an acute toxicity zone where fish cannot live and which extends over a few hundred meters downstream from the junction of the Amous River and Reigous Creek.

Live fish were classified and segregated, measured, and weighed using a calibrated, portable scale. Individual specimens were sacrificed. Each fish was filleted using a stainless steel knife. Muscles, livers and the whole head were double-bagged in separate new plastic bags, sealed and labelled with a unique identifying number. All materials used in the fish collection and processing procedures were carefully chosen to prevent contamination by heavy metals. Immediately upon return to the laboratory, all fish muscles and livers were deep-frozen. Otoliths were removed from the head, washed and air-dried. Metals (Tl, Pb, Cd, Zn, Cu) and As were analysed in muscles, liver and otoliths.

Samples of SPM, fish muscle, liver and otolith were mineralised on a hot plate in concentrated HNO₃ (Merck Suprapur), H₂O₂ (Merck pro analysis) and HF (Merck Suprapur) when necessary.

Analysis

Metals and metalloids

Fe was determined by Flame or Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Thermo Electron Corporation, France).

Metal concentrations in water, mineralised SPM and fish samples were determined using VG-Elemental PQ2+ (Fisons) and Thermo X7 Series ICP-MS instruments. Quantitative analyses were performed using a conventional external calibration procedure with Indium as an internal standard to correct for instrumental drift and possible matrix effects. For mineralised SPM and otoliths, samples were diluted ten-fold before analysis. Mineralised fish liver and fillet samples were diluted two-fold. Certified reference materials from the Canadian

National Research Council, i.e. SLRS-4 (freshwater sample), DOLT-2 (dogfish liver), DORM-2 (dogfish muscle) and PACS-2 (polluted harbour sediment), and a mineralised aragonite sample spiked with multi-element standard solution were used to check analytical accuracy and precision. The results revealed a recovery rate within $\pm 10\%$.

Analyses of inorganic arsenic species (As(III), As(V)) were carried out using anion-exchange chromatography (25 cm $\times$ 4.1 mm i.d. Hamilton PRP-X100 column with Varian ProStar gradient solvent delivery system) coupled to Hydride Generation (HG) (VGS 200, FISIONS, France) with an Atomic Fluorescence Spectrometry (AFS) detector (Excalibur, PSAnalytical, GB) (Casiot *et al.*, 2005).

An ICS 1000 ion chromatography system (Dionex) was used for the determination of sulphate.

Results

Dissolved material

The mean pH and dissolved element concentrations at the Amous UC, Amous DC and Reigous stations are reported in Table 1.

The input of acidic Reigous water (pH=5 $\pm$ 2) affected very slightly the pH of the Amous River, which remained near neutrality (pH=7.9 $\pm$ 0.7) downstream of the confluence. Contrasting with the high dissolved Fe concentrations of Reigous Creek (0.1 to 159 mg/l), the Fe concentrations at the Amous DC station are below the detection limit. Similarly, Al is highly soluble in Reigous Creek with concentrations ranging from 4 to 44 mg/l but displays comparatively low concentrations (2 to 248 μ g/l) in the Amous River DC.

In the Amous River UC, the metal and metalloid concentrations are comparable to world river averages, reflecting very low natural background concentrations. Downstream

from the confluence, mean sulphate concentrations increased by a factor of 4.45, metal and metalloid concentrations by a factor of 2.6 (Cu) to 70 (Mn). The mean concentrations of Mn, Co, Ni, Zn, As, Cd, Tl and Pb were generally higher than the world river average. In particular, Tl exhibited a concentration that was 166 times higher than the average concentration measured in various large rivers and smaller tributaries throughout the world (Nielsen *et al.*, 2005). Average dissolved As concentration was 36 times higher than baseline concentrations in river water. Only Cu was not enriched in the Amous River compared to world averages.

The time series results for metals, arsenic and ancillary parameters (temperature, monthly rainfall, sulphate concentrations) in the Amous River DC are given in Fig.2.

During the study period, the monthly rainfall was typical of the Mediterranean climate on the southern edge of the Massif Central. Major precipitations generally occurred during a few episodes in autumn and early winter (rainy season). The summer was generally dry. The interannual variability was substantial, with minimum annual rainfall of 571 mm in 2005 and a maximum of 1859 mm in 2002.

In the Amous River DC, the pH values and dissolved Al, Cu, Pb concentrations (not reported) do not show systematic variations according to the season. Sulphate, Zn, Co, Ni, Cd, Mn and Tl exhibited seasonal variations characterised by the occurrence of higher concentration during the rainy season. Arsenic concentrations also varied seasonally in the Amous River DC, but the variations were not in phase with those of metals and sulphate.

The DGT labile metal concentrations are given in Table 2. For Mn, Zn and Cd, these concentrations were similar within the error range to the total dissolved metal concentration. For Ni, Co and Cu, the DGT labile concentrations were significantly lower than total dissolved concentrations in June 2003 and 2004 (Ni, Co), and in April and June 2004 (Cu). The labile fraction represented less than $50 \pm 12\%$ of the total dissolved fraction for Co, $63 \pm$

11% for Ni and $62 \pm 12\%$ for Cu. These results showing a significant proportion of DGT available metals agree with those of Balistrieri *et al.* (2007) in a similar environment.

In the Amous River, both As(III) and As(V) were present with strongly variable contributions to total dissolved As. As(III) was generally the predominant species during the rainy season, As (V) being dominant in summer. The variations of As(V) concentrations were strongly correlated to those of water temperature, displaying the highest values in summer (Fig.2) whereas dissolved As(III) displayed maximum concentrations during the rainy period (Fig.2).

Suspended Particulate Matter

Al and Fe are major components of the SPM in the Amous River DC. Both elements display maximum concentrations during the rainy period from early autumn to the end of winter (Fig.3). The relationship between these two metals allowed the identification of two groups of particles (Fig.4). The first group was characterised by a relatively high Fe/Al ratio compared to the second group.

Most elements, with the exception of Tl, were present in the particulate phase at detectable levels and their particulate concentrations were found to be correlated with either Fe (As) or Al (Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb and to a lesser extent Mn) as shown in Figs.4 and 5. Hence, similarly to Fe and Al, metals (Mn, Ni, Co, Cu, Zn, Cd, Pb) and arsenic displayed maximum particulate concentrations during the rainy season.

The relationship between As and Fe corroborated the occurrence of two SPM populations identified by the correlation between Al and Fe (Fig.4). The population presenting the lowest As/Fe ratio ($\text{As/Fe}=0.004 \text{ mol/mol}$) was also depleted in Al compared to Fe. Conversely, the population enriched in As relative to Fe ($\text{As/Fe}=0.04 \text{ mol/mol}$) was characterised by the highest Al/Fe ratio.

The correlation of Ni, Co, Cu, Zn, Cd, Pb and Mn with Al reflects their efficient coprecipitation with Al oxides at the confluence of Reigous Creek and the Amous River. The proportion of metals scavenged by the particulate phase is reported in Fig.6. It varies according to the metal considered, with an affinity for the particulate phase increasing in the order $Mn=Ni=Co<Zn=Cd<Cu<Pb$.

Fish

Concentrations in fish tissues are provided in Table 3. Concentrations were generally lower in muscle than in liver tissue, as also reported by Yilmaz *et al.*, (2007). In muscles, the concentrations were similar in the Amous River UC and the Amous River DC. In liver, differences were observed for As and Pb, which showed higher concentrations in the fish collected at the polluted site. In otoliths, only Tl was significantly higher at the polluted site.

Discussion

Fe-Al behaviour: influence of oxide precipitation and hydrology

Reigous Creek is the major source of Fe and/or Al to the Amous River. During the mixing of alkaline Amous water and acidic Reigous water, substantial precipitation of Al and Fe oxides takes place. Reigous Creek brings also to the Amous River solid Fe phases in the form of Fe hydroxysulfates such as schwertmannite (Casiot *et al.*, 2005). Contrary to the oxides that form at the confluence, these oxides do not bear Al because of the high solubility of Al in acidic water. Schwertmannite is not stable in alkaline water, and it likely decomposes into ferrihydrite in the Amous River in agreement with the findings of Bigham *et al.*, (1996).

In the Amous River DC, dissolved Fe concentrations are generally below detection limit, reflecting the very low solubility of Fe in alkaline water. In contrast, a significant

proportion of Al is generally present in the dissolved phase (62%, Fig.6). With a few exceptions, dissolved Al concentrations are lower than those predicted in water at equilibrium with amorphous $\text{Al}(\text{OH})_3$ and are generally oversaturated with regard to gibbsite (Fig.7). These concentrations are probably fixed by the solubility of amorphous or poorly crystallised Al oxides or aluminosilicates such as allophanes, as reported by Cravotta (2008) in a similar system.

During the rainy season, the enhanced percolation of meteoric water through the tailings stock increases the production of AMD and thus the quantity of dissolved Fe and Al transported by Reigous Creek. Moreover, the Fe hydroxysulfates deposited in the Reigous bed can be eroded during rainy events and transported away. In the Amous River, the increased AMD input is reflected by an increase of particulate Fe concentrations and of both particulate and dissolved Al concentrations.

Metal behaviour: influence of coprecipitation processes and hydrological control

The correlation between Al and most metals (Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb and to a lesser extent Mn), with the exception of Tl in the particulate phase, illustrates metal scavenging by the Al oxides that precipitate at the confluence. This correlation suggests that dissolved metal and metalloid concentrations are controlled by coprecipitation with Al oxides rather than by the precipitation of pure metal mineral phases.

Nevertheless, the scavenging processes by oxides have a relatively low impact on dissolved metal concentrations since most metals, with the exception of Pb, are mainly transported in dissolved phase as shown in Fig.7. In this respect, the relatively high solubility of Mn (87 to 100% of Mn) suggests that the majority of Mn is in the reduced form ($\text{Mn}(\text{II})$) despite well-oxygenated water and generally alkaline conditions. The persistence of $\text{Mn}(\text{II})$

over at least 1200 meters downstream from the confluence with Reigous Creek may be accounted for by a slow kinetic of Mn oxidation.

Particulate Tl concentrations do not indicate specific interactions between Tl and Al or Fe oxides. On average 99% of Tl is in the dissolved phase, in keeping with the findings of Casiot *et al.* (2005), indicating a conservative behaviour of dissolved Tl during the mixing of Amous and Reigous water. Relatively few studies have dealt with Tl biogeochemistry in fresh water. Although Tl(III) may exist in colloidal form that increases its apparent solubility (Lin and Nriagu, 1999), low solubility of Tl(III) is generally reported (Raogadde and Laitinen, 1974; Bidoglio *et al.*, 1993; Dahal and Lawrance, 1996; Koschinsky and Hein, 2003). According to thermodynamic calculations, Tl(I) is the stable Tl species in water (Vink *et al.*, 2003). In this form, Tl(I) can replace K(I) in the clay mineral lattice. Experimental studies have confirmed the affinity of Tl(I) for illite but showed little Tl uptake on kaolinite or montmorillonite (Matthews and Riley, 1970; Jacobson *et al.*, 2005). Although confirming this hypothesis would require Tl species analysis, it is thus likely that the high solubility of Tl in the Amous River is accounted for by the presence of Tl(I) and a majority of clay minerals which do not have a strong affinity for Tl.

The seasonal variations of metal concentrations highlight increased AMD generation during the rainy season. For the metals that are primarily (over 80%) transported in the dissolved phase (Mn, Co, Ni, Zn, Cd), this is reflected by an increase in both dissolved and particulate concentrations. For Cu and Pb, which display a comparatively lower affinity for the dissolved phase, the intense coprecipitation that takes place during the mixing of Reigous and Amous water obliterates any dissolved concentration increase.

Arsenic behaviour: influence of redox processes and hydroclimatic factors

Arsenic shows a strong affinity for particulate Fe oxides in the Amous River DC, as

often reported elsewhere (Smedley and Kinniburgh, 2002, and the references therein).

Different As/Fe ratios are observed according to the origin of the Fe oxides. The Al-poor Fe oxides originating from Reigous Creek contain As that coprecipitates or adsorbs on Fe oxides throughout Reigous Creek (Morin *et al.*, 2003; Casiot *et al.*, 2005) but with lower As/Fe ratios compared to the Al-rich oxides that form at the confluence between the two streams.

The dissolved As brought by the Reigous is predominantly in the reduced form As(III) (Casiot *et al.*, 2005). In the Amous River, As(III) is unstable and oxidises. The coexistence of As(III) and As(V) in the Amous water is related to the slow oxidation kinetic of As in natural water (Cherry *et al.*, 1979).

In the Amous River, peaks of dissolved As(III) concentrations and particulate As are observed in relation to increased AMD input during the rainy season. In addition, during the summer, dissolved As concentrations increase with temperature. Similar observations in other rivers affected by mine drainage have been attributed to the reduction of metal oxides driven by increased bacterial activity (Masson *et al.*, 2007) or to decreased adsorption due to the influence of temperature on metalloid adsorption (Nimick *et al.*, 2003). In our study, the increase in dissolved As is associated with the increase in As(V) concentration. Therefore the variations are likely related to increased biooxidation rates of As during summer, due to higher temperatures that boost the bacterial activity. Both As(V) and As(III) adsorb on Fe oxides in the Amous River, as observed in a previous study (Casiot *et al.*, 2005). The oxidation of As is expected to release As into solution, in agreement with the findings of Raven *et al.*, (1998) showing a lower sorption of As(V) compared to As(III) on Fe oxides in alkaline water.

Potential risks and observed effects on *Leuciscus cephalus*

The European Commission has established Maximum Allowable Concentrations (MAC) for 17 priority substances and proposed Environmental Quality Standards (EQS) for 33 other pollutants. The MAC and EQS values for the elements studied are reported in Table 1. Among the elements considered in this study, Co, Ni, Zn, As, Cd, Tl and Pb displayed mean annual dissolved concentrations that were higher than MAC or EQS. Mean concentrations of Cu were generally lower than the EQS, but occasionally (November 2004, September 2005 and September 2006) exceeded EQS.

The DGT analyses indicate that metals in the Amous River occur mainly as free metal ions or as DGT labile complexes. This feature could be due to concentrations exceeding the complexing capacity of dissolved organic matter, the Amous water being characterised by generally low concentrations (0.5 to 2mg/l, unpublished data) of dissolved organic carbon.

Despite the high concentration of bioavailable metals in water, Cd and Pb concentrations in fish muscle at the Amous DC station remain below the maximum level allowed by the European regulation (EC, 2005). Bioaccumulation is detected only for As and Pb in liver and Tl in otoliths. Metal bioaccumulation does not occur in muscle. Thus for most metals, *Leuciscus cephalus* seem to have developed regulation mechanisms that allow them to maintain metal homeostasis.

Conclusion

This study has identified the biogeochemical and hydrological processes that control the variations of metal and arsenic concentration in a small Mediterranean river contaminated by acidic water from a mining creek.

With the exception of Fe and Pb, metals (Al, Cu, Zn, Cd, Co, Mn, Ni and Tl) are generally transported in dissolved phase.

In the particulate phase, metals, with the exception of Tl, are associated to Al oxides that precipitate at the junction between the main river and the mining creek. Arsenic is borne by Fe oxides either inherited from the mining creek or precipitated through AMD neutralisation. During the wet season, increased acid mine drainage takes place. This results in an increase of both particulate and dissolved concentrations for most metals and arsenic, the exceptions being Cu and Pb. For the latter metals, extensive scavenging by Al oxides prevents an increase in their dissolved concentrations.

During summer, the higher temperature increases bacterial activity, which controls As(III) oxidation rates. As(V), which adsorbs less than As(III) on Fe oxides in alkaline water, is released into solution.

The metal concentrations in the Amous River are generally higher than the European Environmental Maximum Allowed Concentrations (MAC) for priority pollutants (Ni, Cd and Pb) and Environmental Quality Standards (EQS) for other pollutants in inland surface water. Most metals are in DGT labile form. Nevertheless, concentrations of Cd and Pb in the muscle tissue of *Leuciscus cephalus* are below the European maximum allowed concentrations for fish consumption. Metal or As bioaccumulation was not detected in muscles. Concentrations of As and Pb in liver tissue and Tl in otoliths were found to be higher at the contaminated site than at the uncontaminated reference site. Finally, our results suggest that *Leuciscus cephalus* in the Amous River have developed mechanisms that allow them to regulate their internal metal concentrations. Although they live in water that does not comply with the European regulation for inland surface water, these fishes are edible.

429 **Acknowledgements**

430 This study was supported by the ECCODYN and EC2CO programmes of the Institut
431 des Sciences de l'Univers (INSU-France) and the French National Research Agency (RARE
432 project). Marion Egal benefited from a grant of the CNRS for her Ph-D. We thank Marie Tela
433 and David Rozin for technical help.

References

- Balistrieri, L., Seal II, R., Piatak, N., Paul, B., 2007. Assessing the concentration, speciation, and toxicity of dissolved metals during mixing of acid-mine drainage and ambient river water downstream of the Elizabeth Copper Mine, Vermont, USA. *Applied Geochemistry*, 22, 930-952.
- Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury-Brachet, R., Bossy, C., Boudou, A., Blanc, G., 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Science of the Total Environment*, 337, 265-280.
- Bednar, A.J., Garbarino, J.R., Ranville, J.F., Wildeman, T.R., 2002. Preserving the distribution of inorganic arsenic species in groundwater and acid mine drainage samples. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 2213-2218.
- Bidoglio, G., Gibson, P.N., O'Gorman, M., Roberts, K.J., 1993. X-ray adsorption spectroscopy investigation of surface redox transformation of thallium and chromium on colloidal mineral oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 57, 2389-2394.
- Bigham, J.M., Schwertmann, U., Traina, S., Windland, R., Wolf, M., 1996. Schwertmannite and the chemical modelling of iron in acid sulfate waters, *Geochim Cosmochim Acta*, 60, 2111-2121.
- Boutier, B., Chiffolleau, J.-F., Gonzalez, J.-L., Lazure, P., Auger, D., Truquet, I., 2000. Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the waters: consequences on the Marennes-Oléron bay (France). *Oceanologica Acta*, 23, Issue 7, 1 745-757.

458 Braungardt, C., Achterberg, Elbaz-Poulichet, F., Morley, N.H., 2003. Metal biogeochemistry
 459 in an acidic mine polluted estuarine system in south-west Spain. *Applied Geochemistry*,
 460 18, 1757-1871.

461 Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Personne, J.C., 2006. Diversity of
 462 microorganisms involved in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès
 463 (France). *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 551-556.

464 Casiot, C., Lebrun, S., Morin, G., Bruneel, O., Personne, J.C., Elbaz-Poulichet, F., 2005.
 465 Sorption and redox processes controlling arsenic fate and transport in a stream impacted
 466 by acid mine drainage. *Science of the Total Environment*, 347, 122-130.

467 Casiot, C., Morin, G., Bruneel, O., Personné, J.C., Leblanc, M., Dusquesne, C., Bonnefoy, V.,
 468 Elbaz-Poulichet, F., 2003. Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid
 469 mine drainage (Carnoulès creek, France). *Arsenic behaviour in the aqueous phase*.
 470 *Water Research*, 37, 2929-2936.

471 Cherry, J.A., Shaikh, A.U., Tallman, D.E., Nicholson, R.V., 1979. Arsenic species as an
 472 indicator of redox conditions in groundwater. *J. of Hydrol.*, 43, 373-392.

473 Cravotta, C.A., III, 2008. Dissolved metals and associated constituents in abandoned coal-
 474 mine discharges, Pennsylvania, USA. Part 2: Geochemical controls on constituent
 475 concentrations. *Appl. Geochem.*, 23, 203-226.

476 Dahal, M.P., Lawrance, G.A., 1996. Adsorption of thallium(I), lead(II), copper(II),
 477 bismuth(III) and chromium(III) by electrolytic manganese dioxide. *Adsorp. Sci.*
 478 *Technol.*, 13, 231-240.

479 Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. A
 480 biotic ligand model of the acute toxicity of metals. I. Technical basis. *Environ. Toxicol.*
 481 *Chem.* 20, 2383-2396.

482 Elbaz-Poulichet, F., Martin, J.M., Huang, W.W., Zhu, J.X., 1987. Dissolved Cd behaviour in
 483 some selected French and Chinese estuaries. Consequences on Cd supply to the ocean.
 484 Mar. Chem. 22, 125-136.

485 Elbaz-Poulichet, F., Morley, N.H., Cruzado, A., Velasquez, Z., Achterberg, E., Braungardt,
 486 C., 1999a. Preliminary assessment of trace metal and nutrient concentrations (including
 487 metal speciation) in an extremely low pH (2.5) river-estuarine system, the Ria of Huelva
 488 (South-West Spain). Sci. Tot. Env., 227, 1, 73-83.

489 EC, 2005. Commission Regulation (EC) No. 78/2005 of 19 January 2005.

490 Gammons, C.T., David, G., Nimick, A., Parker, S., DeGrandpre, M., 2007. Diel changes in
 491 water chemistry in an arsenic-rich stream and treatment-pond system. Science of the
 492 Total Environment 384, 433–451.

493 Gaume, E., Bouvier, C. 2004. Hydrological analysis of the Gard and Vidourle river floods on
 494 the 8th and 9th September 2002. La Houille Blanche, 6, 99-106.

495 Jacobson, A.R., McBride, M.B., Baveye, P., Steenhuis, T.S., 2005. Environmental factors
 496 determining the trace-level sorption of silver and thallium to soils. Sci. Tot. Environ.,
 497 345, 191-205.

498 Johnson, D., Hallberg, K., 2005. Acid mine drainage remediation options: a review. Sci. Tot.
 499 Env., 338, 3-14.

500 Kimball, B.A., Broshears, R.E., Bencala, K.E., McKnight, D.M., 1994. Coupling of
 501 hydrologic transport and chemical reactions in a stream affected by acid mine drainage.
 502 Environ. Sci. Technol., 28, 2065-2073.

503 Koschinsky, A., Hein, J.R., 2003. Uptake of elements from seawater by ferromanganese
 504 crusts: solid-phase associations and seawater speciation. Marine Geology, 198 (3-4),
 505 331-351.

- Lin, T.-S., Nriagu, J., 1999. Thallium speciation in the Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 3394-3397.
- Martin, J.-M., Whitfield, M., 1983. The significance of river input of chemical elements to the ocean. In *Trace Metals in Sea Water*, C.S. Wong and E. Boyle., eds, Plenum Press, New York, 265-296.
- Martin, J.-M., Meybeck, M., 1979. Elemental mass-balance of material carried by major world rivers. *Mar. Chem.*, 7, 173-206.
- Masson, M., Schäfer, J., Blanc, G., Anschutz P., 2007. Seasonal variations and annual fluxes of arsenic in the Garonne, Dordogne and Isle Rivers, France. *Science of the Total Environment*, 373, Issue 1, 196-207.
- Matthews, A.D., Riley, J.P., 1970. The occurrence of thallium in sea water and marine sediments. *Chem. Geol.*, 149, 149–152.
- Mok, W., Wai, C., 1990. Distribution and mobilization of arsenic and antimony species in the Cœur D’Alene River, Idaho. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 102-108.
- Morel, F.M.M., 1983. *Principles of aquatic chemistry*. New York: John Wiley and Sons.
- Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Bruneel, O., Personne, J.C., Elbaz-Poulichet, F., Leblanc, M., Ildefonse, P., Calas, G., 2003. Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). XANES and XRD evidence of As(V)- or As(III)-Fe(III) gels and tooeleite. *Env. Sci. Technol.*, 37, 1705-1712.
- Nielsen, S., Rehkämper, M., Porcelli, D., Andersson, P., Halliday, A.N., Swarzenski, P.W., Latkoczy, C., Günther, D., 2005. Thallium isotope composition of the upper continental crust and rivers—An investigation of the continental sources of dissolved marine thallium. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, 8, 2007-2019.

529

- 530 Nimick, D., Gammons, C., Cleasby, T., Madison, P., Skaar, D., Brick, C., 1998. Diel cycles in
531 dissolved metal concentrations in streams: occurrence and possible causes. *Water*
532 *Resources Research*, vol. 39, no. 9, citation number 1247, doi:10.1029/WR001571.
- 533 Paulson, A.J., Balistrieri, L.S., 1999. Modeling removal of Cd, Cu, Pb, and Zn in acidic
534 groundwater during neutralization by ambient surface waters and groundwaters.
535 *Environ. Sci. Technol.*, 33, 3850-3856.
- 536 Raogadde, R., Laitinen, H.A., 1974. Studies of heavy-metal adsorption by hydrous iron and
537 manganese oxides. *Anal. Chem.*, 46, 2022-2026.
- 538 Scally, S., Davison, W., Zhang, H., 2006. Diffusion coefficients of metals and metal
539 complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. *Anal. chim. acta.*, 558,
540 222-229.
- 541 Schemel, L.E., Kimball, B.A., Bencala, K.E., 2000. Colloid formation and metal transport
542 through two mixing zones affected by acid mine drainage near Silverton, Colorado.
543 *Appl. Geochem.*, 15, 1003-1018.
- 544 Sigg, L., Black, F., Buffle, J., Cao, J., Cleven, R., Davison, W., Galceran, J., Gunkel, P.,
545 Kalis, E., Kistler, D., Martin, M., Noel, S., Nur, Y., Odzak, N., Puy, J., van Riemsdijk,
546 W., Temminghoff, E., Tercier-Waeber, M-L., Toepperwien, S., Town, R., Unsworth, E.,
547 Warnken, K., Weng, L., Xue, H., Zhang, H., 2006. Comparison of analytical techniques
548 for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters. *Environ. Sci. Technol.*, 40,
549 1934-1941.
- 550 Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution
551 of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.*, 17, 517-568.
- 552 Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gilbin, R., Bakkaus, E., Garric, J., 2004. Performance of diffusive
553 gradient in thin films in evaluating the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*.

554 Environ Toxicol Chem., 23, 2154-2161.
 555 Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay, C., Lorgeoux, C., Mouchel, J.M., Buzier, R., Gilbin, R.,
 556 Elbaz-Poulichet, F., 2007. Bioavailability of dissolved contaminants in the river Seine
 557 basin. Science of the Total Environment, 375, 244-256.
 558 Unsworth, E.R., Warnken, K.W., Zhang, H., Davison, W., Black, F., Buffle, J., Cao, J.,
 559 Cleven, R., Galceran, J., Gunkel, P., Kalis, E., Kistler, D., van Leeuwen, H.P., Martin,
 560 M., Noel, S., Nur, Y., Odzak, N., Puy, J., van Riemsdijk, W., Sigg, L., Temminghoff,
 561 E., Tercier-Waeber, M.-L., Toepperwien, S., Town, R.M., Weng, L., Xue, H., 2006.
 562 Model predictions of metal speciation in freshwaters compared to measurements by in
 563 situ technique. Environ. Sci. Technol., 40, 1942-1949.
 564 Vink, B.W., 1998. Thallium in the (sub) surface environment: its mobility in terms of Eh and
 565 pH. In J.O. Nriagu, ed., Thallium in the environment, Wiley Series in Advances in
 566 Environmental Science and Technology, vol. 29, John Wiley and Sons.
 567 Yilmaz, F., Ozdemir, N., Demirak, A., Tuna, A.L., 2007. Heavy metal levels in two fish
 568 species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. Food Chemistry, 100, 830-835.
 569 Yu, J.-Y., Heo, B., 2001. Dilution and removal of dissolved metals from acid mine drainage
 570 along Imgok Creek, Korea. Appl. Geochem., 16, 1041-1053.
 571 Zhang, H., 2004. In-situ speciation of Ni and Zn in freshwaters: Comparison between DGT
 572 measurements and speciation models. Environ. Sci. Technol. 38, 1421-1427.
 573 Zhang, H., Davison, W., 1999. Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT and DET
 574 techniques. Anal. Chim. Acta., 398, 329-340.
 575 Zhang, H., Davison, W., 2000. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically
 576 bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients
 577 in thin films. Anal. Chem., 72, 4447-4457.
 578 Zhang, H., Davison, W., 1995. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films

579 for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. Anal. Chem., 67, 3391–
580 3400.
581
582
583
584

Captions to Figures

Figure 1. Map showing location of study area and sampling stations

Figure 2. Monthly variations of dissolved metal (Mn, Zn, Co, Ni, Cd, Tl) and dissolved arsenic (Total, As(III), As(V)) concentrations in the Amous River. Variations of ancillary parameters (monthly rainfall, sulphate concentration and temperature (T)) are also presented.

Figure 3. Seasonal variations of particulate Al and Fe

Figure 4. (a) Particulate As vs Fe, (b) particulate Al vs Fe

Figure 5. Variations of particulate (a) Mn, (b) Co, (c) Ni, (d) Cu, (e) Zn, (f) Cd and (g) Pb as a function of particulate Al.

Figure 6. Proportion of total metal carried by the suspended phase in the Amous River DC.

Figure 7. Logarithm of Al activity (Log aAl) as a function of pH in the Amous River DC. The thermodynamic data provided by Cravotta (2008) have been used for the construction of solid phase solubility diagrams. The solubility of kaolinite is calculated for $a_{H_4SiO_4}=10^{-3.16}$.

Figure 1

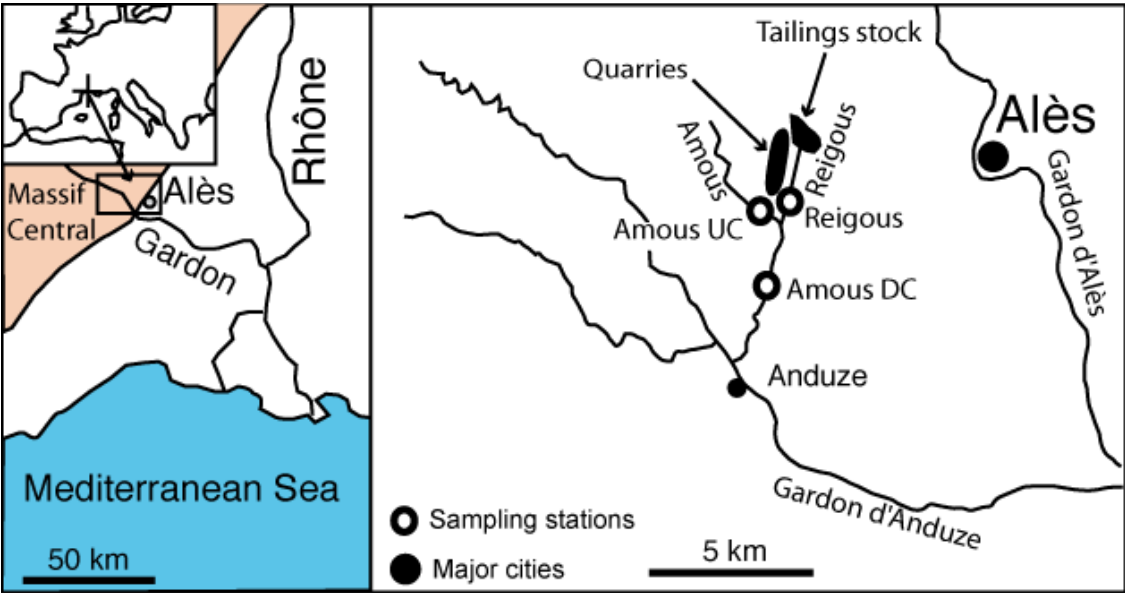


Figure 2

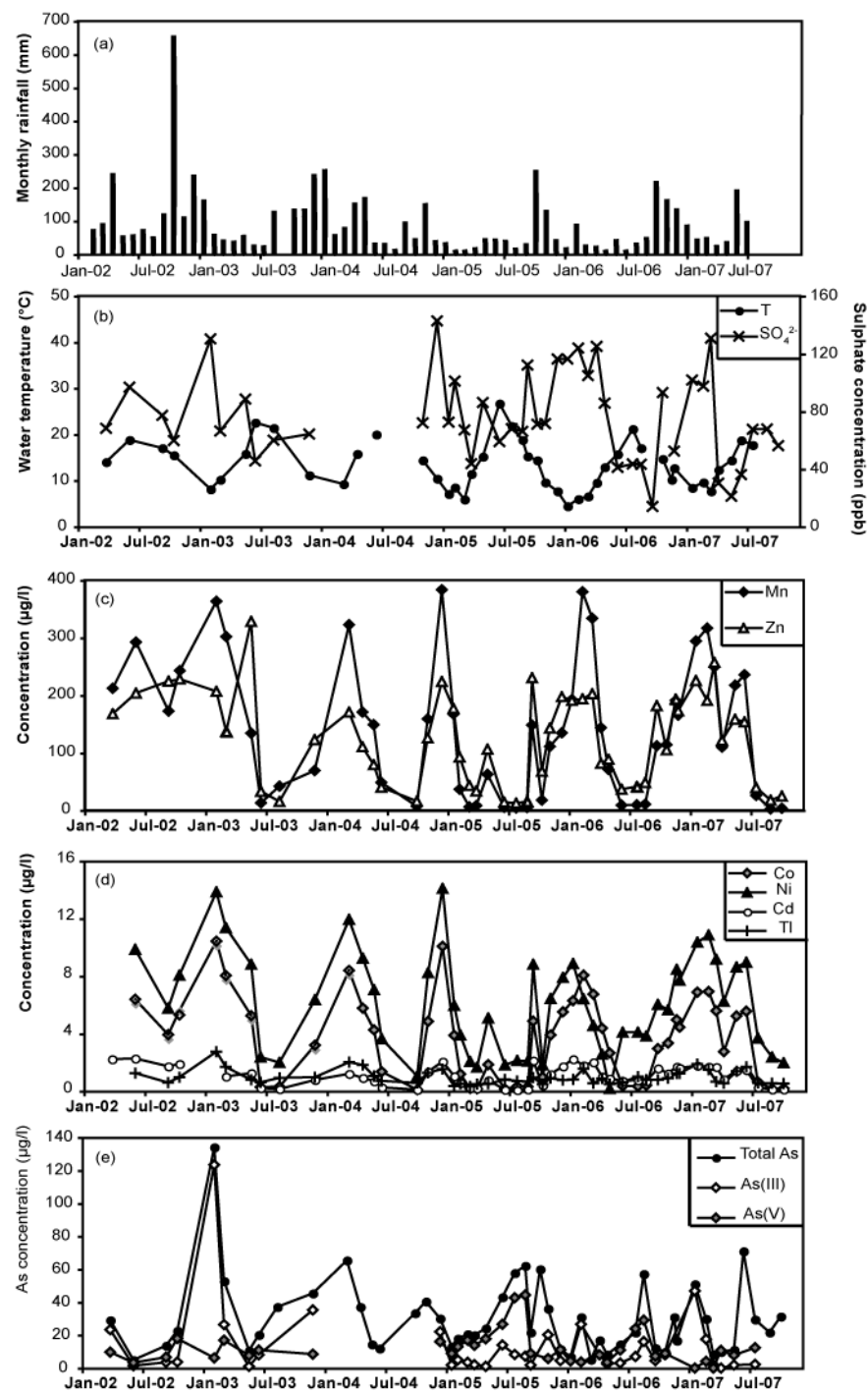


Figure 3

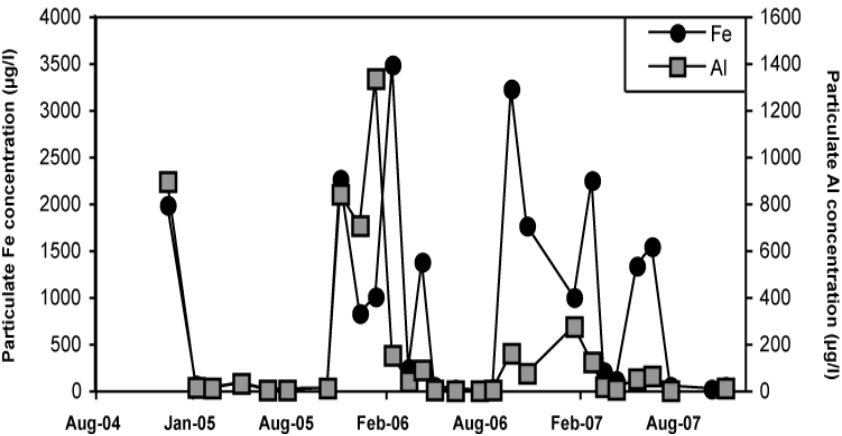


Figure 4

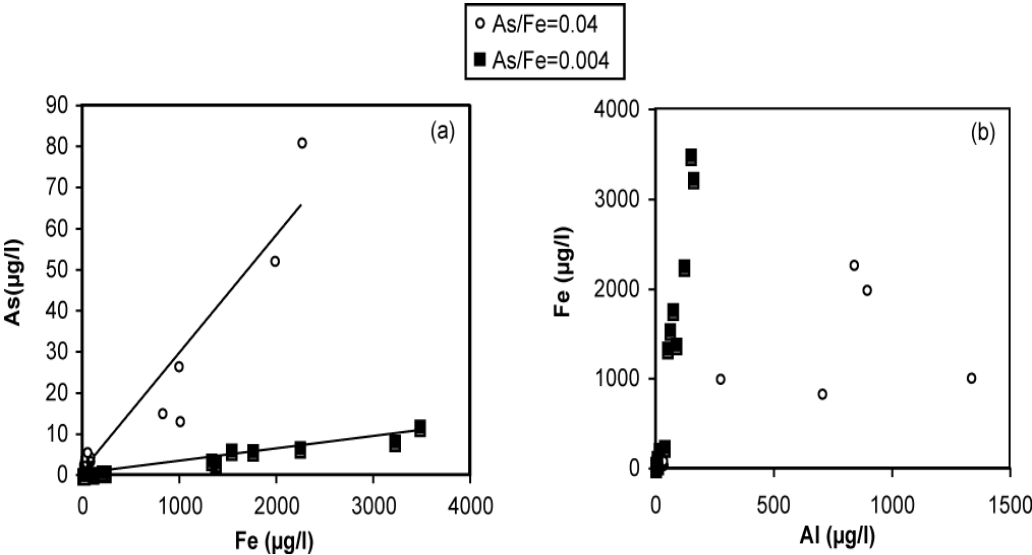


Figure 5

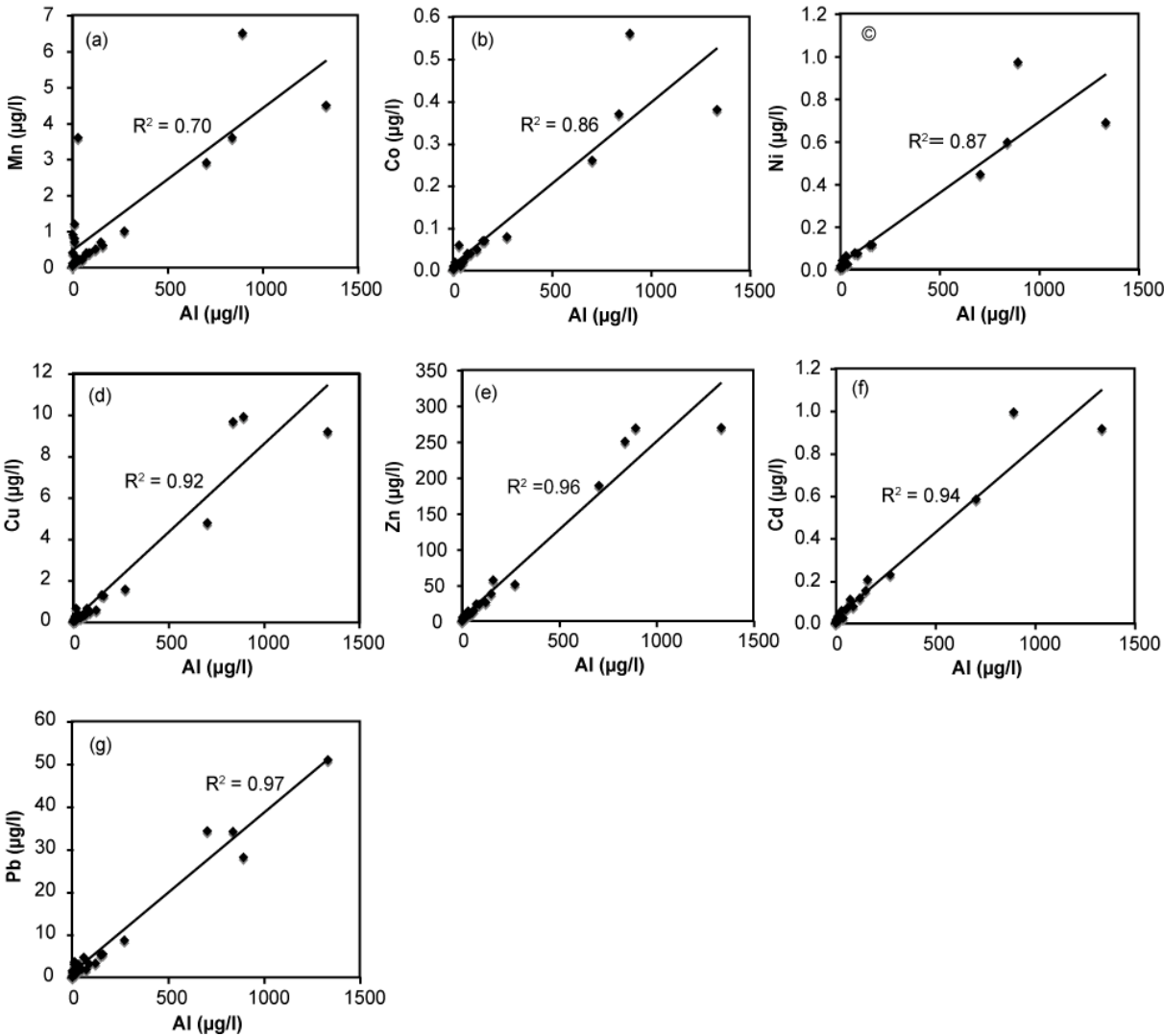


Figure 6

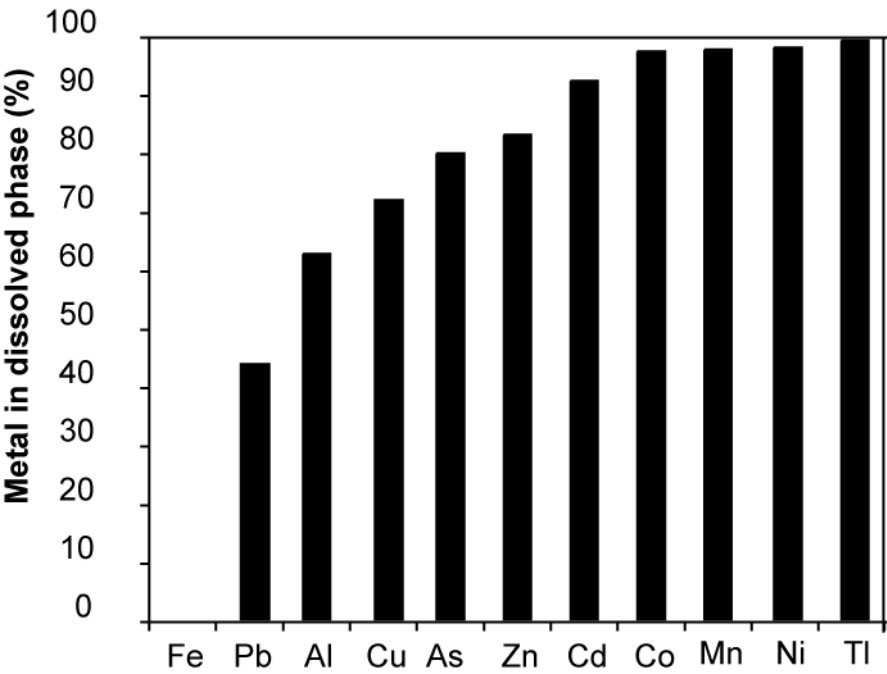


Figure 7

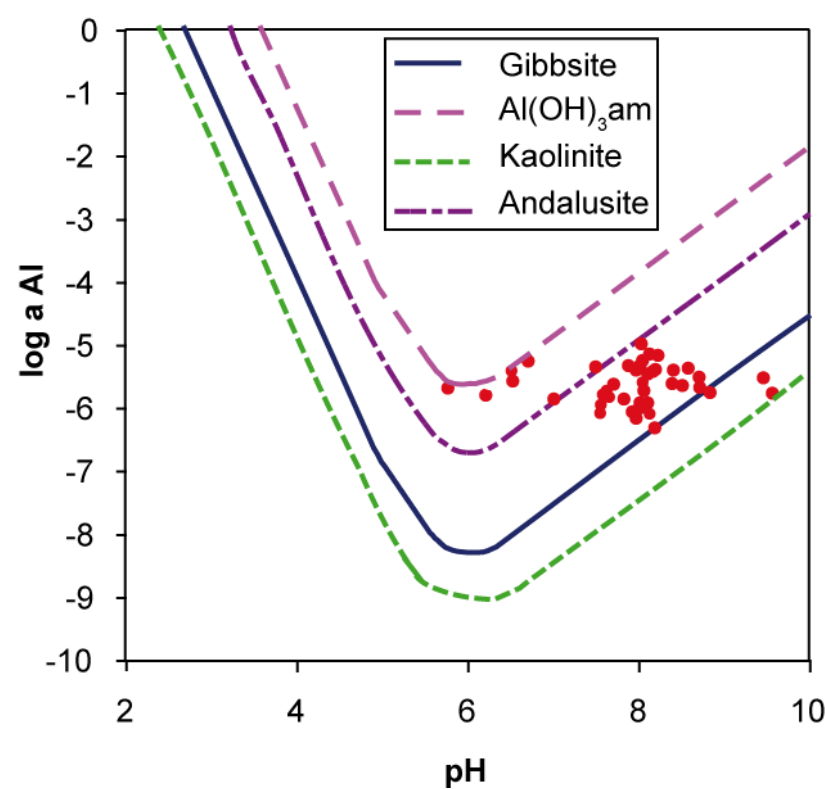


Table 1: pH, sulphate concentrations (mg/l) and dissolved metal, metalloid concentrations (µg/l) in Reigous Creek and in the Amous River upstream (UC) and downstream (DC) from the confluence with the Reigous. Average world river concentrations, European Environmental Maximum Allowed Concentration (MAC) for priority pollutants (Ni, Cd and Pb) and Environmental Quality Standards (EQS) for other pollutants in inland surface waters are also collated.

	Reigous		Amous UC		Amous DC		World river averages ^(a)	EQS/MAC
	mean±SD	range	mean±SD	range	mean±SD	range		
pH	5 ± 2	2.8-8.4	8.0 ± 0.4	7.2-8.5	7.9 ± 0.5	6.5-8.8		
SO ₄ ²⁻	838 ± 321	110-1524	17 ± 6	10- 31	76 ± 31	14 -143		
Fe	23000 ± 28000	100-159000	<DL	<DL	1 ± 4	<DL-16	40	
Al	14000 ± 13000	4000-44000	7 ± 10	0.4-31	69 ± 49	2-248	50	
Mn	6000 ± 3000	1500-11800	2 ± 1	(0.2-5)	140 ± 118	3-383	8.2	
Co	160 ± 69	44-288	0.11 ± 0.05	0.001-0.227	4 ± 3	0.1-10.4	0.2	GB+0.3=0.4
Ni	204 ± 120	63-779	1.4 ± 0.7	0.8-2.9	6 ± 4	0.2-14.1	0.5	2.1
Cu	131 ± 93	1-403	0.5 ± 0.4	0.02-1.7	1.3 ± 0.8	0.4-4.9	1.5	GB+1.4=1.9
Zn	9000 ± 3000	3000-17000	32 ± 25	2.6-69	126 ± 81	12-328	30	GB+7.8 = 39.8
As	1000± 2000	16-14000	2 ± 4	0.4-15	30 ± 23	5-134	0.83	GB+4.2=6.2
Cd	53 ± 20	9-87	0.2 ± 0.2	0.01-0.59	1.1 ± 0.7	0.1-2.3	0.05	0.25
Tl	14 ± 9	(4-48)	0.06 ± 0.05	0.01-0.16)	0.9 ± 0.5	0.2-2	0.006	GB+0.1=0.16*
Pb	634 ± 394	0.4-1307	0.4 ± 0.3	0.08 –0.95	2 ± 3	0.1-15.3	0.1	0.4

SD: standard deviation; GB: geochemical background concentration = concentration in Amous river UC; DL: detection limit.

^(a) Data are from Martin and Meybeck (1979) and Martin and Whitfield (1983), except for As (Smedley and Kinniburgh, 2002) and Tl (Nielsen et al., 2005)

Table 2: DGT labile metal concentration (C_{DGT}) and pH at Amous DC station.

		date	pH	C_{DGT} (mean $\pm$ 1SD)	
				$\mu\text{g/l}$	% of total dissolved
Mn		Jun-03	8.01	12.3 ± 0.2	104 ± 16
		Mar-04	7.96	362 ± 12	112 ± 12
		Apr-04	8.04	182 ± 9	107 ± 7
		Jun-04	8.02	48 ± 4	99 ± 12
Co		Jun-03	8.01	0.13 ± 0.02	50 ± 17
		Mar-04	7.96	9 ± 1	111 ± 16
		Apr-04	8.04	5.9 ± 0.4	103 ± 8
		Jun-04	8.02	1.1 ± 0.2	81 ± 19
Ni		Jun-03	8.01	1.5 ± 0.2	63 ± 17
		Mar-04	7.96	14 ± 2	115 ± 20
		Apr-04	8.04	9.3 ± 0.6	100 ± 10
		Jun-04	8.02	2.7 ± 0.2	73 ± 7
Cu		Jun-03	8.01	0.49 ± 0.04	92 ± 14
		Mar-04	7.96	1.2 ± 0.3	134 ± 31
		Apr-04	8.04	0.7 ± 0.1	72 ± 22
		Jun-04	8.02	0.5 ± 0.1	62 ± 19
Zn		Jun-03	8.01	36.6 ± 0.5	113 ± 5
		Mar-04	7.96	186 ± 20	109 ± 15
		Apr-04	8.04	110 ± 9	112 ± 10
		Jun-04	8.02	42 ± 5	105 ± 14
Cd		Jun-03	8.01	0.24 ± 0.01	105 ± 4
		Mar-04	7.96	1.29 ± 0.03	107 ± 7
		Apr-04	8.04	1.0 ± 0.1	102 ± 10
		Jun-04	8.02	0.25 ± 0.01	94 ± 10

Table 3: Metal and arsenic concentrations (µg/g wet weight ±1 standard deviation) in fish (*Leuciscus cephalus*) tissues in the Amous River upstream (UC) and downstream (DC) of the confluence with Reigous Creek.

			Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	As	Tl	Pb
Muscle	This study	Amous UC	0.22±0.11			0.36±0.36	8.5±2.2	0.005±0.005	0.11±0.05	0.03±0.02	0.04±0.02
	This study	Amous DC	0.20±0.07			0.38±0.14	6.9±1.3	0.005±0.002	0.20±0.07	0.03±0.01	0.09±0.05
	(1)		0.11±0.01			0.19±0.02	6.3±2.3	0.023±0.014			0.07±0.01
	(2)							0.05			0.2
Liver	This study	Amous UC	1.6±0.7			7.8±4.2	22±10	0.32±0.16	0.07±0.03	0.05±0.04	0.09±0.05
	This study	Amous DC	2.0±0.7			9.8±3.4	16±4	0.72±0.18	0.25±0.07	0.07±0.02	0.54±0.18
	(1)			0.11±0.06		2.5±1.2	23.8±4.7	0.035±0.002			0.83±0.06
Otolith	This study	Amous UC	1.2±0.2	0.80±0.08	0.47±0.08	0.08±0.01	3±2	0.021±0.005	0.09±0.02	0.4±0.08	0.07±0.02
	This study	Amous DC	1.4±0.4	0.7±0.1	0.4±0.2	0.1±0.1	5±3	0.03±0.01	0.09±0.03	0.7±0.1	0.2±0.2

number of fishes analysed at each station: n=15

(1) Yilmaz et al. (2007)

(2) Maximum concentration allowed for fish consumption EC (2005).

**Annexe 2 : Diversité des populations
d'*Archaea* dans le DMA de Carnoulès**

Archaeal diversity in a Fe–As rich acid mine drainage at Carnoulès (France)

O. Bruneel · N. Pascault · M. Egal · C. Bancon-Montigny ·
M. S. Goñi-Urriza · F. Elbaz-Poulichet · J.-C. Personné ·
R. Duran

Received: 26 November 2007 / Accepted: 9 March 2008
© Springer 2008

Abstract The acid waters (pH = 2.73–3.4) that originate from the Carnoulès mine tailings (France) are known for their very high concentrations of As (up to 10,000 mg l⁻¹) and Fe (up to 20,000 mg l⁻¹). To analyze the composition of the archaeal community, (their temporal variation inside the tailing and spatial variations all along the Reigous Creek, which drains the site), seven 16S rRNA gene libraries were constructed. Clone analysis revealed that all the sequences were affiliated to the phylum Euryarchaeota, while Crenarchaeota were not represented. The study showed that the structure of the archaeal community of the aquifer of the tailing stock is different to that of the Reigous Creek. Irrespective of the time of sampling, the most abundant sequences found inside the tailing stock were related to *Ferroplasma acidiphilum*, an acidophilic and ferrous-iron oxidizing Archaea well known for its role in bioleaching. Inversely, in Reigous Creek, a sequence affiliated to the uncultured Thermoplasmatales archaeon, clone YAC1, was largely dominant. This study provides a better understanding of the microbial community associated with an acid mine drainage rich in arsenic.

Keywords Microbial diversity · Arsenic · Acid mine drainage · Mine tailings

Introduction

The processing of sulfide-rich ores in the recovery of base metals such as copper, lead, zinc, and gold, has produced large quantities of pyrite wastes (Langmuir 1997). When exposed to rain, this material generates acid mine drainage (AMD) which contains large quantities of sulfate, iron, arsenic and heavy metals. Despite their toxicity, these waters are colonized by iron- and sulfur-oxidizing prokaryotes and form stable microbial communities with obligate acidophilic eukaryotes (fungi, yeasts, algae and protozoa; Johnson 1998; Zettler et al. 2002). The metabolic activities of such communities lead to solubilization (leaching) of the heavy metals from the sulfidic ores and pollution of surface and subsurface waters fed by the run-off.

For several decades, bacteria-like *Acidithiobacillus* or *Leptospirillum* have been considered to be the principal acidophilic sulfur- and iron-oxidizing microorganisms in AMD. They were believed to be responsible for pyrite oxidation and for the release of associated metals. However, during the last 10 years, several studies have evidenced the presence of archaeal communities in acidic waters (Edwards et al. 2000; Dopson et al. 2004). Previously, Archaea were renowned for their ability to inhabit extreme environments and specialized niches but their widespread presence in non-extreme environments, such as marine and terrestrial soils, was also recently revealed (Chaban et al. 2006).

Archaeal communities are often better adapted to low pH, high concentrations of total and ferrous iron and other

Communicated by J.N. Reeve.

O. Bruneel (✉) · N. Pascault · M. Egal · C. Bancon-Montigny ·
F. Elbaz-Poulichet · J.-C. Personné
Laboratoire Hydrosociences Montpellier, UMR 5569,
IRD, CNRS, Universités Montpellier 1 et 2,
Université Montpellier 2, Place E. Bataillon,
Case MSE, 34095 Montpellier Cedex 05, France
e-mail: bruneel@msem.univ-montp2.fr

M. S. Goñi-Urriza · R. Duran
Equipe Environnement et Microbiologie
UMR CNRS 5254, IPREM, EEM, Université de Pau
et des Pays de l'Adour, Avenue de l'Université, IBEAS,
BP 1155, 64013 Pau Cedex, France

metals, and moderately elevated temperatures than classical bioleaching mesophilic bacteria (*Acidithiobacillus* spp. and *Leptospirillum* spp.). Archaea were seen as numerically significant members in these environments (Bond et al. 2000; Edwards et al. 2000; Johnson and Hallberg 2003). Furthermore, it has been suggested that Archaea could play a major role in the generation of AMD (Baker and Banfield 2003) with oxidation of iron. Some members of the Archaea that respire As(V) like *Pyrobaculum aerophilum* and *Pyrobaculum arsenaticum* have been discovered (Huber et al. 2000; Oremland and Stolz 2003). Furthermore, *Pyrobaculum arsenaticum*, forms realgar (As₂S₂) as a precipitate under organotrophic conditions in the presence of thiosulfate and arsenate. These findings suggest that Archaea may play a significant role in the biogeochemical cycling of arsenic (Huber et al. 2000; Chaban et al. 2006).

Highly acidic environments are relatively scarce worldwide and are generally associated with mining activities. The oxidation by meteoric water of the pyrite-rich wastes from the abandoned Pb–Zn Carnoulès mine generates low pH (2.7–3.4) water containing high concentrations of As and Fe, up to 10,000 and up to 20,000 mg l⁻¹, respectively (Casiot et al. 2003a). We previously characterized the bacterial communities and showed that populations related to sulfate-reducing bacteria and *Gallionella ferruginea* seem to play a key role in AMD functioning (Bruneel et al. 2005, 2006). To know how a system is structured and how it functions, we first have to address the diversity of the whole community. We used a molecular phylogenetic approach to characterize the microbial structure and infer a corresponding ecosystem function where appropriate. The aim of the present study was to investigate the archaeal community in water samples from an AMD very rich in As, to improve our understanding of the implication of these microorganisms in AMD functioning. This is the first molecular analysis of the archaeal community present in the Carnoulès mine system.

Materials and methods

Description of the study site

The lead and zinc mine of Carnoulès, which has been abandoned since 1963, produced 1.2 MT of spoil material containing sand, sulfide minerals, heavy metals (Pb, Zn, Tl) and metalloids (As, Sb). The material is deposited in the middle of and across the upstream part of a creek (the Reigous) at the site of its natural spring. The Reigous collects downstream seepage waters from the surroundings before joining, at 1.5 km, the relatively pristine Amous river.

The source of the Reigous Creek, now located at the foot of the dike retaining the mining spoil, is acid (pH 2.7–3.4) and very rich in dissolved arsenic and iron (80–350 and 750–2,700 mg l⁻¹ respectively, Leblanc et al. 2002) predominantly in their reduced forms: As(III) and Fe(II). The water discharge is comprised between 0.8 and 1.7 l s⁻¹.

In the Reigous Creek, As(III) is the dominant As species whereas Fe occurs as Fe(II). Along the first 30 m of the creek (about 1 h residence time), the microbial mediated oxidation of Fe(II) leads to the coprecipitation of 20–60% of the dissolved As. As-rich (up to 20%) yellow sediments cover the bottom of the creek. The precipitate is mainly composed of amorphous Fe(III)–As(III) associated with tooeleite, a rare nanocrystal mineral of Fe(III)–As(III) during the winter period and with amorphous Fe(III)–As(V) the rest of the year (Casiot et al. 2003b; Morin et al. 2003). Bacteria play an essential role in the oxidation of Fe and As (Casiot et al. 2003b). Bacterial diversity is lower than in unpolluted water. Sequences related to *G. ferruginea*, a neutrophilic Fe-oxidizing bacterium, are dominant (Bruneel et al. 2006).

The biogeochemical processes that occur in the Carnoulès spoil heaps are more complex than those in the creek. The general hydrochemistry and aquifer hydrodynamics have already been broadly characterized (Koffi et al. 2003; Casiot et al. 2003a). The spoil heaps are covered by an impermeable layer of clay which prevents rainwater percolation from the surface towards the unsaturated zone. The aquifer originates from former natural springs that were buried under the tailings (Koffi et al. 2003). Therefore, the primary region of oxidation is located at the base of the tailing, where the oxygen rich rainwater can penetrate directly. The dominant organisms (27–65%) are related to *Desulfosarcina variabilis* a sulfate-reducing bacterium. *Acidithiobacillus ferrooxidans* represent the second most important group (8–14%).

Cultivable bacterial strains of *A. ferrooxidans* and *Thiomonas* (shown to be very active in the oxidation of As) were identified both in the tailing stock and in the Reigous Creek (Bruneel et al. 2003).

Sampling and analysis

Three surveys were carried out in November 2004, April 2005, and September 2005 in the tailing stock. Groundwaters were collected in a borehole (S5, between 10 and 12 m deep) located in the center of the tailings. Samples were also taken along the Reigous Creek, (collecting downstream seepage waters from the surroundings) in November 2005, at the spring (S1), 30 m downstream from the spring (station COWG), 150 m downstream (COWS), and 1,500 m (CONF) upstream from the confluence between the Reigous and the Amous river. Water samples

(300 ml) were filtered through sterile 0.22 µm Nuclepore filters that were then transferred to cryotubes, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

The main physicochemical parameters [pH, $T^{\circ}\text{C}$, dissolved oxygen (DO), etc.] were measured at the sampling points. Measurements of pH and water temperature were made in the field with an Ultrameter Model 6P (Myron L 125 Company, Camlab, Cambridge). Water samples were immediately filtered through 0.22 µm Millipore membranes fitted on Sartorius polycarbonate filter holders. Samples for total Fe and As determination were acidified to pH = 1 with HNO_3 (14.5 M), and stored at 4°C in polyethylene bottles until analysis. The samples for Fe and As speciation and sulfate determination were stored in the dark and analyzed within 24 h.

DNA isolation

Genomic DNA was extracted from filtered water using the UltraClean Soil DNA Isolation Kit according to the recommendations of the manufacturer (MoBio Laboratories Inc., USA). All the extracted genomic DNA samples were stored at -20°C until further processing.

PCR amplification

Amplification of archaeal 16S rRNA genes was obtained using primers Arch21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') and Arch958R (5'-YCCGCGCTTGAMTCCAA TT-3') (Delong 1992). The PCR amplifications were performed as previously described (Bruneel et al. 2006). The amount of PCR product was determined by comparison to known concentrations after migration on agarose gel.

Archaeal 16S rRNA gene library analysis

Archaeal 16S rRNA gene libraries were constructed to characterize the archaeal populations. Archaeal 16S rRNA genes were amplified with Arch21F and Arch958R primers. These PCR products were cloned in *E. coli* TOP 10 using the pCR2.1 Topo TA cloning kit (Invitrogen, Inc.), according to the manufacturer's instructions. Cloned 16S rRNA gene fragments were reamplified using the primers TOP1 (5'-GTGTGCTGGAATTCGCCCTT-3') and TOP2 (5'-TATCTGCAGAATTCGCCCTT-3') located on the vector and surrounding the inserted PCR fragment, and then digested with the enzymes *Hae*III or *Hin*FI. Restriction profiles were analyzed using 2.5% agarose gel electrophoresis (small-fragment resolution agarose; QA agarose, QBiogene, Inc.). Around 60–70 clones from each library were analyzed and grouped according to their RFLP patterns (*Hae*III and *Hin*FI digestion). The sequences of clones from dominant groups were determined.

16S rRNA gene sequencing

Partial sequences of the 16S rRNA gene were determined by the dideoxy nucleotide chain-termination method using the BigDye 3.1 kit (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 3730XL Genetic analyzer (Applied Biosystems). Sequences were checked for chimeras using the CHIMERA CHECK function of the Ribosomal Database Project II (Maidak et al. 2001). DNA sequence analyses were performed using the BLAST, ALIGNN, and CLUSTALW programs (Altschul et al. 1990; Felsenstein 1993; Thompson et al. 1994). A phylogenetic tree was constructed using the PHYLIP computer package (Felsenstein 1993). The confidence level of the phylogenetic tree topology was evaluated by performing 100 bootstrap replications with the SEQBOOK program. All the sequences obtained were submitted to the EMBL databases under accession numbers AM765808 to AM765809 and AM778965 to AM778977.

Chemical analysis

The determination of total dissolved As was performed by hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS). Analyses of As species were carried out using coupled anion-exchange chromatography–HG-AFS. This method, described by Bohari et al. (2001), has a detection limit of 2.3 nM for As(III) and 6.1 nM for As(V). The precision is better than 5%. Total dissolved Fe was determined by flame atomic absorption spectrometry. Fe(II) was determined using colorimetry at 510 nm after complexation with 1,10-phenanthroline chloride solution in buffered samples (pH 4.5) (Rodier et al. 1996). The detection limit is 0.2 µM and the precision better than 5%. The sulfate concentration was determined after precipitation of BaSO_4 with BaCl_2 and spectrophotometric measurement at 650 nm.

Rarefaction analysis, diversity index, and coverage values

PAST (PAleontological STatistics v 1.19) software from the website <http://folk.uio.no/ohammer/past/> was used for different diversity indices (Rarefaction analysis, Taxa, Total clones, Singletons, Dominance, Coverage, Shannon, Equitability, and Simpson) for each clone library. To perform rarefaction analysis, the total number of clones obtained compared with the number of clones representing each unique phylotype was used to produce the rarefaction curves. Coverage values were calculated to determine how efficiently the libraries described the complexity of a theoretical community like an original archaeal community. The coverage (Good 1953) value is given as

$C = 1 - (n1/N)$ where $n1$ is the number of clones that occurred only once in the library.

Results

Aqueous chemistry

The physicochemical composition of the water is presented in Table 1. The pH inside the piezometer was between 3.73 and 5.78. The temperature varied from 15.5 to 20.6°C and was relatively stable throughout the year (Koffi et al. 2003). The DO was quite low particularly in April 2005 (between 0.1 and 0.2 mg l⁻¹). The concentration of As inside the tailing stock varied greatly. As(III) was predominant, comprised between 78 and 277 mg l⁻¹, and As(V) varied between 42 and 66 mg l⁻¹. The concentration of Fe(II) (Fe(III) not detected, data not shown) varied greatly, i.e. between 778 and 1,299, and sulfate between 3,264 and 4,195 mg l⁻¹. The concentrations of As(III), Fe and SO₄²⁻ were highest in November 2004.

In the Reigous creek, the 2.5 pH at the spring increased along the creek to reach 3.43 at COWS and 3.25 just before the confluence with the Amous (CONF), 1.5 km away. The DO content was 1 mg l⁻¹ in the spring but it increased along the creek to reach 5–6 at COWS and 3–4 mg l⁻¹ at CONF. Dissolved As and Fe concentrations decreased at varying degrees along the course of the creek, (30 mg l⁻¹ for As(III), 39 mg l⁻¹ for As(V), 879 mg l⁻¹ for Fe(II) and 4,388 mg l⁻¹ for sulfate at the spring station (S1) but only 0.53 for As(III and V), 25 mg l⁻¹ for Fe(II) and 749 for sulfate at the CONF station. These elements are removed by coprecipitation with Fe(III). This process results from bacterially mediated As- and Fe-oxidation (Casiot et al. 2003b). Furthermore, the increase in pH as a result of dilution by unpolluted tributaries after COWG also contributes to an increase in As and Fe precipitation. During this sampling period, the concentrations of As, Fe and SO₄²⁻ were not particularly high in comparison to the concentrations usually found in these waters (up to 10,000

and 20,000 mg l⁻¹ for As and Fe, respectively) in the tailing stock (Casiot et al. 2003a) and from 80 to 350 mg l⁻¹ for As, 750 to 2,700 mg l⁻¹ for Fe, and 2,000 to 7,500 mg l⁻¹ for sulfate in the head waters of the Reigous creek (Leblanc et al. 2002).

Composition of archaeal communities

16S rRNA gene library analyses were performed to identify the dominant groups of archaeal populations. The most representative sequences of the dominant clones are summarized in Table 2 and the phylogenetic filiations of the sequences obtained are presented in Fig. 1. DNA could be extracted from all sampling sites except the S5 borehole in November 2005. In the Carnoulès mine drainage, numerous sequences in the libraries are related to sequences previously found in AMD, showing that the clone libraries were not contaminated.

Clones analysis revealed that all the sequences were affiliated to the phylum Euryarchaeota, while Crenarchaeota were not represented. The most abundant sequence types present in the water of the tailing (S5) displayed from 99 to 100% homology with *Ferroplasma acidiphilum* strain DR1, that was detected in microbial consortia from AMD and in industrial bioleaching environments (Dopson et al. 2004, AY22042). They were recovered in the groundwater in November 2004 and April 2005, representing a large majority of the clones (65–72%). The second most abundant group (9% in November 2004 but 65% in September 2005) was similar (99–100%) to the uncultured archaeon clone ant h4 (Table 2, Fig. 1) found in two anaerobic sludges (DQ462728, unpublished). The sequences representing the second most abundant type in April 2005 (15%) were similar (91%) to clones of the uncultured archaeon clone YAC1 (Table 2, Fig. 1) found in communities of different hot springs (DQ237924, unpublished). In September 2005, the second most important group (20%), (Table 2), was related to the uncultured archaeon clone ASL1 found in AMD (Baker and Banfield 2003; AF544224).

Table 1 Physico-chemical characteristics of the water (mg l⁻¹) during the sampling in S5, S1, COWG, COWS and CONF

Sampling station	Sampling period	pH (±SD)	T (°C)	DO (±SD)	As(III) (±SD)	As(V) (±SD)	Fe (II) (±SD)	SO ₄ ²⁻ (±SD)
Tailing stock	November 2004	5.78 (±0.05)	15.5	2	277 (±14)	42 (±2)	1299 (±104)	4195 (±420)
	April 2005	4.05 (±0.05)	17.3	0.1–0.2	128 (±6)	66 (±3)	784 (±62)	3264 (±326)
	September 2005	3.73 (±0.05)	20.6	4–5	78 (±4)	53 (±3)	778 (±62)	3629 (±363)
Reigous Creek	November 2005	2.5 (±0.05)	14.6	1	30.0 (±0.8)	39 (±2)	879 (±70)	4388 (±441)
	COWG	2.74 (±0.05)	10.6	5–6	22.0 (±0.8)	22.0 (±0.8)	501 (±40)	1785 (±182)
	COWS	3.43 (±0.05)	7.2	5–6	4.5 (±0.2)	1.50 (±0.08)	95 (±8)	902 (±90)
	CONF	3.25 (±0.05)	6.7	3–4	0.53 (±0.02)	0.53 (±0.02)	25 (±2)	749 (±75)

SD Standard deviation

Table 2 Archaeal clones found in Carnoulès mine drainage with closest match organism or clone name, percent similarity, phylogenetic group, closest relative and percent number of each group compared to the total number of clones

Sampling station		Sampling period	Clones	Phylum	Closest relative (accession number)	Number of bp identical and % similarity	Relative abundance of clones (%) ^a
Tailing stock	S5	November 2004	S5Nov04 73	Euryarchaeota	<i>F. acidiphilum</i> strain DR1 (AY222042)	100	72
			S5Nov04 82	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone ant h4 (DQ303256)	100	9
		April 2005	S5Apr05 12	Euryarchaeota	<i>F. acidiphilum</i> strain DR1 (AY222042)	99	65
			S5Apr05 47			99	
			S5Apr05 45	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone YAC1 (DQ237924)	91	15
		September 2005	S5Sep05 53	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone ant h4 (DQ303256)	99	65
			S5Sep05 56	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone ASL1 (AF544224)	97	20
Reigous Creek	S1	November 2005	S1Nov05 90	Euryarchaeota	<i>F. acidiphilum</i> strain DR1 (AY222042)	99	54
			S1Nov05 58	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone YAC1 (DQ237924)	93	21
	COWG		CGNov05 19	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone YAC1 (DQ237924)	93	59
			CGNov05 94			93	
			CGNov05 32	Euryarchaeota	<i>F. acidiphilum</i> strain DR1 (AY222042)	100	4
	COWS		CSNov05 10	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone YAC1 (DQ237924)	92	93
			CSNov05 20	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone ant g10 (DQ303253)	99	6
	CONF		CFNov05 6	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone YAC1 (DQ237924)	94	74

^a The abundance of clones was calculated for each library

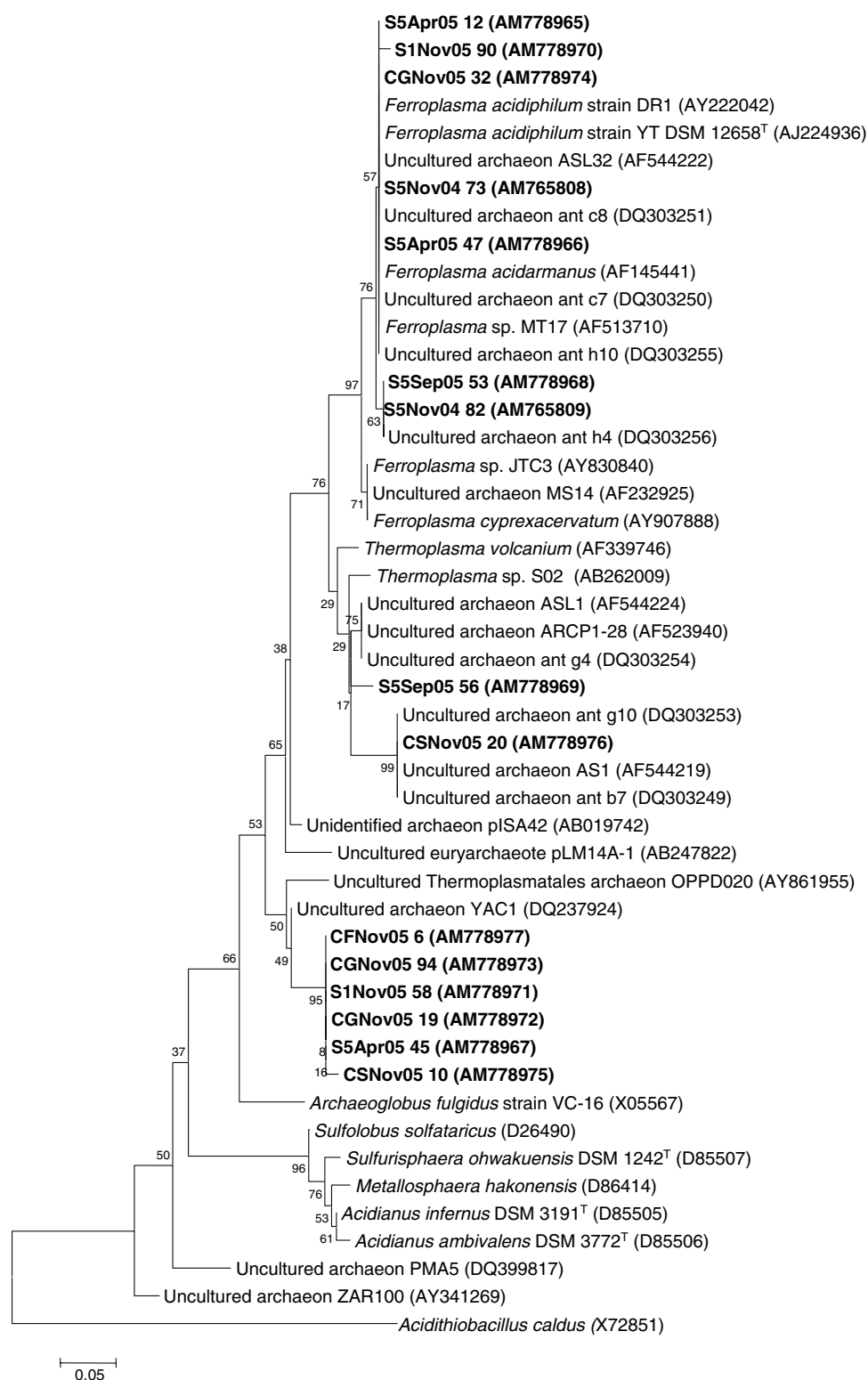
In the Reigous creek during the sampling campaign in November 2005, the most abundant group (21% at the spring S1, 59% at COWG, 93% at COWS and 74% at CONF) was related (92–94%) to the uncultured archaeon clone YAC1. These clones were found in low abundance (15%) in the groundwater and only in April 2005. The second most abundant group in the creek was similar (99–100%) to *F. acidiphilum*, also numerically significant members in Carnoulès tailing stock. The abundance of this group decreased along the creek, representing 54% of the clones at the spring S1, but only 4% at COWG and was undetected at COWS and CONF. The least abundant sequences (6%) found only at the COWS station was

related (99% similarity) to the uncultured archaeon clone ant g10 isolated in macroscopic filaments from an extremely acidic environment, Tinto River (DQ303253, unpublished). Phylogenetic analyses (Fig. 1) did not enable affiliation of the clone sequences with any representative of the subdivision. The closest relative (91%) was *Thermoplasma* sp. SO2 (AB262009, unpublished).

Rarefaction analysis, diversity index and coverage values of the clone libraries analyzed

Table 3 shows Dominance, Shannon, Equitability, Simpson index and Coverage values calculated for each library.

Fig.1 Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences affiliated with Archaea members from the AMD of Carnoulès (France). Clone names in **bold** correspond to sequences found in the Carnoulès mine drainage



To estimate diversity coverage and to determine whether a sufficient number of clones from each library had been sequenced, rarefaction analysis was performed. The generated curves were near saturation (data not shown), consistent with the high coverage values (between 0.82 and

0.93). In November 2005, the COWS library showed lower diversity indices (Shannon: 0.5704; Simpson: 0.2397) than the other libraries (Shannon ranging from 1.151 to 1.604; Simpson from 0.4488 to 0.6545). Inversely, in November 2005, the COWS library presented a higher Dominance

Table 3 Diversity indices calculated for the seven clone libraries from different stations in Carnoulès mine drainage

Clone library	Taxa	Total clones	Singletons	Dominance	Coverage(C)	Shannon (H)	Equitability	Simpson (1-D)
S5 November 2004	9	66	5	0.4913	92	1.151	0.5241	0.5087
S5 April 2005	11	66	6	0.4564	90	1.277	0.5323	0.5436
S5 September 2005	10	61	6	0.4512	90	1.234	0.5361	0.5488
S1 November 2005	14	57	10	0.3456	82	1.604	0.6077	0.6545
COWG November 2005	13	69	9	0.3989	86	1.424	0.5552	0.6011
COWS November 2005	6	61	4	0.7603	93	0.5704	0.3183	0.2397
CONF November 05	12	61	6	0.5512	90	1.189	0.4785	0.4488

index (0.7603) than the other libraries (from 0.3456 to 0.5512).

Discussion

In the AMD site of Carnoulès, more than 65% of the archaeal sequences could not be closely related to cultured organisms, suggesting that they may constitute new taxa. Only sequences close to *F. acidiphilum* were related to cultured organisms. Rarefaction data and percent coverage calculations suggested that the archaeal 16S rRNA gene libraries reach saturation.

Whatever the sampling period, the water of S5 inside the tailing stock, where intensive pyrite oxidation takes place, was numerically dominated by sequences clearly related to *F. acidiphilum*, or to the uncultured clone ant h4 which showed more than 98% similarity with *F. acidiphilum*. This isolate was an acidophilic, mesophilic, ferrous-iron oxidizing, cell-wall lacking microbe that became the basis of a new archaeal lineage: the new genus *Ferroplasma* within the new family *Ferroplasmaceae*, in the order *Thermoplasmatales*, which includes the families *Thermoplasmaceae* and *Picrophilaceae* (Golyshina and Timmis 2005). These two populations represented 81% of clones in November 2004, 65% in April 2005, and 65% in September 2005. Previous analysis of the bacterial community in the Carnoulès tailing showed that the dominant population was related to the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* (Bruneel et al. 2005). This population could not clearly explain the leaching of the Carnoulès tailing as it is well known that it was mostly acidophilic ferrous iron-oxidizing microorganisms that were found to be involved in the production of acid mine drainage (Baker and Bandfield 2003). Iron oxidizing bacteria like *A. ferrooxidans* and *Sulfobacillus* spp. were also present in the Carnoulès mine tailing but represented a minor population (Bruneel et al. 2005). Thus, *F. acidiphilum* could explain the intensive leaching observed in the Carnoulès tailing and the high concentration of As, up to 10,000 mg l⁻¹, one of the highest concentrations reported

in the world. Furthermore, some strains of this genus like *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 was shown to be an arsenic-hypertolerant acidophilic archaeon (Gihring et al. 2003; Baker-Austin et al. 2007). This strain, isolated from the Iron Mountain mine, California, was able to grow with up to 10 g arsenate per litre but his growth was reduced with 5 and 10 g of arsenite per litre. This population, which is more acid-resistant than iron- and sulfur-oxidizing bacteria, is in fact known to mobilize metals from sulfide ores, e.g. pyrite, arsenopyrite and copper-containing sulfides. According to Golyshina and Timmis (2005) *Ferroplasma* spp. are probably the major players in the biogeochemical cycling of sulfur and sulfide metals in highly acidic environments, and may have considerable potential for biotechnological applications such as biomining and biocatalysis under extreme conditions. These results are consistent with those of Edwards et al. (2000) at the Iron Mountain acid-generating site (United State), where the microbial community is dominated (85%) by an archaeon of the genus *Ferroplasma*. For these authors, the presence of this population and other closely related *Thermoplasmatales* suggests that these acidophiles are important contributors to acid mine drainage and may substantially impact iron and sulfur cycles. The growth of *F. acidiphilum* occurs between 20 and 45°C with an optimum at 35°C and at pH 1.3–2.2 with an optimum at pH 1.7 (Golyshina et al. 2000). Surprisingly, we detected this population in a less acidic environment (3.73–5.7). Isolation and characterization of members of this population are needed to determine their physiological capabilities especially at the pH range found in Carnoulès waters.

The clone sequences from the Reigous Creek were related to the same groups detected in the tailing S5 but the abundance of each varied. The dominant population in the Reigous Creek (21% of total clones at the spring S1, 59% at COWG, 93% at COWS and around 74% CONF) was related to the uncultured archaeon clone YAC1 found in communities in different hot springs. Phylogenetic analyses (Fig. 1) did not enable affiliation of the clone sequences with any cultured representative of the subdivision and this clone could thus represent a new species. The closest

relative (91%) was the uncultured Thermoplasmatales archaeon found in the Yellowstone geothermal ecosystem (Spear et al. 2005). The order Thermoplasmatales includes the families Ferropasmaceae, Thermoplasmaceae and Picrophilaceae (Golyshina and Timmis 2005). The known members of the Thermoplasmatales are all acidophilic. Some groups, like the family Ferropasmaceae within this order, are capable of iron oxidation (Edwards et al. 2000; Golyshina and Timmis 2005). A previous study of bacterial populations in the Carnoulès creek showed that the dominant bacterial population was related to *G. ferruginea*, a neutrophilic bacterium that oxidizes Fe (Bruneel et al. 2006). Consistent with previous observations demonstrating that *G. ferruginea* efficiently remove As (III and V) in water by coprecipitation with Fe (Katsoyiannis and Zouboulis 2004), this population may play a key role in the remediation process observed in the Reigous creek (Casiot et al. 2003b). If the uncultured archaeon clone YAC1 oxidizes Fe, this population could play a role in the natural remediation processes occurring in the Reigous Creek in association with *G. ferruginea*, but until the archaeal strains are isolated, their physiological role in the creek ecology will remain uncertain. Environmental genome data like those obtained with analysis of assembled random shotgun sequence data can also provide detailed insight into the metabolic potential of uncultivated organisms (Tyson et al. 2005).

Our study demonstrated the existence of a complex prokaryotic community in the Carnoulès AMD where bacterial and archaeal populations are present. Both phylotype communities were significantly altered in terms of size and structure with microhabitats varying inside the AMD particularly in underground water from the tailing and in the Reigous and the small creek draining the site. The occurrence of different dominant communities is likely associated with the formation of environmental gradients of temperature, pH, oxidation–reduction potential, etc. Other methods such as fluorescence in situ hybridization (FISH) will help to clearly assess the relative proportion of population. However, this method has not been widely applied to samples of thermophilic archaea and may be limited by cross-hybridization. Furthermore, methods such as metagenomic research (study of the entire genetic composition of communities of an environment) could help to study the total diversity, physiology, ecology and phylogeny of microbial population but all of the approaches that are available today have advantages and limitations (Pontes et al. 2007). Only, the isolation of archaeal strains at the Carnoulès mine will extend our understanding of the ubiquity of archaea in such environments, and help elucidate the microbial component driving the biogeochemical processes present in this and other extreme AMD sites.

Acknowledgments The study was financed by the EC2CO programme (Institut National des Sciences de l'Univers, CNRS). We thank Marjorie Cloez for identification of the archaeal population in the site, and Marie Ange Cordier for assistance in analysis of physical–chemical parameters.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Baker BJ, Banfield JF (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* 44:139–152
- Baker-Austin C, Dopson M, Wexler M, Sawers RG, Stemmler A, Rosen BP, Bond PL (2007) Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon “*Ferroplasma acidarmanus*” Fer1. *Extremophiles* 11:425–434
- Bohari Y, Astruc A, Astruc M, Cloud J (2001) Improvements of hydride generation for the speciation of arsenic in natural freshwater samples by HPLC-HG-AFS. *J Anal At Spectrom* 16:774–778
- Bond PL, Smriga SP, Banfield JF (2000) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol* 66:3842–3849
- Bruneel O, Personné J-C, Casiot C, Leblanc M, Elbaz-Poulitchet F, Mahler BJ, Le Flèche A, Grimont PAD (2003) Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid mine drainage (Carnoulès, France). *J Appl Microbiol* 95:492–499
- Bruneel O, Duran R, Koffi K, Casiot C, Fourcans A, Elbaz-Poulitchet F, Personné J-C (2005) Microbial diversity in a pyrite-rich tailings impoundment (Carnoulès, France). *Geomicrobiol J* 22:249–257
- Bruneel O, Duran R, Casiot C, Elbaz-Poulitchet F, Personné JC (2006) Diversity of acidophilic microorganisms involved in Fe–As immobilisation and oxidation in Carnoulès acid mine drainage (France). *Appl Environ Microbiol* 72:551–556
- Casiot C, Leblanc M, Bruneel O, Personné J-C, Koffi K, Elbaz-Poulitchet F (2003a) Geochemical processes controlling the formation of As-rich waters within a tailings impoundment. *Aquatic Geochem* 9:273–290
- Casiot C, Morin G, Juillot F, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M, Duquesne K, Bonnefoy V, Elbaz-Poulitchet F (2003b) Bacterial immobilization of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Res* 37:2929–2936
- Chaban B, Ng SYM, Jarrell KF (2006) Archaeal habitats, from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* 52:73–116
- Delong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5685–5689
- Dopson M, Baker-Austin C, Hind A, Bowman JP, Bond PL (2004) Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol* 70:2079–2088
- Edwards KJ, Bond PL, Gihring TM, Banfield JF (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 287:1796–1799
- Felsenstein J (1993) PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.5c). Department of Genetics, University of Washington, Seattle
- Gihring TM, Bond PL, Peters SC, Banfield JF (2003) Arsenic resistance in the archaeon “*Ferroplasma acidarmanus*”: new insights into the structure and evolution of the ars genes. *Extremophiles* 7:123–130

- Golyshina OV, Timmis KN (2005) *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking Archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environ Microbiol* 7:1277–1288
- Golyshina OV, Pivovarova TA, Karavaiko GI, Kondratyeva TF, Moore ERB, Abraham WR, Lunsdorf H, Timmis KN, Yakimov MM, Golyshin PN (2000) *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferropasmaceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:997–1006
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika* 40:237–264
- Huber R, Sacher M, Vollmann A, Huber H, Rose D (2000) Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic Archaea. *Syst Appl Microbiol* 23:305–14
- Johnson DB (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 27:307–317
- Johnson DB, Hallberg KB (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Res Microbiol* 154:466–473
- Katsoyiannis IA, Zouboulis AI (2004) Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwater. *Water Res* 38:17–26
- Koffi K, Leblanc M, Jourde H, Casiot C, Pistre S, Gouze P, Elbaz-Poulitchet F (2003) Reverse oxidation zoning in mine tailings generating arsenic-rich acidic waters (Carnoulès, France). *Mine Water Environ* 22:7–14
- Langmuir D (1997) Acid mine waters. In: McConnin R (eds) *Aqueous environmental geochemistry*. Prentice-Hall, New Jersey, pp 457–478
- Leblanc M, Casiot C, Elbaz-Poulitchet F, Personné C (2002) Arsenic removal by oxidizing bacteria in a heavily arsenic contaminated acid mine drainage system (Carnoulès, France). In: Younger PL, Robins NS (eds) *Mine water hydrogeology and geochemistry*. Geological Society of London Special Publication, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 464
- Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Jr Saxman PR, Farri RJ (2001) The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 29:173–174
- Morin G, Juillot F, Casiot C, Bruneel O, Personné J-C, Elbaz-Poulitchet F, Leblanc M, Ildefonse P, Calas G (2003) Bacterial formation of tooeleite and mixed arsenic(III) or arsenic(V)-iron(III) gels in the Carnoulès acid mine drainage, France. A XANES, XRD, and SEM study. *Environ Sci Technol* 37:1705–1712
- Oremland RS, Stolz JF (2003) The ecology of arsenic. *Science* 300:939–944
- Pontes DS, Lima-Bittencourt CI, Chartone-Souza E, Nascimento AMA (2007) Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:463–473
- Rodier J, Broutin JP, Chambon P, Champsaur H, Rodier L (1996) *L'analyse de l'eau*. Dunod, Paris, p 1383
- Spear JR, Walker JJ, McCollom TM, Pace NR (2005) Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2555–2560
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Tyson GW, Lo I, Baker BJ, Allen EE, Hugenholtz P, Banfield JF (2005) Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Appl Environ Microbiol* 71:6319–6324
- Zettler LAA, Gómez F, Zettler E, Keenan BG, Amils R, Sogin ML (2002) Eukaryotic diversity in spains river of fire. *Nature* 417:137

**Annexe 3 : Un cas de pollution à grande
échelle : les fleuves Tinto et Odiel
(Andalousie, Espagne)**

Large scale mine-related pollution: The Tinto and Odiel Rivers case study (SW Spain)

M.EGAL, HydroSciences (UMR 5569), Montpellier, France, egal@msem.univ-montp2.fr

C.CASIOT, HydroSciences (UMR 5569), Montpellier, France, casiot@msem.univ-montp2.fr

O.BRUNEEL, HydroSciences (UMR 5569), Montpellier, France, obruneel@msem.univ-montp2.fr

A.SARMIENTO, University of Huelva, Huelva, Spain, aguasanta.miguel@dgeo.uhu.es

J.M.NIETO, University of Huelva, Huelva, Spain, jmnieto@dgeo.uhu.es

F.ELBAZ-POULICHET, HydroSciences (UMR 5569), Montpellier, France, elbaz@msem.univ-montp2.fr

ABSTRACT

Abandoned mines are present in many historical mine districts in the world. In the Iberian Pyrite belt, which hosts the largest known massive sulphide deposit in the world, intensive mining has taken place for almost five thousand years until the present day. This study provides a review of the knowledge on the extent of regional contamination and summarizes the on-going debate about water remediation. Mine activity has produced an extremely large amount of pyrite wastes that generate acid mine drainage, a large part of which is released into the Tinto and Odiel Rivers. As a consequence, these rivers are extremely acidic (pH around 2) and metal-rich for a distance of 50 km up to their mouth. The Tinto and Odiel inputs are responsible for enrichment of metals in the Gulf of Cadiz. As the water in the Gulf of Cadiz represents a significant fraction of the Atlantic inflow to the Mediterranean Sea, the Tinto and Odiel Rivers are the main source of metal into the Mediterranean Sea.

The Tinto River is bright red in colour which makes it the more remarkable of the two rivers; it hosts a wide range of extremophile microorganisms. This seems to have given rise to a consensus to conserve this environment. In the Odiel River, the situation is more favourable to remediation which could involve passive in-situ remediation techniques such as wetlands.

1. INTRODUCTION

In Andalusia (south-western Spain), mining activity has resulted in enormous metal wastes that are a serious threat for the environment. The risk of accidental metal spill materialized a few years ago with the collapse of the retaining dam of a tailing reservoir in Aznalcollar (April, 25, 1998). Between 5 and $7 \times 10^6 \text{ m}^3$ of acid sludge and water (pH=2) were released into the Rio Agrio, a tributary of the River Guadimar (Van Geen and Chase, 1998). The released sulphide sludge formed a layer up to 1 m thick over a distance of ca 40 km, covering more than 4000 ha of the river bed and the agriculturally important flood plains of the Guadimar (Medio Ambiente web site). The pollution reached the Donana Park (which is listed by UNESCO as a world biosphere reserve) located 45 km south of the mine.

This disaster should not be allowed to mask the reality of chronic pollution that results from thousands of years of mining in the Iberian Pyrite Belt (IPB). The IPB extends from Seville province, across Huelva province from east to west and ends in Portugal. The IBP hosts the massive Rio Tinto sulphide deposit, which is considered to be the biggest in the world with a length of more than 200 km, a width of about 40 km and estimated reserves in the order of 750 Mt of sulphide ore, out of original reserves of about 1700 Mt (Saez et al., 1999). The ore contains a small percentage of Cu, Zn, Pb, and several ppm of Au and Ag (Tornos, 2006). It has been exploited nearly continuously from prehistoric times to the present.

The oxidation of the sulphide-rich waste by oxygenated water generates acid mine drainage (AMD), most of which is released into the Tinto and Odiel Rivers that drain the important mining district of the Huelva Province. The aims of this paper are to summarize the available knowledge on the consequences of this

mining activity as regards water pollution and to present the state of the art concerning possible remediation or rehabilitation strategies.

2. HYDROLOGY

The Tinto and Odiel River basin is shown in Fig.1. The Odiel River, which is 140 km long, is the longer of the two rivers. The surface of its drainage basin is 2300 km². Its annual flow has been estimated at about 460 Mm³/yr (Sainz *et al.*, 2003). The Tinto River (length: 100 km, surface of the watershed: 720 km²), has an average annual flow of 90 Mm³/yr. Marked variations from this mean occur in both rivers due to the Mediterranean climate, which includes long periods of drought and intense rainy events. The mean annual rainfall in the basin is 812 mm, 50% of which occurs between October and January. The two rivers meet in Huelva forming a common estuary before discharging into the Gulf of Cadiz, west of Gibraltar.

3. HISTORY OF POLLUTION

Archaeological remains provide evidence that mining and smelting activities for the recovery of copper in the Iberian Pyrite Belt date back to the first half of the Third millennium BC (Nocete et al., 2005). Still visible slag deposits indicate that approximately 25 MT of ore were mined by the Romans (Strauss et al., 1977).

As far as pollution is concerned, the first known written reference was sent to the king Felipe II by the priest Diego Delgado in 1556: "*In this river [Tinto] there is no type of fish nor living creature, and neither people nor animals drink these waters. Another property of the water is that if iron is put into it, in some days it is consumed; I proved this myself by putting a living frog into the river which died without leaving the water*".

Figure 1: Location of Odiel and Tinto mines. Red: streams affected by Acid Mine Drainage.

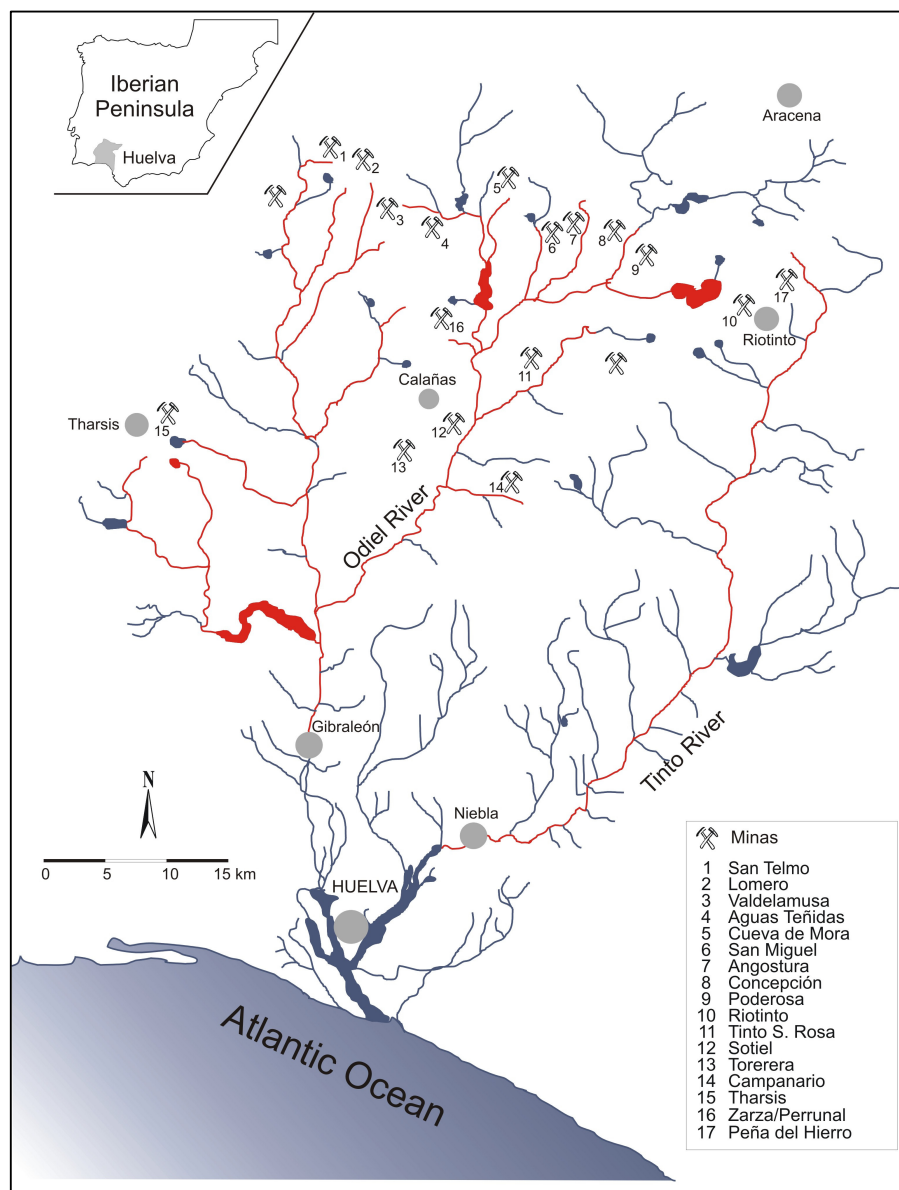


Table 1: pH, sulphate, As and metal concentrations in the Tinto and Odiel Rivers and in selected French Rivers. Sulphate concentrations are in mg/L; metal concentrations are in mg/L in the Tinto and Odiel Rivers and in µg/L in the other rivers. Concentrations in mg/L in the Tinto-Odiel Rivers; SD: Standard deviation

	Tinto River ⁽¹⁾			Odiel River ⁽¹⁾				Seine ⁽²⁾	Rhône ⁽³⁾	Garonne ^(4,5)
	Min-Max	Mean	SD.	Min.	Max.	Mean	SD			
pH	1.80-6.80	2.63	0.50	2.40	6.30	3.35	0.56	8.1	8	7.2-8
SO ₄ ²⁻	58-25256	2455	3031	51	3821	978	709			15
As	0.00-34.48	0.86	3.37	0.00	0.40	0.01	0.04	0.75	1.95	1.5
Cd	0.00-5.34	0.25	0.51	0.00	0.31	0.06	0.04	0.031	0.033	0.02
Cu	0.02-365.0	27.2	38.8	0.03	37.6	6.0	4.0	2.23	2.22	1.06
Fe	0.02-5080	393.5	648	0.03	171.0	12.8	18.9			7.8
Mn	0.561-113.0	11.4	13.8	0.5	43.4	10.8	8.2			
Pb	0.03-1.52	0.19	0.22	0.00	1.18	0.11	0.11	0.35	0.083	0.19-0.25
Zn	0.73-591.0	61.8	80.1	0.36	86.4	16.8	13.3		1.30	2.72
Al	6.8-239.8	75.0	45.8	3.5	80.4	29.8	19.7			
Co	0.05-1.27	0.49	0.24	0.07	0.80	0.28	0.18			0.11
Ni	0.02-0.43	0.14	0.08	0.02	0.50	0.16	0.13		0.62	

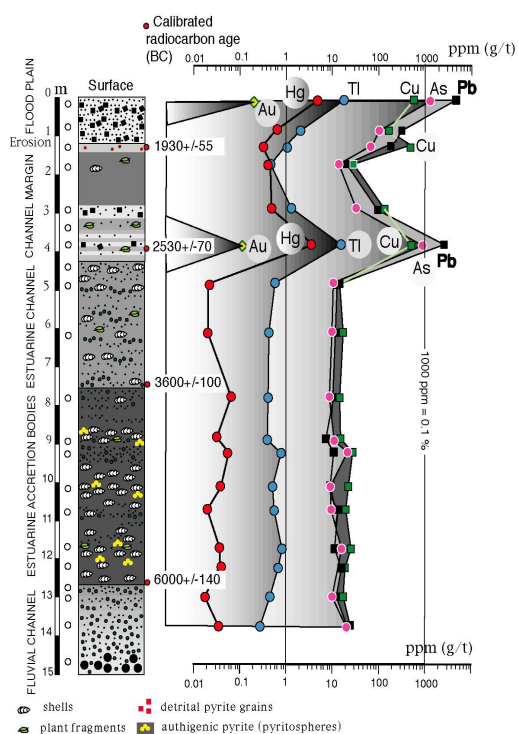
⁽¹⁾ Olias et al. (2006), ⁽²⁾ Elbaz-Poulichet et al. (2006), ⁽³⁾ Elbaz-Poulichet, F et al. (1996), ⁽⁴⁾ Audry, S. et al. (2004)

However, geochemical studies show that pollution due to mining already occurred in the copper age. This is particularly well demonstrated by a metal profile taken in the sediments of the Tinto estuary. In this profile, two metal-rich horizons can be observed (Fig.2). The upper level corresponds to modern mining; the lower horizon has been dated to 2530 yr BC (^{14}C AMS calibrated age). The presence of small droplets of likely slags (vesicular glasses with Fe-Si or C-Si content with up to 0.5% of Cu and sulphur) and fragments of charcoal in the lower horizon is compelling evidence for active contemporaneous metallurgical activity (Leblanc et al., 2000).

In the core from the Tinto estuary, the levels corresponding to the Carthaginian and Roman periods have been eroded but other environmental records have provided evidence for mining activity in the IPB at that period. For example, Greenland Ice layers displaying high concentrations of metal between 300 AD and 600 BC have been found. The similar Pb isotope signatures in these old ice layers and in the IPB deposits, suggest that mining activity in the IBP was the main source of atmospheric contamination in the Northern hemisphere (Rosman et al., 1997).

Modern mining began in the second half of the 19th century. The English created the Rio Tinto mining company in 1873 to mine the Rio Tinto copper deposit. Since that time mining activity has been intensive in the Huelva Province where numerous mines have been exploited (Fig.1). Approximately 250 MT of sulphide ore were extracted from the IBP from the 19th century through the late 1970s (van Geen et al., 1999). Today, mining has stopped in the Huelva Province. However, it is still active in South Portugal where Cu is extracted at the Neves Corvo mine. Owing to the high price of base metals on the international market, several mines are expected to open or reopen around Huelva in the near future.

Figure 2: Metal profile in the sediments of the Tinto estuary

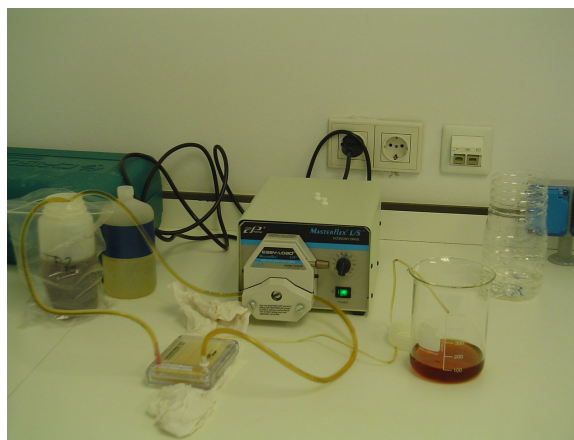


4. PRESENT DAY CONTAMINATION

4.1 Inland waters

Nowadays, the numerous mine tailings, quarries and galleries left by past mining activity contain large amounts of pyrite and other sulphide minerals that are exposed to meteoric water. In the Odiel basin, about 461 km of rivers are affected by AMD out of a total of 1149 km (Sarmiento et al., 2006). At the entry in the estuary, the Tinto and Odiel Rivers are still highly acidic ($2.2 < \text{pH} < 3.6$). Their sulphates and Fe concentrations reach g/L whereas dissolved concentrations of As, Co, Cu, Mn and Zn are in the range of a few mg/L. Dissolved Fe is in the form of Fe(III) in the Tinto which gives the river its red colour (Fig.3) and its name Tinto, *vino tinto* being red wine in Spanish.

Figure 3: Filtration of Tinto water. Left bottle: raw sample; right bottle: Tinto water after ultrafiltration through a 5 kdaltons pore size membrane.



As shown in Table 1, metal and As concentrations in the Tinto and Odiel Rivers are several orders of magnitude higher than those encountered in French rivers draining densely populated and industrial regions such as the Seine and the Rhone Rivers. The concentrations are also much higher than those in the Garonne River, although this river is also affected by metal pollution due to treatment of Zn ore on one of its tributaries. In the Tinto and Odiel Rivers, metal contamination varies considerably with the season (Olias et al., 2004).

Table 2: Gross dissolved metal fluxes discharged by the Tinto and Odiel Rivers to the ocean, and comparison with estimates of global river flux (Gesamp, 1987).

	Tinto and Odiel Flux (t.y^{-1}) ⁽¹⁾	Global river flux to the ocean	Fraction (%)
As	36	10000	0.00
Cd	11	340	3.3
Cu	1721	10000	17.2
Fe	7922	1400000	0.6
Mn	1615	280000	0.6
Pb	27	2000	1.3
Zn	3475	5800	59.9
Co	71	1700	4.2
Ni	36	11000	0.3

The maximum sulphate, Fe, Zn, Mn, Cd and Pb concentrations occur during the autumn rains, which dissolve the precipitates that had formed by evaporation during the summer months. In winter, the intense rains cause an increase in the river flow. This dilutes the metal concentrations and favours a slight increase in the pH. Arsenic behaves differently and displays maximum concentrations in winter and minimum in spring.

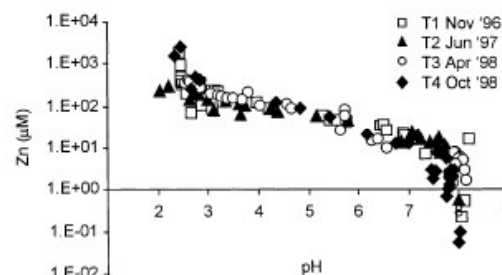
The dissolved metal(-loid) fluxes of both rivers are given in Table 2. They reach 8% of the global river discharge of Zn to the ocean.

4.1. Gulf of Cadiz and Mediterranean Sea

During estuarine mixing, the main physicochemical parameters (ionic strength, redox potential, suspended matter concentration) are modified. These changes are responsible for the enhanced reactivity of metals in estuaries. The reactions result in several processes such as sorption/desorption, dissolution/precipitation, coagulation/coprecipitation and sedimentation which modify the solid-liquid partitioning of metals and thus their inputs to the sea. The Tinto and Odiel waters are acidic at the entry of their common estuary. They are neutralised through mixing with seawater (pH=8.2). Based on a close relationship between dissolved metal concentrations and pH (Fig. 4), Braungardt et al. (2003) suggested that the metal distribution in the system is largely controlled by pH. With the low pH (<2.7), and low salinity (<3.8), the particles carry a positive charge (Achterberg et al., 2003) which hinders metal adsorption. Metals consequently remain in the dissolved phase until the neutralization of water at higher salinity (around 35) when removal takes place.

In spite of this removal, significant quantities of metal can escape from the estuary and from the Tinto-Odiel estuary, where metal concentrations are maximum. A plume of contaminated water follows the coast of the Gulf of Cadiz in the direction of the Strait of Gibraltar (van Geen et al., 1991; Elbaz-Poulichet et al., 2001a). This metal-rich water contributes to the Atlantic inflow to the Mediterranean Sea. Flux calculations show that these waters are the main known source of Ni, Cu, Cd, Zn and As to the western Mediterranean basin (Table 3, Elbaz-Poulichet et al ;2001b).

Figure 4: Zn concentration vs pH in the Tinto and Odiel Rivers.



5. TO REMEDIATE OR NOT TO REMEDIATE ?

North of Huelva, water resources are scarce and the remediation of the acidic waterbodies would be an important tool to favour the economic development of the population who, since the closure of the mines, have lived mainly from agriculture. Moreover, the Water Framework Directive obliges the member states to achieve a good chemical and ecological status of surface waters by 2015.

The remediation of water in the region faces difficulties that were summarized by Sainz et Loredó (2005) with respect to the Tinto River. One of these difficulties lies in the extent of the wastes. The sulphide mass of the Rio Tinto mine is estimated at 500 MT. The spoil heaps in the area have a total volume of 26Mm³ and cover a surface of 2 Mm². Due to the gigantic size of the problem, physical remediation of these heaps respecting modern standards for the disposal of mining waste would be extremely difficult if not impossible, and certainly very expensive. Treatment of decant water flowing from mine galleries or of water percolating through sulphide waste would be possible at some locations but the cost of one water treatment station is estimated at 1 000 000 €. Moreover, the treatment does not guarantee good water quality of the Tinto River since the river sediments contain high amounts of detrital pyrite transported by flood events. This pyrite is a source of acidity and heavy metals right up to the mouth of the river.

Table 3: Dissolved metal inputs (t.yr⁻¹) to the western Mediterranean basin (w:winter; s:summer) (Elbaz-Poulichet et al. (2001) and references therein.

	Atmosphere	Rivers	Gibraltar		Sicily		Total Straits		Total Input	
			w	s	w	s	w	s	w	s
Mn	2600-3300	360	1240	8340	1500	740	2700	9100	5700-6300	12000-13000
Fe	4200-22700	1000	630	1880	11300	2600	12000	4500	17000-36000	10000-28200
Ni	150-350	160	2020	2370	10000	8400	12000	10700	12300-12500	11000-11300
Co	17-190	7	80	145	100	100	180	250	200-350	270-450
Cu	180-560	230	1420	3220	4000	3400	5400	6600	5800-6200	7000-7400
Zn	1300-3900	130	1220	7300	18500	7400	19700	15000	21000-24000	16000-18700
As	95-132	200	29000	30000	57000	57000	86000	87000	86300	87300
Cd	25-40	3	60	145	260	250	320	400	350-370	420-440
Pb	180-500	8	250	720	830	450	1100	1200	1260-1600	1360-1690

Recently, biologists showed that the Tinto River hosts a large range of extremophile microorganisms (Archaea, bacteria and eukaria) (Zettler et al., 2002; Gonzalez-Toril et al., 2003; Lopez-Archilla, 2004). It was also suggested that water could have been acidic long before mining activity took place (Gonzales-Toril et al., 2001). In addition, in the Tinto region the continuous mining since prehistoric times has left a significant quantity of archaeological and historical vestiges that can be considered as a world industrial heritage.

These different factors resulted in the inclusion of the Tinto River in the Protected Natural Space Network of Andalusia as a protected landscape and the promotion of industrial tourism in the region.

The situation of the Odiel River is different. Its slightly higher pH values compared to the Tinto reflect a lower degree of contamination. It is thus envisaged to remediate the water contamination using passive in-situ remediation systems such as anaerobic wetlands in the most polluted tributaries beginning upstream. The feasibility to divert the Tinto tributaries that are not affected by mine drainage towards the Odiel is also under study. The final objective of treatment and dilution is to increase the pH level and to decrease the heavy metal and sulphate concentrations to values that would allow the use of the Odiel water for irrigation.

REFERENCES

- Achterberg E., Herz, V., Braungardt C., Millward G., 2003, Metal behaviour in an estuary polluted by acid mine drainage. *Environ. Pollut.*, (121) 283–292.
- Audry S., Blanc G., Schäfer Y.J., 2005, The impact of sulphide oxidation on dissolved metal (Cd, Zn, Cu, Cr, Co, Ni, U) inputs into the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.*, (20) 919-931.
- Audry S., Schäfer J., Blanc G., Bossy C., Lavaux G., 2004, Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the lots-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.*, (19) 769-786.
- Braungardt C., Achterberg E., Elbaz-Poullichet F., Morley N.H., 2003, Metal biogeochemistry in an acidic mine polluted estuarine system in south-west Spain. *Appl. Geochem.*, (18) 1757-1871.
- Elbaz-Poullichet F., Garnier J.M., Guan D.M., Martin J.M., Thomas A.J., 1996, The conservative behaviour of trace metals (As, Cd, Cu, Ni and Pb) in the surface plume of stratified estuaries: example of the Rhone river (France). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, (42) 289-310.
- Elbaz-Poullichet, F., Guieu, C., Morley, N.H., 2001. A reassessment of trace metal budgets in the Western Mediterranean Sea, *Marine. Pollution. Bulletin*, (42) 623-627.
- Elbaz-Poullichet F., Morley N.H., Beckers J.M., Nomerange P., 2001a, Dissolved metal fluxes through the Strait of Gibraltar: the influence of the Tinto and Odiel rivers (SW Spain). *Mar. Chem.*, (3-4) 193-213.
- Elbaz-Poullichet F., Seidel F., Casiot C., Tusseau-Vuillemin M-H, 2006, Short –term variability of dissolved trace element concentrations in the Marne and Seine Rivers near Paris. *Sci. Total Environ.*, in press.
- Gesamp, 1987, GESAMP Reports and Studies: No. 32; Land/sea boundary flux of contaminants: contributions from rivers. IM0/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution.
- González-Toril E., Gómez F., Rodríguez N., Fernández-Remolar D., Zuluaga J., Marín I., Amils R. 2001, Geomicrobiology of the Tinto river, a model of interest for biohydrometallurgy. in *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development* (eds Ciminelli, V. S. T. & García, O.) 639-650, Elsevier.
- Gonzalez-Toril E., Llobet-Brossa E., Casamayor E., Amann R., Amils R., 2003, Microbial ecology of an extreme caidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.*, (69) 4853-4865.
- Leblanc M., Morales J.A., Borrego J., Elbaz-Poullichet F., 2000, A 4500 years old mining pollution in Spain. *Economic Geology*, (95) 665-662.
- Lopez-Archilla A., Gerard E., Moreira D., Lopez-Garcia P., 2004, Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic-rich River Tinto, Spain. *FEMS Microbiology Letters*, (235) 15, 221-228.
- Medio ambiente web site:
<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/web/>
- Nocete F., Alex E., Nieto J.M., Sàez R., Bayona M.R., 2005, An archaeological approach to regional environmental pollution in the south-western Iberian Peninsula related to Third millennium BC mining and metallurgy, *Journal of Archaeological Science*, (32) 1566-1576.
- Olias M., Canovas C., Nieto J.M., Sarmiento A., 2006, Evaluation of the dissolved contaminant load transported by the Tinto and Odiel Rivers (South West Spain). *Appl. Geochem.*, in press.
- Olias M., Nieto J.M., Darmiento A., Ceron J., Canovas C., 2004, Seasonal water quality variations in a river affected by acid mine drainage : the Odiel River (South West Spain). *Sci. Total Environ.*, (333) 267-281.
- Rossmann K., Chisholm W., Hong S., Candelone J.P., Boutron C., 1997, Lead from carthaginian and roman Spanish mines isotopically identified in Greenland ice date from 600 B.C. to 300 A.D. *Environ. Sci. Technol.*, (31) 3413-3416.
- Saez R., Pascual E., Toscano M., Almodovar G., 1999, The Iberian type of volcano-sedimentary massive sulphide deposits. *Mineralia deposita*, (34) 549-570.
- Sainz A., Grande J.A., de la Torre , 2003, Odiel River, acid mine drainage and current characterisation by means of univariate analysis. *Environ. Internat.*, (29) 51-59.
- Sainz A., Loredó J., 2005, Tinto River : remediation versus conservation. In proceedings of the 9th International Mine Water Association Congress, 5th-7th September 2005, Oviedo, Spain, 563-568.
- Sarmiento A., Nieto J.M., Olias M., Casiot C., Egal M., Elbaz-

- Poulichet F., 2006, An extreme case of contamination by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt : the Odiel watershed and Tinto River (SW Spain). Dissolved total metals and As speciation in surface water, in preparation.
- Strauss G.K., Madel J., Alosno F.F., 1977, Exploration practice for strata-bound volcanogenic sulphide deposits in the Spanish-Portuguese pyrite belt, in Klemm D.D., and Schneider H.Y., eds., Time-and-strata-bound ore deposits: Berlin, Springer-Verlag, 56-91.
- Tornos F., 2006, Environment of formation and styles of volcanogenic massive sulphide : the Iberian Pyrite Belt. *Ore geology Reviews*, (28), 259-307.
- Van Geen A. Chase Z., 1998, Recent mine spill adds to contamination of southern Spain. *Eos*, (79) 449-450.
- Van Geen A., Boyle E.A., Moore W.S., 1991, Trace metal enrichments in waters of the Gulf of Cadiz, Spain. *Geochim. Cosmochim. Acta*, (55) 2173-2191.
- Van Geen A., Takesue R., Chase Z., 1999, Acid mine tailings in southern Spain. *Sci Total Environ.*, (242), 221-229.
- Zettler L., Gomez F., Zettler E., Keenan B., Amils R., Sogin M., 2002, Microbiology: Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature* (417(6885)) 137.

