

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]



Université d'Ottawa • University of Ottawa

**CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU VIEILLISSEMENT DES OXYDES
DE FER BIOGÉNIQUES FORMÉS À LA SURFACE DE DIFFÉRENTES BACTÉRIES**

par

Isabelle Ladouceur

Thèse soumise à l'École des Études Supérieures et Postdoctorales

comme exigence partielle

pour l'obtention du grade de M. Sc. en Sciences de la Terre

CENTRE GÉOSCIENTIFIQUE OTTAWA-CARLETON

ET

UNIVERSITÉ D'OTTAWA

OTTAWA, CANADA

© Isabelle Ladouceur, Ottawa, Canada, 2001



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-67829-6

Canada

RÉSUMÉ

Dans les environnements aquatiques naturels, les oxydes de fer jouent un rôle d'importance dans le cycle et la mobilité des métaux traces à l'aide de processus de sorption. Leurs caractéristiques physiques (structure peu ordonnée et grande unité de surface) favorisent la sorption des métaux à leur surface. Des études récentes ont démontré que les bactéries peuvent participer à la formation des oxydes de fer en augmentant la rétention des métaux traces en solution.

Cette recherche en laboratoire a été entreprise dans le but de connaître les mécanismes naturels de la formation de oxydes de fer sur la paroi bactérienne ainsi que leur vieillissement dans des conditions de laboratoire simulant le milieu lacustre naturel. Les oxydes de fer furent formés par l'oxydation du Fe(II) à un pH de 5.75 à deux concentrations distinctes de fer (10^{-4} M et 10^{-5} M) et en présence de quatre souches bactériennes différentes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa*). Une variété d'espèces dissoutes (SO_4 (10^{-4} M), PO_4 (10^{-5} M), Al (10^{-7} M) et Si (10^{-3} M)) ont été ajoutées aux systèmes afin de déterminer leur rôle dans la formation et le vieillissement des oxydes de fer biogéniques. Tous les systèmes ont été laissés dans le noir à 4°C pour une période de 6 mois afin de simuler la diagénèse des sédiments lacustres. Des systèmes abiotiques ont également été utilisés dans des conditions identiques afin de permettre des comparaisons ultérieures.

Mensuellement, une portion filtrée de chacun des systèmes fut analysée en terme de concentration de fer, sulfate, phosphate, aluminium et silicium. Également, des lectures de pH et de potentiel rédox étaient effectuées. Des échantillons étaient également préparés pour analyse en microscopie électronique à transmission (TEM) et diffraction des rayons X (XRD). Les résultats démontrent que le taux de fer total dissout en solution a diminué dans le temps ce qui suggère une sorption ou une précipitation lente dans les différents systèmes. En termes généraux, le pH est devenu plus acide dans le temps, à l'exception des systèmes contenant du silicium. Une mince proportion des impuretés (PO_4 , SO_4 , Si) semblait s'intégrer au cristal lors de la formation des oxydes de fer. Aussi, la diminution de Fe(II) en solution suggère l'absence de conditions anaérobiques dans les bouteilles, même après une période de vieillissement de six (6) mois.

La minéralogie des échantillons initiaux et finaux (temps 0 et 6 mois) fut analysée par diffraction des rayons X. Les échantillons étaient faiblement ordonnés et n'ont pas semblé évoluer vers des phases plus cristallines au fil du temps. La lépidocrocite fut identifiée à quelques reprises comme étant un oxyde de fer se formant dans nos systèmes. La présence d'impuretés a favorisé la stabilité des oxydes de fer pour la durée de l'expérience, mais le rôle joué par les bactéries à ce niveau n'est pas à négliger.

La morphologie des oxydes de fer fut déterminée par TEM. Dans tous les systèmes, peu de particules étaient visibles à la surface des bactéries lorsqu'une méthode d'imprégnation était utilisée. Cet état des choses peut sans doute être expliqué par les étapes de lavage associées à la préparation des échantillons, qui ont sans doute retiré le matériel biogénique

attaché à la paroi cellulaire, ou à une erreur de temps de séchage apparue dans le protocole. Toutefois, des analyses effectuées sur des échantillons frais (whole mount) ont clairement indiqué la présence de matériel amorphe à la surface des bactéries et dans le milieu extracellulaire. Ce matériel n'a pas évolué dans le temps. De forme amorphe, il est parfois passé à une forme granulaire et la présence d'aiguilles est soupçonnée.

ABSTRACT

In natural aquatic environments, Fe-oxides play an important role in the cycling and mobility of trace metals through sorption processes. Their physical characteristics (poorly ordered structure and large surface area) favour the sorption of metals on their surface. Recent studies have shown that bacteria could participate in the formation of Fe-oxides, increasing the scavenging of trace metals in solution.

This laboratory study was undertaken to investigate the natural mechanisms of Fe-oxide formation onto bacteria and their ageing under laboratory conditions simulating the natural aquatic environment. Fe-oxides were formed by the oxidation of Fe(II) at pH 5.75 at two different Fe concentrations (i.e. 10^{-5} M and 10^{-4} M) in the presence of four different bacterial strains (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas aeruginosa*). Various dissolved species (SO_4 (10^{-4} M), PO_4 (10^{-5} M), Al (10^{-7} M) and Si (10^{-3} M)) were also added to the systems in order to assess their role on the formation and ageing of biogenic Fe-oxides. All systems were left in the dark at 4° C for a period of six months to simulate lake diagenesis. Abiotic systems were formed under identical conditions for further comparisons.

Each month, a filtered aliquot of each system was analyzed for its content in dissolved Fe, SO_4 , PO_4 and Si, and for pH and Eh. Sub-samples were also taken for transmission electron microscopy (TEM) observations and X-ray diffraction. Results show that soluble Fe generally decreased over time, which suggests a slow sorption and/or precipitation of Fe. In all systems, with the exception of the Si-Fe ones, the pH dropped over time. This is consistent with the precipitation of Fe-oxides and the presence of oxygen in the systems. A small portion of the impurities (SO_4 , PO_4 , Si) seemed to participate in the formation of the Fe-oxides. Also, the decrease in the concentration of Fe(II) suggested the absence of anaerobic conditions in the different systems, even after 6 months.

The mineralogy of the initial and final (6 months old) samples were observed by X-ray diffraction. The samples were poorly ordered and did not appear to evolve to more stable Fe-oxide phases overtime. Lepidocrocite was only identified in a few systems. The introduction of impurities (PO_4 , SO_4 , Si) might have favored the stability of the Fe-oxides over time, but the presence of bacteria also affected the poorly ordered structure of the oxides.

The morphology of the Fe-oxides was determined by TEM. In all systems, few Fe-oxide particles were visible at the surface of the bacteria when using resin-embedded samples. This is probably related to the successive wash of the samples during the preparation process, which likely removed most of the biogenic minerals attached to the bacterial cell wall, or to an error in the drying time sets in the embedding protocol. However, TEM observations of whole mounts (i.e., samples directly deposited on grids) indicated the presence of finely granular material at the surface of the bacteria and in between the cells. The presence of needles was sometimes suspected.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout spécialement ma superviseure, Dr. Danielle Fortin, pour ses nombreux conseils et sa grande disponibilité lors de cette recherche en laboratoire.

Je souhaite également souligner l'aide technique et morale déployée par mes collègues de laboratoire, tout particulièrement Dr. Xavier Châtellier et Dr. Christopher Daughney. De plus, je voudrais remercier Ron Hartree pour les analyses en diffraction X, Andrew Ochalski pour l'utilisation du microscope électronique (Université d'Ottawa) et Dr. David Lean pour l'utilisation de plusieurs instruments indispensables à ma recherche.

Mes plus sincères remerciements vont à l'équipe du Dr. T.J. Beveridge de l'Université de Guelph, notamment Dianne Moyles et Robert Harris, pour leur grande gentillesse et leur patience à toute épreuve lors de mon séjour d'apprentissage en microscopie électronique dans leur région.

Merci à mes parents et amis pour leur présence et encouragements; cet appui m'a permis de croire en moi et en mes capacités afin de réaliser un rêve d'enfance. Ma gratitude va également à l'endroit de mon copain, Gabriel, pour son implication technique et morale, particulièrement dans les derniers mois de ce projet, où le stress était à son point culminant.

Finalement, je tiens à remercier le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et Santé Canada (TSRI) pour leurs subventions qui ont permis le financement de ce projet de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xiii
1. Formation et rôle des oxydes de fer en milieu lacustre naturel	1
1.1. Généralités	1
1.2. Solubilité du fer	2
1.3. Mécanismes d'adsorption des ions et des molécules par les oxydes de fer	6
1.3.1. Modèles d'adsorption	7
1.4. Formation des oxydes de fer	9
1.5. Effets des espèces en solution sur la formation des oxydes de fer	11
1.6. Rôle des bactéries comme substrat d'adsorption et de nucléation en milieu aquatique	13
1.6.1. Mécanismes d'adsorption à la surface des bactéries	14
1.6.2. Mécanismes de nucléation à la surface des bactéries	16
1.7. Buts et hypothèses de la présente recherche	16
2. Matériel et méthodes	18
2.1. Culture des bactéries	18
2.1.1. Poids sec des bactéries	20
2.1.2. Compte des cellules (DAPI)	21
2.2. Concentrations et réactifs utilisés	21
2.2.1. Systèmes abiotiques	23
2.3. Vieillessement des oxydes de fer	26
2.4. Sous-échantillonnage et analyses	26
2.4.1. Analyses chimiques	26
2.4.1.1. Vérification des électrodes de pH et de potentiel rédox	27
2.4.1.2. Concentrations dissoutes	29
2.4.1.3. Concentrations totales initiales	31
2.4.1.4. Analyses de sulfate en solution	31
2.4.1.5. Analyses du fer par absorption atomique	31

2.4.1.6. Analyses du fer(II) par la méthode de la Ferrozine	32
2.4.1.6. Analyses chimiques de la fraction particulaire	32
2.4.1.7. Acidification des bouteilles	33
2.4.2. MINEQL	33
2.4.3. Diffraction des rayons X	34
2.4.4. Microscopie électronique à transmission	35
2.4.4.1. Préparation des échantillons	35
2.4.4.2. Imprégnation au Nanoplaste	36
2.4.4.3. Imprégnation pour échantillons déshydratés	37
2.4.4.4. Préparation des micro-sections	38
2.4.4.5. Analyses par spectroscopie avec énergie dispersive (EDS)	39
2.4.4.6. Observations par microscopie électronique à transmission (MET)	39
3. Résultats	40
3.1. Culture des bactéries	40
3.1.1. Courbes de croissance bactérienne	40
3.1.2. Poids sec des bactéries	41
3.1.3. Comptes des cellules (DAPI)	43
3.2. Analyses chimiques	44
3.2.1. Vérifications mensuelles du pH et du potentiel rédox	44
3.2.2. Analyses d'espèces dissoutes	50
3.2.2.1. Analyses des impuretés	50
3.2.2.2. Analyses du fer total en solution	55
3.2.2.3. Analyses du Fe(II) en solution	59
3.2.2.4. Vérification de l'exactitude et de la précision du HACH	63
3.2.3. Analyses d'espèces totales	64
3.2.3.1. Concentrations des impuretés et du fer total en solution	64
3.2.3.2. Concentrations du Fe(II) au début de l'expérience	64
3.2.4. Rôle des bouteilles dans la disponibilité du fer en solution	68
3.3. MINEQL	69
3.4. Diffraction des rayons X	70
3.5. Microscopie électronique à transmission (MET)	86
3.5.1. Préservation des cellules bactériennes	86
3.5.2. Observations des oxydes de fer	97

3.5.3. Analyses par spectroscopie avec énergie dispersive (EDS)	98
4. Discussion des résultats	100
4.1. Formation et évolution cristalline des oxydes de fer en laboratoire	100
4.1.1. Diffraction des rayons X	101
4.1.1.1. Formation et évolution cristalline des systèmes abiotiques	101
4.1.1.2. Formation et évolution cristalline des systèmes biotiques	106
4.1.2. Analyses chimiques en solution	110
4.1.3. Évolution morphologique des oxydes de fer en laboratoire	112
4.2. Évolution chimique et effets des différents types de bactéries sur la formation d'oxydes de fer	117
4.2.1. Systèmes abiotiques	118
4.2.2. Systèmes biotiques	121
4.3. Effet de la concentration initiale de fer introduite dans les systèmes	126
4.3.1. Problématique de l'état d'oxydation	126
4.3.2. Analyses par XRD et TEM	127
4.4. Similarités entre les simulations de diagénèse et le milieu naturel	128
5. Conclusion	129
6. Références	132
7. Annexes	
Annexe A	xv
Annexe B	xvi
Annexe C	xviii
Annexe D	xx
Annexe E	xxvi

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1:** 3
 Contours du fer dissout en fonction du pH et du pe en présumant $P_{\text{CO}_2} = 10^{-2}$ atm et l'activité des espèces $S = 10^{-2}$. Les lignes pointillées représentent la mackinawite (FeS), un sulfure de fer pouvant se former à pH neutre. Dans des conditions réductrices, une faible concentration de fer devrait être obtenue à toutes les valeurs de pH normales (Tiré de Drever, 1997).
- Figure 1.2:** 3
 Contours du fer dissout en fonction du pe et du pH en présumant $P_{\text{CO}_2} = 10^{-2}$ atm et l'absence d'espèces S. Dans des conditions réductrices, la concentration de fer est fonction de la solubilité de FeCO_3 (Tiré de Drever, 1997).
- Figure 1.3:** 5
 Schéma illustrant la dynamique du fer dans un lac (Modifié de Fortin, 1992).
- Figure 1.4:** 9
 Représentation schématique d'une section transversale d'un oxyde métallique. (A) Ions métalliques de surface ayant des lacunes au niveau de leur sphère de coordination. (B) Les lacunes sont occupées par des molécules d'eau (C) Réarrangement des protons pour former une surface de groupes hydroxyles (Tiré de Drever, 1997).
- Figure 2.1:** 25
 Schéma illustrant les différents systèmes à l'étude.
- Figure 2.2:** 28
 Prélèvement chimique mensuel. Une seringue de 10 ml était utilisée pour retirer le liquide. A) Début de l'expérience. B) Après 3 mois. C) À la fin de l'expérience.
- Figure 3.1:** 42
 Courbes de croissance des différentes bactéries à l'étude.

Figure 3.2:	45-46
Évolution du pH dans les systèmes à l'étude pour la durée de l'expérience.	
Figure 3.3:	48-49
Évolution du potentiel rédox (Eh) dans les systèmes à l'étude pour la durée de l'expérience. Valeurs corrigées (+ 199mV).	
Figure 3.4:	51
Évolution de la concentration des impuretés (SO ₄ , PO ₄ et Si) totales dissoutes sur une période de 6 mois dans chacun des systèmes à l'étude.	
Figure 3.5:	56-57
Évolution de la concentration du fer total dissout sur une période de 6 mois dans chacun des systèmes à l'étude.	
Figure 3.6:	61-62
Évolution de la concentration totale dissoute de Fe(II) dans chacun des systèmes sur une période de 6 mois selon la méthode colorimétrique du HACH.	
Figure 3.7:	65
Histogrammes de la concentration de Fe(II) initiale dissoute visant à déterminer les probabilités de formation des oxydes de fer dans les différents systèmes, mesurées avec le HACH.	
Figure 3.8:	67
Comparaison des concentrations de Fe(II) total obtenues au départ de l'expérimentation (temps 0) avec la méthode colorimétrique du HACH et celle de la Ferrozine pour <i>Escherichia coli</i> .	
Figure 3.9:	72-76
Patrons de diffraction X montrant l'évolution cristallographique des minéraux formés lors de cette recherche	
(A) Évolution cristallographique d' <i>Escherichia coli</i> avec sulfate et 10 ⁻⁴ M Fe.	72
(B) Évolution cristallographique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> avec sulfate et 10 ⁻⁴ M Fe.	72
(C) Évolution cristallographique de <i>Bacillus subtilis</i> avec phosphate et 10 ⁻⁴ M Fe.	73

(D) Évolution cristallographique de <i>Bacillus subtilis</i> avec aluminium et 10^{-4} M Fe.	74
(E) Évolution cristallographique d' <i>Escherichia coli</i> avec aluminium et 10^{-5} M Fe.	74
(F) Évolution cristallographique de <i>Bacillus licheniformis</i> avec silicium et 10^{-4} M Fe.	75
(G) <i>Bacillus licheniformis</i> avec silicium et 10^{-5} M Fe à la fin de l'expérience (temps 6).	75
(H) Évolution cristallographique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à 10^{-4} M Fe.	76
(I) <i>Bacillus subtilis</i> à 10^{-5} M Fe au début de l'expérience.	76
Figure 3.10:	84-85
Identification des oxydes de fer des systèmes abiotiques d'après la couleur des particules retenues par le filtre.	
(A) Couleur des oxydes formés en laboratoire.	
(B) Couleur des oxydes déterminée par Cornell et al., 1996.	
Figure 3.11:	88
<i>Bacillus subtilis</i> en présence de sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe dans le Nanoplaste. (A) Cellules au temps de départ (0 mois). Remarquez la paroi cellulaire déformée et l'absence d'oxydes de fer. (B) Cellules au temps final (6 mois). Remarquez la présence de fines particules à la surface de la paroi cellulaire pratiquement intacte.	
Figure 3.12:	89
Nanoplaste (A) <i>Escherichia coli</i> en présence de sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois de vieillissement. Notez le décollement de la paroi cellulaire et la faible quantité d'oxydes de fer y étant attachée. (B) <i>Bacillus licheniformis</i> en présence de sulfate à une concentration 10^{-5} M Fe après 6 mois. Constatez le phénomène de décollement ainsi que la présence de fines particules à la surface de la bactérie.	
Figure 3.13:	90
Nanoplaste (A) <i>Bacillus subtilis</i> en présence de phosphate à une concentration 10^{-5} M Fe après 6 mois. Remarquez la préservation remarquable des cellules et le peu d'oxydes de fer formés. (B) <i>Bacillus subtilis</i> avec phosphate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. La cellule est très bien préservée et les oxydes de fer ne sont pas plus abondants qu'en (A) malgré une augmentation de la	

concentration de fer. (C) *Bacillus licheniformis* avec phosphate à une concentration 10^{-5} M Fe au début de l'expérience (temps 0). Notez la baisse de la qualité de la préservation cellulaire vs *Bacillus subtilis*.

Figure 3.14:

91

Nanoplaste (A) *Escherichia coli* en présence d'aluminium à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. Notez la piètre qualité de la paroi cellulaire et l'absence d'oxydes dans le milieu. (B) *Bacillus subtilis* avec aluminium à une concentration 10^{-4} M Fe. Remarquez la meilleure préservation cellulaire, mais l'absence d'oxydes dans le milieu.

Figure 3.15:

92

Nanoplaste (A) *Bacillus subtilis* avec silicium à une concentration 10^{-4} M Fe au temps initial. Observez la présence de nombreuses particules d'oxydes de fer à la surface des bactéries et dans le milieu extracellulaire. La membrane cellulaire apparaît déformée. (B) *Bacillus subtilis* avec silicium à une concentration 10^{-4} M après 6 mois. Constatez la présence d'oxydes de fer sur la totalité de la surface bactérienne disponible. Remarquez également que les particules ont la forme de fines aiguilles. (C) *Bacillus licheniformis* avec silicium à une concentration 10^{-4} M Fe après 5 mois. La présence d'oxydes granulaires peut être détectée à la surface des 3 bactéries.

Figure 3.16:

93

Nanoplaste (A) *Bacillus subtilis* en présence de 10^{-5} M Fe au temps initial. Notez la faible qualité de la préservation cellulaire ainsi que l'absence d'oxydes de fer. (B) *Bacillus subtilis* en présence de 10^{-5} M Fe après 6 mois. Observez la conservation de la paroi cellulaire des bactéries sans leurs cytoplasmes. (C) *Escherichia coli* en présence de 10^{-4} M après 6 mois. Remarquez la faible qualité de la préservation cellulaire ainsi que la présence de quelques particules de fer à sa surface.

Figure 3.17:

94

Échantillons sur grille (whole mount) d'*Escherichia coli* au temps initial à une concentration de 10^{-4} M Fe (A) Avec sulfate, notez les oxydes de fer amorphes dispersés sur les cellules et dans le milieu. Observez également la concentration du cytoplasme qui diffère à certains endroits

dans les cellules. (B) Avec aluminium, notez que les oxydes ne sont pas distribués à la surface des bactéries, mais plutôt dans le milieu extracellulaire. (C) Avec silicium, observez la petitesse des oxydes amorphes et leur faible concentration dans ce système.

Figure 3.18:

95

Échantillons sur grille (whole mount) (A) *Escherichia coli* avec sulfate à une concentration 10^{-5} M Fe après 12 mois. Notez la présence de vésicules et le développement d'un pont reliant 2 cellules. Remarquez aussi que les cellules semblent collées sur un élément à faible contraste. Notez finalement l'absence d'oxydes de fer. (B) *Pseudomonas aeruginosa* avec sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe après 10 mois. Notez la présence d'oxydes (aiguilles) à la surface de la bactérie et possiblement d'un sel dans le milieu (particules incolores).

Figure 3.19:

96

Échantillons sur grille (whole mount) (A) *Bacillus licheniformis* avec phosphate à une concentration 10^{-4} M Fe après 11 mois. Les bactéries ont tendance à former des masses dans les systèmes. Absence d'oxydes de fer. (B) *Pseudomonas aeruginosa* avec phosphate à une concentration 10^{-4} M Fe après 10 mois. Remarquez le cytoplasme concentré dans certaines parties des bactéries et la distribution aléatoire des oxydes à la surface des bactéries présentes dans le milieu. Quelques oxydes semblent avoir adoptés la forme d'aiguilles.

Figure 3.20:

99

Analyses EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) évaluant la composition des particules disposées à la surface des bactéries ou dans le milieu extracellulaire. (A) *Escherichia coli* avec sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. (B) *Escherichia coli* à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. (C) *Bacillus subtilis* avec sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. (D) *Bacillus subtilis* avec phosphate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. (E) *Bacillus subtilis* avec silicium à une concentration 10^{-4} M Fe au début de l'expérience. (F) Même que (E), mais pris à un endroit différent sur la cellule.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Liste des principaux oxydes de fer, de leur mode de formation en laboratoire et de leur produit de solubilité	10
Tableau 2.1: Temps d'exposition des souches bactériennes au milieu nutritif	19
Tableau 2.2: Concentrations d'espèces dissoutes typiques observées dans les eaux douces naturelles	22
Tableau 2.3: Tableau sommatif des différents systèmes	24
Tableau 2.4: Sommaire de la périodicité de l'échantillonnage	27
Tableau 3.1: Poids secs des différentes bactéries à l'étude correspondant à une densité optique de 0.3	41
Tableau 3.2: Dénombrement des cellules présentes en solution selon la technique de DAPI	43
Tableau 3.3: Concentrations initiales totales des éléments retrouvés dans les différents systèmes	50
Tableau 3.4: Espèces minérales pouvant se former dans les systèmes abiotiques à l'étude selon le programme d'équilibre chimique MINEQL ⁺	71
Tableau 3.5: Identification des 3 pics d'intensité d'importance pour les différentes espèces minérales pouvant se former en solution	78

Tableau 3.6:	79
Identification des pics d'intensité des solides cristallins formés en solution et de la grosseur des particules correspondantes par microscopie électronique	
Tableau 3.7:	83
Identification des espèces minérales formées en solution en l'absence de bactéries d'après la couleur de l'oxyde déposé sur le filtre	

La présente recherche s'inscrit dans un projet multidisciplinaire portant sur la caractérisation des oxydes de fer biogéniques et leur rôle dans l'adsorption de métaux traces dans les milieux aquatiques.

1. Formation et rôle des oxydes de fer en milieu lacustre naturel

1.1. Généralités

Une grande variété de composés et d'éléments présents dans les milieux lacustres naturels sont responsables de plusieurs mécanismes et phénomènes qui régissent ces écosystèmes. Plusieurs substrats minéraux ou organiques ont la capacité d'interférer avec le cycle des éléments traces ou nutritifs en solution, en sorbant une certaine quantité de ces éléments à leur surface, minimisant possiblement leur toxicité, disponibilité et transport en phase soluble dans les écosystèmes aquatiques. Ainsi, un élément potentiellement toxique comme le plomb peut n'avoir aucun effet néfaste, s'il est immobilisé, puisqu'il n'est plus disponible aux divers organismes aquatiques.

Parmi tous les éléments présents dans la colonne d'eau, le fer semble remplir un rôle important dans la géochimie des eaux naturelles et interstitielles. Des études récentes (Gu et al., 1994; Düker et al., 1995; Tessier et al., 1996; Cooper et al., 2000) ont démontré que le fer, sous forme d'oxyde de fer, possédait cette capacité inhérente de capter des métaux traces à sa surface, limitant ainsi la toxicité du milieu. Quatrième élément d'importance dans la croûte terrestre, le fer est introduit dans les eaux naturelles par l'altération physique, chimique, biologique de certaines roches et minéraux, mais également par déposition atmosphérique

(Fortin, 1992). De façon générale, la concentration moyenne de fer dissout retrouvée dans les milieux lacustres dits naturels se situe entre 10^{-5} et 5×10^{-4} M (Tableau 2.2).

1.2. Solubilité du fer

Afin d'être en mesure de cibler l'importance du rôle joué par le fer dans l'environnement aquatique, il est essentiel d'en connaître la forme prédominante sous des conditions données, pour être en mesure d'évaluer la proportion du métal pouvant participer à la formation d'oxydes de fer. La concentration de fer en solution est fonction du pH et du potentiel rédox du milieu (Figures 1.1 et 1.2), mais de façon générale, le fer soluble demeure peu abondant en milieu oxygène aquatique puisqu'il y existe majoritairement sous forme d'oxydes insolubles. En effet, les oxydes de Fe(III) se forment généralement sous des conditions oxygènes et à un pH variant entre 4 à 9 (Stumm and Morgan, 1981). Sous des conditions anoxiques, les oxydes de fer sont réduits en Fe(II) soluble, car ils servent d'accepteurs d'électrons dans la dégradation de la matière organique (Équation 1.1):



Le fer (II) peut alors diffuser vers la zone oxygène susjacent et être oxydé à nouveau ou encore migrer vers la zone de réduction sous-jacente (Fortin, 1992). Le fer (II) peut également être oxydé par les bactéries présentes dans le milieu. De façon générale, les oxydes de fer (III) sont des formes stables à un pH neutre, impliquant un faible taux de fer en solution. Or, à un pH très alcalin ou acide, la solubilité des oxydes de fer augmente, pouvant rejeter les éléments traces sorbés à leur surface dans le milieu liquide environnant. Les oxydes

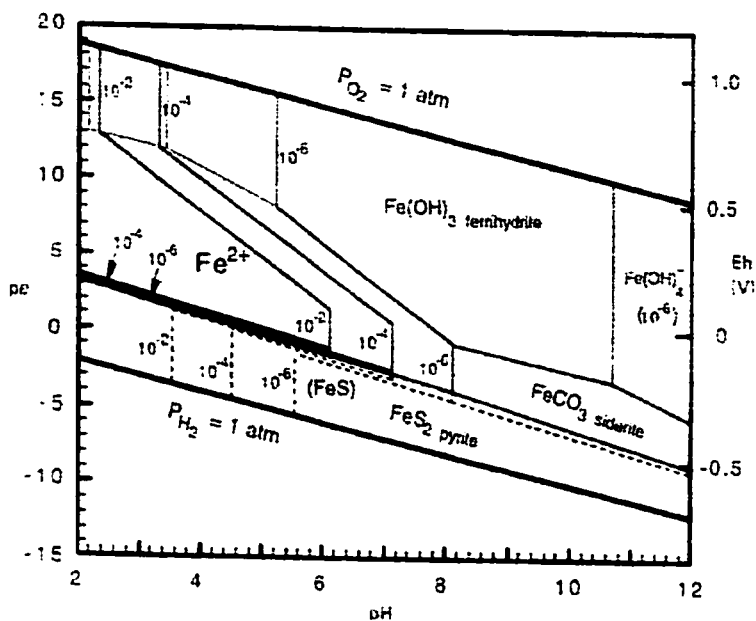


Figure 1.1 Contours du fer dissout en fonction du pH et du pe en présumant $P_{CO_2} = 10^{-2}$ atm et l'activité des espèces S = 10^{-2} . Les lignes pointillées représentent la mackinavite (FeS), un sulfure de fer pouvant se former à pH neutre. Dans des conditions réductrices, une faible concentration de fer devrait être obtenue à toutes les valeurs de pH normales (Tiré de Drever, 1997).

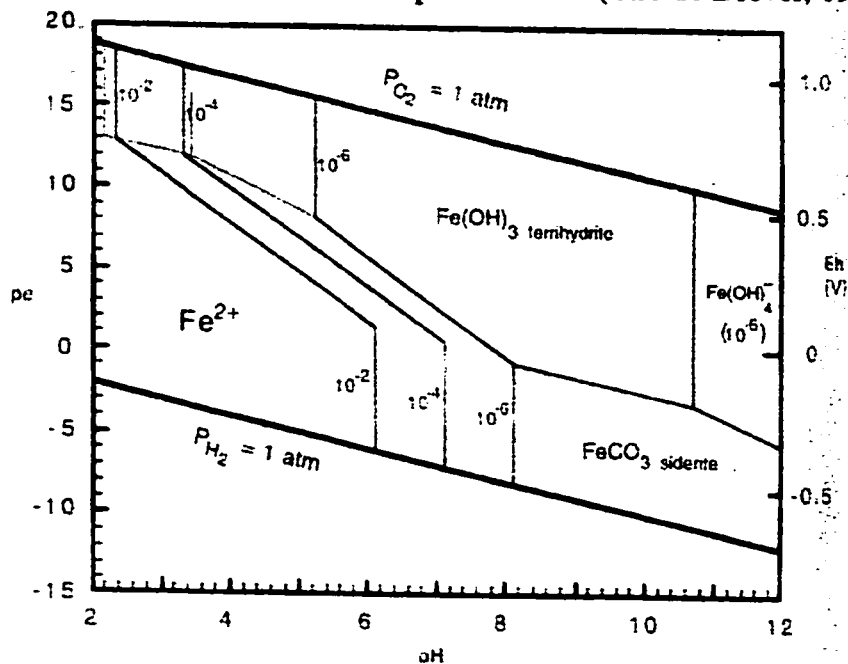


Figure 1.2 Contours du fer dissout en fonction du pe et pH en présumant $P_{CO_2} = 10^{-2}$ atm et l'absence d'espèces S. Dans des conditions réductrices, la concentration de fer est fonction de la solubilité de $FeCO_3$ (Tiré de Drever, 1997).

de fer sont des espèces qui sont grandement affectées par les conditions réductrices du milieu, alors que les autres solides moins réactifs, comme les silicates, sédimenteront et s'accumuleront dans les sédiments profonds anoxiques. Dans les eaux naturelles, à un pH jouant entre 4 et 10 et en l'absence d'agents complexants, il ne devrait pas y avoir une quantité de fer excédant 10^{-6} M en solution (Cornell and Schwertmann, 1996). La solubilité d'un composé n'est pas seulement fonction du pH; elle dépend également de la température, de la force ionique du milieu, de la taille des particules et des défauts présents dans la structure cristalline. En effet, les cristaux minuscules ($< 1 \mu\text{m}$) ont une plus grande surface par unité de volume et leur solubilité en est donc grandement augmentée. Par contre, la présence de certaines impuretés dans la structure des oxydes de fer a pour effet de stabiliser les oxydes et de minimiser leur transformation ultérieure (Section 1.5).

La dissolution (réduction) des oxydes de fer est perçue comme un mécanisme à plusieurs étapes:

Un ion ou une molécule se détache de la surface, diffuse et se retrouve en solution. À ce stade deux processus peuvent avoir lieu:

- Complexation: ligand adsorbé à la surface affaiblit les liens de l'oxyde;
- Réduction: le lien structurel entre les atomes de fer s'affaiblit, il y a alors réduction du Fe(III) en Fe(II) (Modifié de Cornell et Schwertmann, 1996).

Le cycle du fer est un moyen efficace de visualiser et de mettre en relation les formes variées de cet élément dans un écosystème lacustre (Figure 1.3). Puisque la distribution du fer

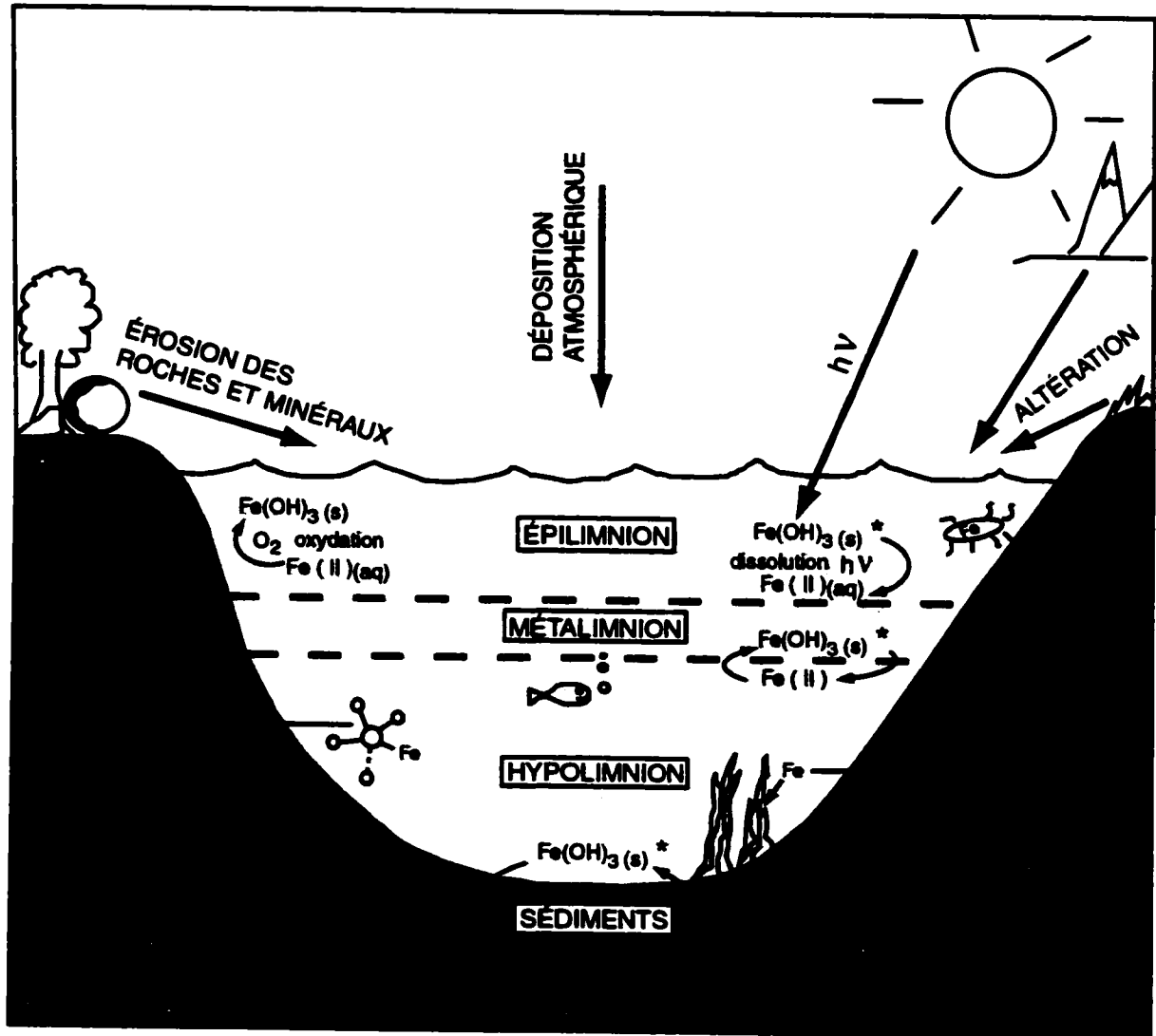


Figure 1.3 Schéma illustrant la dynamique du fer dans un lac (modifié de Fortin, 1992).

est dépendante de l'emplacement de la barrière oxiq/anoxiq, il faut mentionner que les oxydes de fer peuvent se former dans la colonne d'eau ou dans les sédiments de surface du lac, là où il existe un gradient rédox. De plus, il ne faut pas oublier que plusieurs microorganismes sont capables d'oxyder le Fe(II) pour se procurer de l'énergie selon un processus primaire pour répondre à leurs nombreux besoins (Madigan et al., 1997) (Équation 1.2).



Ce processus d'oxydation se produit à bas pH ou à des pH près de la neutralité. À bas pH, le taux d'oxydation du Fe(II) en Fe(III) est plutôt relié à une réaction enzymatique. L'importance de cette découverte est capitale puisque les bactéries sont présentes dans tous les types d'environnements, qu'ils soient terrestres ou aquatiques.

1.3. Mécanismes d'adsorption des ions et des molécules par les oxydes de fer

En milieu aquatique, il est souvent observé que les concentrations à l'équilibre des éléments traces sont sous-saturées par rapport à leurs solides respectifs, car plusieurs mécanismes d'adsorption affectent la solubilité de ces éléments (Tessier et al., 1996). Ainsi, la formation d'oxydes de fer réduit la quantité du métal trace disponible puisque les ions et les molécules chargés peuvent être retenus par les sites d'absorption uniques disposés à la surface de l'oxyde. L'adsorption à la surface des oxydes de fer se fait à l'aide des groupes hydroxyls (FeOH , FeOH_2^+ et FeO^-) qui entrent en contact avec l'environnement immédiat. Les oxydes de fer peuvent adsorber à leur surface à la fois des anions (PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , As (III, V), etc.) et des

cations (Cu^{2+} , Si^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , etc.). Généralement, les facteurs limitant l'adsorption sont la présence d'agents complexants en solution (comme le carbone organique dissout), la concentration d'espèces impliquées, la compétition pour les sites d'adsorption, la force ionique, etc. (Cornell et Schwertmann, 1996). Le phénomène d'adsorption s'effectue en deux étapes distinctes (Cornell et Schwertmann, 1996):

- Il y a d'abord diffusion des espèces dissoutes près des sites d'adsorption (étape rapide);
- Par la suite, il y a incorporation et diffusion des particules dans la structure de surface de l'oxyde (étape lente)

1.3.1. Modèles d'adsorption

Plusieurs méthodes existent pour décrire l'adsorption des éléments traces aux surfaces solides. Dans certains cas, une simple équation empirique ou une représentation graphique peut être utilisée pour relier la concentration de l'ion adsorbé à la concentration des ions en solution. Dans l'exemple du coefficient de distribution linéaire, la quantité adsorbée est directement proportionnelle à la quantité en solution (Équation 1.3) (Drever, 1997).

$$M_{\text{ions}}(\text{ads}) = K_d M_{\text{ions}}(\text{solution}) \quad (\text{Équation 1.3})$$

Où M_{ions} est la concentration d'espèces adsorbées (moles/Kg de solide) sur la phase solide, K_d est le coefficient de distribution (L/Kg) et M_{ions} est la concentration (moles/L) des espèces en solution.

Par contre, dans l'exemple de l'isotherme de Freundlich, l'hétérogénéité des sites d'adsorption à la surface est pris en ligne de compte ainsi que la différence d'énergie impliquée (Drever, 1997) (Équation 1.4). Au départ, les sites possédant le plus d'énergie seront occupés et par la suite, les autres sites seront accaparés.

$$M_{\text{ions}} (\text{ads}) = K_f M_{\text{ions}}^n (\text{solution}) \quad (\text{Équation 1.4})$$

Où n représente une constante inférieure à 1. Finalement, dans l'exemple de l'isotherme de Langmuir, l'adsorption se fait de façon constante jusqu'à ce que la presque totalité des sites vacants soient occupés (Drever, 1997) (Équation 1.5).

$$K_{\text{Langmuir}} = M_{\text{ions}} (\text{ads}) / (M_{\text{ions}} (\text{solution}) \times M_{\text{sites vacants}}) \quad (\text{Équation 1.5})$$

Le processus de complexation de surface repose, quant à lui, sur les sites vacants non-occupés dans la sphère de coordination d'un solide. Les modèles de complexation de surface tiennent compte des interactions électrostatiques et chimiques entre les sites de surface et les ions en solution (Dzombak et Morel, 1990). Des molécules d'eau peuvent occuper ces sites vacants et se dissocier (en fonction du pH) pour former des sites protonnés, neutres et déprotonnés, lesquels peuvent participer à l'adsorption des espèces solubles (Drever, 1997) (Figure 1.4).

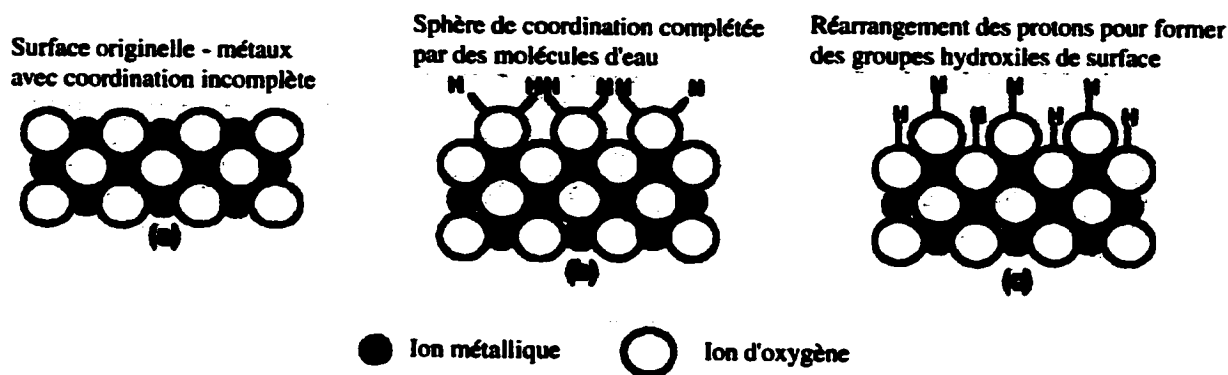


Figure 1.4 Représentation schématique d'une section transversale d'un oxyde métallique. (A) Ions métalliques de surface ayant des lacunes au niveau de leur sphère de coordination. (B) Les lacunes sont occupées par des molécules d'eau. (C) Réarrangement des protons pour former une surface de groupes hydroxyles (Tiré de Drever, 1997).

1.4. Formation des oxydes de fer

Jusqu'à présent, plusieurs oxydes de fer ont été identifiés dans la nature (Tableau 1.1). La formation d'un oxyde de fer s'effectue suite à une précipitation directe en solution (ex. akaganéite, goethite) ou par un processus solide qui permet un réarrangement dans la structure cristalline interne du crystal. Les oxydes de fer peuvent être formés à partir de systèmes comportant du Fe(III), mais également suite à l'oxydation et l'hydrolyse du Fe(II) (ex. ferrihydrite et lépidocrocite) (Équation 1.6).



La formation des oxydes de fer est gouvernée par plusieurs facteurs, notamment: le pH, le taux d'oxydation, la température du système, la concentration de fer disponible et par la présence d'autres espèces dans le système.

Tableau 1.1. Liste des principaux oxydes de fer, de leur mode de formation en laboratoire et de leur produit de solubilité

Nom général	Modes de formation	Produit de solubilité (pK_p)
Akaganéite (β-Fe(O,OH,Cl))	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Précipitation directe ▪ Oxydation d'un sel de fer (II) ▪ Présence de chlore et de fluor 	34.8*
Ferrihydrite ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Fe}_3\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hydrolyse rapide d'un soluté de fer (II) ▪ Oxydation d'un sel de fer (II) ▪ Ferrihydrite à 2 et 6 lignes 	37 à 39
Goethite (α-FeOOH)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Précipitation directe ▪ Oxydation d'un sel de fer (II) 	$\leq 44.1 \pm 0.2$ (40-44)
Hématite (α-Fe₂O₃)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Transformation de la ferrihydrite ▪ Précipitation directe 	$\leq 43.9 \pm 0.2$ (42.2 à 43.3)
Lépidocrocite (γ-FeOOH)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oxydation de fer (II) par l'intermédiaire de "green rust" ▪ Précipitation directe 	38.7 à ≥ 40.6 (42)
Maghémite (γ-Fe₂O₃)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oxydation sèche ou humide de la magnétite ▪ Chauffage de la lépidocrocite 	38.8 à ≥ 40.4 (40.4)
Magnétite (Fe₃O₄)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oxydation de fer (II) par l'intermédiaire de "green rust" ▪ Précipitation directe ▪ Réduction à haute température 	35.7**

Modifié de (Langmuir, 1997) (Cornell et Schwertmann, 1996).

Les valeurs entre parenthèses proviennent de Cornell, 1996.

* $\text{pFe} + 2.7 \text{pOH}$

** $\log (\text{Fe}^{2+})^3 / (\text{H})^8 (\text{e})^2$

Le taux d'oxydation est dépendant du pH de la solution, tel que démontré par l'équation 1.7.

$$d [\text{Fe(II)}]/dt = k p\text{CO}_2[\text{Fe(II)}] [\text{OH}^-]^2 \quad (\text{Équation 1.7})$$

où k est une constante, $p\text{CO}_2$ est la pression partielle du gaz carbonique, $[\text{Fe(II)}]$ est la concentration de fer ferreux et $[\text{OH}^-]$, la concentration d'ions hydroxydes.

1.5. Effets des espèces en solution sur la formation des oxydes de fer

Certaines espèces ioniques, lorsque présentes dans le système, peuvent avoir un effet sur la formation des oxydes de fer. Il peut y avoir substitution de l'espèce pour le fer dans la structure cristalline, adhésion de l'espèce à la surface ou simplement un retard dans l'oxydation du fer (II) en fer (III). Par exemple, l'ion chlorure a pour effet de promouvoir la formation de la lépidocrocite en retardant la formation de la magnétite, rendant impossible le couplage OH - Fe - O - Fe à la surface de l'oxyde (Cornell et Schwertmann, 1996). Plusieurs autres ions (SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Al^{3+} , Si^{2+} , Mn^{2+} , etc) ont aussi des effets remarquables sur la cristallographie des oxydes de fer (Cornell et Schwertmann, 1996). Ces changements sont visibles par diffraction des rayons X, car il y a déplacement des distances entre les plans (d_{hkl}), suite à l'introduction d'espèces ayant un rayon ionique différent de celui du fer.

Le sulfate a un effet stabilisateur vis à vis de la goethite puisqu'il agit comme un élément capable de solidifier la structure des atomes de fer. Le retrait de l'arrangement en forme de tunnel incorporant le sulfate et le fer a pour effet de déstabiliser la structure et le composé se transforme en goethite (Bigam et al., 1990). L'addition de sulfate a pour effet de

réduire la cristallinité de l'oxyde en solution, causant un espacement plus élevé des pics caractéristiques de l'oxyde par diffraction X.

En présence de silice, la formation de la lépidocrocite est difficile puisque cet élément bloque les sites de nucléation à la surface de l'oxyde de fer. Seule la ferrihydrite est favorisée dans de telles conditions (Schwertmann et Thalmann, 1976) et demeure stable pour une durée d'une semaine ou deux (Anderson et Benjamin, 1985). En effet, la présence de silice dans un système favorise la stabilité des espèces amorphes d'oxydes de fer, diminuant les chances de cristallisation (Quin et al., 1988; Vempati et Loeppert, 1989; Kandori et al., 1992).

Le phosphate empêche la formation des formes FeOOH et celle de la magnétite en respectant les mêmes conditions que celles observées pour la lépidocrocite en présence de silice. Généralement, la taille des particules formées en solution diminuera avec une augmentation de la concentration d'anions ajoutée. L'inhibition de la cristallisation des formes de FeOOH serait associée à une complexation avec le Fe(III) en solution et par l'adsorption sur la surface des particules (Kandori et al., 1992).

Le cation principal affectant la formation des oxydes de fer est sans conteste l'aluminium. Ce cation trivalent a une influence considérable sur la cinétique et l'hydrolyse de l'espèce Fe^{2+} en solution, favorisant la précipitation d'une phase solide à faible pH et une concentration restreinte de Fe^{2+} . L'aluminium favorise la formation d'un solide faiblement cristallin, substituant pour le fer dans la structure interne, menant à la formation de goéthite au détriment de la lépidocrocite (Schwertmann et Thalmann, 1976).

Il n'est pas rare qu'en présence de conditions favorables dans le milieu aqueux, une forme particulière d'oxyde de fer se transforme graduellement en oxyde plus stable sous ces conditions, passant d'une forme amorphe à une forme dite plus cristalline (Cornell et Schwertmann, 1996).

1.6. Rôle des bactéries comme substrat d'adsorption et de nucléation en milieu aquatique

En tentant de mieux comprendre le cycle des métaux traces dans l'environnement aquatique, plusieurs surfaces propices à l'adsorption telles que les substrats organiques et les minéraux ont été étudiées. Par contre, ce n'est que récemment que plusieurs études (McLean et al., 1992; Fein et al., 1997; Daughney et al., 1998; Cooper et al., 2000) ont suggéré l'adsorption probable des éléments traces à la surface des parois cellulaires bactériennes. En effet, sous des conditions de pH favorables (neutres), l'adsorption à la surface de ces substrats serait non-négligeable. La structure de la paroi cellulaire des bactéries permet aussi de capter le maximum de nutriments par diffusion (Ferris et Beveridge, 1985). Dans les milieux aquatiques naturels, la concentration des bactéries se situe entre 10^3 et 10^{10} cellules par centimètre cube, en prenant en considération les bactéries liées à la surface d'un substrat quelconque et celles qui sont libres de tout mouvement dans la colonne d'eau (Welch et Vandevivere, 1994). Leur abondance est donc importante et elle permet de croire que les bactéries jouent un rôle marquant dans le cycle des éléments traces.

Plusieurs études ont aussi démontré que la paroi cellulaire des bactéries peut servir de surface de nucléation lors de la formation de minéraux diagénétiques, comme les oxydes de

fer, manganèse, silicates et carbonates (Urrutia et Beveridge, 1993; Fortin et al., 1997). La formation de minéraux dits "biogéniques" se fait sous des conditions de saturation. Ces minéraux biogéniques possèdent une petite taille (1-100 nm) et une structure cristalline peu ordonnée (Fortin et al., 1997; Fortin et Beveridge, 2000). Des travaux de Châtellier et al. (2001) ont démontré que la lépidocrocite formée à la surface des bactéries présentait une taille plus petite que la lépidocrocite abiotique et que sa structure cristalline était désordonnée. Ces propriétés physiques suggèrent que les oxydes de fer biogéniques peuvent agir comme excellents substrats d'adsorption pour les éléments traces, s'ils sont présents en milieu naturel.

1.6.1 Mécanismes d'adsorption à la surface des bactéries

Afin de déterminer la distribution spatiale des éléments traces dans la nature, il est important de connaître leur affinité pour les bactéries. Les bactéries sont divisées en deux catégories selon leur réaction au réactif de Gram; elles peuvent être Gram-positives ou Gram-négatives. Les deux types sont composés d'une substance structurale stable, le peptidoglycane. Cette couche est en fait la composante primaire de la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives. Les Gram-négatives sont beaucoup plus complexes que leurs consœurs, puisque que la cellule est délimitée par deux membranes indépendantes, la membrane plasmique (interne) et la membrane extérieure. Le peptidoglycane, dans ce dernier cas, est pris au piège entre ces deux structures. Dans les deux types de bactéries, la présence de groupes amphotères et de groupements amines leur confèrent une surface anionique (à pH neutre) leur permettant d'agir passivement avec les ions solubles (Beveridge, 1989; Schultze-Lam et al., 1993; Fortin et al., 1998). Une étude menée par Fein et son équipe (Fein et al.,

1997) a démontré que les sites réactifs responsables de l'adsorption des métaux étaient les groupes carboxyls et phosphoryls exposés sur la paroi cellulaire. De façon générale, les bactéries Gram-positives adsorbent davantage de cations que les Gram-négatives puisqu'elles possèdent une plus grande densité de sites d'adsorption par unité de masse (Beveridge et Fyfe, 1985). Le rôle joué par les bactéries dans l'adsorption du fer à leur surface peut se faire de façons variées. Une première façon est par le processus d'adsorption enzymatique qui oxyde le Fe(II) en Fe(III) pour ainsi former des oxydes de fer à la surface des bactéries. Le second, un processus non-enzymatique, fait interagir la surface réactive de la bactérie avec les ions présents en solution (Fortin et Ferris, 1998). À la surface de *Bacillus subtilis*, une bactérie Gram-positive, l'adsorption et la formation d'oxyde de fer auraient un effet mommifiant, préservant la paroi cellulaire de façon exceptionnelle (Ferris et al., 1988).

L'adsorption de phosphate, sulfure, métal et matériel organique est favorable aux sites de nucléation bactériens (Beveridge et al., 1983). Il semble également que l'adsorption obéisse au modèle-type de Langmuir; l'adsorption étant constante jusqu'à ce que la saturation des sites approche (Warren et Ferris, 1998). En comparant les oxydes de fer formés de manière abiotique à ceux formés en présence de bactéries, il est apparu évident que les derniers sont amorphes et plus facile à subir une réduction bactérienne. De plus, en produisant métaboliquement des acides organiques et inorganiques faibles, les bactéries réussissent à dissoudre plusieurs minéraux situés dans leur environnement immédiat (Welch et Vandevivere, 1994). En présence de réduction bactérienne des oxydes de fer et du retour en solution de Fe(II), celui-ci pourrait être de nouveau adsorbé à la surface de l'oxyde toujours en

place, adsorbé sur les sites de nucléation libres à la surface bactérienne, précipité en nouvelle forme minérale ou encore demeuré en solution sous forme d'un complexe.

1.6.2 Mécanismes de nucléation à la surface des bactéries

Peu d'études ont tenté de quantifier le processus de nucléation à la surface des bactéries. Il est cependant proposé, dans la littérature, que la nucléation de minéraux se fait en deux étapes: soit d'une part, une réaction d'adsorption du métal à la surface de la paroi cellulaire et d'une autre part, une réaction de nucléation sur le même site (Beveridge et Murray, 1976). Une étude récente de Warren et Ferris (1998) indique qu'il existerait un continuum entre l'adsorption de Fe(III) à la surface des bactéries et la nucléation d'oxydes de fer. L'adsorption se terminerait lorsque tous les sites sont saturés. Le mécanisme exact de nucléation d'oxydes de fer est toujours à l'étude.

1.7 Buts et hypothèses de la présente recherche

La présente recherche s'inscrit dans le cadre d'un projet portant sur la caractérisation physique et chimique d'oxydes de fer biogéniques et sur leur rôle dans l'adsorption de Pb et Cd en milieu aquatique. Le but général de la présente étude est de déterminer si les oxydes de fer formés à la surface de bactéries se transforment vers des formes thermodynamiquement plus stables sous des conditions de diagénèse lacustre. Le but secondaire est de déterminer si le type de bactéries utilisés (Gram-positives et Gram-négatives), la concentration initiale de Fe (II) et la présence d'impuretés (soit Al, Si, SO₄ et PO₄) affectent le vieillissement des oxydes de fer biogéniques.

Les hypothèses de base sont les suivantes:

- 1. De part leur nature amorphe et leur petite taille, les oxydes de fer biogéniques devraient se transformer en formes plus stables avec le temps et ce, sous des conditions de diagénèse, si les impuretés présentes dans le système n'ont pas un effet stabilisateur.**
- 2. Le type de bactéries ne devrait pas affecter la transformation, car les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives sont considérées comme des substrats passifs de nucléation, c'est à dire qu'elles ne participent pas directement à la formation des oxydes de fer.**
- 3. La concentration initiale de Fe(II) devrait affecter la quantité d'oxydes de fer biogéniques se formant à la surface des bactéries. Lors de la réaction d'oxydation du fer et en présence du même nombre de bactéries, des concentrations de Fe(II) de l'ordre de 10^{-5} M devraient favoriser une plus grande adsorption du Fe(III) sur la paroi cellulaire, alors que des concentrations de l'ordre de 10^{-4} M de Fe(II) devraient promouvoir l'adsorption et la nucléation d'oxydes de fer sur la paroi cellulaire.**

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Culture des bactéries

Quatre souches différentes de bactéries furent utilisées comme surface de nucléation pour la synthèse des oxydes de fer. *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (avec des exopolymères) représentent les bactéries Gram-négatives tandis que *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* (avec des exopolymères) sont les représentantes des Gram-positives. À même cette division, chacune des catégories est subdivisée en bactérie avec et sans exopolymères. Ceux-ci se définissent comme étant des structures extracellulaires attachées à la paroi cellulaire et se présentent sous forme de minces fibrilles (quelques nm de diamètre et plusieurs centaines de nm de long). Les buts poursuivis par cette diversité morphologique sont de vérifier si les divers types de parois cellulaires et la présence de fibrilles favorisent la formation et la rétention de différents oxydes de fer.

Chacune des souches bactériennes fut cultivée en laboratoire, suivant le protocole élaboré ci-dessous. Les souches ont été conservées au réfrigérateur (4°C), dans des pétris de Tryptic Soy Agar (TSA), pour une période maximale de deux semaines. À la fin de cette période ou lors d'une culture pour la mise en bouteille, elles étaient inoculées à nouveau en aseptie pour s'assurer d'avoir des souches exemptes de contamination. Par la suite, elles étaient placées dans un incubateur à 37°C pour la nuit.

Pour la culture en milieu liquide, un prélèvement aseptique de bactéries était placé dans une fiole de 250 ml contenant 50 ml de Tryptic Soy Broth (TSB) stérile et mis en rotation à une vitesse de 100 rpm pour une période approximative de 16 heures, à 37°C. Par la

suite, 10 ml était pipeté de ce milieu et placé dans un Erlenmeyer de 2L contenant un milieu de TSB pré-autoclavé de 500 ml. Ce milieu était également agité à 100 rpm à 37°C pour un temps pré-déterminé correspondant à la fin de la phase exponentielle de croissance des bactéries, mais avant le début de la phase stationnaire. Une courbe de croissance pour chaque espèce, suivant cette méthodologie, fut préalablement établie afin d'obtenir des résultats reproductibles (Figure 3.1). De façon générale, le temps d'exposition des bactéries au milieu nutritif variait entre 6 à 13 heures (Tableau 2.1):

Tableau 2.1 Temps d'exposition des souches bactériennes au milieu nutritif

Souches bactériennes	Temps d'exposition
<i>Escherichia coli</i>	6 heures
<i>Bacillus subtilis</i>	7 heures 30 minutes
<i>Bacillus licheniformis</i>	9 heures
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 heures

Une fois que les bactéries eurent atteint le stade choisi, elles furent récupérées dans des bouteilles de 250 ml en plastique Nalgène et centrifugées (Sorvall RC 28S) à 6000 rpm, afin de récupérer le culot bactérien. Étant donné que la vitesse de rotation est dépendante de l'identité de la centrifuge utilisée, les rpm (rotations par minute) furent converties en force FCR (Force Centrifugale Relative), permettant de meilleures comparaisons, à l'aide de l'équation suivante donnée en unités de g:

$$\text{FCR} = 11.17 r (n/1000) (n/1000) \quad (\text{Équation 2.1})$$

où r est le rayon depuis le centre du rotor et n est la vitesse en rotations par minute. Ainsi, pour une vitesse de centrifugation de 6000 rpm, la FCR correspondante est de 4000g +/- 1000g, compte tenu des différences de rayons du tube depuis le centre du rotor ($r=7$ à 13 cm, $r_{\text{moyen}} = 10$ cm).

Par la suite, le culot fut lavé 5 fois avec du NaNO_3 (10^{-3}M) pour empêcher la rupture de la paroi cellulaire et centrifugé à chacune des étapes de lavage à 4000g. Le culot bactérien des 3 Erlenmeyers de 2L fut ensuite recueilli dans un bécher en pyrex de 3L et resuspendu dans 2500 ml d'eau ultrapure (Barnstead-Sybron, Nanopure). La densité optique de la suspension fut ajustée à une valeur avoisinant 0.3 à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DU-65) à une longueur d'onde de 600 nm. 500 ml de cette suspension furent transvidés à l'aide d'un cylindre gradué de 250 ml dans une bouteille Nalgène rectangulaire de 500 ml avec grande ouverture.

2.1.1. Poids sec des bactéries

Quelques techniques existent pour évaluer la quantité de bactéries dans un échantillon ou un système donné. Le poids sec est l'une de ces méthodes. Il suffit de prendre un volume choisi de la suspension bactérienne, de l'ajuster à la densité optique sélectionnée (soit 0.3) et de le centrifuger pour récupérer le culot bactérien. Le culot humide est pré-pesé et ensuite séché au four à 60°C jusqu'à ce que la lecture du poids sec demeure constante sur une période de 24 heures.

2.1.2. Comptes de cellules (DAPI)

La teinture fluorescente 4'6-diamino-2-phénylindole (DAPI) est utilisée pour visualiser les cellules bactériennes par microscopie optique. Ce traitement permet d'identifier par épifluorescence les particules contenant de l'ADN, comme les bactéries. Les cellules des quatre différentes souches ont été préparées suivant le protocole établi précédemment, en s'assurant d'ajuster la densité optique à 0.3. Toutefois, puisque le nombre de cellules était élevé, la suspension de cellules a été diluée par un facteur de 1000. La préparation des échantillons et de la solution DAPI, ainsi que l'énumération en microscopie à épifluorescence, suivent le protocole établi par Porter et Feig (1980) (Annexe A).

2.2. Concentrations et réactifs utilisés

Les concentrations des éléments utilisés furent déterminées suite à une recherche de littérature concernant les concentrations naturelles de diverses espèces dissoutes dans les eaux douces (de surface et interstitielles). Ces valeurs sont indiquées au Tableau 2.2.

Les réactifs ont été additionnés au milieu en utilisant les sels suivants:

- Fer: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Tetrahydrate de chlorure ferreux)
- Sulfate: Na_2SO_4 (Sulfate de sodium anhydre)
- Phosphate: KH_2PO_4 (Orthophosphate de potassium)
- Aluminium: AlCl_3 (Chlorure d'aluminium anhydre)
- Silicium: $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Silicate de sodium)

Tableau 2.2 Concentrations d'espèces dissoutes typiques observées dans les eaux douces naturelles

Fe (tot) (M)	PO₄ (M)	SO₄ (M)	Si (M)	Al (M)	Type d'échantillon	
1.56E-4 à 1.15E-3					Eau interstitielle Non filtrée	(Winger et al., 1998)
1.34E-4 à 1.07E-3					Eau interstitielle filtrée (0.45µm)	(Winger et al., 1998)
0 à 4.5E-4					Interface sed-eau	(Hamilton -Taylor et al., 1996)
3.22E-7 à 1.36E-6		9.37E-5 à 2.19E-3	4.98E-5 à 3.56E-4	4.45E-7 à 3.34E-6	Eau interstitielle	(Farrell et al., 1993)
3.90E-5 5-3500 ueq/L		9.26E-6 10-80 ueq/L	2.55E-7		Eau interstitielle	(Sherman et al., 1994)
0 à 1.8E-3					Eau interstitielle	(Carignan et al., 1985)
1.1E-6 1.58E- 5					Eau interstitielle	(Tessier et al., 1984)
1.79E-6 à 2.33E-4			3.56E-6 à 8.9E-3	1.1E-5 à 7.41E-3	Eau interstitielle	(Azcue et al., 1996)
0 à 3.6E-4		0 à 1.85E- 4			Eau interstitielle	(Huerta- Diaz et al., 1998)
3.9E-7 à 3.18E-5		3.19E-5 à 1.18E-4			Eau interstitielle	(Rudd et al., 1986)
		1.75E-4 à 2.27E-4			Au-dessus de l'interface sed-eau	(Tessier et al., 1996)
1.45E-7 à 1.42E-6	1.1E-7 à 4E- 7 1.8E-5	5.1E-5 à 4.65E-4	3E-6 à 8.5E-5		Au-dessus de l'interface sed-eau	(Fortin et al., 1993)
			1E-3		Eau interstitielle	(Lean, 1999)

Deux concentrations distinctes de fer ont été retenues pour cette expérience, 10^{-4} M et 10^{-5} M, pour représenter les concentrations naturelles de fer dissout dans les eaux naturelles. Le choix de 2 concentrations différentes a été effectué pour étudier les différences entre la sorption, à basse concentration de fer et la précipitation d'oxydes de fer, à forte concentration. Les concentrations suivantes ont été retenues pour les autres éléments, considérés dans l'expérience comme des impuretés présentes dans le milieu naturel: SO_4 (10^{-4} M) ; PO_4 (10^{-5} M); Al (10^{-7} M) et Si (10^{-3} M). Dans chacune des bouteilles de 500 ml, 0.501 ml de fer d'une solution mère de 10^{-3} M (pour concentration finale de 10^{-5} M) ou 0.501 ml d'une solution de fer de 10^{-2} M (pour une concentration finale de 10^{-4} M) fut ajouté. Les concentrations finales d'impuretés furent ajustées en fonction du volume de chaque système. La composition chimique et le type de bactéries présentes dans les divers systèmes sont indiqués au tableau 2.3 et peuvent être visualisés à la figure 2.1.

2.2.1. Systèmes abiotiques

Des systèmes ne contenant aucune bactérie ont également été mis en bouteille afin de comparer le développement et le vieillissement des oxydes de fer dans de telles conditions. La procédure générale fut maintenue, bien que le volume utilisé fut multiplié par 8 (4L) pour obtenir suffisamment de matériel. La centrifugation des échantillons fut remplacée par une filtration mensuelle de 480 ml au travers d'un filtre Nucléopore de $0.45 \mu\text{m}$. La portion recueillie sur le filtre fut rincée 2 fois à l'eau ultrapure et utilisée par la suite pour les analyses en diffraction X. Le surnageant recueilli lors de la filtration fut, quant à lui, utilisé pour les analyses des espèces dissoutes. Un petit morceau de chaque filtre fut également découpé et imprégné dans la résine Nanoplaste pour l'observation au microscope électronique.

Tableau 2.3 Tableau sommatif des différents systèmes

Systèmes		SO ₄ 10 ⁻⁴ M	PO ₄ 10 ⁻⁵ M	Al 10 ⁻⁷ M	Si 10 ⁻³ M
10 ⁻⁵ M Fe	10 ⁻⁴ M Fe				
S1	S1A	✓			
S2	S2A		✓		
S3	S3A			✓	
S4	S4A				✓
S5	S5A				
S6	S6A	✓			
S7	S7A		✓		
S8	S8A			✓	
S9	S9A				✓
S10	S10A				
S11	S11A	✓			
S12	S12A		✓		
S13	S13A			✓	
S14	S14A				✓
S15	S15A				
S16	S16A	✓			
S17	S17A		✓		
S18	S18A			✓	
S19	S19A				✓
S20	S20A				
S21	S21A	✓			
S22	S22A		✓		
S23	S23A			✓	
S24	S24A				✓
S25	S25A				

À noter: rouge: *E. coli*, bleu: *B. subtilis*, vert: *B. licheniformis*, noir: *P. aeruginosa* et gris: abiotique

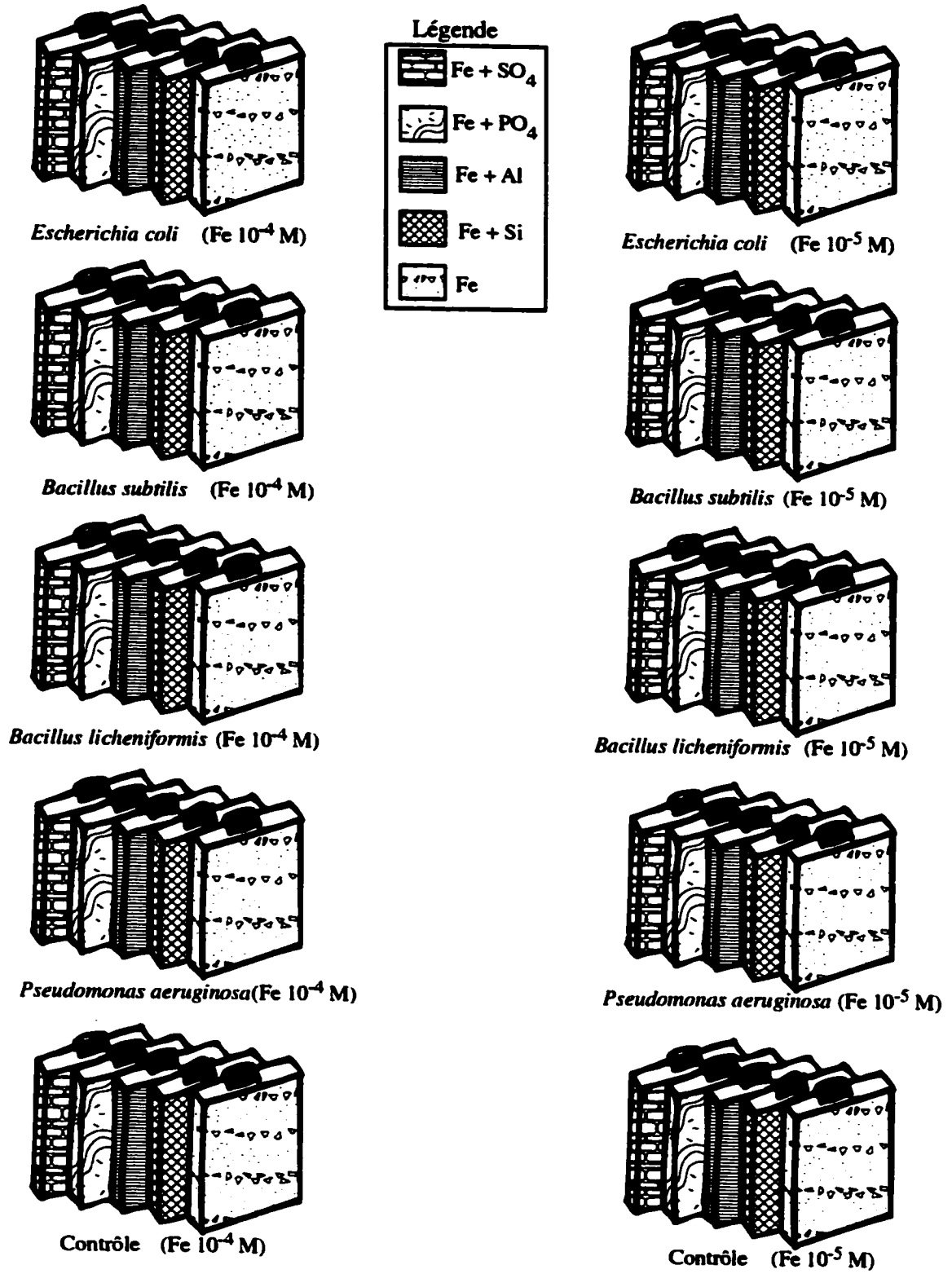


Figure 2.1 Schéma illustrant les différents systèmes à l'étude.

2.3. Vieillissement des oxydes de fer

Lors de l'addition des réactifs, le pH fut maintenu approximativement à 5.75, en ajoutant de petites quantités de soude ou d'acide chloridrique concentré, pour éviter l'oxydation rapide des oxydes à pH élevé et un changement important dans le volume des systèmes. Les systèmes ont par la suite été soumis à un bullage à un taux de une bulle d'air/seconde pendant 2 heures, pour oxyder une partie du fer (II) en fer (III) et ainsi créer les oxydes de fer. Une mesure du pH et de potentiel rédox furent prises à l'aide d'un pH mètre, avant de sceller les bouteilles et de les recouvrir entièrement de papier d'aluminium, pour simuler l'absence de lumière en profondeur lacustre. Les bouteilles furent ensuite mises à reposer dans une chambre froide où la température était constamment maintenue à 4°C pour simuler la diagénèse des sédiments lacustres.

2.4. Sous-échantillonnage et analyses

Afin d'étudier l'évolution chimique et minéralogique des divers systèmes, des prélèvements mensuels ont été effectués sur une période de 6 mois consécutifs (Tableau 2.4).

2.4.1. Analyses chimiques

Des échantillons furent prélevés à chaque quatre semaines pour effectuer des mesures de pH et de Eh et pour mesurer la concentration des espèces dissoutes, i.e, Fe, Fe²⁺, SO₄, PO₄, Si et Al (Figure 2.2). Le volume prélevé à l'aide d'une seringue de 10 ml fut placé dans des tubes de 50 ml. La suspension fut ensuite centrifugée à 6300g +/- 1200g (9000 rpm; $r_{\text{moyen}}=7\text{cm}$) pour 10 minutes afin de récupérer le surnageant dans chacun des tubes à l'aide de la seringue. Ce surnageant fut ensuite filtré (0,2 µm, VWR) pour fins d'analyses d'espèces

dissoutes. En ce qui concerne les systèmes abiotiques, 30 ml de surnageant récupéré lors de la filtration fut filtré de nouveau (0.2 µm, VWR) et analysé par la suite (Section 2.4.1.2.). Le culot de chaque centrifugation fut quant à lui récupéré à l'aide de pipettes Pasteur pour analyses par diffraction X (Section 2.4.3.).

Tableau 2.4 Sommaire de la périodicité de l'échantillonnage

Systèmes	*T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 5	T = 6
1 à 5	99/11/12	99/12/13	00/01/13	00/02/13	00/03/13	00/04/13	00/05/11
1A à 5A	99/11/25	99/12/21	00/01/25	00/02/24	00/03/27	00/04/26	00/05/25
6 à 10	99/12/08	00/01/07	00/02/07	00/03/07	00/04/07	00/05/08	00/06/08
6A à 10A	99/12/17	00/01/18	00/02/19	00/03/17	00/04/17	00/05/17	00/06/18
11 à 15	00/01/18	00/02/24	00/03/20	00/04/25	00/05/23	00/06/23	00/07/17
11A à 15A	00/01/26	00/02/25	00/03/27	00/04/29	00/05/25	00/06/23	00/07/26
16 à 20	00/02/16	00/03/16	00/04/16	00/05/16	00/06/15	00/07/15	00/08/24
16A à 20A	00/02/17	00/03/19	00/04/25	00/05/19	00/06/22	00/07/17	00/08/26
21 à 25	00/03/10	00/04/11	00/05/11	00/06/12	00/07/11	00/08/11	00/09/11
21A à 25A	00/03/14	00/04/14	00/05/12	00/06/14	00/07/13	00/08/14	00/09/13

*: temps en mois

2.4.1.1. Vérification des électrodes de pH et du potentiel rédox

À chacun des prélèvements et avant la centrifugation, les mesures du pH et du potentiel rédox furent prises en s'assurant de calibrer préalablement le pH mètre (VWR Scientific modèle 8005 ou 2000) à 4°C (avec des tampons à pH 4 et 7 de VWR) et en prenant également soin de convertir les mesures de Eh prises à 25°C à 4°C, selon l'équation 2.1:

$$E(\text{volts}) = 0.23145 - 1.5220 \times 10^{-3} (t - 25) - 2.2449 \times 10^{-6} (t - 25)^2 \quad (\text{Équation 2.1})$$

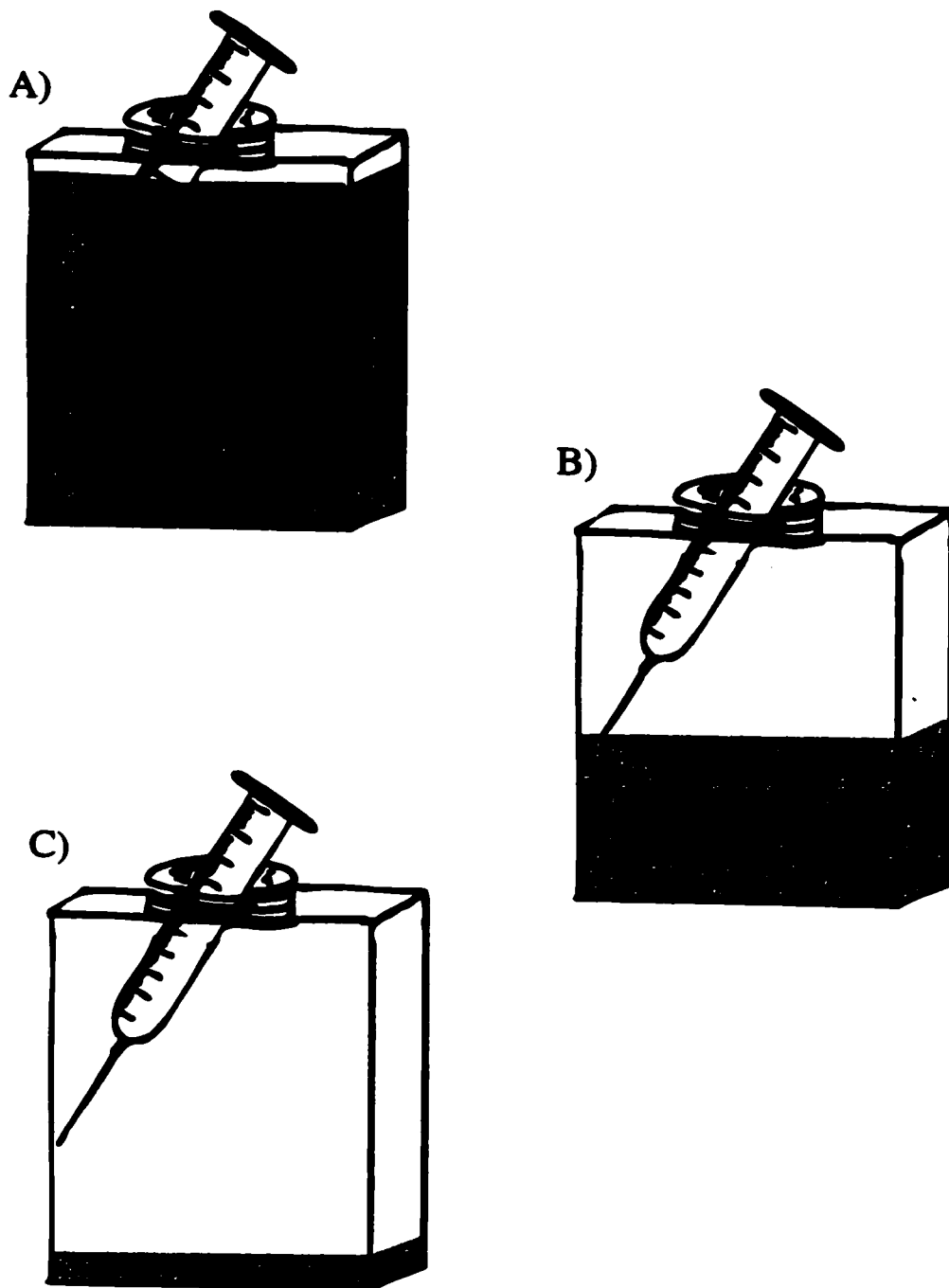


Figure 2.2 Prélèvement chimique mensuel. Une seringue de 10 ml était utilisée pour retirer le liquide.
A) Au début de l'expérience.
B) Après 3 mois.
C) À la fin de l'expérience

où t est la température en degrés Celsius. Les électrodes rédox (VWR et Corning Rédox Combo w/R5) ont été vérifiées avec la solution de ZoBell (Nordstrom, 1977). La mesure du pH (VWR Scientific) fut effectuée en agitant quelque peu la solution pour s'assurer de l'homogénéité de celle-ci. Pour le Eh, aucune agitation n'a été produite puisque l'introduction de l'oxygène influence grandement la lecture de l'électrode.

2.4.1.2. Concentrations dissoutes

L'aliquot de 30 ml récupéré au stade de la centrifugation fut immédiatement analysé pour les concentrations d'éléments dissouts dans les systèmes. L'appareil utilisé pour exécuter cette tâche fut le HACH DR/2010, Portable Datalogging Spectrophotometer, une technique colorimétrique se basant sur la différence d'absorbance enregistrée entre un blanc et l'échantillon à une longueur d'onde donnée. Compte tenu que l'aliquot fut filtré à l'aide d'un filtre de 0.2 μm , la transparence de l'échantillon était comparable à celle de l'eau. Après un test pratique, il fut déterminé que l'absorbance mesurée de l'eau et de l'échantillon était identique. Par économie d'échantillon, l'eau distillée fut choisie pour tenir le rôle du blanc par la suite. Le mode de fonctionnement de l'appareil est assez simple:

- D'abord s'assurer que la concentration de notre échantillon se situe à l'intérieur des limites de détection de l'appareil;
- S'assurer d'avoir un aliquot de 25 ml, lequel volume est requis pour que la réaction se produise;
- Choisir la méthode correspondante au réactif recherché et entrer la longueur d'onde correspondante dans l'appareil;

- **Transvider 25 ml de l'échantillon dans une cellule de quartz, ajouter la pochette de poudre comprenant les réactifs**
- **Laisser agir pour le temps prescrit**
- **Calibrer l'appareil à l'aide du blanc**
- **Effectuer la lecture de l'échantillon (concentration en mg/L)**
- **Mesurer de nouveau pour s'assurer de l'exactitude de l'appareil.**

(Voir Annexe B pour détails sur les méthodes)

Pour les échantillons possédant une concentration de Fe de 10^{-5} M, il a fallu effectuer une dilution de 1:3 pour demeurer dans la gamme de concentration de l'appareil et avoir assez d'échantillon jusqu'à la fin de l'expérience. Par contre, pour les échantillons de Fe $\times 10^{-4}$, une dilution de 1:5 a été effectuée. Les mesures pour le sulfate, le phosphate, le fer (II) et le silicium correspondaient aux facteurs de dilution observés pour le fer leur étant associés, i.e. 1:5 pour 10^{-4} M et 1:3 pour 10^{-5} M. Le volume restant (i.e., le volume restant après les diverses analyses) a été acidifié avec du HNO₃ omni trace (soit un ajout de 0.425 ml de HNO₃ concentré dans 30 ml afin d'obtenir un pH < 2). Si l'utilisation de l'aliquot acidifié s'avérait nécessaire, le pH était ré-ajusté à 4 pour fins d'analyses avec le HACH. Les ajouts étaient pris en note pour corriger le volume restant.

Pour s'assurer de la reproductibilité des mesures en utilisant le HACH, 65 échantillons furent choisis au hasard et soumis de nouveau à cette méthode colorimétrique dans les mêmes conditions de base.

2.4.1.3. Concentrations totales initiales

Le lendemain de l'embouteillage des systèmes, un prélèvement de 15 ml de la solution-mère a été effectué pour vérifier les concentrations initialement ajoutées dans les bouteilles. Ces 15 ml ont servi à une analyse totale des éléments en solution, après digestion à l'acide nitrique concentré (pH de l'échantillon =1) pendant 12 heures à 60°C. Pour les systèmes comprenant les concentrations de fer de 10^{-5} M, une dilution de 1:5 fut effectuée; pour les systèmes possédant une concentration de fer de 10^{-4} M, une dilution de 1:8 était de mise. La méthodologie fut identique à celle des composés dissouts (Section 2.4.1.2), cependant le blanc fut un aliquot de l'échantillon puisque celui-ci n'était pas transparent (matière en suspension).

2.4.1.4. Analyses du sulfate en solution

Compte tenu du fait que la concentration du sulfate détectée par la méthode colorimétrique du HACH s'approchait de la limite de détection de l'appareil, des analyses supplémentaires à l'aide de la méthode de la turbidité furent effectuées (Annexe C). Cette méthode implique une réaction des échantillons avec du chlorure de baryum stabilisé et mis en parallèle avec la courbe d'absorbance de standards connus afin de déterminer leurs concentrations respectives.

2.4.1.5. Analyses du fer par absorption atomique

Afin de s'assurer de l'exactitude des valeurs de concentrations trouvées par la méthode du HACH, la totalité des échantillons restants après les prélèvements initiaux furent analysés par absorption atomique avec flamme pour le fer dissout. L'appareil d'absorption atomique, de

type Varian AA-1475, utilisait une longueur d'onde d'analyse de 248.3nm pour l'absorbance du fer en solution. Les résultats furent par la suite comparés à ceux obtenus préalablement par colorimétrie (Annexe D).

2.4.1.6. Analyses du fer (II) par la méthode de la Ferrozine

L'acidification des échantillons pouvant interférer avec la lecture de la concentration de Fe(II) par la méthode du HACH, l'expérimentation à l'aide de la Ferrozine fut également retenue pour les systèmes contenant *Escherichia coli*. à des fins de comparaisons. Cette méthode colorimétrique détermine la concentration de Fe(II) en solution en comparant l'absorbance mesurée de l'échantillon à une courbe d'absorbance d'étalons pré-établie. L'avantage de cette méthode consiste en l'ajout d'un réactif aux différents standards dont le but ultime est de conserver la concentration de Fer(II) stable pour le temps d'analyse, en empêchant entre autre, l'oxydation de celui-ci (Stookey, 1970). Il a été démontré que le complexe Ferrozine-Fe(II) en solution demeurerait stable pour des périodes temporelles de durées supérieures à 1h30 sous de telles conditions d'analyse (Viollier et al., 2000).

2.4.1.7. Analyses chimiques de la fraction particulaire

Quelques milligrammes du culot bactérien avec oxydes de fer furent séchés et pesés avant d'être dissouts dans de l'acide nitrique 10% et laissés pendant plusieurs jours au four à 60°C ou jusqu'à ce qu'aucune particule ne soit visible. Ces échantillons furent réservés pour analyses chimiques de la fraction particulaire, au besoin.

2.4.1.8. Acidification des bouteilles

À la toute fin de l'expérience, le matériel contenu dans les bouteilles fut retiré et remplacé par de l'acide chloridrique 1M et laissé pour digestion au four à 60°C pour un minimum de deux (2) jours. Cette façon de procéder indiquait si une portion du fer introduit dans le système fut adsorbé par les parois de la bouteille, le rendant non disponible pour les bactéries. Les analyses furent effectuées à l'aide de l'adsorption atomique avec flamme (Varian AA-1475) disponible à l'Université d'Ottawa (Annexe D).

2.4.2. MINEQL

Afin de calculer les indices de saturation des solides pouvant précipiter dans chacun des systèmes abiotiques, les concentrations initiales totales de tous les éléments mis en solution furent entrées dans le logiciel de calcul thermodynamique MINEQL⁺ v.3.01 (Schecher et McAvoy, 1994). Ce programme permet, entre autre, de calculer la spéciation à l'équilibre des espèces chimiques dans le système aqueux, ainsi que les indices de saturation (S.I.), selon l'équation suivante:

$$\text{S.I.} = \log (\text{PAI}/K_{\text{m}}) \quad (\text{Équation 2.2})$$

où PAI est le produit d'activité ionique et K_{m} , le produit de solubilité du solide en question. Si l'indice de saturation excède 1, le système est saturé ou sur-saturé par rapport au solide, alors qu'une valeur inférieure à 1 indique une sous-saturation de la solution par rapport au solide.

2.4.3. Diffraction des rayons X

Lors des analyses mensuelles, la diffraction des rayons X fut également utilisée afin d'identifier le type d'oxydes de fer formés en solution. Cette technique permet de calculer la distance entre les plans atomiques (d_{hkl}) (Équation 2.3):

$$d_{hkl} = \lambda / 2(\sin\theta) \quad (\text{Équation 2.3})$$

où λ est la longueur d'onde des rayons X (Å) et θ , l'angle des rayons X.

Le diffractomètre utilisé, un modèle Phillips (X'Pert équipé d'un générateur PW 1830) du département de Physique de l'Université d'Ottawa, possède une source de $\text{CuK}\alpha$ avec une longueur d'onde fixe à 1.5418 Å. Les analyses furent effectuées entre 4 et 90 degrés, par portion de 0.5 degrés, à une vitesse de balayage de 3 secondes chacune.

Le culot des échantillons prélevés pour les analyses dissoutes a été utilisé à cette étape. Ce culot a par la suite été soumis à trois (3) nettoyages consécutifs à l'eau ultrapure à l'aide d'une mini-centrifuge Eppendorf à 8700g +/- 2100g (14000 rpm, $r_{\text{moyen}} = 4\text{cm}$) pour 2 à 3 minutes. Le tout fut laissé à sécher dans la chambre anaérobie, sous atmosphère d'azote, pour empêcher l'oxydation et le vieillissement des oxydes de fer.

Préalablement aux analyses, l'échantillon séché (quelques mg) fut réduit en poudre à l'aide d'un pilon et d'un mortier en verre et de quelques gouttes d'isopropanol (ceci préserve la qualité de l'échantillon). Le tout fut ensuite pipeté sur un support possédant un faible bruit de

fond et laisser à sécher à l'air avant de procéder à l'analyse. Le spectre de diffraction fut enregistré pour une période de 1 heure trente sur axe rotatif afin d'être en mesure d'observer les changements cristallographiques associés au vieillissement des échantillons. Les pics obtenus furent ensuite comparés à ceux compris dans la base de données (Total access diffraction database, Philips Plus 41, 1991 PDF-2) ou dans la littérature pour identifier les solides formés.

2.4.4. Microscopie électronique en transmission

Quelques microscopes électroniques de haute performance, aux Universités de Guelph (Philips 300 et un Philips 400) et d'Ottawa (Phillips 200) ont été utilisés pour observer le développement des oxydes de fer à la surface des bactéries. Il a été possible de déterminer la morphologie puisque ces appareils permettent l'observation de très petites particules (de l'ordre du nm).

2.4.4.1. Préparation des échantillons

À chaque mois, 1.5 ml de solution fut prélevé et centrifugé (Eppendorf, Centrifuge 5415C) à 8700g +/- 2100g pour 2-3 minutes pour récupérer le culot bactérien. Celui-ci fut ensuite lavé 3 fois à l'eau ultrapure suivant la même méthode. Deux échantillons furent préparés de cette façon pour satisfaire aux deux méthodes différentes d'imprégnation.

2.4.4.2. Imprégnation au Nanoplaste

Tous les échantillons ont été imprégnés dans une mélamine hydrophile (Nanoplaste FB-101, Marivac, Halifax, Canada) suite à leur prélèvement. Cette mélamine permet l'imprégnation d'échantillons humides, sans phase de séchage préalable, ce qui réduit les possibilités de transformations structurales (Fortin, 1992; Lienemann et al., 1998). L'imprégnation des échantillons s'est fait en ajoutant quelques gouttes de la résine dans le tube Eppendorf contenant l'échantillon. Le mélange échantillon-résine, approximativement 0.5 ml, a ensuite été placé dans un moule en plastique de 1 cm par 0.5 cm. Le durcissement de la résine (dureté moyenne) s'est effectuée en deux étapes, soit en chauffant à 37-40°C pour 2 jours consécutifs et ensuite quelques heures à 60°C jusqu'à ce que la résine se détache du moule sans coller. Le film de Nanoplaste contenant l'échantillon était ensuite retiré du moule et encapsulé dans une résine époxy (TAAB 812, Marivac, Halifax, Canada). Le durcissement de cette résine (préparée pour dureté moyenne) s'est effectuée à 60°C pour une durée d'environ 12 heures.

Or, après vérification de la méthode originale d'imprégnation, il s'est avéré que le durcissement du mélange Nanoplaste-échantillon devait être fixé à 2 jours à 37°C, mais également à 2 jours à 60°C afin d'obtenir une imprégnation optimale (Liss et al., 1996; Leppard, 2001). La dernière étape d'encapsulation, dans le TAAB, s'accomplit pour une période minimale de 12 heures à 60°C. Cette erreur de temps de séchage à 60°C est apparue au début de l'expérience et n'a pas été corrigée par la suite.

2.4.4.3. Imprégnation pour échantillons déshydratés

Une autre façon d'imprégner, modifiée de Lienemann et al. (1998), fut utilisée pour observer le vieillissement des oxydes de fer. Celle-ci comporte des étapes de déshydratation puisque la résine utilisée est hydrophobe. Les cellules furent fixées au glutaraldéhyde 2% pour la nuit dans le tube Eppendorf à 4°C. Elles furent ensuite lavées en centrifugeant deux fois à l'eau ultrapure et fixées de nouveau à l'aide d'une solution de rouge de ruthénium (0.05% concentration finale) dans un tampon de Cacodylate de sodium (67 nM à pH:7) pour 2 heures. Les cellules furent ensuite nettoyées deux fois à l'eau avant d'être fixées au tétraoxyde d'Osmium (1.33% concentration finale) pour une heure. Les cellules furent ensuite lavées deux fois avant d'être mélangées à de l'agar 2% chaud (liquide) et solidifié sous forme de cylindres. Ceux-ci furent par la suite déshydratés avec de l'éthanol (25%, 50%, 75%, 95%, 99%, 99% et 99%) à défaut de 15 minutes à chacune des étapes. Après déshydratation, l'échantillon fut infiltré avec un mélange de résine époxy TAAB sans durcisseur (Résine TAAB 812 + MNA (Méthyl Nadic Anhydride) + DDSA (Dodécényl Succinic Anhydride)) et d'éthanol pour un ratio final de 50/50 et ce, pour une durée d'une heure. Par la suite, l'échantillon fut infiltré dans la résine sans durcisseur (DMP30: 2,4,6-tri(diméthylamino-méthyl phénol)) pour une période d'une heure. Un cylindre de chaque échantillon fut par la suite placé dans un moule de caoutchouc où il fut imprégné de résine époxy TABB (avec DMP30) et laissé à durcir pour la nuit à 60°C.

Cependant, après la lecture de l'ébauche de cette section par différents examinateurs, il a été établi que ce protocole s'avérait incorrect quant à l'ordre des différentes étapes employées et le mélange de certains réactifs. En effet, pour obtenir une préservation cellulaire

maximale, les directives auraient dû considérer, tout d'abord, une imprégnation de l'échantillon à l'aide d'un mélange de glutaraldéhyde et de rouge de ruthénium pour une première fixation de l'ordre de deux heures (Leppard et al., 1996; Liss et al., 1996). Il est à noter que le glutéraldéhyde incorpore un tampon de cacodylate de sodium ajusté à un pH avoisinant la neutralité. Le tout est par la suite centrifugé et rincé, au moins à deux reprises, à l'aide du tampon de cacodylate de sodium. Par la suite, le culot bactérien est mis en contact avec le fixatif secondaire, le trétroxyde d'osmium (1.33% en concentration finale) dans la solution tampon de cacodylate de sodium pour une durée de deux heures (Leppard et al., 1996; Liss et al., 1996). Le tout est ensuite centrifugé et le surnageant est alors récupéré. Les étapes de déshydratation et d'imprégnation suivent le protocole établi préalablement.

2.4.4.4. Préparation des micro-sections

Cette étape est nécessaire aux observations morphologiques afin d'avoir une bonne résolution de l'image. La technique de préparation des micro-sections, apprise à l'Université de Guelph, consistait à couper l'échantillon en minces sections à l'aide d'un couteau à diamant monté sur un microtome Servall Porter-Blum MT1. L'épaisseur des sections a été estimée à l'aide de la classification des couleurs de Peachey (Peachey, 1958). Les sections utilisées pour l'observation au microscope électronique à transmission avaient une épaisseur moyenne de 50-70 nm et une couleur dorée à argentée. Plusieurs sections ont été déposées sur un support en cuivre ou en nickel recouvert d'une couche de formvar et d'un mince film de carbone. Pour accentuer le contraste de certains échantillons, un traitement de 5 minutes avec une solution d'acétate d'uranyl 1% a été effectué.

2.4.4.5. Analyses par énergie dispersive (EDS)

Cette technique consiste à focaliser un mince faisceau d'électrons sur une très petite portion de l'échantillon forçant ainsi la surface à émettre des rayons X, dont la longueur d'onde est spécifique à chaque élément présent dans l'échantillon. Les particules possédant une plus petite surface que le faisceau lumineux ne pourront être analysées quantitativement, puisque la matrice environnante sera également prise en ligne de compte. L'ordinateur relié au microscope a éprouvé quelques problèmes techniques; les analyses EDS furent disponibles que pour certains échantillons. Les analyses ont été effectuées à 100 kV pendant 100 secondes avec un détecteur Link Analytical LZ5.

2.4.4.6. Observations par microscopie électronique à transmission (MET)

Afin de mieux identifier les effets des différents modes d'imprégnation sur les cellules et les oxydes de fer, quelques observations immédiates ont été effectuées à l'Université d'Ottawa. Une goutte de la suspension fut prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et déposée sur un support de cuivre recouvert de minces films de formvar et de carbone. La goutte fut laissée à sécher pour quelques heures. Les échantillons furent observés à l'aide d'un microscope électronique Philips 200, opéré à 80kV, au département de Biologie de l'Université d'Ottawa .

3. RÉSULTATS

3.1. Culture des bactéries

Étant donné que la réussite de l'expérience reposait sur des conditions initiales optimales, plusieurs essais ont été réalisés dans le but d'obtenir des résultats reproductibles. Plusieurs facteurs devaient être considérés pour respecter ce dernier critère. Pour s'assurer de pouvoir comparer les différentes souches bactériennes utilisées, leur phase de croissance devait être identique lors de la mise en bouteille initiale. En effet, certaines études tendent à démontrer que la phase de croissance de la bactérie affecte grandement le taux de métal pouvant être sorbé à sa surface (Daughney et al., 2001). En effet, *Bacillus subtilis* favorise l'adsorption d'une espèce chargée en solution lorsqu'elle atteint sa phase exponentielle au détriment de la phase stationnaire ou de la période de formation de spores. Par contre, l'adsorption d'une espèce neutre en solution ne serait aucunement avantagée par la phase de croissance des bactéries (Daughney et al., soumis). Dans le cas présent, la phase exponentielle est importante puisque l'adsorption du Fe(II) et du Fe(III) représente une des problématiques importantes de la recherche en laboratoire.

3.1.1. Courbes de croissance bactérienne

Les bactéries mises en bouteille, au début de l'expérience, ont été soumises à des conditions respectant le protocole de laboratoire initial (Section 2.1). Une courbe de croissance mettant en relation l'absorbance mesurée de la solution et le temps écoulé depuis l'inoculation initiale fut effectuée pour chacune des souches afin de déterminer le moment exact de leur retrait du milieu nutritif pour obtenir des bactéries au même stade de développement. Dans le cas présent, il fallait obtenir les bactéries au début de la phase

stationnaire et à la fin de la phase exponentielle, considérant que la quantité de métaux sorbé à leur surface est quasi optimale. Les résultats sont donnés à la figure 3.1. La croissance des bactéries s'est avérée dépendante de la vitesse de rotation du milieu de culture et celui-ci fut soumis à une vitesse constante de 100 rpm sur une plaque rotative.

3.1.2. Poids sec des bactéries

Considérant que chacune des espèces bactériennes possède des caractéristiques qui lui sont propres en terme de taille et de poids, il est présumé qu'une densité optique similaire de différentes souches ne donnera pas un nombre identique de bactéries. Le nombre de surfaces de nucléation ne sera donc pas le même pour les différents systèmes. Pour tenter de résoudre ce dilemme, la technique du poids sec permet de comparer le poids sec des bactéries en fonction d'une densité optique connue (Tableau 3.1) et par la suite, d'établir une approximation du nombre de surface de nucléation, car un poids plus élevé devrait contenir davantage de cellules.

Tableau 3.1 Poids sec des bactéries à l'étude correspondants à une densité optique de 0.3.

Bactérie	Poids sec (mg/L) Pour 50 ml	Variance	Moyenne (mg/L) Pour 500 ml
<i>Escherichia coli</i>	A. 0.0057	1.8E-07	0.0578 +/- 0.0010
	B. 0.0057	1.25E-07	
	C. 0.00595	2E-08	
<i>Bacillus subtilis</i>	A. 0.00515	2E-08	0.0503 +/- 0.0004
	B. 0.0049	5E-09	
<i>Bacillus licheniformis</i>	A. 0.00575	8E-08	0.0580 +/- 0.0007
	B. 0.00605	2E-08	
	C. 0.0056	4.5E-08	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A. 0.00625	8E-08	0.0617 +/- 0.0007
	B. 0.0062	2E-08	
	C. 0.00605	4.5E-08	

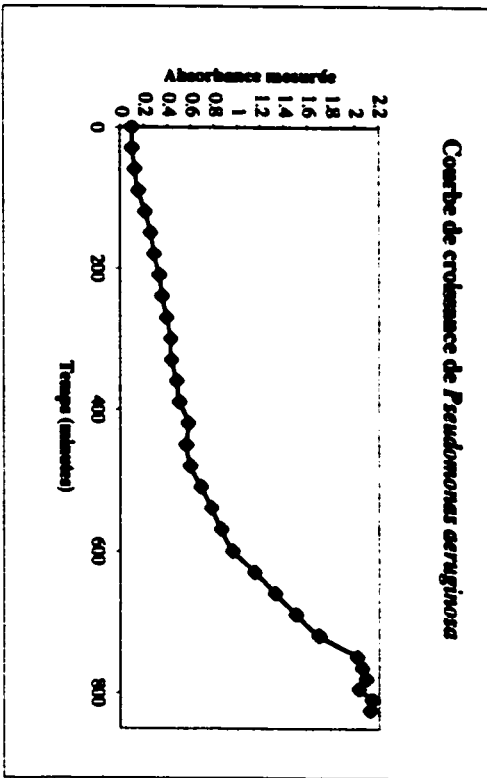
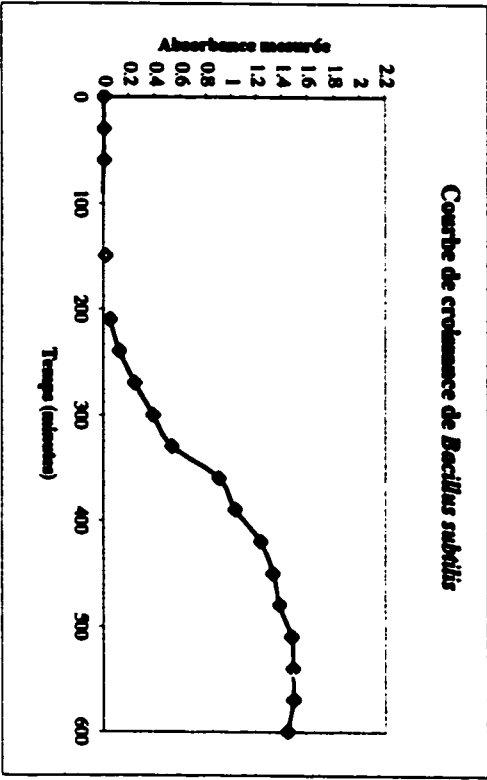
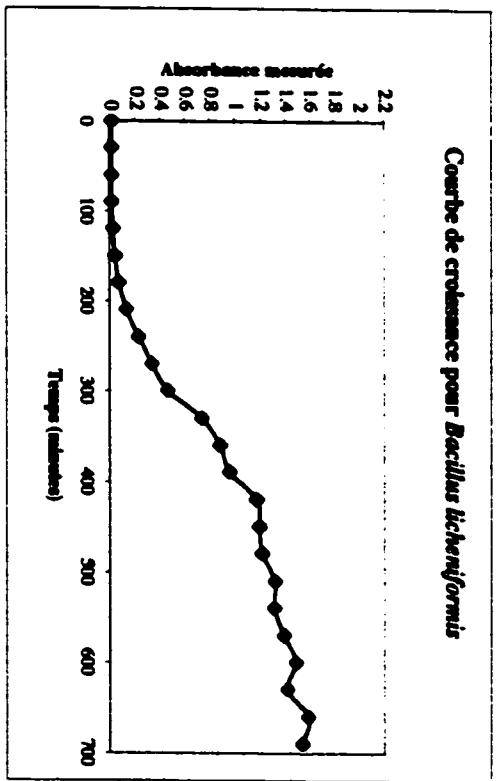
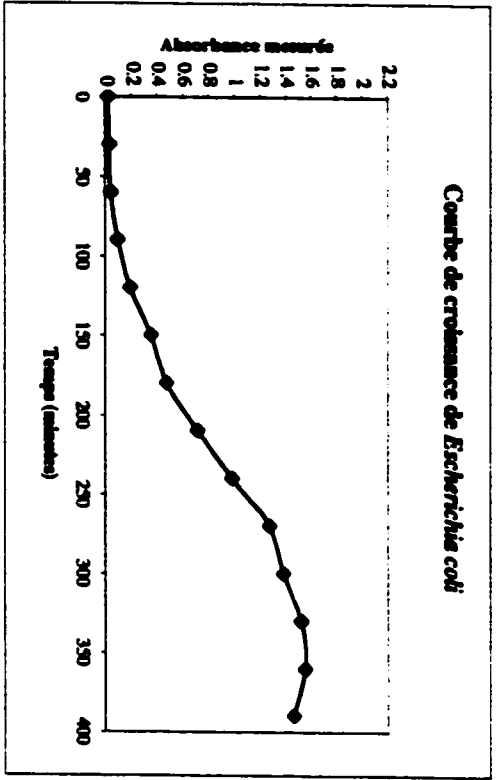


Figure 3.1 Courbes de croissance des différentes bactéries à l'étude.

Selon les données recueillies, il semble, à priori, que la présence d'exopolymères (*B. licheniformis* et *P. aeruginosa*) ne peut, à elle seule, expliquer les différences de poids retrouvées. Le plus grand poids recueilli en ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa* peut être expliqué par le fait que cette bactérie représente la plus petite espèce à l'étude, impliquant une plus grande quantité de cellules pour obtenir la même densité optique. Pour effectuer les calculs, la variance fut utilisée à des fins arithmétiques puisqu'une moyenne d'écart-type est problématique. Effectuer une moyenne des variances pour ensuite faire une conversion en écart-type donne des résultats beaucoup plus justes (Robin, 2000).

3.1.3. Comptes de cellules (DAPI)

Pour être en mesure de comparer les résultats entre les différentes souches bactériennes, la technique des comptes de cellules est aussi acceptable. De façon aléatoire, le nombre de bactéries comprises en solution (densité optique de 0.3) peut être déterminé en dénombrant, par microscopie en épifluorescence, leur quantité dans une petite portion du volume, dilué (ici par un facteur de 1000) et ajusté au volume final par la suite (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 Dénombrement des cellules présentes en solution selon la technique de DAPI.

Bactérie	Dénombrement Cellules/ml	Variance Cellules/ml	Nombre moyen de cellules/ml
<i>Escherichia coli</i>	2.7702×10^8	4.8515×10^9	2.1182×10^8 +/- 5.1718×10^4
	1.7913×10^8	1.2197×10^9	
	1.7931×10^8	1.9530×10^9	
<i>Bacillus subtilis</i>	1.7108×10^8	8.6523×10^8	1.6750×10^8 +/- 2.9711×10^4
	1.6392×10^8	9.0026×10^8	
<i>Bacillus licheniformis</i>	2.6664×10^8	1.9419×10^9	2.5805×10^8 +/- 5.1000×10^4
	2.4946×10^8	3.2600×10^9	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.9114×10^8	1.2748×10^9	9.9114×10^8 +/- 5.1809×10^4
	9.9114×10^8	4.0935×10^9	

Selon les résultats obtenus, il est évident que le compte de cellules appuie le poids sec trouvé en 3.1.2. En effet, *Pseudomonas aeruginosa* possède le plus grand nombre de cellules par unité de surface, ce qui en fait d'elle, le plus petit spécimen utilisé lors de cette expérience et également, une plus grande quantité de surface de nucléation pour les oxydes de fer biogéniques. Ainsi, l'ordre de grandeur des bactéries va comme suit en ordre décroissant: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les exopolymères n'ont apparemment pas affectés les résultats obtenus.

3.2. Analyses chimiques

3.2.1. Vérifications mensuelles du pH et du potentiel rédox

La détermination des conditions du milieu (oxydantes ou réductrices, acides ou basiques) fut établie à l'aide d'une mesure de potentiel rédox et de pH mensuelle. Cette information est essentielle pour tenter d'expliquer la formation possible d'oxydes en conditions neutres ou leur dissolution sous conditions acides ou réductrices. L'évolution du milieu pour la durée de cette étude fut évalué en disposant les différentes valeurs sous forme de graphiques (Figures 3.2 et 3.3).

L'électrode de pH a toujours donné des résultats exacts et précis tout au long de cette recherche. Cependant, il faut préciser qu'à quelques reprises, il y a eu changement d'électrodes utilisées pour des raisons pratiques. Les systèmes contenant du fer en concentration $10^{-4}M$ sont devenus acides au fil des mois alors que le système contenant de la silice démontraient

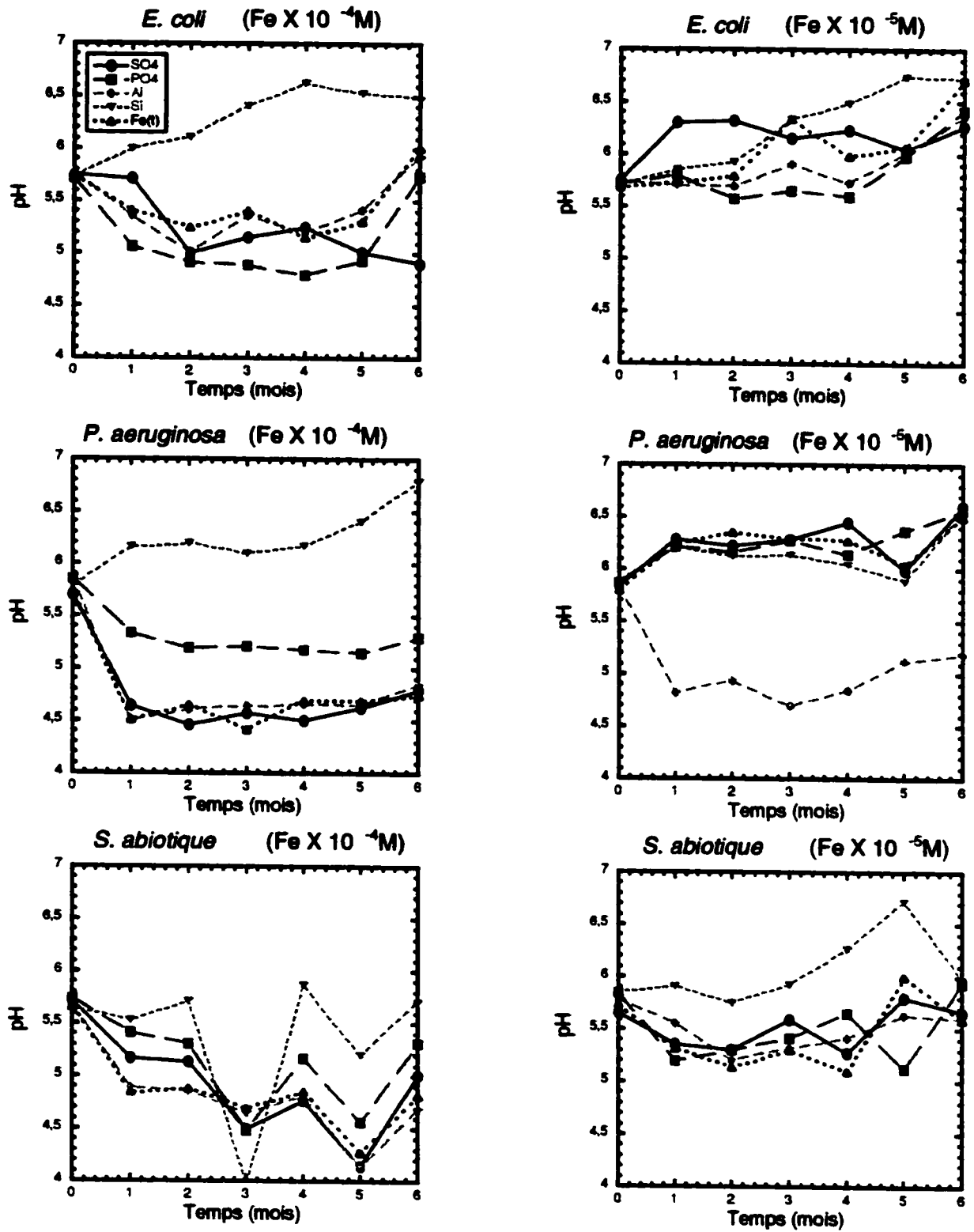


Figure 3.2 Évolution du pH dans les systèmes à l'étude pour la durée de l'expérience

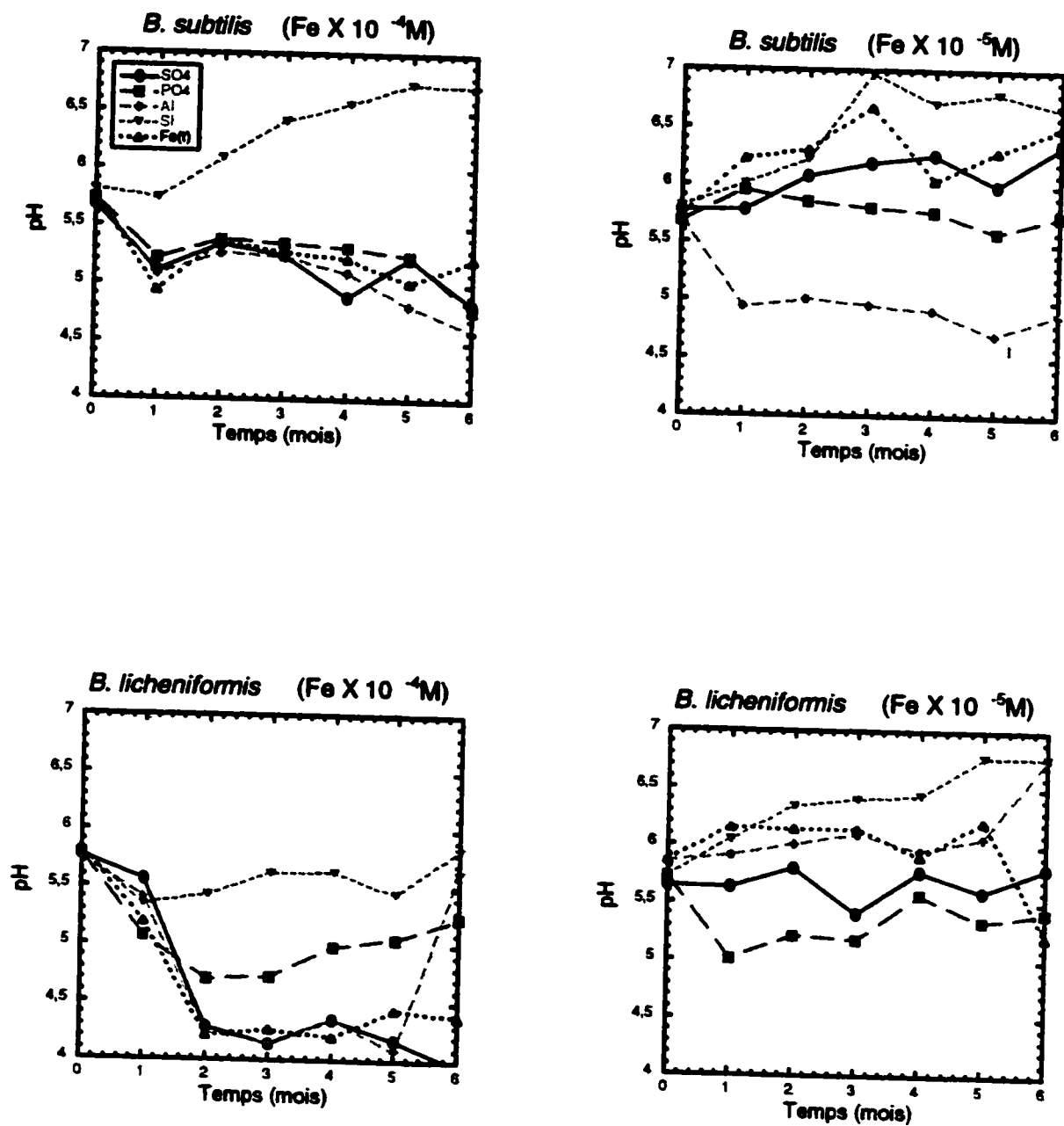


Figure 3.2 Évolution du pH dans les systèmes à l'étude pour la durée de l'expérience

des conditions davantage basiques dès le départ (Figure 3.2). L'évolution des systèmes comprenant du fer à une concentration $10^{-5}M$ variait selon l'impureté introduite ainsi que la souche bactérienne. Ainsi, les systèmes contenant du phosphate ont semblé favoriser des conditions acides excepté quand il y avait présence de *P. aeruginosa*. Dans ce dernier cas, l'aluminium seulement a favorisé des conditions acides (Figure 3.2). En règle générale, les systèmes $10^{-5}M$ ont semblé préférer une faible hausse du pH au fil des mois. Le silicium fut toujours le système le plus basique en bout de ligne, quel que soit la bactérie impliquée.

L'électrode du potentiel rédox a, quant à elle, donné des résultats fluctuants et deux électrodes différentes furent également utilisées lors de l'étude. Autant que possible, les bouteilles furent maintenues stables afin d'obtenir une lecture représentative du milieu en solution. Dans la plupart des cas, la vérification initiale des électrodes correspondait à la valeur du tampon dans une étendue de +/- 35 mV. Il faut d'ailleurs mentionner que les résultats ont été corrigés par rapport à l'électrode de référence suivant l'équation 3.1.

$$\text{Valeur mesurée} + 199 \text{ mv} = \text{valeur corrigée} \quad (\text{Équation 3.1})$$

Les systèmes contenant du fer en concentration $10^{-4}M$ ont réagi de façon distincte: les bactéries Gram- positives ont favorisé une réduction du potentiel rédox dans le temps (anoxique) tandis que les Gram- négatives et le contrôle ont présenté une hausse du potentiel rédox (oxique) (Figure 3.3). En ce qui concerne les systèmes renfermant du fer en concentration $10^{-5}M$, les conditions réductrices furent toujours privilégiées à l'exception des contrôles abiotiques qui favorisèrent des conditions oxiques (Figure 3.3).

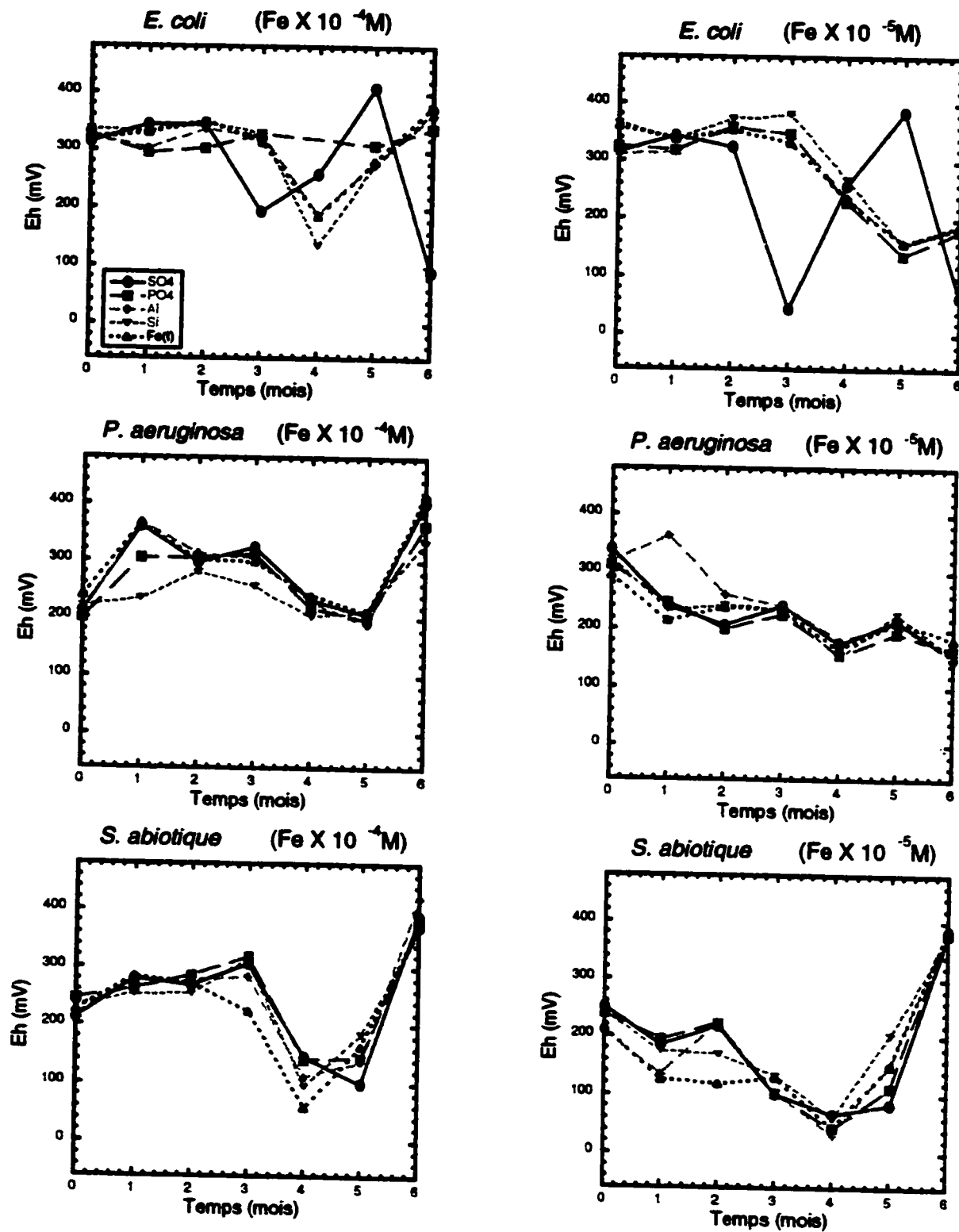


Figure 3.3 Évolution du potentiel rédox (Eh) dans les systèmes à l'étude pour la durée de l'expérience. Valeurs corrigées (+199mV).

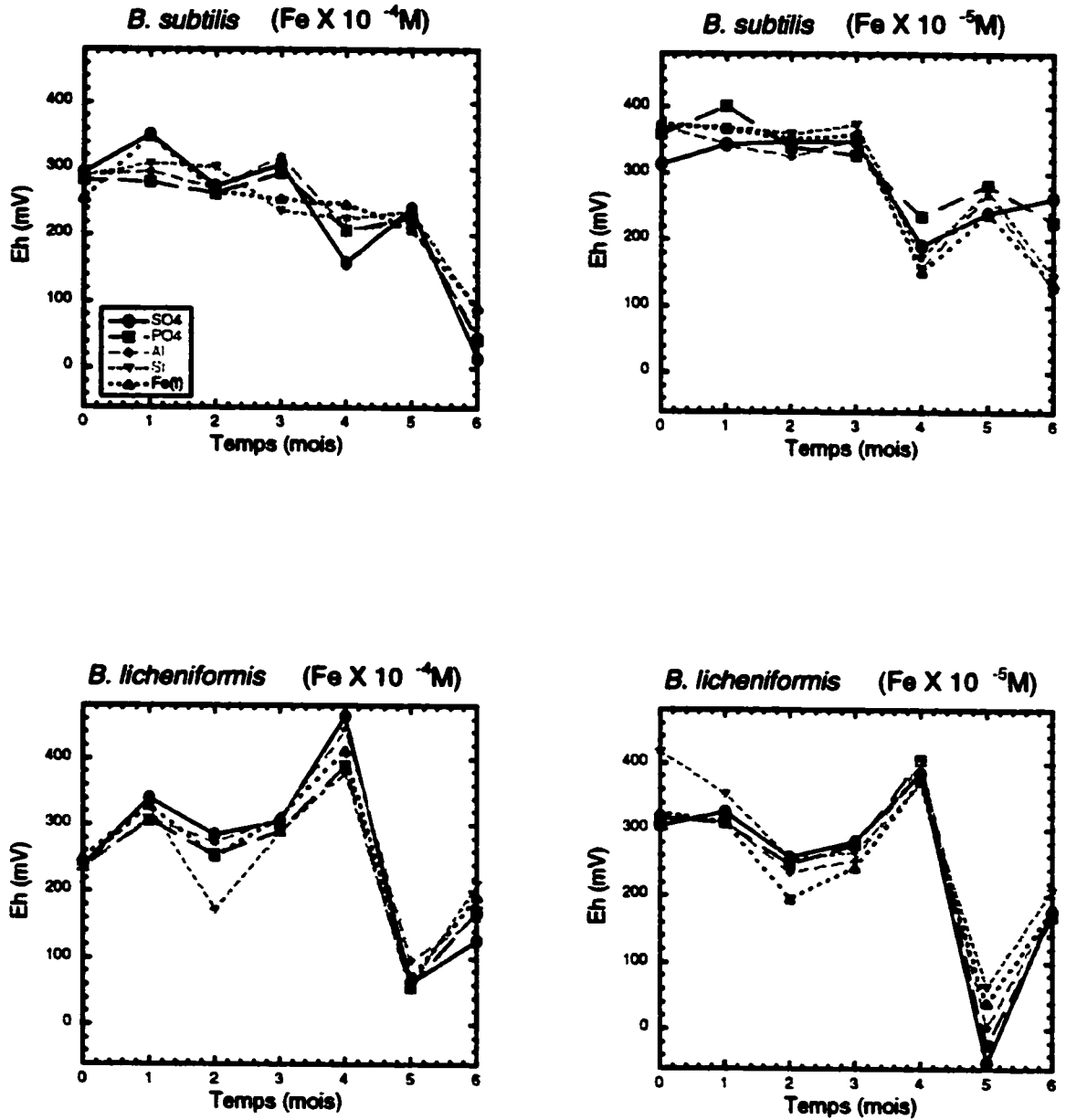


Figure 3.3 Évolution du potentiel rédox (Eh) dans les systèmes à l'étude pour la durée de l'expérience. Valeurs corrigées (+199mV).

3.2.2. Analyses d'espèces dissoutes

3.2.2.1. Analyses des impuretés

La méthode colorimétrique du HACH fut utilisée afin de déterminer les concentrations des différents éléments en solution. Cette méthode fut préférée aux méthodes de ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) et A.A. (Absorption atomique) pour des raisons de rapidité d'analyse et de faible coût associé. Le suivi des concentrations dissoutes a servi à identifier des éléments qui sont adsorbés, précipités ou retournés en solution au fil du temps par rapport à la concentration initiale des éléments ajoutés au départ (Tableau 3.3). Les concentrations des éléments d'importance ont été déterminées mensuellement et mises en parallèle par la suite afin de déterminer l'évolution chimique de chacun des systèmes. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques (Figure 3.4), mettant en relation chacun des élément en solution avec le système dans lequel l'addition a eu lieu préalablement.

Tableau 3.3 Concentrations initiales totales des éléments retrouvés dans les différents systèmes

Éléments	Moyennes des concentrations totales (M)	Écart-type (M)
Fer (10^{-6} M)	1.53×10^{-5}	4.56×10^{-6}
Fer (10^{-4} M)	9.23×10^{-4}	1.68×10^{-5}
SO ₄ (10^{-4} M)	1.69×10^{-4}	6.80×10^{-5}
PO ₄ (10^{-4} M)	2.21×10^{-5}	1.99×10^{-5}
Si (10^{-3} M)	1.77×10^{-3}	7.20×10^{-4}
Al (10^{-7} M)	Non mesurée	Non mesurée

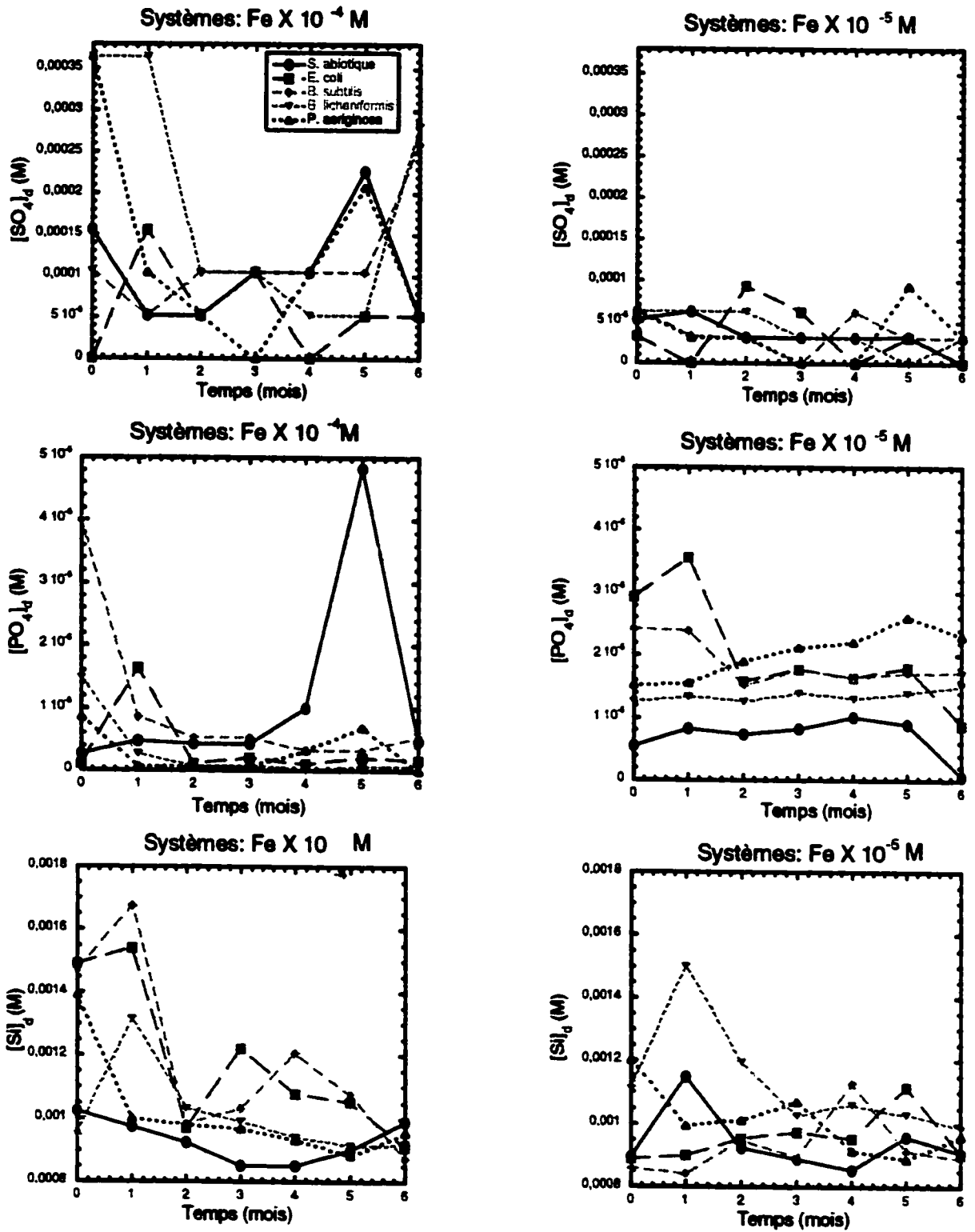


Figure 3.4 Évolution de la concentration des impuretés (SO_4 , PO_4 et Si) totales dissoutes sur une période de 6 mois dans chacun des systèmes à l'étude.

Sulfate

L'évolution de la concentration du sulfate (à une concentration initiale de 10^{-4}M) en solution fut tout d'abord évaluée à l'aide de la méthode du HACH. Cependant, il est apparu rapidement que les valeurs trouvées correspondaient à la limite de détection de cet appareil. Pour remédier à cette situation, une analyse complémentaire des échantillons acidifiés toujours disponibles fut effectuée à l'aide de la méthode de la turbidité (analyse à l'aide de barium). Les résultats de cette méthode, ainsi qu'une comparaison avec la méthode du HACH sont démontrés en Annexe C. Ici, seulement les résultats obtenus par la méthode du HACH sont conservés puisque tous les échantillons furent analysés, contrairement à la méthode de la turbidité. Par contre, la variabilité pourrait être reliée de près à une erreur analytique. D'après les résultats obtenus pour les systèmes contenant une concentration de fer de 10^{-4}M , la concentration de sulfate en solution a fluctué énormément, démontrant à certains endroits des concentrations extrêmes (Figure 3.4). Si ces données ne sont pas considérées, la tendance générale démontre des conditions de stabilité dans le temps. Les fluctuations du sulfate (données extrêmes) en solution représentent des valeurs plus élevées que les concentrations de sulfate ajoutée initialement dans les systèmes (Tableau 3.3).

Dans les systèmes contenant du fer à une concentration de 10^{-5}M , le sulfate était présent en plus faible quantité en solution. En se basant sur la concentration de cet élément introduite au départ, moins de la moitié était en solution au temps initial (Figure 3.4). Au cours de l'expérience, la concentration de cet élément tendait à diminuer sensiblement (Figure 3.4). Toutefois, cette diminution fut progressive dans le temps sans aucune fluctuation intense

comme pour les systèmes 10^{-4} M. L'incorporation ou la sorption aux différents oxydes de fer serait minime.

Phosphate

Le phosphate (à une concentration initiale de 10^{-5} M) a démontré différentes concentrations de départ en solution en relation avec la souche bactérienne impliquée dans le système (Tableau 3.3). Ainsi, pour une concentration de fer de 10^{-4} M, le système abiotique et celui contenant la bactérie *E.coli* ont obtenu une concentration soluble de départ inférieure à la moitié de la concentration totale mesurée au début (Tableau 3.3). Ce sont également les deux seuls systèmes qui ont favorisé un retour en solution du phosphate au fil du temps, puisque les concentrations en solution ont augmenté au temps final (Figure 3.4). Tous les autres systèmes possédaient une concentration aqueuse initiale approximative à la quantité introduite initialement et tendaient à former des précipités puisque cette valeur a chuté énormément au temps final (Figure 3.4).

En ce qui a trait aux systèmes renfermant une concentration de fer de 10^{-5} M, l'évolution de la concentration de phosphate a indiqué des conditions de stabilité dans le temps (Figure 3.4). La tendance générale voulait que la concentration initiale de phosphate en solution soit approximativement le double de la concentration retrouvée en solution à la fin de l'expérience. La seule exception à cette règle concerne le système contenant *B. licheniformis* qui a atteint une concentration finale de phosphate relativement près de la concentration totale initiale et qui a conservé une forte concentration soluble de cet élément tout au long de l'expérience (Figure 3.4). Il faut également remarquer ici que les systèmes abiotiques

possédaient, pour les deux concentrations de fer ajoutées, une faible concentration de phosphate en solution (Figure 3.4).

Silicium

Le silicium (à une concentration initiale de 10^{-3}M), au temps initial dans les systèmes 10^{-4}M , a déployé une concentration approximative en solution légèrement plus élevée que la moitié de la concentration totale introduite au départ (Tableau 3.3). La concentration finale était légèrement inférieure à la concentration de départ (Figure 3.4). Le système abiotique seulement a conservé la totalité ou presque du silicium en solution tout au long de l'expérience (Figure 3.4).

L'évolution du silicium en solution dans les systèmes 10^{-5}M fut également stable au fil des mois, n'illustrant que très peu de variations (Figure 3.4). Le silicium soluble retrouvé dans les systèmes abiotiques était présent dans des concentrations plus faibles que pour les systèmes biotiques. Quatre systèmes ont retourné, à un moment ou l'autre, cet élément en solution faisant augmenter faiblement la concentration en solution (Figure 3.4). Seul le système renfermant *B. licheniformis* a préféré une faible précipitation (Figure 3.4).

Aluminium

L'aluminium fut choisi au départ parce qu'il représentait un facteur pouvant affecter la morphologie et la stabilité des oxydes de fer en solution. Cependant, son analyse chimique s'est avérée impossible puisque la concentration représentative du milieu naturel (10^{-7}M) est située sous la limite de détection de l'appareil par méthode colorimétrique. L'analyse par ICP-

MS fut également rejetée pour des raisons similaires. La concentration de l'aluminium ne fut donc pas déterminée, mais les systèmes furent conservés à des fins de comparaisons ultérieures au niveau de la morphologie et de la cristallographie des oxydes de fer.

3.2.2.2. Analyses du fer total en solution

Une analyse mensuelle du fer dissout en solution fut effectuée pour tous les systèmes. Une analyse complémentaire fut effectuée à l'aide de l'absorption atomique (A.A.) (Annexe D) à des fins de comparaisons sur les échantillons restants. La méthode colorimétrique fut retenue ici puisqu'elle possède une meilleure limite de détection et que tous les échantillons sont représentés. La méthode de l'absorption atomique se voulait seulement un élément de comparaison afin de vérifier la reproductibilité de la méthode colorimétrique. Les résultats de cette dernière sont présentés sous forme de graphiques en fonction de l'impureté contenu dans le milieu (Figure 3.5).

Systemes contenant 10^{-4} M Fe

La tendance générale a démontré une certaine décroissance dans la concentration du fer retrouvée en solution au fil des mois. Cela suppose donc une précipitation ou une adsorption minimale entre chaque période d'échantillonnage. La quantité de fer total toujours disponible en solution variait selon l'impureté introduite ainsi qu'en fonction de la souche de bactéries présente dans le système. D'après les résultats obtenus, les systèmes contenant *B.licheniformis* possédaient la plus forte concentration de fer en solution en fonction du temps, après les systèmes abiotiques (Figure 3.5). Au deuxième rang, *B. subtilis* selon l'impureté contenue dans le système et *P.aeruginosa* s'échangeaient cette position à tour de

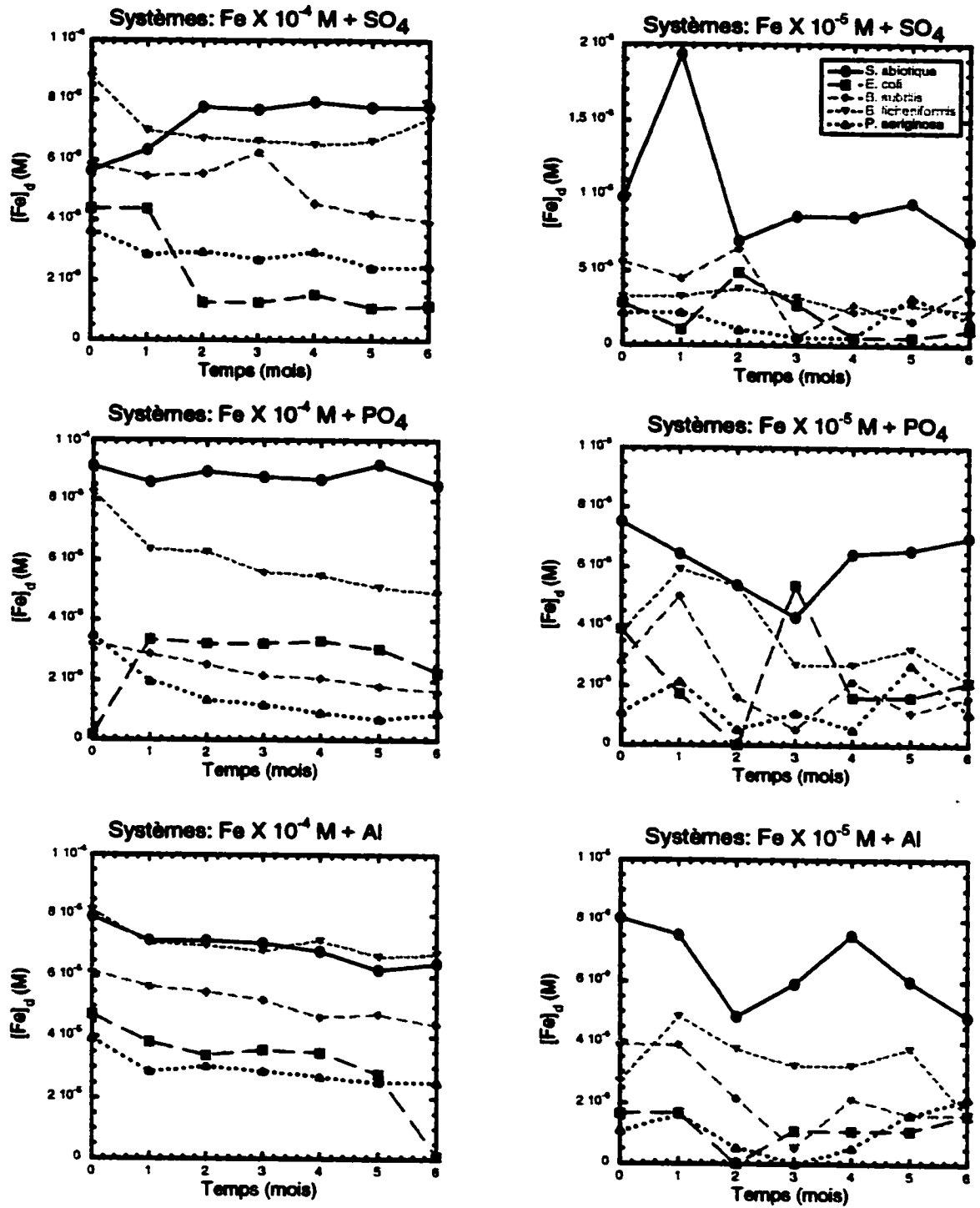


Figure 3.5 Évolution de la concentration du fer total dissout sur une période de 6 mois dans chacun des systèmes à l'étude.

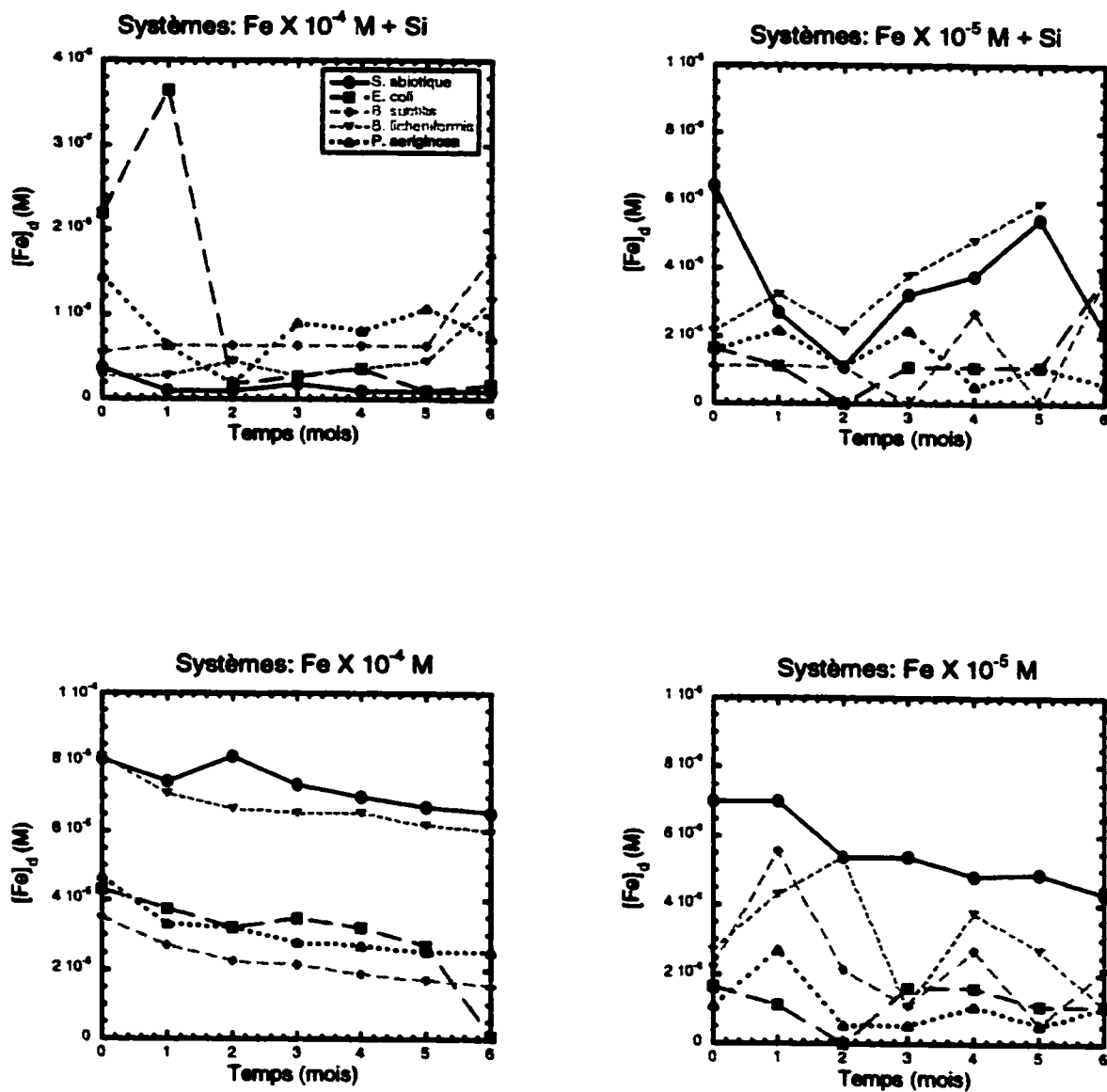


Figure 3.5 Évolution de la concentration du fer total dissout sur une période de 6 mois dans chacun des systèmes à l'étude.

rôle (Figure 3.5). Finalement, dans la plupart des cas, les systèmes contenant *E.coli* représentaient les systèmes où la concentration de fer soluble était la plus faible avec une concentration de fer minimale à la fin de l'expérience (Figure 3.5).

En excluant les systèmes contenant du silicium, la concentration de fer en solution dépendait aussi de l'impureté introduite en solution. Il y avait moins de fer en solution dans le cas de *E.coli* dans les systèmes avec du SO_4 , pour *P.aeruginosa* et *B.subtilis* c'était en présence de PO_4 et finalement pour *B.licheniformis*, l'élément aluminium a influencé la faible concentration de fer retrouvé (Figure 3.5).

De plus, les systèmes abiotiques possédaient toujours une concentration de fer en solution plus élevée que les systèmes comportant des bactéries, appuyant l'hypothèse de la sorption bactérienne (Figure 3.5). Dans le cas du silicium, il faut remarquer que le système abiotique ne comportait que peu de fer en solution comparativement aux autres systèmes ayant des bactéries.

Systemes contenant 10^{-5}M Fe

Les systèmes contenant du fer à une concentration initiale de 10^{-5}M ont favorisé une diminution de la concentration de fer dissout au fil du temps (Figure 3.5). Par contre, cette diminution fut minimale et dans certains cas, la stabilité des conditions pour la période de l'étude a pu être observée (Figure 3.5).

La souche bactérienne ayant favorisé une grande concentration de fer dissout en solution est difficile à établir avec certitude. En effet, lorsqu'il y a présence de sulfate, *E.coli* a favorisé une faible concentration de fer dissout à la fin de l'expérience. En présence de phosphate et de silicium, *P.aeruginosa* a favorisé une précipitation avec un faible taux de fer en solution (Figure 3.5). *B. licheniformis* à, quant à elle, favorisée une faible dissolution dans les systèmes contenant de l'aluminium et du fer seulement avec une faible augmentation des concentrations respectives. En tout et partout, les systèmes contenant *B. subtilis* ont toujours déployé une concentration appréciable de fer en solution (Figure 3.5). Or, il faut noter que les concentrations de fer dissout retrouvées dans les systèmes contenant une concentration de fer total initiale 10^{-5} M furent toujours, en général, plus faibles que celles des systèmes contenant du fer à une concentration totale initiale de 10^{-4} M (Figure 3.5).

Les systèmes contenant du silicium ont semblé parfois préférer une plus grande concentration de fer dissout à la fin de l'expérience. Ainsi, pour les systèmes composés de *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis*, cette conclusion a pu être établie. De plus, les systèmes abiotiques sont toujours ceux qui ont obtenu la plus grande concentration de fer dissout et ce, quel que soit l'impureté présente dans les bouteilles.

3.2.2.3. Analyses du fer(II) en solution

Ce n'est pas tout le fer en solution qui est capable de participer à la formation des oxydes de fer. En effet, seul la composante Fe(III) est nécessaire dans la formation de ces particules. Une mesure directe de la quantité de cet élément en solution peut aider à prédire s'il y aura formation d'oxydes à la surface des bactéries et dans le système. La méthode

colorimétrique du HACH permet, à l'aide d'un réactif de phénanthroline, de déterminer la portion de Fe(II) présente en solution au temps donné. En soustrayant cette valeur de la concentration totale de fer présent en solution, il est également possible de connaître l'apport de Fe(III) à la formation de futurs oxydes de fer. Le Fe(II) fut déterminé mensuellement à l'aide de cette méthode et les résultats apparaissent à la figure 3.6.

Les systèmes contenant du fer à un niveau initial de 10^{-4} M ont démontré des fluctuations pas très évidentes dans le temps. Il semblait, en effet, qu'*E.coli* et *B. subtilis* aient réagi de façon différente, selon l'impureté introduite en solution. Ainsi, à l'exception des systèmes contenant du silicium où la concentration de Fe(II) en solution a diminué dans le temps, ces deux souches bactériennes ont montré une augmentation de la concentration de Fe(II), en présence de SO_4 , PO_4 et Al pour *E.coli* et en présence de SO_4 et Al pour *B. subtilis* (Figure 3.6). Ceci laisse supposer une réduction du Fe(III) au fil des mois ou encore un relargage de fer en solution. Pour les deux autres souches et le contrôle abiotique, la concentration de Fe(II) en solution a baissé au fur et à mesure que l'expérience a progressé. En ce qui a trait à *B. licheniformis*, la réduction de la concentration de Fe(II) a toujours mené à la disparition de cette espèce, en solution, à la fin de l'expérience (Figure 3.6). Les fluctuations étaient beaucoup plus visibles pour ces systèmes que ceux à 10^{-5} M (Figure 3.6).

À première vue, tous les systèmes contenant du fer en concentration initiale de 10^{-5} M ont réagi de la même façon en ce qui concerne le Fe(II) présent en solution. En effet, pour tous, une diminution du Fe(II) en solution au fil des mois est remarquée (Figure 3.6), ce qui

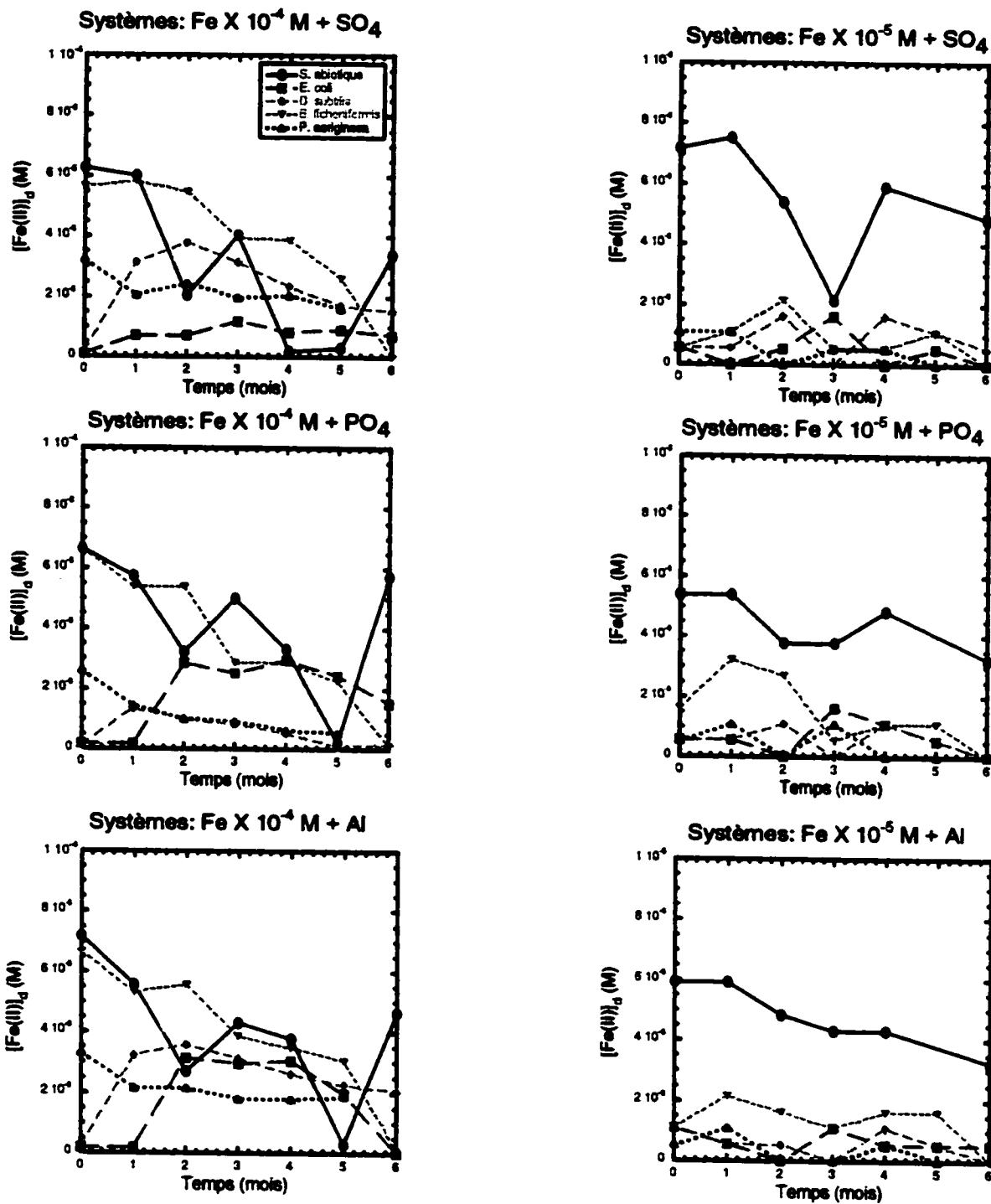


Figure 3.6 Évolution de la concentration totale dissoute de Fe(II) dans chacun des systèmes sur une période de 6 mois selon la méthode colorimétrique du HACH.

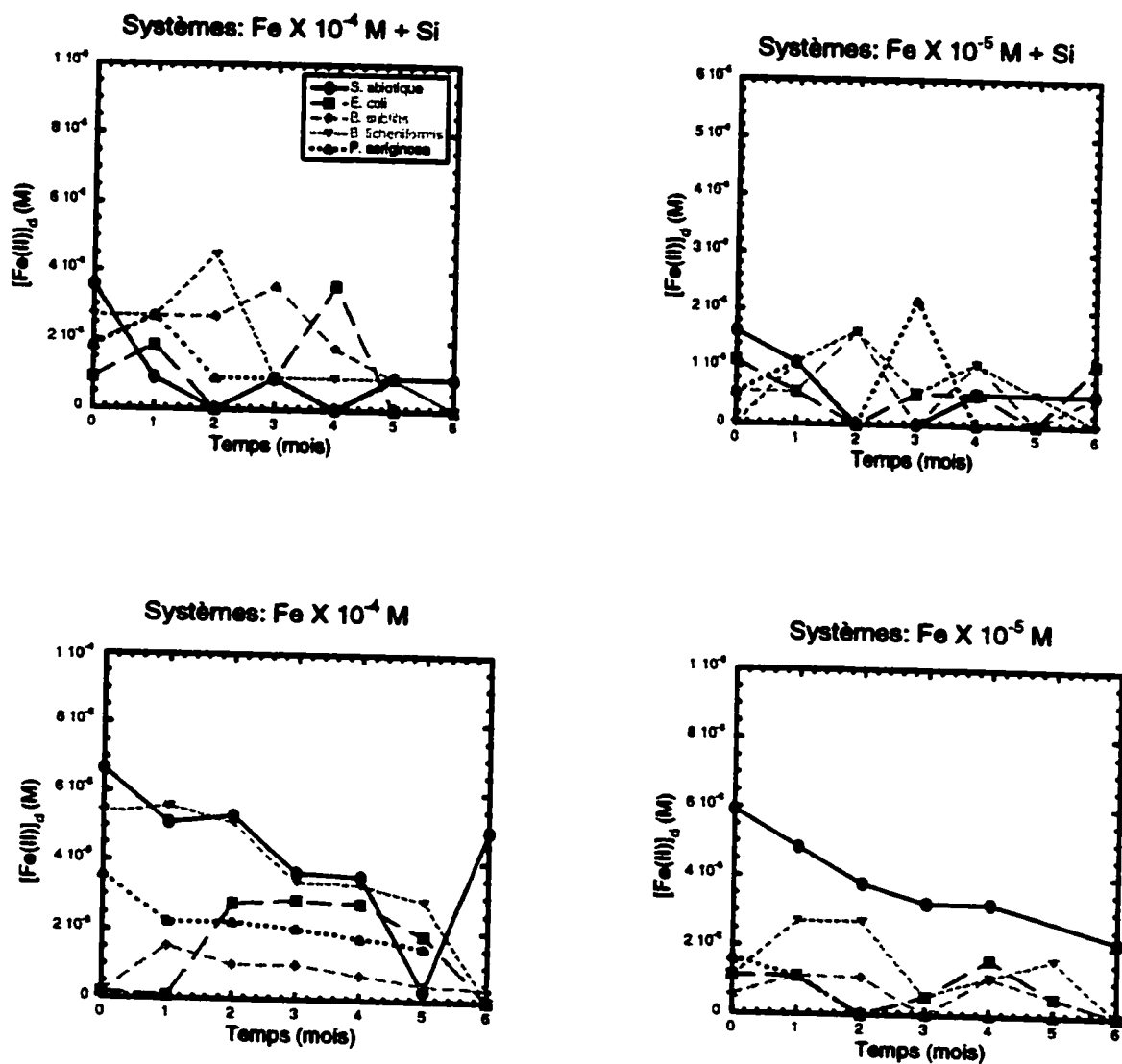


Figure 3.6 Évolution de la concentration totale dissoute de Fe(II) dans chacun des systèmes sur une période de 6 mois selon la méthode colorimétrique du HACH.

suppose une oxydation du Fe(II) en Fe(III) ou encore une sorption ou une précipitation dans le milieu. Il peut également être remarqué que les changements sont faibles, plusieurs systèmes démontrant en fait des conditions d'équilibre au fil des mois. Il faut toutefois mentionner que les faibles fluctuations observées pourraient être reliées de près à la limite de détection de l'appareil.

Il est important de noter également que les systèmes abiotiques ont toujours été ceux qui contenaient la plus grande concentration de Fe(II) en solution, et ce à tout moment, pendant notre étude (Figure 3.6).

3.2.2.4. Vérification de l'exactitude et de la précision du HACH

Des tests cherchant à démontrer la précision du HACH furent effectués afin de cerner la valeur analytique des concentrations trouvées. Dans tous les cas, une lecture fut prise à deux reprises et s'avérait identique ou déviante de 0.01mg/L (aussi la limite de détection de l'appareil).

L'exactitude du HACH fut également mise à l'épreuve en effectuant une vérification des lectures quelques mois après l'analyse initiale. En effet, plusieurs mois après leur analyse, soixante-cinq (65) échantillons furent soumis à nouveau à une lecture de concentration de fer dissout en solution à l'aide du HACH. Dans la plupart des cas, les valeurs variaient sensiblement des lectures initiales, la variation augmentant grandement en s'approchant de la limite de détection de l'appareil. Les résultats de ces deux tests sont disponibles en Annexe E.

3.2.3. Analyses d'espèces totales

3.2.3.1. Concentrations des impuretés et du fer total en solution

Deux concentrations de fer ont été retenues pour atteindre les buts fixés par cette expérimentation en laboratoire. Lors de l'introduction des éléments en solution à l'aide de solutions concentrées, une analyse de la concentration totale fut effectuée afin de connaître la véritable concentration des éléments ajoutés en solution. Les valeurs de ces concentrations sont données au Tableau 3.3.

3.2.3.2. Concentration du Fe(II) au début de l'expérience

Il est essentiel de connaître la concentration de Fe(II) total présent en solution au démarrage de l'expérience afin d'évaluer quantitativement les oxydes de fer pouvant se former dans ces conditions. Lors des premières analyses de Fe(II), les échantillons recueillis étaient acidifiés pour conserver leurs conditions chimiques intactes jusqu'au moment de la prise de données. Tous ces échantillons furent analysés et démontrèrent des concentrations de Fe(II) relativement faibles (près du 0%, résultats absents de cette section) appuyant l'hypothèse que le bullage des systèmes avaient réussi à atteindre l'état d'équilibre et ainsi favoriser la formation des oxydes de fer biogéniques en solution. Pourtant, les échantillons non-acidifiés comportait une concentration appréciable de Fe(II) toujours présent en solution au début de l'expérience (Figure 3.7) démontrant que les conditions du milieu étaient plus ou moins favorables à la formation des oxydes. Le dilemme posé par cet état des choses fut résout en utilisant la technique de la Ferrozine. Cette méthode, colorimétrique comme le HACH, permet l'ajout d'un réactif rendant le Fe(II) en solution stable et la mesure à l'aide du spectrophotomètre des standards de Fe(II) exacts. L'utilisation de cette méthode ne requiert

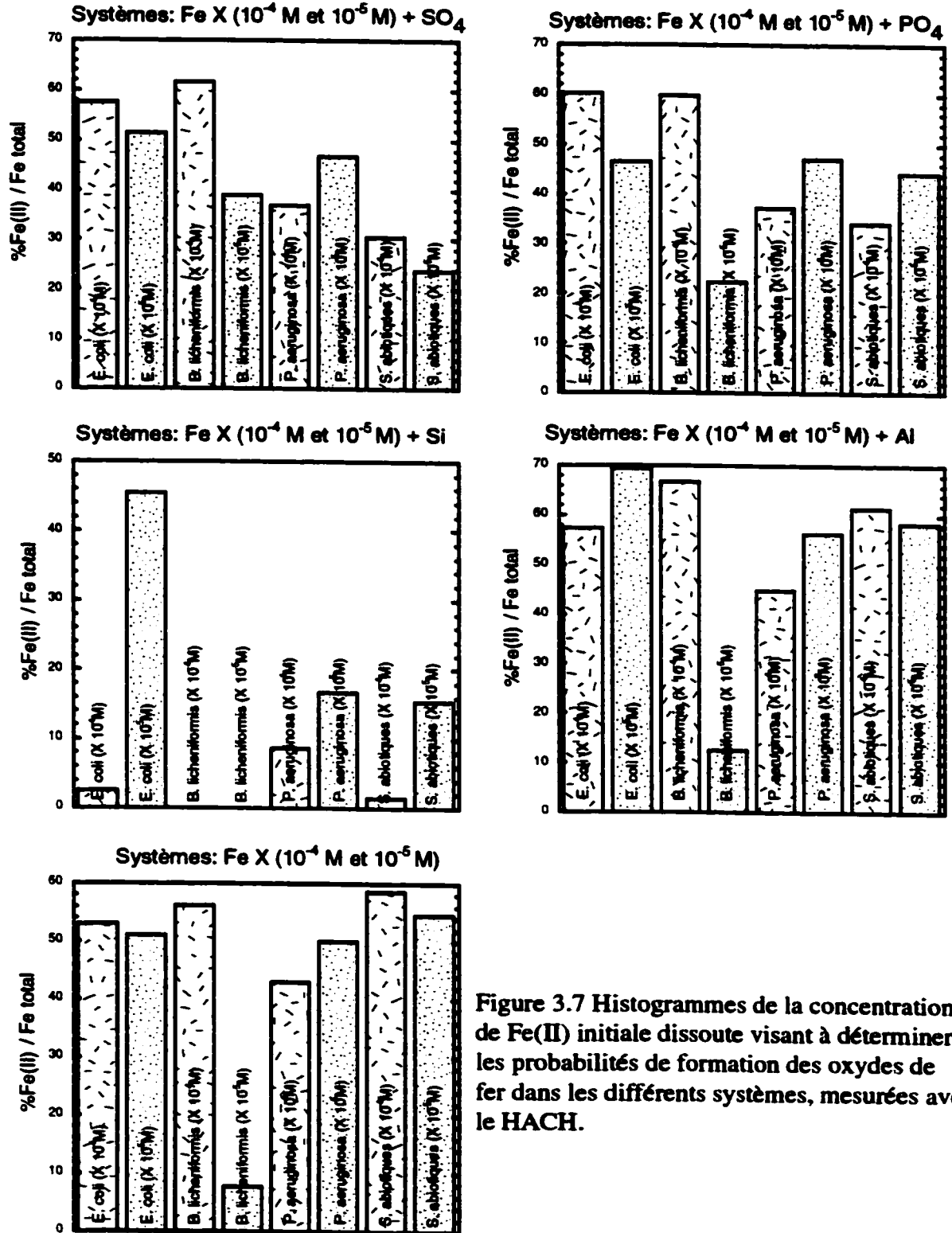


Figure 3.7 Histogrammes de la concentration de Fe(II) initiale dissoute visant à déterminer les probabilités de formation des oxydes de fer dans les différents systèmes, mesurées avec le HACH.

aucune dilution de l'échantillon comme le HACH, réduisant par le fait même les risques d'erreurs. Une comparaison des concentrations de Fe(II) obtenues en utilisant les deux méthodes pour les systèmes contenant *E. coli* à des concentrations de fer totales de 10^{-4} M et 10^{-5} M furent établies en laboratoire. Les résultats de ces tests sont montrés ci-dessous (Figure 3.8).

Il apparait évident que les systèmes contenant du fer en concentration 10^{-4} M ont généré des résultats très similaires indépendamment de la méthode employée (Figure 3.8). Or, une légère surestimation peut être remarquée en ce qui a trait à la méthode du HACH par rapport à la méthode de la Ferrozine. Les résultats obtenus pour les systèmes contenant du fer à une concentration de 10^{-5} M ont démontré une nette différence allant jusqu'à émettre une incohérence entre les deux méthodes. En effet, tous les résultats du HACH sont surestimés de 50% et plus comparativement aux résultats obtenus à l'aide de la Ferrozine. La limite de détection du HACH, dans ces conditions, pourrait être remise en cause. Les rapports de pourcentage Fe(II)/Fer total démontrés à la Figure 3.5 pour les systèmes contenant 10^{-5} M de fer ne sont donc pas réalistes. Selon la méthode de la Ferrozine, environ 50% de Fe(II) est retrouvé dans les systèmes 10^{-4} M après un bullage de 2 heures contre environ 5% pour les systèmes 10^{-5} M.

Les pourcentages de fer(II) total présent en solution au moment de débiter l'expérience sont présentés ici sous forme d'histogrammes (Figure 3.7). Les résultats de ces histogrammes proviennent de la méthode colorimétrique du HACH puisque seule cette méthode fut utilisée pour tous les échantillons. De plus, seulement les systèmes non-acidifiés sont

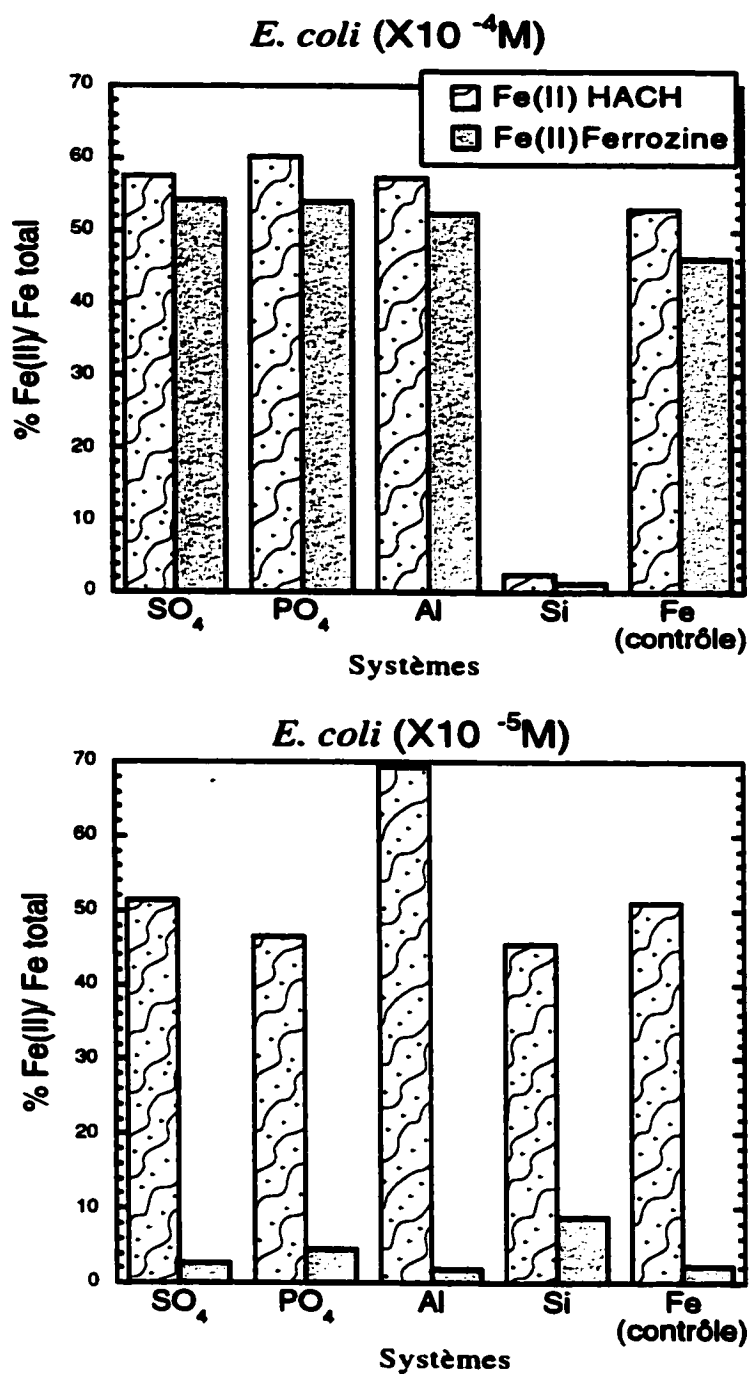


Figure 3.8 Comparaison des concentrations de Fe(II) total obtenues au départ de l'expérience (temps 0) avec la méthode colorimétrique du HACH et celle de la Ferrozine pour *Escherichia coli*.

présentés ici et les systèmes contenant du fer à une concentration de 10^{-5}M sont illustrés à des fins de comparaisons entre les souches bactériennes et les impuretés ajoutées.

L'impureté et la souche bactérienne présentes en solution ont eu un faible effet sur la quantité de fer(II) retrouvé dans le système au début de l'expérience, puisque les autres propriétés physico-chimiques étaient constantes pour tous les systèmes. À première vue, les systèmes contenant du fer en concentration initiale de 10^{-5}M ont démontré, en règle générale, un pourcentage de Fe(II) soluble moindre que les systèmes contenant 10^{-4}M de fer, à l'exception des systèmes contenant du silicium où tous les systèmes avec du fer 10^{-5}M présentaient un rapport plus élevé que les systèmes à 10^{-4}M (Figure 3.7). Les systèmes contenant *Bacillus licheniformis* ont toutefois présenté un rapport Fe(II)/Fer total très faible, et ce dans chacun des systèmes (Figure 3.7). Par contre, lorsque la concentration de fer augmentait dans le milieu, *B. licheniformis* possédait autant, sinon plus de Fe(II) en solution. Il est présumé que tous les systèmes 10^{-4}M ont réagi de façon similaire (Figure 3.7).

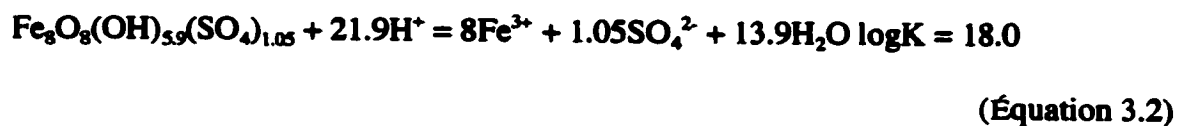
3.2.4. Rôle des bouteilles dans la disponibilité du fer en solution

Lors de l'introduction initiale de fer dans les bouteilles, il a été assumé que la quantité introduite correspondait à la valeur de la concentration de fer total donnée par le HACH. Afin de vérifier le tout, un test d'acidification des bouteilles fut effectué dans le but de déloger les particules de fer pouvant être adhérentes à la paroi à la fin de l'expérience de 6 mois. Les valeurs présentées à l'Annexe D sont représentatives de la moyenne de dix (10) lectures consécutives à l'absorption atomique (A.A.). Dans la plupart des cas, les bouteilles n'ont capté

qu'une très faible proportion du fer en solution possédant un rôle minime dans la géochimie du fer dans les systèmes.

3.3. MINEQL

Plusieurs minéraux peuvent précipiter en phase aqueuse si les conditions chimiques du milieu leur sont favorables. A l'aide des concentrations initiales totales des espèces présentes dans les divers systèmes abiotiques, les indices de saturation des solides pouvant précipiter dans les systèmes ont été calculés. MINEQL n'a été utilisé que pour les systèmes abiotiques, car la sorption de métaux à la surface des bactéries ne peut être adéquatement calculée à l'aide de ce logiciel. L'oxyde de fer schwertmannite fut ajouté à la base de donnée de MINEQL, en utilisant le produit de solubilité mesuré par Bigham et al, 1996, tel que décrit par l'équation suivante (Équation 3.2):



Une correction pour l'effet de la taille des particules fut effectuée sur la solubilité des oxydes de fer en utilisant l'équation suivante (Tardy et Nahon, 1985):

$$K_{so} \text{ (apparent)} = K_{so} + 27/d$$

(Équation 3.3)

où d est le diamètre moyen des particules en nm. La correction ne fut effectuée que pour la lépidocrocite et la ferrihydrite, car des travaux de Châtellier et al (2001 et comm. pers.) ont

démontré que ces oxydes de fer étaient les formes prédominantes lorsque le Fe(II) était oxydé en Fe(III) à pH près de la neutralité et ce en présence ou en absence d'impuretés. Les corrections suivantes ont été effectuées (Équations 3.4.a et 3.4.b):

$$\text{A) Ferrihydrite: } K_{sp} = 4.89 + 27/5\text{nm} = 10.29 \quad (\text{Équation 3.4.a})$$

$$\text{B) Lépidocrocite: } K_{sp} = 1.37 + 27/50 \text{ nm} = 1.91 \quad (\text{Équation 3.4.b})$$

D'après les résultats (Tableau 3.4), tous les systèmes étaient saturés par rapport à la lépidocrocite, goethite, hématite, maghémite et magnétite. Certains systèmes étaient aussi saturés par rapport à la silice amorphe, la calcédoine, la cristobalite, la diaspore, la jarosite, la schwertmannite, la cristobalite, la rodolicoite et la strengite, dépendamment de l'impureté présente en solution.

3.4. Diffraction des rayons X

Une grande portion de cette recherche en laboratoire reposait sur le visionnement des changements cristallographiques des oxydes de fer formés en solution à l'aide de la diffraction des rayons X. Cette méthode permet de déterminer la phase cristalline formée en permettant de découvrir la distance entre les atomes du cristal, information unique à chaque élément. Plusieurs tests ont été effectués en utilisant cette méthode pour tenter d'identifier avec le plus de justesse possible, les solides cristallins se formant à la surface des différentes

Tableau 3.4 Espèces minérales pouvant se former dans les systèmes abiotiques à l'étude selon le programme d'équilibre chimique MINEQL.

Espèces minérales	Formule chimique	Étendue de l'indice de saturation (log C)	Systèmes abiotiques favorisés
Boehmite	AlO(OH)	-1.597 à -1.532	Aucun
Calcédoine	SiO ₂	0.742 à 0.768	24a et 24
Chlorure de fer	Fe(OH) _{2,7} Cl _{0,3}	5.956 à 7.851	Tous
Cristobalite	SiO ₂	0.855 à 0.881	24a et 24
Diaspore	αAlO(OH)	0.302 à 0.367	23a et 23
Ferrihydrite	Fe ₂ O ₃ · 0.5(H ₂ O)	-4.202 à -2.985	Aucun
Gibbsite (C)	Al(OH) ₃	-1.493 à -1.428	Aucun
Goethite	αFeO(OH)	4.744 à 6.001	Tous
Hématite	Fe ₂ O ₃	14.391 à 16.906	Tous
Jarosite (H)	(K,H)Fe ₃ (SO ₄) ₂ (OH) ₆	-1.649 à -0.083	Aucun
Jarosite (Na)	(K,Na)Fe ₃ (SO ₄) ₂ (OH) ₆	0.566 à 2.246	21a et 21
Lépidocrocite	FeO(OH)	4.138 à 5.395	Tous
Maghémite	γ Fe ₂ O ₃	5.71 à 8.225	Tous
Magnétite	Fe ₃ O ₄	11.741 à 14.926	Tous
Rodolicoite ou Hétérosite	Fe(PO ₄)	1.411 à 2.268	22a et 22
Quartz	SiO ₂	1.314 à 1.34	24a et 24
Schwertmanite	Fe ₈ (OH) _{21,9} (SO ₄)	18.868 à 23.651	21a et 21
SiO ₂ (A,Gl)	SiO ₂ (A,Gl)	0.227 à 0.253	24a et 24
SiO ₂ (A,Pt)	SiO ₂ (A,Pt)	-0.11 à -0.084	Aucun
Strengite	Fe(PO ₄) · 2 (H ₂ O)	1.898 à 2.755	22a et 22
Tétrahydroxide de fer	Fe ₃ (OH) ₈	-1.942 à 1.244	21a,22a,23a et 25a

bactéries et dans le milieu aqueux. En effet, chacun des patrons de diffraction X fut comparé au bruit de fond provenant du support, au bruit de fond provenant de la souche bactérienne pure en jeu et également, au sel initial permettant d'obtenir les concentrations recherchées en solution. Les résultats les plus concluants seront illustrés dans cette section, les autres seront omis puisqu'ils n'ont apporté aucune information utile à l'expérimentation. Les résultats montrés à la figure 3.9 peuvent démontrer l'évolution cristallographique des systèmes sur la

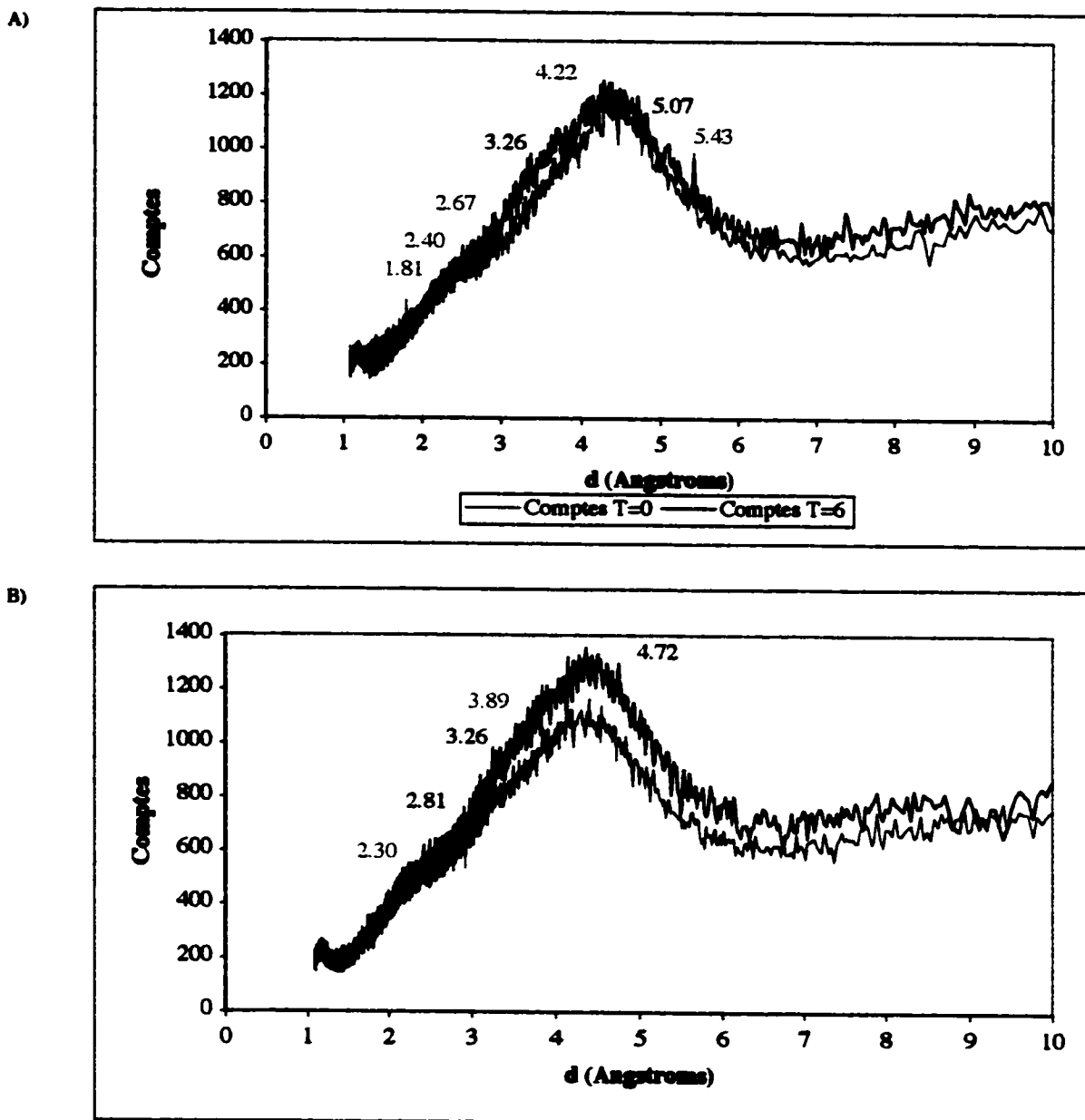


Figure 3.9 Patrons de diffraction X montrant l'évolution cristallographique des minéraux formés lors de cette recherche. (A) Evolution cristallographique d'*Escherichia coli* avec sulfate et 10^{-4} M Fe. (B) Evolution cristallographique de *Pseudomonas aeruginosa* avec sulfate et 10^{-4} M Fe.

c)

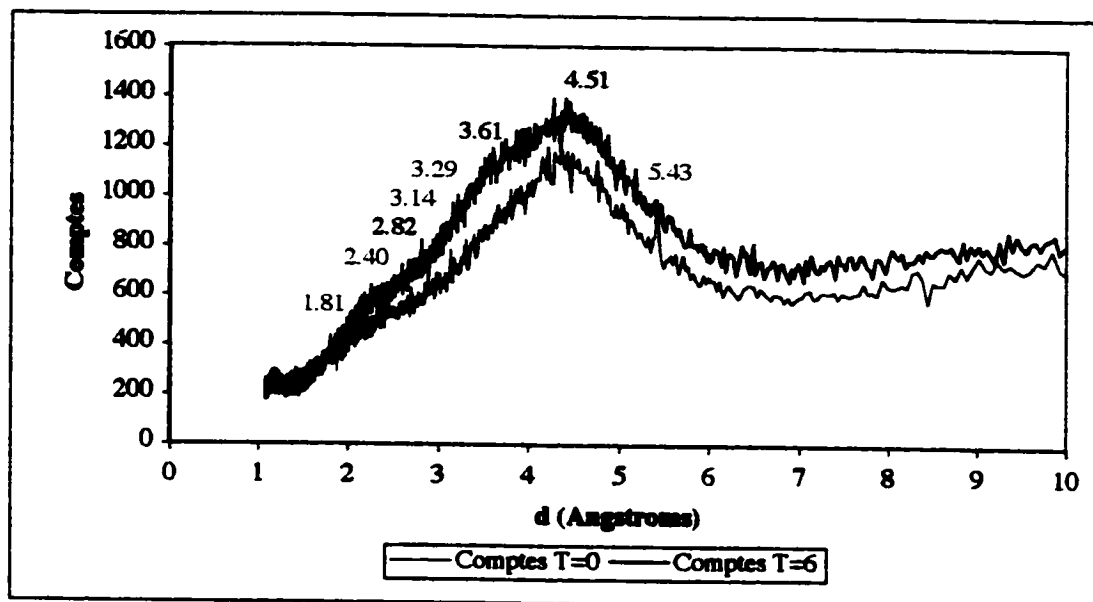


Figure 3.9 Patrons de diffraction X montrant l'évolution cristallographique des minéraux formés lors de cette recherche. (C) Evolution cristallographique de *Bacillus subtilis* avec phosphate et 10^{-4} M Fe.

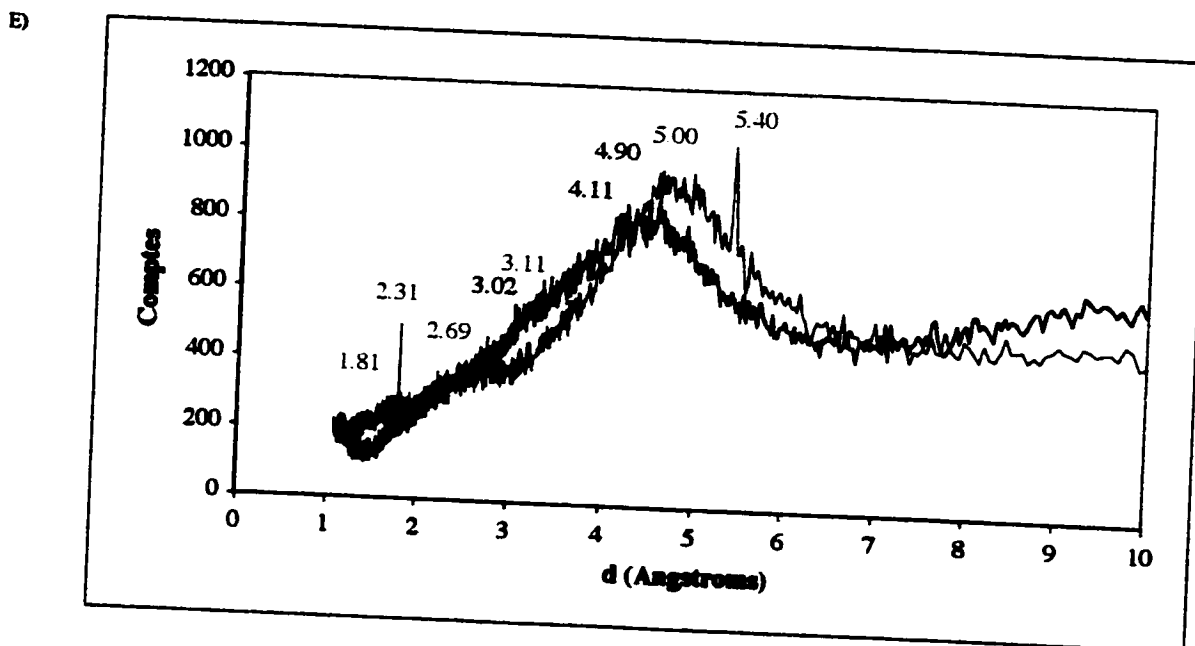
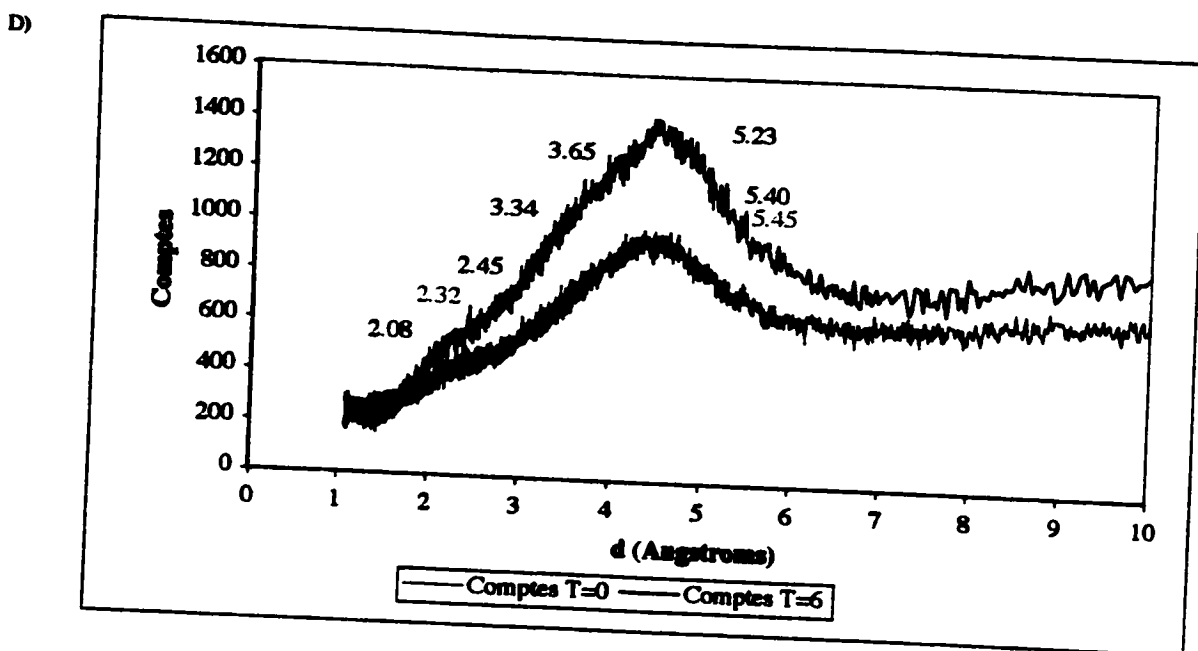


Figure 3.9 Patrons de diffraction X montrant l'évolution cristallographique des minéraux formés lors de cette recherche. (D) Evolution cristallographique de *Bacillus subtilis* avec aluminium et 10^{-4} M Fe. (E) Evolution cristallographique d'*Escherichia coli* avec aluminium et 10^{-4} M Fe.

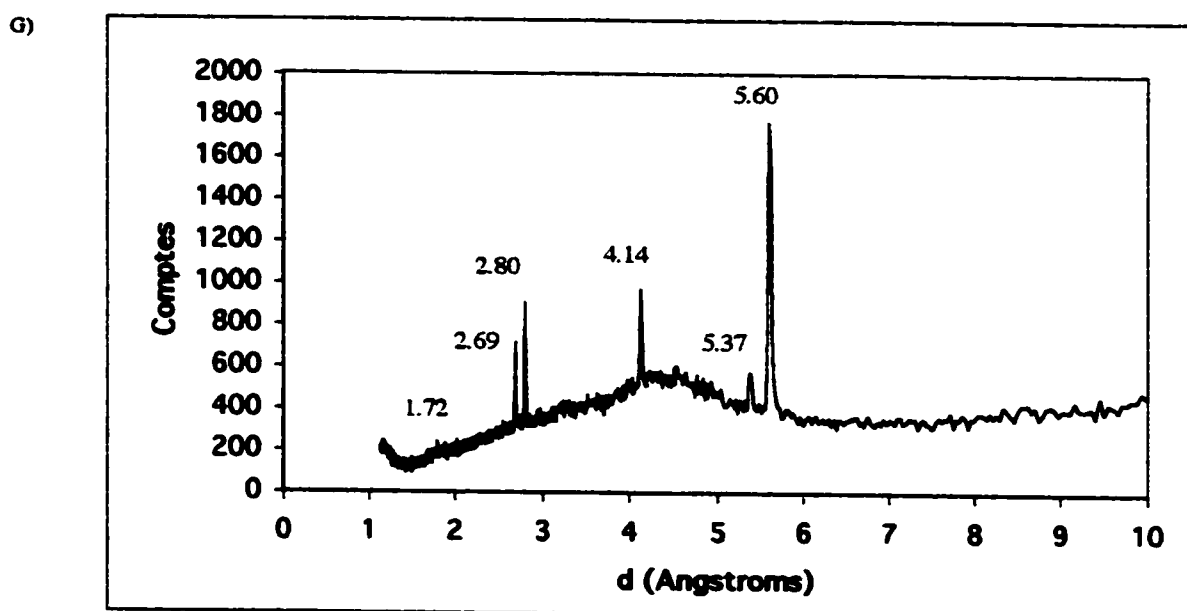
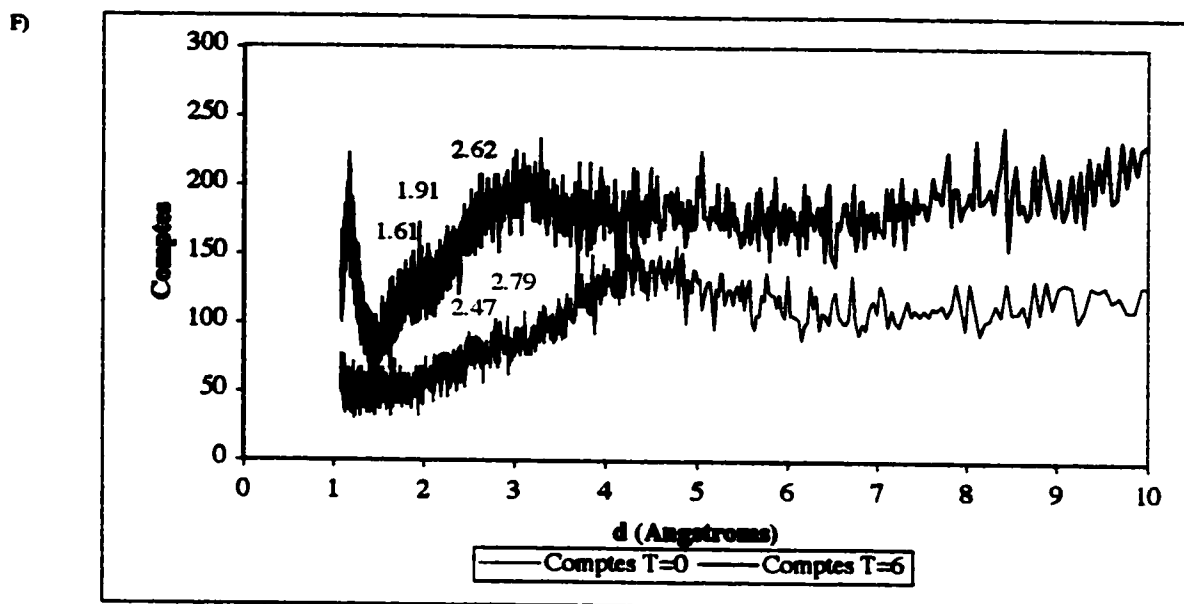
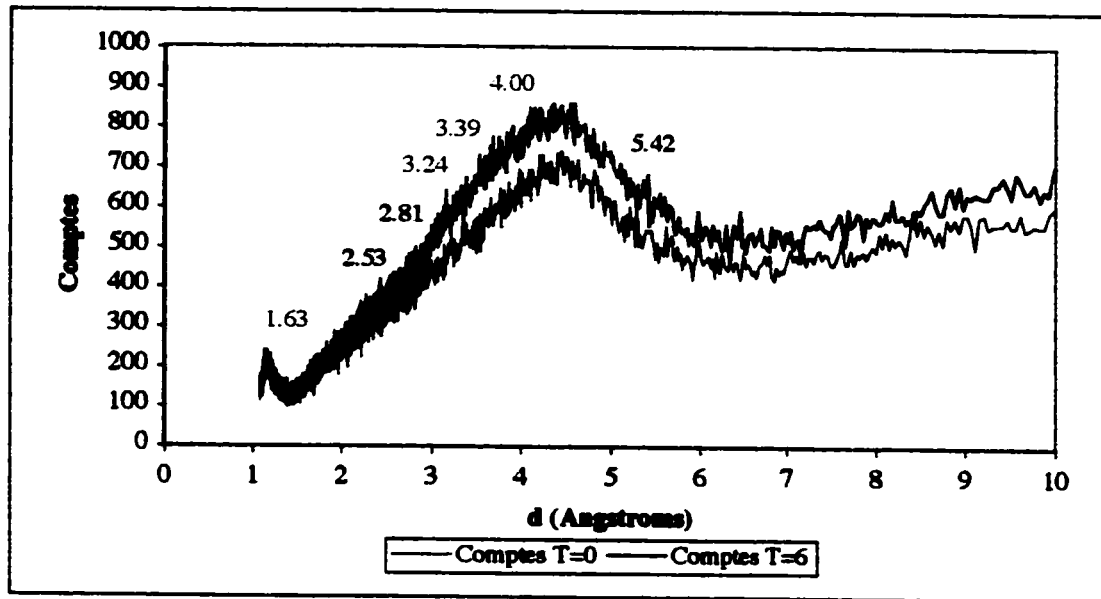


Figure 3.9 Patrons de diffraction X montrant l'évolution cristallographique des minéraux formés lors de cette recherche. (F) Evolution cristallographique de *Bacillus licheniformis* avec silicium et 10^{-4} M Fe. (G) *Escherichia coli* avec silicium et 10^{-3} M Fe à la fin de l'expérience (temps 6 mois).

H)



I)

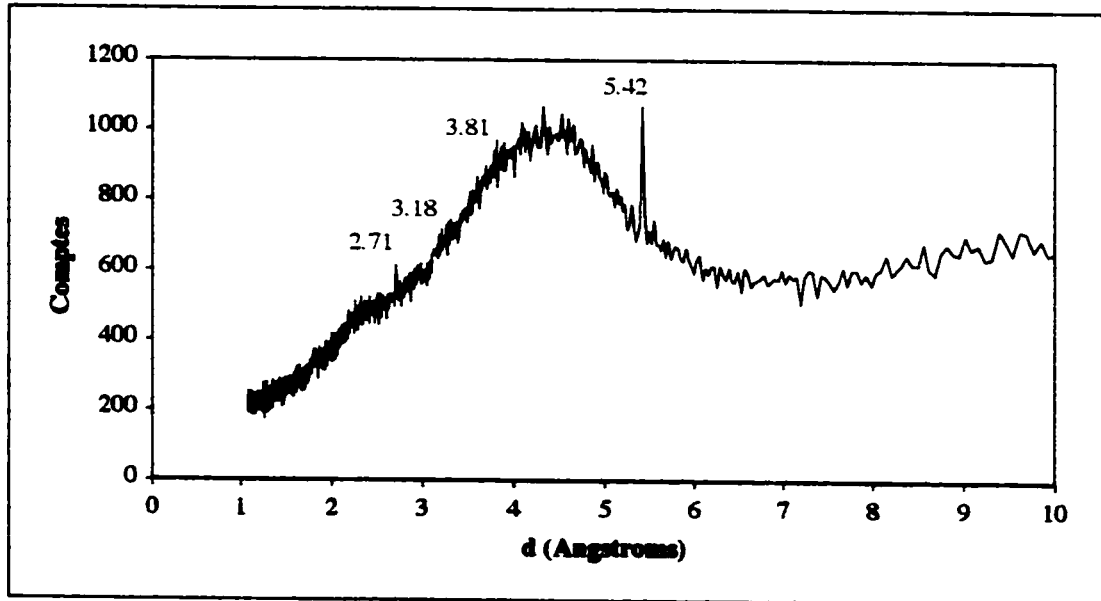


Figure 3.9 Patrons de diffraction X montrant l'évolution cristallographique des minéraux formés lors de cette recherche. (H) Évolution cristallographique de *Pseudomonas aeruginosa* à 10^{-4} M Fe. (I) *Bacillus subtilis* à 10^{-3} M Fe au début de l'expérience.

totalité de la période d'étude. Pour la plupart des systèmes, un diffractogramme fut obtenu au temps 0 et à la fin de l'expérience (au temps 6 mois) pour observer les changements ayant pris place. Pour faciliter la compréhension des changements observés, le tableau 3.6 se veut une façon rapide de visualiser les modifications cristallographiques et morphologiques (TEM) survenues lors de cette expérimentation. Ces valeurs ont été obtenues suite à une comparaison avec les 3 pics d'intensité les plus importants des principaux oxydes de fer (Tableau 3.5).

L'identification des phases cristallines formées dans les systèmes fut très difficile car les pics étaient à peine visibles, rendant leur identification quasi-impossible. Les espèces cristallines ayant un plus grand avantage de formation sont retenues dans le tableau 3.6. Les espèces cristallines identifiées tiennent également compte de la thermodynamique des systèmes et des solides donnée par MINEQL. Il semble que la lépidocrocite fut une espèce cristalline favorisée dans plusieurs systèmes (S3a, S5a, S7a, S8a, S9a, s18a). Dans certains systèmes (S1a, S5a, S12a, S11, S13, systèmes abiotiques), les pics distinctifs de la goethite ont aussi été observés. Les espèces telles que la maghémite, la magnétite, l'hématite ou la ferrihydrite furent rarement avantagées (Tableau 3.6). Certaines conditions privilégiaient la formation de cristal relié à l'impureté présente dans le système comme le quartz (Si), la cristobalite (Si) ou la schwertmannite (SO_4). Dans la plupart des cas, toutefois, des sels de chlorure ferrique et ferreux ont été retenus lors de l'identification des cristaux formés et ce, indépendamment de la concentration de fer ajoutée initialement (Tableau 3.6). Quelquefois, le sel ajouté dans le système a généré un pic distinctif lors de l'identification par rayons X (Tableau 3.6). Certains systèmes n'ont semblé contenir aucun matériel cristallin, car leurs pics

d'intensité ne correspondaient pas aux trois (3) pics majeurs de tous les cristaux ayant une possibilité de formation.

Tableau 3.5 Identification des 3 pics d'intensité d'importance pour les différentes espèces minérales pouvant se former en solution

Espèces minérales	Pic #1 (I/I ₀)	Pic #2 (I/I ₀)	Pic #3 (I/I ₀)
Magnétite	2.53 (1)	1.483 (0.85)	1.614 (0.85)
Lépidocrocite	6.26 (1)	3.29 (0.9)	2.47 (0.8)
Ferrihydrite	2.45 (1)	1.97 (0.6)	2.25 (0.6)
Maghémite	1.61 (1)	2.52 (1)	2.95 (1)
Strengite	3.114 (1)	4.383 (0.85)	5.509 (0.6)
Boehmite	6.11 (1)	3.164 (0.65)	2.346 (0.53)
Schwertmannite	2.55 (1)	3.39 (0.46)	4.86 (0.37)
Goethite	4.18 (1)	2.69 (0.3)	2.452 (0.25)
Hématite	2.69 (1)	1.69 (0.6)	2.51 (0.5)
Jarosite	3.08 (1)	3.11 (0.6)	2.292 (0.5)
Rodolicoite	3.445 (1)	4.36 (0.19)	2.362 (0.14)
Hétérosite	2.452 (1)	4.31 (0.9)	3.46 (0.85)
Diaspore	3.99 (1)	2.317 (0.56)	2.131 (0.52)
Gibbsite	4.82 (1)	4.34 (0.4)	4.3 (0.2)
Cristobalite	4.05 (1)	2.485 (0.2)	2.841 (0.13)
Quartz	3.342 (1)	4.257 (0.22)	1.8179 (0.14)
Ferrous chloride tetrahydrate (FeCl ₂ · 4H ₂ O)*	2.74	2.38	5.45
Ferric chloride dihydrate (FeCl ₃ · 2H ₂ O)	4.80	5.60 3.50	4.51
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)*	3.72	2.91	1.95
Sodium sulphate anhydrous (Na ₂ SO ₄) *	3.06	2.78	3.18
Sodium silicate Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O*	2.78	2.02	2.92

*Tel qu'identifié en laboratoire par diffraction des rayons X

Référence: <http://www.webmineral.com/data>

Tableau 3.6 Identification des pics d'intensité des solides cristallins formés en solution et de la grosseur des particules correspondantes par microscopie électronique

A: Chlorure ferreux
 B: Chlorure ferrique
 C: Goethite
 D: Ferrihydrite
 E: Lépidocrocite
 F: Magnétite
 G: Schwertmannite

H: Quartz
 I: Hématite
 J: Sulphate de sodium
 K: Orthophosphate de potassium
 L: Cristobalite
 M: Maghémite
 O: Silicate de sodium

A. *Escherichia coli*

Systèmes	Réflexions (XRD) d (Angstroms)	Identité(s) possible(s)	Dimensions des cristaux (TEM) nm*
S1at0	1.81-2.4-2.67-4.22-5.43	A - C	< 10
S1at6	3.26-5.07	E	< 10
S2at0	2.45-2.83-5.1-5.41	A - D	n.d.
S2at6	2.05-3.63-8.42	Aucun	n.d.
S3at0	2.32-3.04-3.53-5.42	A	< 10
S3at6	2.52-2.79-3.27-4.7-4.89- 5.5-9.26	A - B - E	n.d.
S4at0	1.77-2.72-3.27-3.81-5.43	A - H - I	< 10
S4at6	4.56	B	n.d.
S5at0	2.43-3.45-3.63	B - D	n.d.
S5at6	1.82-2.64-2.92-3.23-4.08	C - E - I	< 10
S1t0	2.50-3.26-5.41	A - E	n.d.
S1t6	4.13	Aucune	n.d.
S2t0	2.55-2.77-5.10	C - I	n.d.
S2t6	2.33-2.66-3.33	E	n.d.
S3t0	1.81-2.31-2.69-3.11-5.00- 5.40	A - C - I	n.d.
S3t6	3.02-4.11-4.90	Aucune	n.d.
S4t0	2.73-3.60-4.51	A - B	n.d.
S4t6	3.99-4.10-4.27-4.4	Aucune	n.d.
S5t0	2.34-2.61-2.72-3.81-5.43	A - C - I	n.d.

B. *Bacillus subtilis*

Systèmes	Réflexions (XRD) d (Angstroms)	Identité(s) possible(s)	Dimensions des cristaux (TEM) nm*
S6at0	3.83	Aucune	n.d.
S6at6	1.78-3.13-4.41	J	< 10
S7at0	1.81-2.40-3.14-3.29-5.43	A - E	n.d.
S7at6	2.82-3.61-4.51-6.37	B	< 10
S8at0	2.32-5.45	A	n.d.
S8at6	2.08-2.45-3.34-3.65-5.23- 5.40	A - D- E	n.d.
S9at0	2.28-2.76-3.81-5.43	A	< 10
S9at6	2.54-2.77-3.25-3.79-4.60	C - E - I	< 10
S10at0	2.32-2.8-3.43-3.67-4.51- 4.85-6.00	A - B	n.d.
S10at6	2.72-2.99-3.34-3.87	E	n.d.
S6t0	1.77-2.29-2.72-4.65-5.42	A	n.d.
S7t0	1.78-2.69-2.93-3.74-5.42	A - C - I- K	< 10
S8t0	2.41-2.88-3.36	E	n.d.
S9t0	2.76-3.67-4.08-4.51-4.85	B - L	n.d.
S10t0	2.71-3.18-3.81-5.42	A - C - I	n.d.
S10t6	3.32	E	n.d.

C. Bacillus licheniformis

Systèmes	Réflexions (XRD) d (Angstroms)	Identité(s) possible(s)	Dimensions des cristaux (TEM) nm*
S11at0	1.39-2.36	A	n.d.
S11at6	1.75-2.53-3.00-4.42- 4.89-8.12	Aucune	n.d.
S12at0	2.79-3.18	A - J	n.d.
S12at6	1.73-2.12-2.42-2.62- 6.49	C - D - I	n.d.
S13at0	3.04	Aucune	n.d.
S13at6	1.68-1.74-2.53-2.81	F - M	n.d.
S14at0	2.47-2.79	A - D	n.d.
S14at6	1.61-1.91-2.62	F - I - M	< 10
S15at0	1.29-1.81-2.72-5.42	A	n.d.
S15at6	1.73-2.53-5.47	A - F - M	n.d.
S11t0	1.34-1.55-2.34-2.72- 5.42	A - C - I	n.d.
S12t0	2.72-3.16-5.42	A	n.d.
S13t0	1.8-2.40-2.71-5.43	A - C - I	n.d.
S14t0	1.8-2.33-2.71-5.42	A	n.d.
S14t6	1.72-2.69-2.8-5.37-5.6	A - I	n.d.

D. *Pseudomonas aeruginosa*

Systèmes	Réflexions (XRD) d (Angstroms)	Identité(s) possible(s)	Dimensions des cristaux (TEM) nm*
S16at0	2.30-3.89	Aucune	n.d.
S16at6	3.26-4.72	B - E	n.d.
S17at0	3.61-3.98	Aucune	n.d.
S17at6	2.09	Aucune	n.d.
S18at0	1.80-3.33	E	n.d.
S18at6	2.57-3.27-3.51	E	n.d.
S19at0	1.99-3.02-4.18-5.32	A - C - O	n.d.
S19at6	4.02-4.83-5.26-5.49	A - B - L	n.d.
S20at0	1.63-3.24-3.39-4.00- 6.00	E	n.d.
S20at6	2.53-2.81-5.42-6.46	A - F	n.d.

E. Abiotiques

Systèmes	Réflexions (XRD) d (Angstroms)	Identité(s) possible(s)	Dimensions des cristaux (TEM) nm**
S21at6	2.09-2.62-3.20-5.64	B	n.d.
S22at6	4.43	Aucune	n.d.
S23at6	2.52	E - F - M	n.d.
S24at6	1.45-1.81	Aucune	n.d.
S25at6	1.53-1.80-2.28-2.50	D - F - M	n.d.

- * Évaluation effectuée à l'aide des photos disposées dans la thèse. Les valeurs n.d. indiquent l'absence d'oxydes de fer ou les systèmes qui ne furent pas évalués en section photographique.
- ** Dimensions des cristaux non évaluées par TEM.

Les systèmes abiotiques ne démontrèrent aucun pic significatif par diffraction et une analyse de la couleur du film d'oxydes de fer déposé sur le filtre lors de l'étape de la filtration

fut entreprise. Ceux-ci furent donc comparés aux couleurs déterminées préalablement par Cornell et Schwertmann (1996) et sont disposés à la figure 3.10 et inclus dans le tableau 3.7.

L'identification de la lépidocrocite et de la goethite fut possible pour la plupart des systèmes. La couleur déployée par chacun des systèmes n'a pas changée pour la durée de l'expérience. Les oxydes de fer formés dans les systèmes contenant du sulfate ont montré une couleur pouvant être similaire à la schwertmannite et à l'akaganéite. Les oxydes retrouvés dans les systèmes avec du phosphate obtenaient une couleur s'apparentant à celle de l'akaganéite et la goethite.

Tableau 3.7 Identification des espèces minérales formées en solution en l'absence de bactéries d'après la couleur de l'oxyde déposé sur le filtre

Systèmes	Couleur laissée sur le filtre	Espèces minérales possibles
S21at6	Orange foncé	Schwertmannite Lépidocrocite
S22at6	Orange pâle	Goethite Akaganéite
S23at6	Jaune-brun	Goethite Akaganéite Lépidocrocite
S24at6	Rouge-brun	Lépidocrocite Goethite Ferrihydrite
S25at6	Beige jaunâtre	Goethite Lépidocrocite Akaganéite
S21t6	Beige jaunâtre pâle	Goethite Schwertmannite
S22t6	Beige jaunâtre	Goethite Akaganéite
S23t6	Jaune-brun	Goethite Lépidocrocite Akaganéite
S24t6	Jaune pâle (incolore)	Goethite
S25t6	Beige-jaunâtre	Goethite

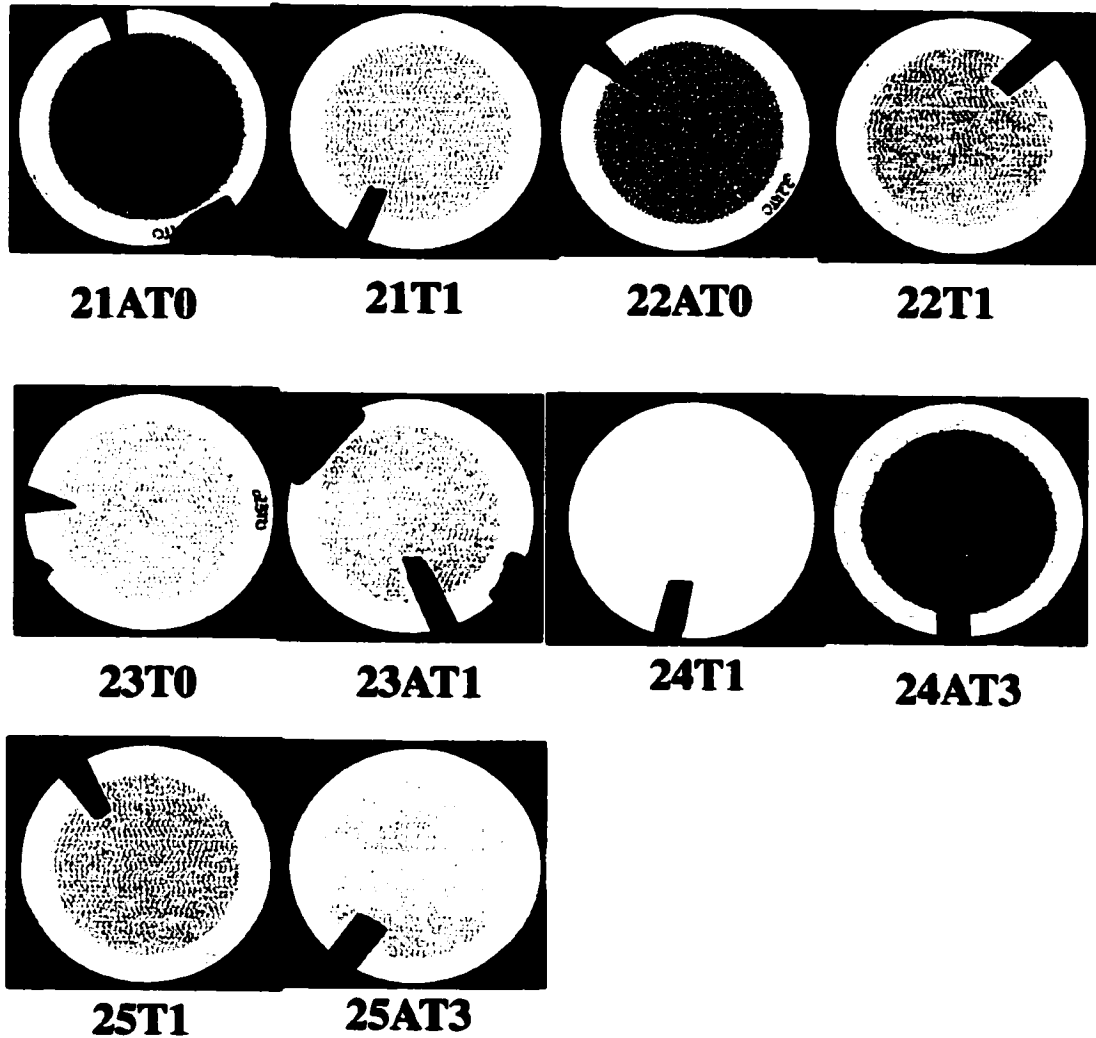


Figure 3.10 Identification des oxydes de fer des systèmes abiotiques d'après la couleur des particules retenues par le filtre.
(A) Couleur des oxydes formés en laboratoire.

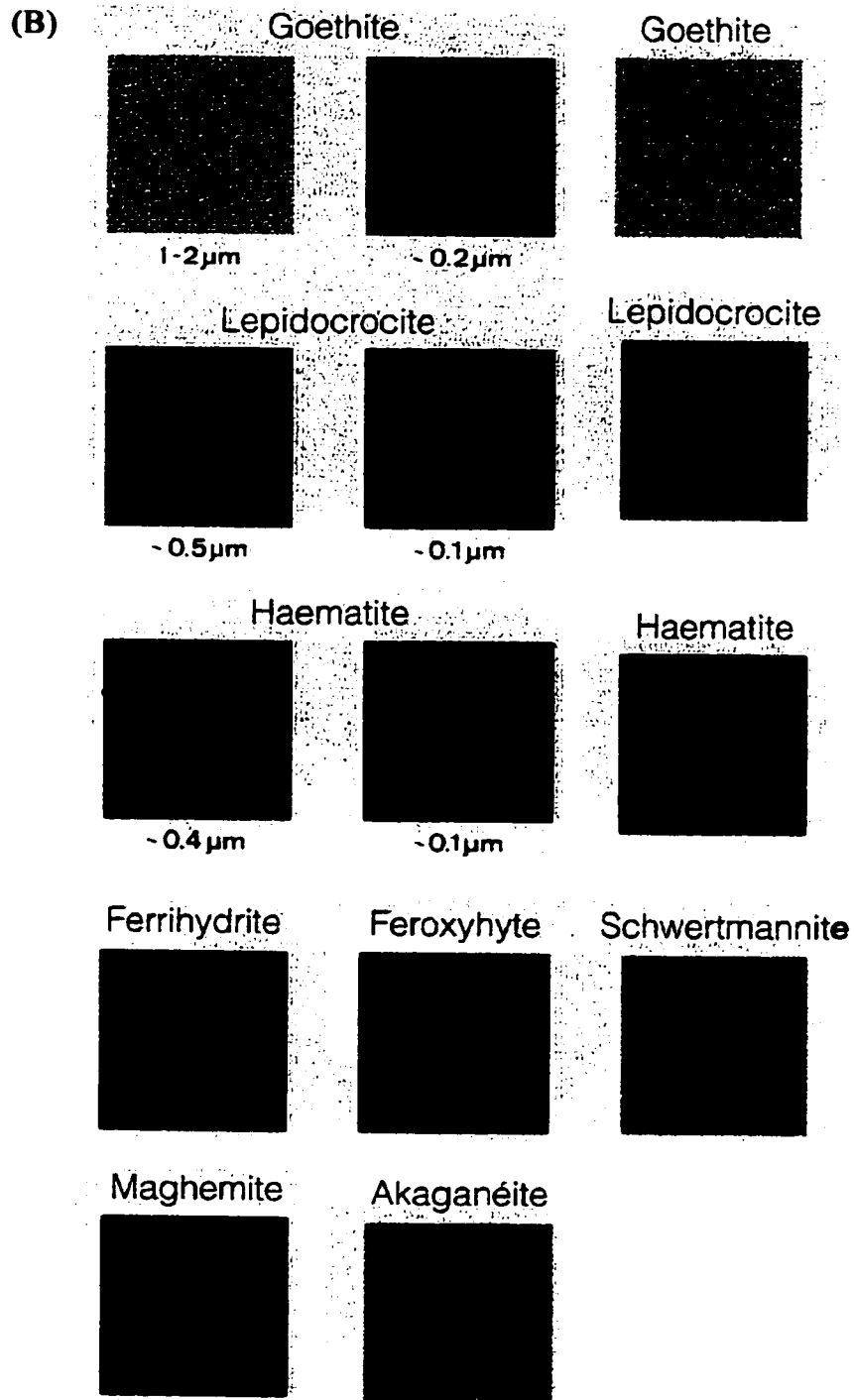


Figure 3.10 Identification des oxydes de fer des systèmes abiotiques d'après la couleur des particules retenues par le filtre.

(B) Couleur des oxydes déterminée par Cornell et al., 1996.

Finalement, pour les systèmes renfermant du silicium, la lépidocrocite, la goethite et la ferrihydrite semblaient les espèces favorisées.

3.5. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les changements morphologiques des oxydes de fer ainsi que la préservation des bactéries furent observés par microscopie électronique à transmission (MET). Les diverses observations sont présentées sous forme de photographies aux figures 3.11 à 3.19 inclusivement. Les observations en MET des coupes minces ont démontré que, dans plusieurs systèmes, les oxydes de fer n'étaient pas visibles à la surface des bactéries (Figure 3.11), surtout lorsqu'une technique d'imprégnation était utilisée. Par contre, dans d'autres cas, de faibles quantités d'un matériel granulaire était clairement identifié sur la paroi cellulaire, surtout en présence de silicium (Figure 3.15). L'observation des échantillons déposés directement sur les grilles (sans imprégnation) a permis de voir qu'il y a en fait formation d'oxydes de fer sur les bactéries et dans le milieu aqueux (Figure 3.12A).

3.5.1 Préservation des cellules bactériennes

Le choix de l'impureté en solution a eu un effet sur la préservation de la paroi cellulaire. Le sulfate ajouté aux systèmes a préservé les cellules de façon efficace en empêchant la rupture de la membrane plasmique (Figures 3.11, 3.12 et 3.18). Par contre, cette dernière apparaissait souvent déformée en présence de cet élément, mais le matériel intracellulaire semblait toujours intact contrairement aux systèmes ayant seulement du fer (Figures 3.11, 3.12 et 3.18). Il est à remarquer que tous les systèmes contenant du sulfate ont réagi de façon similaire en préservant les cellules à différents niveaux. Par contre, la tendance générale

laisse supposer que les bactéries Gram- positives auraient un léger avantage sur leurs consoeurs, possédant une meilleure conservation de la membrane cellulaire dans les mêmes conditions chimiques (Figures 3.11, 3.12 et 3.18).

Dans le cas du phosphate, les cellules furent préservées à merveille quelque fut la concentration de fer ajoutée à la solution (Figures 3.13 et 3.19). Il est d'ailleurs possible de remarquer quelques oxydes de fer dans le milieu pour les systèmes $10^{-4}M$ (Figure 3.19).

L'aluminium n'a pas eu d'effet de préservation apparent sur la paroi cellulaire (Figure 3.14). Dès le départ, les cellules de tous les systèmes contenant cet élément furent déformées, offrant une apparence irrégulière et relarguant une partie de leur matériel cellulaire en solution (Figure 3.14). Plusieurs cellules ont eu tendance à former des becs à leurs extrémités dans ces systèmes (Figure 3.14).

La silice ajoutée en solution a eu un effet similaire au sulfate sur les cellules présentes dans les systèmes. Les cellules prélevées au temps zéro et au temps six mois possédaient des oxydes de fer à leur surface (Figure 3.15). Ces oxydes semblaient recouvrir un pourcentage acceptable de la surface cellulaire rendant leur préservation de meilleure qualité que pour l'aluminium ou le fer seulement.

En ce qui concerne les systèmes ne contenant aucune impureté, la préservation des cellules a été médiocre (Figure 3.16). La paroi cellulaire est apparue raboteuse et aucun oxyde de fer n'était présent à la surface ni en solution.

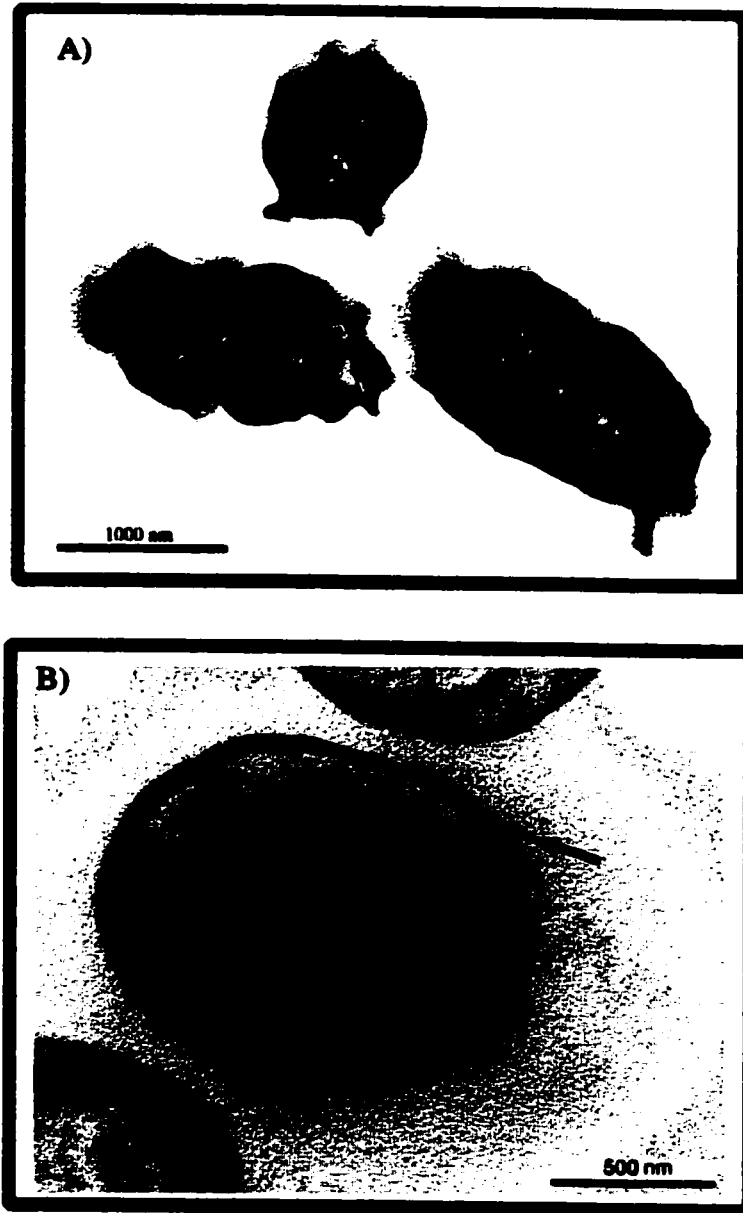


Figure 3.11 *Bacillus subtilis* en présence de sulfate à une concentration $10^{-4}M$ Fe dans le Nanoplaste. A) Cellules au temps de départ (0 mois). Remarquez la paroi cellulaire déformée et l'absence d'oxydes de fer. B) Cellules au temps final (6 mois). Remarquez la présence de fines particules à la surface de la paroi cellulaire pratiquement intacte.

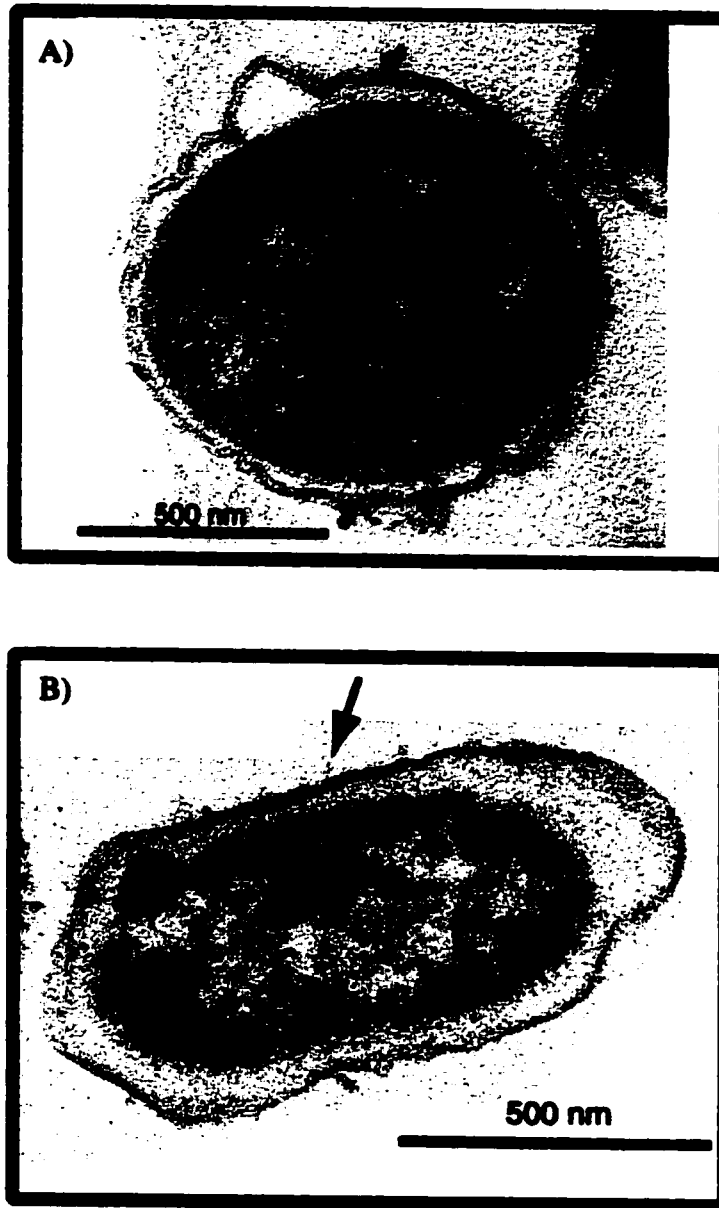


Figure 3.12 Nanoplaste A) *Escherichia coli* en présence de sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois de vieillissement. Notez le décollement de la paroi cellulaire et la faible quantité d'oxydes de fer y étant attachée. B) *Bacillus licheniformis* en présence de sulfate à une concentration 10^{-5} M Fe après 6 mois. Constatez le phénomène de décollement ainsi que la présence de fines particules à la surface de la bactérie.

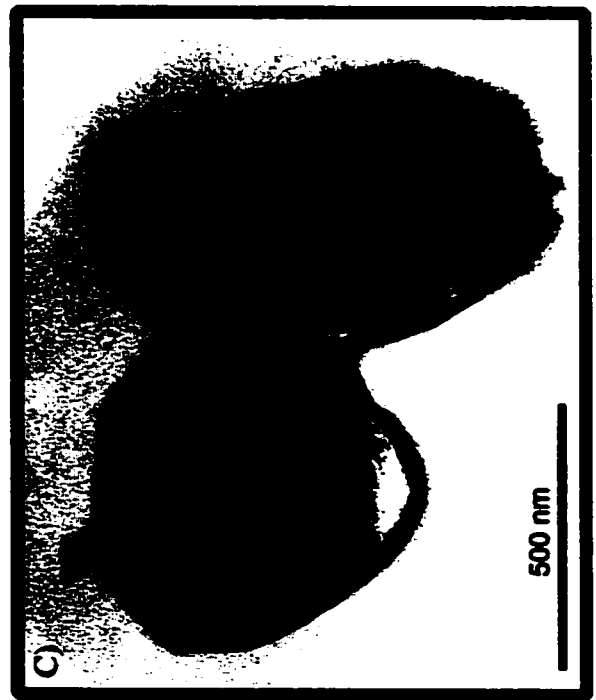
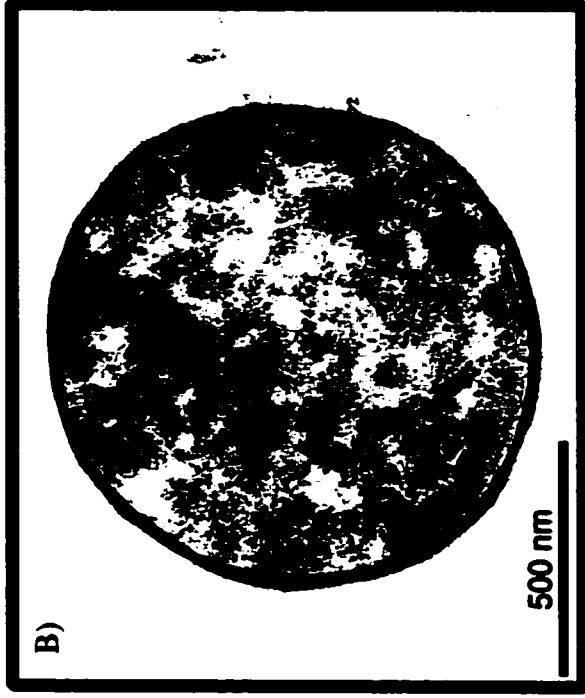
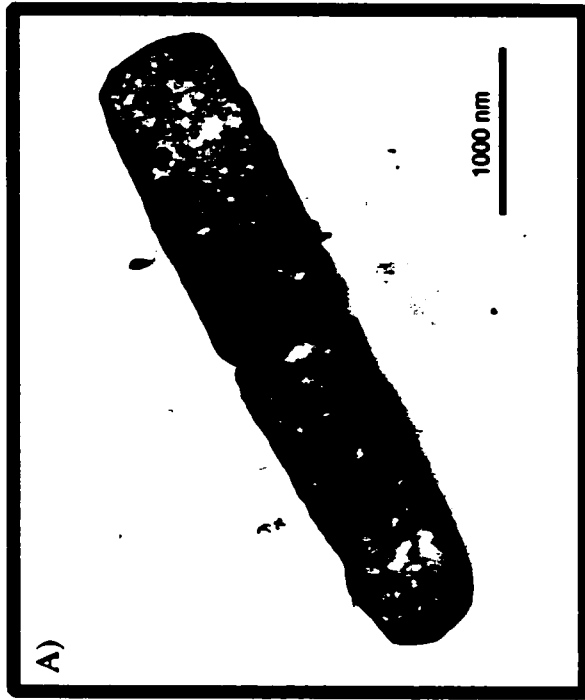


Figure 3.13 Nanoplaste A) *Bacillus subtilis* en présence de phosphate à une concentration $10^{-5}M$ Fe après 6 mois. Remarquez la préservation remarquable des cellules et le peu d'oxydes de fer formés. B) *Bacillus subtilis* avec phosphate à une concentration $10^{-4}M$ Fe après 6 mois. La cellule est très bien préservée et les oxydes de fer ne sont pas plus abondants qu'en A) malgré une augmentation de la concentration de fer. C) *Bacillus licheniformis* avec phosphate à une concentration $10^{-5}M$ Fe au début de l'expérience (temps 0). Notez la baisse de la qualité de la préservation cellulaire vs *Bacillus subtilis*.

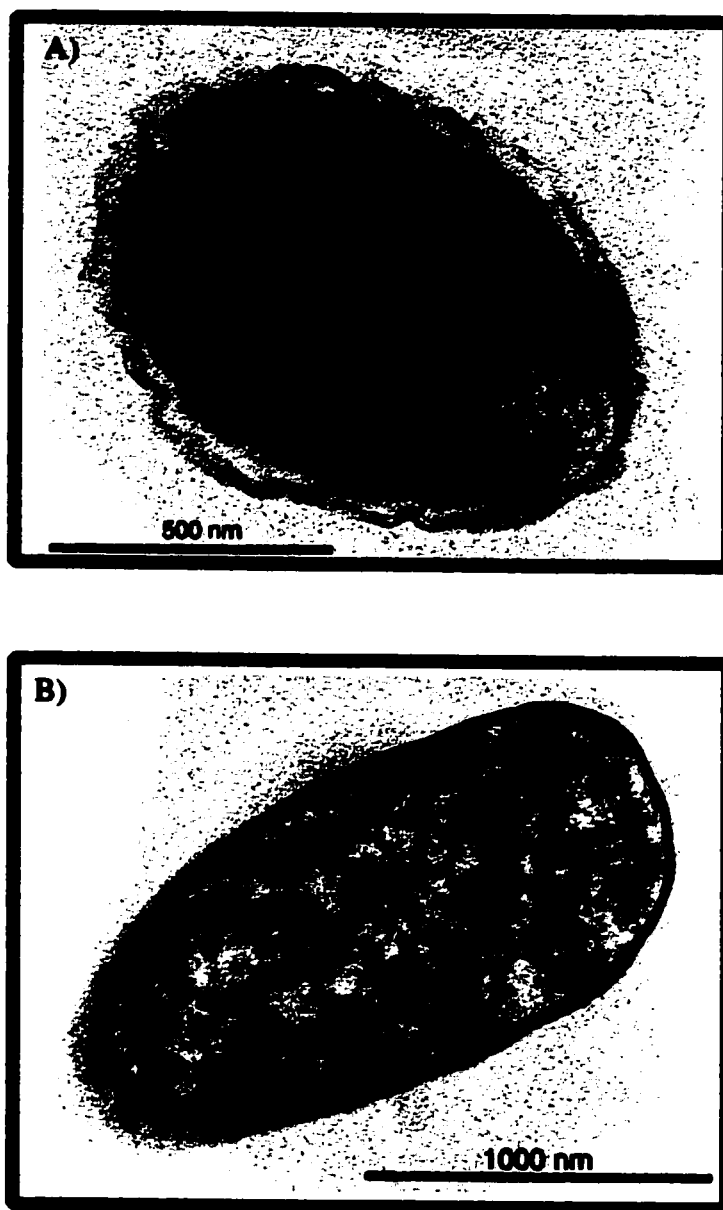


Figure 3.14 Nanoplaste A) *Escherichia coli* en présence d'aluminium à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. Notez la piètre qualité de la paroi cellulaire et l'absence d'oxydes dans le milieu. B) *Bacillus subtilis* avec aluminium à une concentration 10^{-4} M Fe. Remarquez la meilleure préservation cellulaire, mais l'absence d'oxydes dans le milieu.

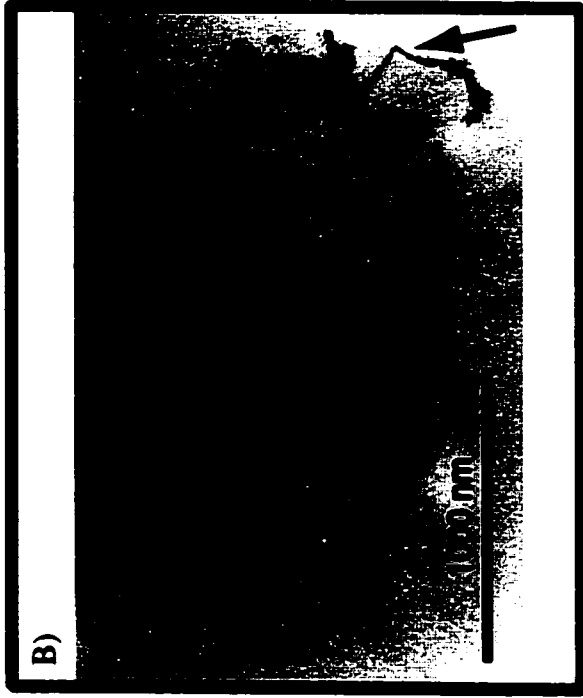
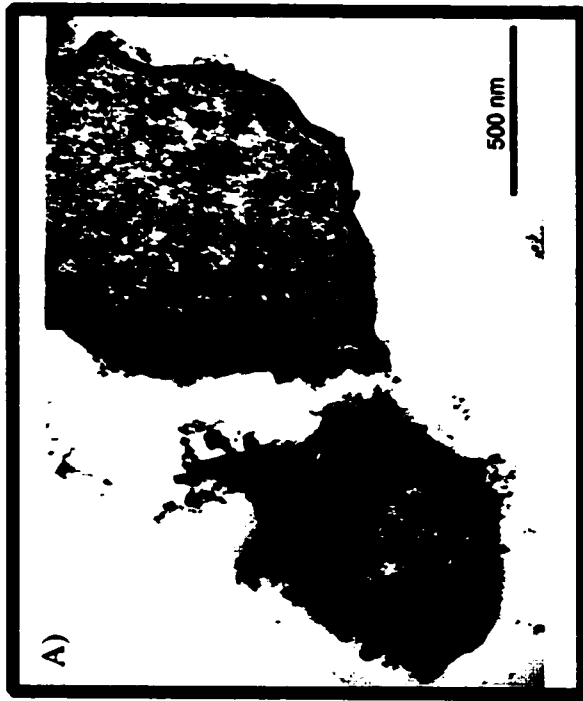


Figure 3.15 Nanoplaste A) *Bacillus subtilis* avec silicium à une concentration 10^{-4} M Fe au temps initial.

Observez la présence de nombreuses particules d'oxydes de fer à la surface des bactéries et dans le milieu extracellulaire. La membrane cellulaire apparait déformée. B) *Bacillus subtilis* avec silicium à une concentration 10^{-4} M après 6 mois. Constatez la présence d'oxydes de fer sur la totalité de la surface bactérienne disponible. Remarquez également que les particules ont la forme de fines aiguilles.

C) *Bacillus licheniformis* avec silicium à une concentration 10^{-4} M Fe après 5 mois. La présence d'oxydes granulaires peut être détectée à la surface des 3 bactéries.



Figure 3.16 Nanoplaste. A) *Bacillus subtilis* en présence de 10^{-5}M Fe au temps initial. Notez la faible qualité de préservation cellulaire ainsi que l'absence d'oxydes de fer. B) *Bacillus subtilis* en présence de 10^{-5}M Fe après 6 mois. Observez la conservation de la paroi cellulaire des bactéries sans leurs cytoplasmes. C) *Escherichia coli* en présence de 10^{-4}M Fe après 6 mois. Remarquez la faible qualité de la préservation cellulaire ainsi que la présence de quelques particules de fer à sa surface.

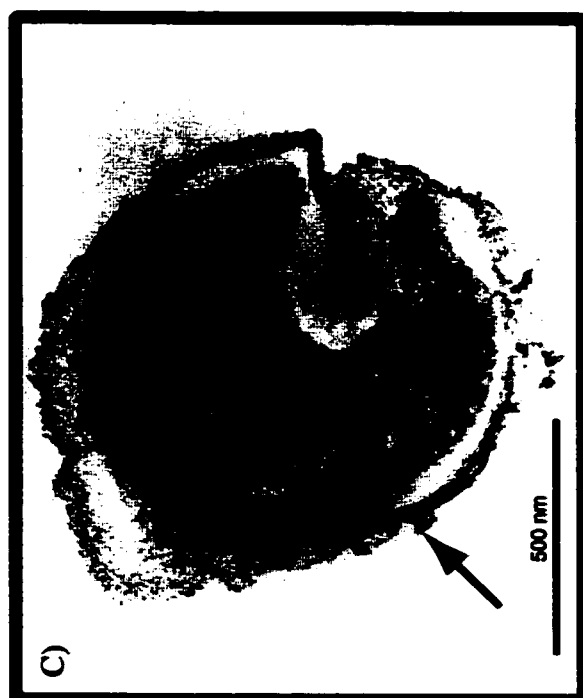
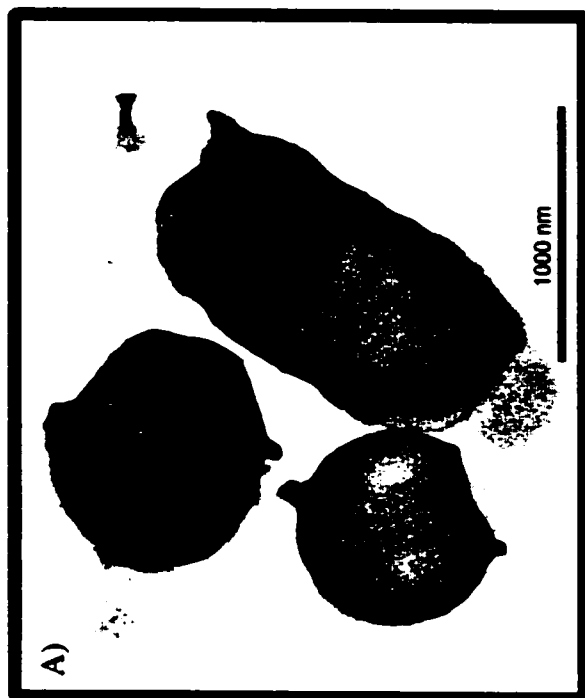
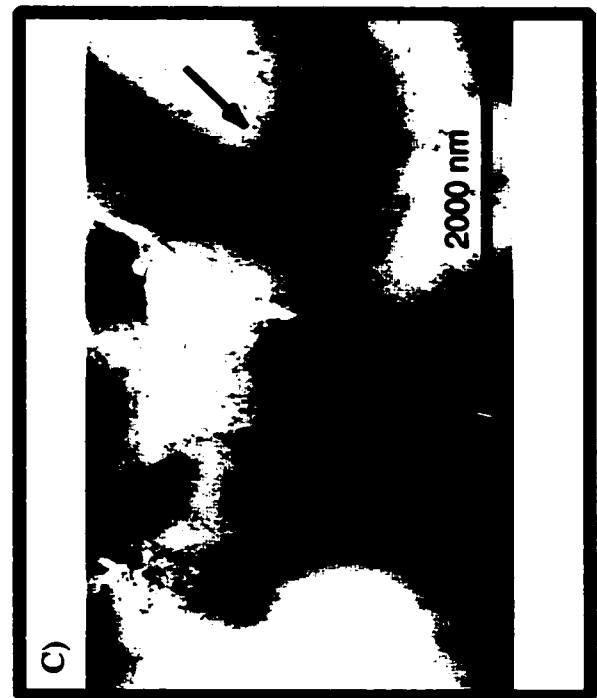




Figure 3.17 Échantillons sur grille (whole mount) d'*Escherichia coli* au temps initial à une concentration de 10^{-4} M Fe A) Avec sulfate, notez les oxydes de fer amorphes dispersés sur les cellules et dans le milieu. Observez également la répartition du cytoplasme qui diffère à certains endroits dans les cellules. B) Avec aluminium, notez que les oxydes ne sont pas distribués à la surface des bactéries, mais plutôt dans le milieu extracellulaire. C) Avec silicium, observez la petitesse des oxydes amorphes et leur faible concentration dans ce système.



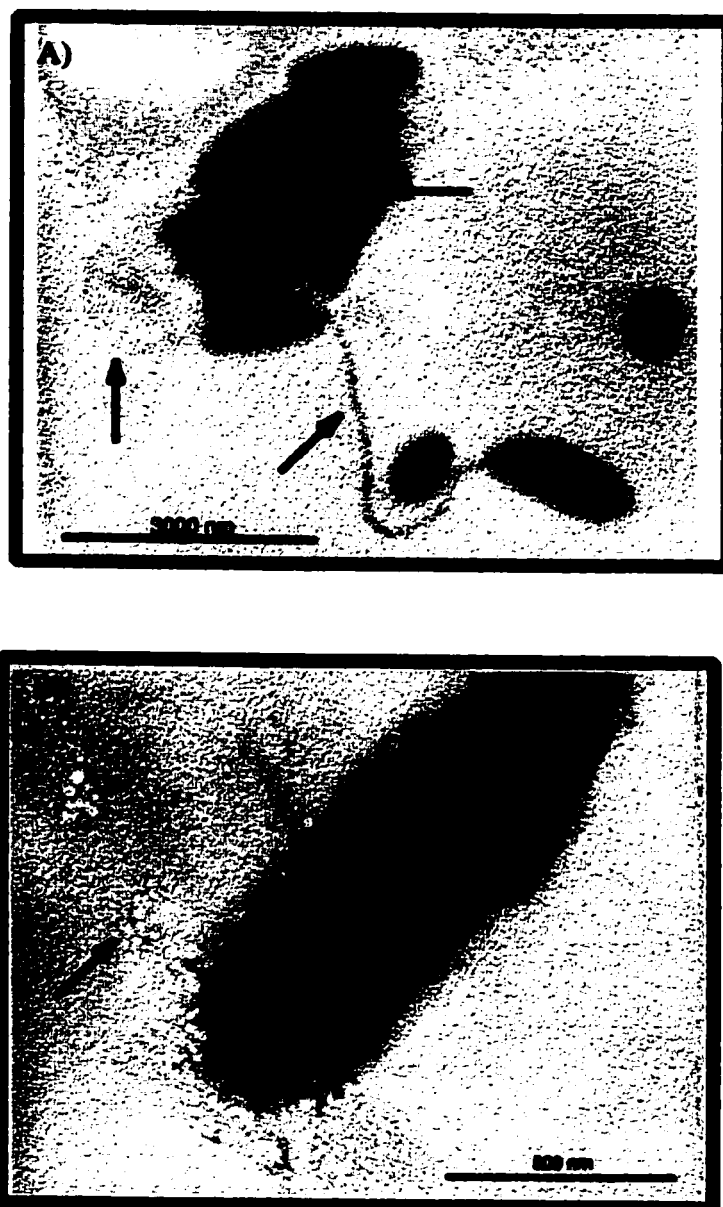


Figure 3.18 Échantillons sur grille (whole mount). A) *Escherichia coli* avec sulfate à une concentration de 10^{-5} M Fe après 12 mois. Notez la présence de vésicules et le développement d'un pont reliant 2 cellules. Remarquez aussi que les cellules semblent collées sur un élément à faible contraste. Notez finalement l'absence d'oxydes de fer. B) *Pseudomonas aeruginosa* avec sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe après 10 mois. Notez la présence d'oxydes (aiguilles) à la surface de la bactérie et possiblement d'un sel dans le milieu (particules incolores).

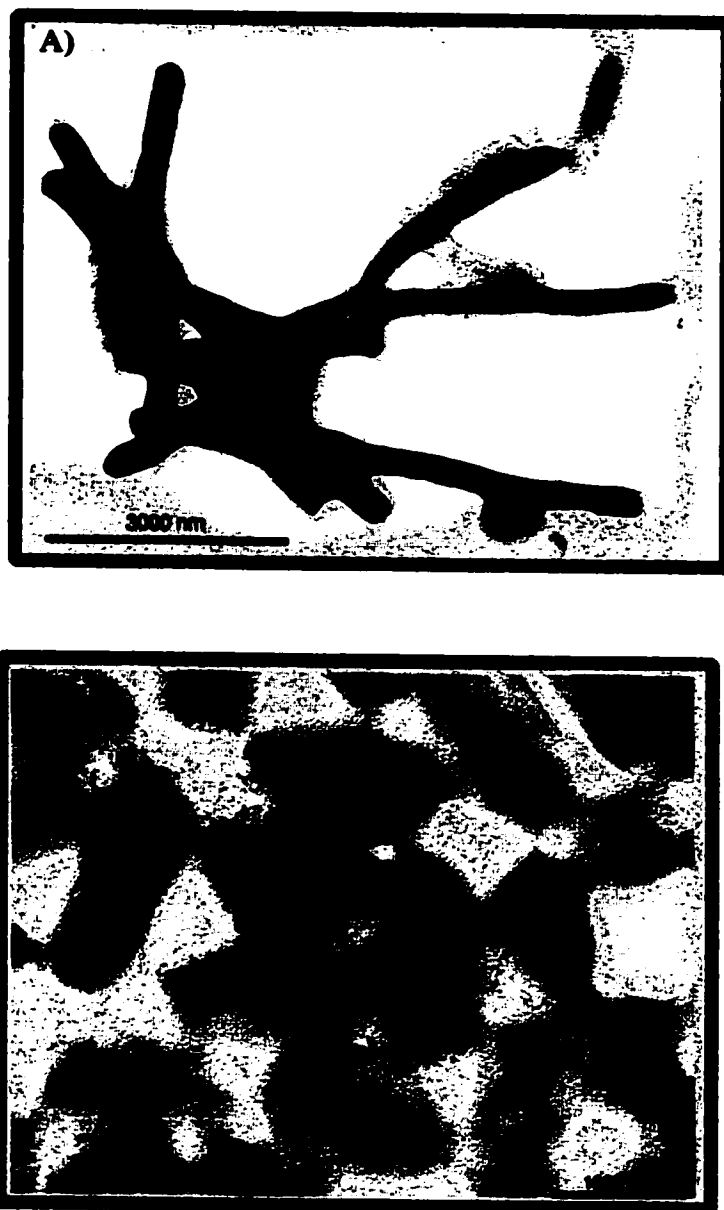


Figure 3.19 Échantillons sur grille (whole mount). A) *Bacillus licheniformis* avec phosphate à une concentration 10^{-4} M Fe après 11 mois. Les bactéries ont tendance à former des masses dans les systèmes. Absence d'oxydes de fer. B) *Pseudomonas aeruginosa* avec phosphate à une concentration 10^{-4} M Fe après 10 mois. Remarquez le cytoplasme concentré dans certaines parties des bactéries et la distribution aléatoire des oxydes à la surface des bactéries présentes dans le milieu. Quelques oxydes semblent avoir adoptés la forme d'aiguilles.

On peut d'ailleurs constater que dans certains cas, le matériel intracellulaire était dispersé dans le milieu environnant. De plus, il est apparu, dans plusieurs photographies, que seule la membrane cellulaire était conservée, bien que déformée, mais sans matériel intracellulaire présent (Figure 3.16). Les observations en coupe mince ne révélèrent aucunement la présence d'exopolymères pour *B. licheniformis* et *P.aeruginosa*. Les cellules déposées directement sur les grilles (whole mount) possédaient des particules noires internes, identifiées par la suite comme des granules de phosphate (Figure 3.17). Dans d'autres cas, des particules blanches (vésicules) meublaient l'espace intracellulaire (Figure 3.17). Une chose étrange fut remarquée pour quelques bactéries. En effet, certaines d'entre elles semblent se lier à une cellule plus éloignée par un cordon (Figure 3.17), pouvant être relié à un exopolymère. Cet état de choses fut identifié dans quelques systèmes seulement. Ceci représente une caractéristique commune aux bactéries se retrouvant dans les réservoirs d'eau distillée, où il y a un manque d'éléments en solution (Leppard, 2001). La préservation des cellules était similaire à celle des cellules provenant des coupes minces.

3.5.2 . Observations des oxydes de fer

L'observation d'échantillons déposés directement sur les grilles à microscopie a permis de voir les petites particules d'oxydes de fer à la surface des bactéries (Figure 3.17 et 3.18). Dans certains cas, cette quantité était appréciable. Le but de ces observations était de caractériser physiquement les oxydes de fer formés en solution. Lorsque des oxydes de fer étaient visibles, leur morphologie se rapprochait davantage à un matériel amorphe d'apparence granulaire, de petite taille. Le matériel observé au temps initial et à la fin de l'expérience a démontré les mêmes caractéristiques, éloignant l'hypothèse d'évolution

minéralogique. Il n'a jamais été possible de remarquer la présence unique d'aiguilles dans les systèmes, mais à certains endroits leur présence est suspectée (Figures 3.15, 3.18 et 3.19). Plusieurs de ces particules pouvaient être trouvées à la surface des bactéries, mais également loin de celles-ci, dans le milieu aqueux environnant (Figures 3.15 et 3.17). L'observation en coupe mince a donné les mêmes résultats lorsque leur présence fut détectée. La quantité de particules formée loin des bactéries est cependant plus faible (Figure 3.11). Il faut remarquer que les systèmes avec silicium avaient toujours une quantité appréciable de matériel amorphe au détriment des autres systèmes (Figure 3.15). Dans le cas de ces derniers, les oxydes apparaissaient surtout en faible quantité et en minuscules cristaux à la surface des bactéries.

3.5.3 Analyses par énergie dispersive (EDS)

Lors d'un court moment, l'analyse par spectroscopie à énergie dispersive fut permise à l'Université de Guelph permettant d'établir la composition chimique des particules formées à la surface des bactéries. Seuls les échantillons sous forme de coupe mince furent soumis à ce type d'analyse. Lors de l'analyse, il a fallu utiliser des grilles de nickel ou de cuivre pour disposer les échantillons et le signal de ces éléments fut très intense sur les spectres, masquant la réponse des autres composantes. De plus, il a fallu utiliser une méthode de coloration à l'acétate d'uranyl pour augmenter le contraste des bactéries. Cet élément apparaissait également sur les spectres. Toujours, le fer et le phosphate ont ressorti lors des analyses, confirmant la présence de fer dans les particules disposées à la surface des bactéries (Figure 3.20). Le phosphate est relié à la structure même de la paroi cellulaire. À certains endroits, un pic de silicium a été identifié provenant d'une contamination lors de la préparation des échantillons à l'aide d'une pipette Pasteur fraîchement fracturée.

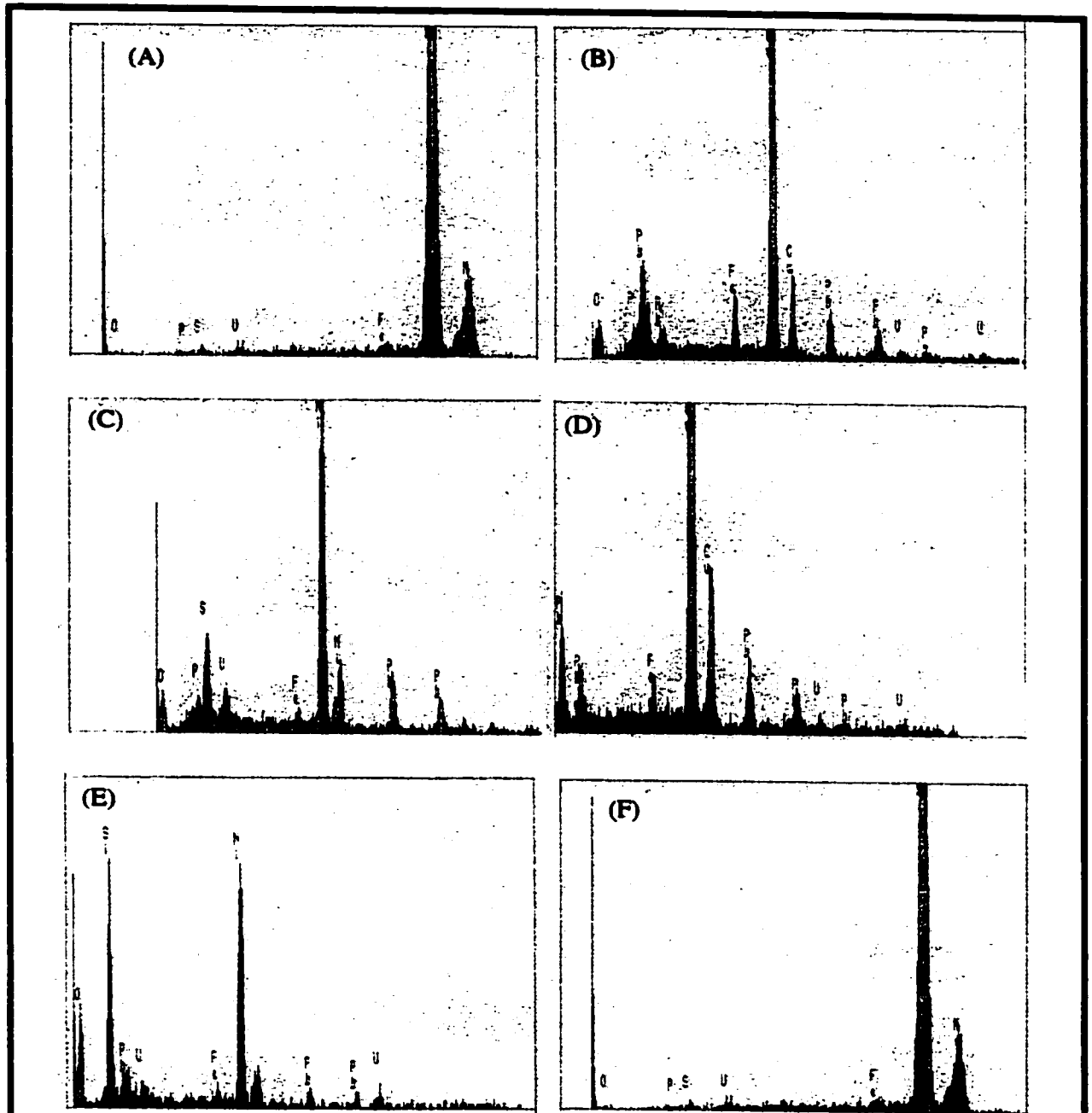


Figure 3.20 Analyses EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) évaluant la composition des particules disposées à la surface des bactéries ou dans le milieu extracellulaire. (A) *Escherichia coli* avec sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. (B) *Escherichia coli* à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. (C) *Bacillus subtilis* avec sulfate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. (D) *Bacillus subtilis* avec phosphate à une concentration 10^{-4} M Fe après 6 mois. (E) *Bacillus subtilis* avec silicium à une concentration 10^{-4} M Fe au début de l'expérience. (F) Même que (E), mais pris à un endroit différent sur la cellule.

4. DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus lors de cette recherche en laboratoire portaient exclusivement sur l'évolution des systèmes avec Fe seulement, $\text{SO}_4 + \text{Fe}$, $\text{PO}_4 + \text{Fe}$ et $\text{Si} + \text{Fe}$. Les systèmes contenant de l'aluminium se sont comportés de façon similaire aux systèmes contenant du fer seulement (contrôle). La concentration d'aluminium utilisée, représentative du milieu lacustre naturel, était trop faible pour engendrer des changements majeurs aux niveaux de la cristallographie et de la morphologie des oxydes de fer, tel qu'observé par Schwertmann (Schwertmann et Carlson, 1994; Schwertmann et al., 2000). Pour cette raison, les systèmes contenant de l'aluminium ne sont pas pris en considération dans la discussion suivante bien que quelques résultats relatifs à cet élément aient été disposés à la section précédente.

De plus, les trois hypothèses de cette recherche seront adressées simultanément au travers des différentes techniques utilisées lors de l'expérimentation. En effet, chaque technique représente une façon différente et complémentaire de tester les hypothèses de recherche.

4.1. Formation et évolution cristalline des oxydes de fer en laboratoire

Le premier volet de l'expérience en laboratoire reposait sur l'étude de la formation et de l'évolution cristallographique des oxydes de fer en laboratoire, sous des conditions se rapprochant du milieu naturel et sur l'impact d'une introduction d'impuretés sur le minéral formé. Ainsi, la première hypothèse de cette recherche voulait que les oxydes de fer trouvés au début de l'étude soient amorphes, de part leur petitesse, et se transforment en espèces plus stables au fil du temps. Par contre, si l'impureté introduite lors de la synthèse des

oxydes parvenait à stabiliser la structure, il était présumé que les cristaux seraient stables pendant leur séjour de six (6) mois au laboratoire. Aussi, plus l'oxyde de fer est amorphe et plus il offre une grande surface permettant de meilleures chances d'adsorption (Warren et Zimmerman, 1994).

4.1.1. Diffraction des rayons X

La première technique utilisée pour identifier les oxydes de fer formés dans les différents systèmes et évaluer leur évolution fut la diffraction des rayons X. Cette méthode analytique représente un moyen précis d'identification d'un oxyde de fer particulier par l'émission d'une gamme de réflexions d'intensité variée correspondante à l'oxyde. Par contre, une technique qualitative a également été utilisée dans le cas des oxydes de fer formés en milieux abiotiques.

4.1.1.1. Formation et évolution cristalline des systèmes abiotiques

Dans le but de simplifier la compréhension du phénomène, des systèmes ne comprenant aucune bactérie furent tout d'abord utilisés. L'identification des espèces minérales formées dans les systèmes abiotiques est sans doute préférable à effectuer en premier lieu puisque l'étude de Châtellier et al. (2001) a démontré que les cristaux à la surface des bactéries étaient plus petits que ceux formés en leur absence, rendant ainsi leur caractérisation beaucoup plus ardue. À l'aide des concentrations de départ totales de tous les éléments ajoutés en solution, il a été établi que les systèmes étaient saturés par rapport à certains oxydes de fer (Tableau 3.4).

Lors de la préparation des échantillons en laboratoire, le taux d'oxydation du Fe(II) fut relativement lent, car le pH était fixé à une valeur avoisinant les 5.75. Il a été démontré qu'un taux d'oxydation rapide permettait la formation d'espèces amorphes ou peu ordonnées (comme la ferrihydrite) tandis qu'une oxydation lente favorisait la formation d'espèces dites cristallines, donc plus stables dans l'environnement (lépidocrocite/goethite) (Martinez et McBride, 1998; Gálvez et al., 1999). Plusieurs études effectuées en laboratoire et sur le terrain tendent à démontrer qu'à des pH intermédiaires (4.5 à 6.5), la formation de la ferrihydrite est grandement favorisée, mais dans plusieurs cas également, la présence de lépidocrocite ne peut être ignorée (Tipping et al., 1989b; Fortin et al., 1993; Bigham et al., 1996; Tessier et al., 1996; Jambor et Dutrizac, 1998; Gálvez et al., 1999; Hochella et al., 1999; Perret et al., 2000).

L'identité de l'oxyde de fer formé en solution est également fonction de l'impureté présente dans le système au moment de l'oxydation. Il a été maintes fois observé que la présence du silicium tendait à favoriser la formation de ferrihydrite (Tipping et al., 1989b; Kandori et al., 1992; Jambor et Dutrizac, 1998; Martinez et al., 1999). Toutefois, en considérant l'ensemble des conditions physico-chimiques des systèmes au temps de départ, la ferrihydrite n'est jamais représentée comme une espèce pouvant se former, car les systèmes sont tous sous-saturés par rapport à cet oxyde (Tableau 3.4). Il faut toutefois mentionner ici, que le produit de solubilité de la ferrihydrite a été corrigé pour tenir compte de la taille des particules se formant dans les systèmes. Les observations microscopiques ont indiqué que les particules amorphes granulaires avaient une taille d'environ 1 à 10 nm (Tableau 3.6). En tenant compte de la correction pour la taille (Équation 3.4a), le produit de solubilité (K_{so}) de la ferrihydrite est passé de 4.89 à 10.29. Selon l'information présentée ci-dessus, il est donc

possible que la ferrihydrite ne se soit pas formée dans les systèmes abiotiques .

L'identification des oxydes de fer abiotiques s'est effectuée selon deux méthodes distinctes. La première façon fut d'employer la technique de la diffraction des rayons X (XRD). Les systèmes abiotiques ne contenaient aucune bactérie et par le fait même avaient moins de matériel à présenter au rayonnement. Il a fallu trouver une technique complémentaire afin d'avoir assez de matériel dans le but d'obtenir un diffractogramme valable. Près de 500 millilitres de chacun des systèmes furent filtrés mensuellement et les plus grosses particules furent retenues à l'aide d'un filtre de 0.45 μm . Les filtres furent ensuite soumis aux rayons X, mais aucun pic d'intensité significatif n'est apparu. En fait, le diffractogramme était identique à celui du filtre seul. Les résultats de diffraction-X indiquent donc que tous les oxydes de fer formés dans les systèmes abiotiques étaient amorphes ou peu ordonnés et qu'ils n'ont pas évolué vers des formes plus cristallines, car les patrons au départ et à la fin de la recherche étaient identiques. Par contre, plusieurs expériences effectuées par d'autres chercheurs stipulent que la méthode de diffraction des rayons X est inadéquate pour l'analyse de matériel amorphe de petite taille (Martinez et McBride, 1998). L'utilisation de techniques XAS (X-ray absorption spectroscopy) serait en fait plus pertinente, car ces dernières permettent d'étudier la structure atomique des oxydes de fer (Manceau et Gates, 1997) restreignant ainsi les erreurs reliées à une fausse interprétation. Malheureusement, cette technique n'était pas accessible pendant cette recherche. Par contre, des études expérimentales très similaires aux nôtres (Châtellier et al., 2001) ont indiqué que la lépidocrocite se formait sous des conditions abiotiques. Le pH de leur synthèse était toutefois légèrement différent du nôtre avec une valeur de 7.00 au lieu de 5.75. Également, la filtration

fut remplacée par une technique de centrifugation qui élimina les erreurs reliées au spectre cristallin du filtre. Les quantités utilisées ici ne permettaient pas l'utilisation d'une telle technique. La divergence des techniques employées et la différence de pH pourraient expliquer pourquoi la présence de la lépidocrocite sur les filtres n'a pu être observée.

La deuxième méthode utilisée pour identifier le matériel des systèmes abiotiques fut la couleur distinctive du film d'oxydes de fer sur le papier filtre lors de l'étape de la filtration. La composition minéralogique de l'oxyde peut parfois être confirmée par l'analyse de sa couleur (Cornell et Schwertmann, 1996). Cette association est subjective puisque la couleur des filtres est probablement induite par la quantité et la taille des oxydes de fer présents sur le papier. Dans presque tous les systèmes, la couleur du film d'oxydes de fer formé se rapprochait de celle de la lépidocrocite et de la goethite (Figure 3.10). Ces deux espèces pouvaient se former dans tous les systèmes, car il y avait saturation (Tableau 3.4). Par contre, ces espèces d'oxydes de fer sont plus cristallines que la ferrihydrite et elles auraient dû être identifiées par diffraction-X. Les résultats précédents indiquent le contraire.

Selon le type d'impureté introduit dans les systèmes, quelques choix alternatifs à la lépidocrocite et la goethite étaient possibles. Les oxydes de fer formés dans les systèmes contenant du sulfate possédaient une couleur qui se rapprochait de celle de la schwertmannite et de l'akaganéite. La schwertmannite est un oxyde de fer couramment retrouvé dans la nature. Le sulfate est un élément clef dans la formation potentielle de la schwertmannite puisque la structure de base de celle-ci repose sur l'akaganéite, mais l'ion chlorure est remplacé dans la structure par le sulfate disponible en solution (Bigham et al., 1996; Cornell

et Schwertmann, 1996). L'akaganéite est une espèce d'oxyde de fer qui n'est pas commune et nécessite une forte concentration de chlore pour réussir à se former (Cornell et Schwertmann, 1996). Ces conditions n'étaient pas présentes pendant l'expérimentation et la possibilité d'obtenir de l'akaganéite comme espèce minérale est donc rejetée. La présence de schwertmannite dans les systèmes contenant du sulfate ne peut pas être ignorée, car cet oxyde peut se former à des pH légèrement acides (5.75) et sa structure a longtemps été confondue à celle de la ferrihydrite (Jambor et Dutrizac, 1998; Bigham et al., 1990; Bigham et al., 1996). De plus, les systèmes contenant du sulfate étaient tous saturés par rapport à la schwertmannite (Tableau 3.4).

La couleur des oxydes de fer formés dans les systèmes contenant du phosphate à une concentration de $10^{-5}M$ s'apparentait à celle de la goethite et de l'akaganéite. Pour des raisons identiques à celles mentionnées ci-haut, seule la goethite représentait une espèce apte à se former dans cette recherche. Pour le système contenant du silicium, la couleur du film d'oxydes de fer se rapprochait de celle de la lépidococite, de la goethite et de la ferrihydrite. Les indices de saturation calculés pour les systèmes contenant du silicium ont toutefois indiqué qu'il y avait sous-saturation par rapport à la ferrihydrite et saturation par rapport aux deux autres espèces (Tableau 3.4).

En conclusion, il apparaît évident que la couleur des oxydes de fer ne permet pas une identification positive des types d'oxydes de fer formés dans les systèmes et que ces derniers semblent amorphes par diffraction-X. La probabilité d'obtenir de la goethite, une espèce cristalline, est donc pratiquement inexistante. L'identification minéralogique des oxydes de

fer abiotiques demeure donc peu concluante et les résultats suggèrent que les espèces formées sont possiblement demeurées amorphes ou peu ordonnées pour la durée de l'expérience.

4.1.1.2. Formation et évolution cristalline des systèmes biotiques

La présence de bactéries lors de la formation de divers minéraux (oxydes de fer, silicates, carbonates, etc.) affecte la structure et la taille des particules (Fortin et al., 1997; Fortin et Beveridge, 2000). L'étude de Châtellier et al. (2001) a démontré que la présence de bactéries, pendant la synthèse d'oxydes de fer, n'influencait pas la minéralogie des oxydes de fer, mais plutôt leur degré de cristallinité. Dans leur recherche, la lépidocrocite s'est formée en présence et en absence de bactéries, mais les cristaux biogéniques, c'est-à-dire ceux formés en présence de bactéries, présentaient une atténuation des réflexions 6.26Å et 3.29 Å (associées à la lépidocrocite) lors de l'analyse par diffraction-X.

Pour tous les systèmes, l'identification exacte de l'oxyde de fer par diffraction-X s'est avérée des plus difficile puisque les pics d'intensité sur presque tous les diffractogrammes étaient à peine visibles et que le bruit de fond du support, ainsi que la présence de bactéries, masquaient plusieurs réflexions. De plus, le matériel observé ne possédait pas un ordre cristallographique élevé puisque les pics étaient très larges et l'identification de l'emplacement exact de la réflexion la plus intense pouvait varier énormément. Aussi, les valeurs de d_{hkl} de la goethite et l'hématite, la lépidocrocite et la ferrihydrite sont très similaires, rendant leur différenciation pratiquement impossible. Pour obtenir des résultats homogènes, l'analyse fut limitée aux trois réflexions les plus intenses pour chacune des espèces cristallines pouvant se former en solution. La corrélation des pics avec ces points pré-déterminés fut tentée par la

suite (Tableau 3.5). Il est présumé qu'un matériel amorphe (peu cristallin) possèdent les réflexions les plus intenses seulement. Dans presque tous les cas, plusieurs identités sont discutables, en partie parce qu'aucun échantillon ne présentait exactement les réflexions des minéraux purs. L'introduction d'une impureté dans la structure cristalline des oxydes de fer peut cependant influencer la position des réflexions par diffraction des rayons X, déplaçant celles-ci quelque peu (Martinez et McBride, 1998; Schulze et Schwertmann, 1987). D'ailleurs, pour cette dernière raison, l'utilisation de la base de données intégrée à l'appareil Phillips utilisé n'a pu être mise à profit adéquatement. En effet, pour obtenir des résultats exacts, il fallait que la réflexion soit exactement celle retrouvée dans la base de données, limitant notre capacité d'analyse. Également, puisque notre matériel était très faiblement cristallin, la machine arrivait avec peine à détecter les pics amorphes rendant l'analyse impossible à accomplir. Il a donc fallu transformer les spectres en format Excel et déduire la position des pics à l'oeil nu. L'amélioration des patrons fut tentée en augmentant le temps d'analyse de l'échantillon, mais même en employant un temps de 15 heures, les pics ne furent pas plus clairs. Il a donc été décidé de modifier le moins possible les paramètres et de continuer à utiliser un temps d'analyse de 1h30.

A maintes occasions, des réflexions non caractéristiques des oxydes de fer étaient visibles dans les diffractogrammes. Après quelques tests, il s'est avéré que ces pics semblaient correspondre aux sels de départ utilisés lors de la synthèse des oxydes de fer. Lors de l'épisode du séchage des oxydes, une portion de l'eau introduite pendant les étapes de lavage s'est évaporée et les sels initialement dissouts en solution furent alors en mesure de précipiter. Il a également fallu considérer l'oxydation possible du chlorure ferreux en chlorure ferrique et

la corrélation de certains pics avec cette espèce. D'ailleurs, quelques systèmes montrent des pics associés à cette forme cristalline (Tableau 3.6).

Les espèces cristallines d'oxydes de fer dépendent souvent des espèces introduites en solution au départ. À titre d'exemple, la formation de la schwertmannite est favorisée à pH acide et en présence de sulfate, alors que la ferrihydrite se forme souvent en présence de Si (Cornell et Schwertmann, 1996). À l'encontre des systèmes abiotiques, où l'identification des oxydes de fer était impossible, celle des espèces biotiques s'est avérée un peu plus facile. Par contre, l'évaluation de l'évolution cristalline s'est avérée difficile à accomplir puisque les espèces identifiées au départ ne concordaient pas toujours avec les espèces à l'arrivée (Tableau 3.6). Afin de prédire si des changements cristallographiques ont pu survenir, les résultats des analyses chimiques et du TEM ont du être considérés.

Dans l'ensemble des systèmes étudiés et ce, pour les temps d'échantillonnage sélectionnés, la lépidocrocite, la goethite et la ferrihydrite ont été identifiées comme formes principales d'oxyde de fer (voir Tableau 3.6). Cependant, seuls les systèmes contenant des réflexions s'approchant de celle de la lépidocrocite ne prêtaient pas à confusion sur l'identité de l'oxyde en solution. En effet, la lépidocrocite possède une réflexion intense (0.9) à 3.29 Å qui lui est unique. Or, il faut mentionner que sur la plupart des spectres, de minuscules pics sont visibles aux environs de 3.26 Å, pouvant laisser supposer la présence de lépidocrocite. La goethite possède également une réflexion qui lui est caractéristique à 4.18 Å. Les réflexions se situant près de 2.69 Å, 2.50 Å et 1.6 Å peuvent être associées à plusieurs oxydes rendant leur différenciation impossible quand une seule réflexion est présente. D'autres

oxydes de fer sujets à se former, selon les impuretés présentes dans le milieu, sont indiqués au Tableau 3.6.

La présence de lépidocrocite est justifiée, car cet oxyde se forme généralement lors de l'oxydation de Fe(II) à des pH près de la neutralité (Schwertmann et Thalmann, 1976; Schwertmann et Fitzpatrick, 1977; Wang et al., 1999). La ferrihydrite pourrait être une autre espèce retrouvée dans les systèmes puisque quelques réflexions par diffraction des rayons X ont semblé indiquer sa présence (Tableau 3.6). Toutefois, les indices de saturation calculés à l'aide de MINEQL⁺ indiquent que cet oxyde ne peut pas se former dans les conditions des systèmes (tableau 3.4). L'absence de ferrihydrite, surtout dans les systèmes contenant du Si, est toutefois inattendue, car plusieurs travaux de Schwertmann ont indiqué que ce type d'oxyde de fer est généralement formé sous ces conditions (Schwertmann et Thalmann, 1976). Par contre, l'analyse chimique du surnageant de ces systèmes a montré que le Si y est demeuré majoritairement en solution (Figure 3.4). La goethite pourrait également être présente dans quelques systèmes, même si cette espèce est préférablement favorisée au détriment de la lépidocrocite quand du gaz carbonique est présent dans l'environnement (Schwertmann et Fitzpatrick, 1977). En effet, à certains endroits, des réflexions se rapprochant de 4.18 Å sont visibles. Il est cependant problématique d'identifier un oxyde de fer avec une seule réflexion valable. Or, comme les résultats de diffraction X sont peu concluants, la présence de cet oxyde fut considérée dans les systèmes puisque son association avec Si et PO₄ fut identifiée préalablement (Quin et al., 1988).

Ces résultats indiquent que les oxydes de fer biotiques ne se transforment pas dans le temps, tout comme les oxydes de fer abiotiques. En effet, d'après les résultats obtenus, une espèce amorphe n'a pas évolué vers une espèce dite cristalline. En effet, la goethite, une espèce cristalline, n'a pas été davantage observée après 6 mois. Elle était présumée présente dans certains systèmes dès le début de l'expérience. La stabilité de la lépidocrocite et d'autres espèces s'explique peut-être par le fait que les impuretés (comme Si, SO₄, PO₄) ont stabilisé le cristal et retardé sa transformation en formes plus stables (Von Gutten et Schneider, 1991; Cornwell et Kipphut, 1992; Stumm et Sulzberger, 1992; Paige et al., 1997; Martinez et McBride, 1998). Or, il faut remarquer qu'aucun système n'a généré les mêmes pics au temps de départ et d'arrivée i.e. qu'une espèce retrouvée au temps 0 n'a pas été nécessairement retrouvée au temps 6 mois. Le spectre de diffraction X n'a pas subi de changements majeurs au cours de la durée de l'expérience. Par contre, plusieurs paramètres tels que la quantité d'échantillons soumis au rayonnement, l'orientation des grains sur le support et la perte de faibles pics dans le bruit de fond pourraient peut-être expliquer pourquoi les espèces de départ à l'arrivée ne sont pas les mêmes. Il faut également mentionner que la possibilité d'avoir des mélanges d'oxydes dans les systèmes ne fut pas considérée. La difficulté lors de l'identification des oxydes pourrait donc être justifiée par la présence de nombreux produits masquant leurs réflexions simultanément.

4.1.2. Analyses chimiques en solution

Afin d'appuyer les résultats trouvés par diffraction des rayons X, l'analyse mensuelle des impuretés retrouvées dans les surnageants des différents systèmes fut effectuée. En déterminant l'ampleur de leur incorporation ou adhésion à la structure de l'oxyde de fer, il est

possible de déterminer si ce facteur influence la stabilité des oxydes de fer présents dans les systèmes.

Les analyses chimiques effectuées sur le surnageant des systèmes contenant 10^{-4} M de fer indiquent que la majorité du sulfate et du Si est demeuré en solution après la synthèse (Figure 3.4). Le phosphate a quant à lui été incorporé ou adsorbé en plus grande concentration par les oxydes de fer (Figure 3.4). Les bactéries peuvent aussi avoir participé à l'immobilisation du phosphate, mais l'ampleur ne peut être déterminée à ce stade. La rétention (par attraction électrostatique) d'espèces anioniques à pH 5.75 par les bactéries devrait par contre être négligeable, car les bactéries possèdent une charge nette négative (Fein et al., 1997). La large quantité de phosphate associé aux oxydes de fer suggère que cette impureté a plutôt été incorporée à la structure de l'oxyde et non pas adsorbée à sa surface. Des travaux de Tipping et Buffle (Buffle et al., 1989; Tipping et al., 1989a) ont démontré que les oxydes de fer naturels pouvaient en fait contenir de grandes quantités de phosphate structural.

Dans les systèmes contenant 10^{-5} M de Fe, le Si est demeuré majoritairement en solution, mais une portion importante de SO_4 était associée aux oxydes de fer (Figure 3.4). Une faible quantité de PO_4 était également inclus dans la structure des oxydes (Figure 3.4). Le phosphate était sûrement structural, mais le comportement du sulfate est néanmoins bizarre, car la quantité d'oxydes de fer était inférieure dans ces systèmes et les oxydes de fer auraient dû adsorber ou incorporer moins d'ions SO_4 que les systèmes à 10^{-4} M Fe. Il est impossible d'expliquer avec certitude, pour le moment, ce comportement inhabituel du sulfate, mais il est supposé que les fluctuations majeures de concentrations survenues dans les systèmes 10^{-4} M y

sont pour une bonne partie responsable. En effet, dans ces derniers systèmes, la concentration recueillie par la méthode du HACH était en tout temps très près de la limite de détection de l'appareil, pouvant par le fait même fausser les résultats. D'après les valeurs, il semblerait que les impuretés (à l'exception du PO_4) aient joué un rôle mineur dans la stabilisation des oxydes de fer. En effet, les changements survenus au niveau chimique appuient l'état d'équilibre des systèmes. L'absence de transformation des oxydes de fer pourrait être attribuable à la présence de matière organique dissoute provenant des bactéries en décomposition. Par contre, le carbone organique dissout (COD) n'a pas été mesuré dans les surnageants des divers systèmes, mais les observations par MET ont indiqué que les bactéries de plusieurs systèmes étaient partiellement décomposées ou ne contenaient pas de matériel plasmique (Figures 3.11 et 3.14). Des travaux de Schwertmann (Schwertmann, 1966) ont indiqué que l'adsorption de composés organiques à la surface d'oxydes de fer empêchait leur transformation ultérieure. Il est donc fort possible que le carbone organique dissout ait joué un rôle stabilisateur plus important que les autres impuretés ajoutées aux systèmes.

4.1.3. Évolution morphologique des oxydes de fer en laboratoire

La meilleure façon de visualiser la morphologie d'oxydes de fer formés dans un système est d'observer les précipités à l'aide de la microscopie électronique. Cette technique permet, dans un premier temps, de s'assurer de la présence quantitative des oxydes de fer et dans un deuxième temps, permet d'associer leur morphologie à une espèce cristalline unique.

Comme il a été constaté pour les oxydes abiotiques recueillis par les filtres, la couleur distinctive est fonction de la quantité des particules se retrouvant à la surface. Dans tous les

systèmes observés par microscopie électronique, les systèmes contenant moins de fer avaient moins de précipités visibles que les autres. L'analyse des oxydes de fer abiotiques n'a pu toutefois être effectuée à l'aide de la microscopie électronique à transmission (MET), car les échantillons avaient été imprégnés avec le filtre et ce dernier a masqué les réflexions associées aux particules d'oxydes de fer.

Pour les échantillons biotiques en coupes minces et imprégnés dans la résine (soit le Nanoplaste et le TAAB) , il est apparu évident dès le départ que les oxydes présents à la surface des bactéries et ceux dispersés dans le milieu extracellulaire étaient très rares et ce, pour les deux concentrations de fer utilisées. En effet, le visionnement des échantillons n'a permis d'identifier que du matériel granulaire en quantité appréciable que dans les systèmes contenant du silicium (Figures 3.11 à 3.17). Les difficultés rencontrées lors des observations par MET sont en partie reliées au fait qu'une très petite quantité de matériel a été prélevée et que les précipités ont été lavés plusieurs fois avant d'être imprégnés. Les multiples étapes de lavage ont sans doute enlevé une grande partie des oxydes de fer présents à la surface des bactéries. De plus, le fait de chauffer un échantillon dans une résine pour la polymérisation (imprégnation) peut également entraîner un artéfact. Lors de la mise au four, la chaleur peut entraîner une circulation à l'intérieur de la résine faisant en sorte que le matériel bouge vers le ménisque formé dans la partie supérieure de l'échantillon (Leppard, 2001, comm. pers.). Une fois parvenu à cet endroit, il y reste collé. L'observation par microscopie ne détecte pas ces particules ce qui fait que la grille semble désertée par les microorganismes.

Les erreurs reliées au temps de séchage inadéquat et à l'ordre des étapes lors de l'imprégnation n'ont probablement pas influencé le faible taux d'oxydes de fer retrouvés dans ces échantillons. En effet, seuls les échantillons imprégnés à l'aide du Nanoplaste ont été utilisés lors des analyses puisque ceux déshydratés possédaient des interférences en analyse EDS reliées aux diverses étapes de teinture pour améliorer le contraste des oxydes de fer. La dissolution possible des exopolymères de *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa* en présence du tampon Cacodylate et de glutaraldéhyde (avant l'étape de rouge de ruthénium) n'a donc pu être vérifiée. Le temps de séchage trop court pour les échantillons imprégnés au Nanoplaste peut avoir occasionné une plus grande difficulté lors du sectionnement, mais ne peut avoir enlevé les oxydes de fer du système. Les difficultés associées aux étapes du protocole ont été prises en note, mais n'ont pas semblé avoir une influence majeure sur les résultats de cette étude.

La détermination de la composition chimique des oxydes de fer fut seulement possible pour quelques échantillons puisque l'analyseur EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) a rendu l'âme avant que les analyses puissent être complétées. Les quelques spectres recueillis (S1AT6, S5AT6, S6AT0, S6AT6, S7AT6, S9AT0 et S10T6) ont démontré la présence de fer dans les fins précipités (Figure 3.20).

Dans quelques systèmes, notamment ceux plus riches en fer (i.e., 10^{-4}M), une faible concentration de matériel était visible à la surface des bactéries, mais il est évident que la paroi cellulaire était loin d'être recouverte en entier (Figures 3.11 à 3.17). Des observations similaires ont été faites par Châtellier et al. (2001). Ils ont attribué ce manque de

recouvrement à la méthode de préparation des échantillons. Pour essayer de contrer les erreurs pouvant être associées à la méthode d'imprégnation et à un grand facteur de dilution, des échantillons frais ont été déposés directement sur une grille (whole mount) et ont été observés en microscopie électronique à l'Université d'Ottawa. Cette méthode a permis d'observer des quantités variables d'oxydes de fer formés (dépendant de la quantité de fer introduite initialement) sur la paroi cellulaire, mais aussi entre les bactéries (Figures 3.18 et 3.19).

La morphologie des oxydes de fer biogéniques variait de granulaire à amorphe, mais parfois de fines aiguilles étaient visibles, surtout sur les "whole mounts" (Figures 3.15, 3.18 et 3.19). Les observations microscopiques n'ont pas permis d'établir de différences majeures entre les divers types de bactéries ou d'impuretés ajoutés aux systèmes. De plus, les fines particules d'oxydes de fer apparues dans les systèmes, au début de l'expérience, avaient la même apparence que celles observées après 6 mois.

Plusieurs oxydes adoptent une forme cristalline qui leur est parfois particulière et qui peut servir à appuyer les résultats trouvés par d'autres méthodes analytiques. Par exemple, la goethite déploie des cristaux aciculaires, ceux de la lépidocrocite ont l'aspect de lattes, ceux de la ferrihydrite forment des granules et finalement, ceux de l'hématite ont l'apparence de romboèdres ou d'hexagones (Schwertmann et Cornell, 1996). À quelques reprises, l'aspect granulaire du matériel s'apparentait à la morphologie de la ferrihydrite (Figure 3.17) mais les calculs de saturation ont indiqué que cet oxyde de fer ne se formait pas dans les systèmes. De plus, des travaux de Châtellier ont indiqué que la lépidocrocite pouvait parfois avoir une forme granulaire lorsque la croissance des cristaux étaient limitée le long de l'axe C

(Châtellier, 2001, comm. pers.). Les observations confirment donc la stabilité cristalline des oxydes de fer dans le temps, tel que démontré par les analyses par diffraction X. Elles sont aussi corroborées par la stabilité chimique des milieux.

La présence d'impuretés dans les systèmes n'a pas eu d'effet sur la morphologie des oxydes de fer, mais elle a influencé la préservation des cellules bactériennes. Pour plusieurs systèmes, en effet, l'aspect des cellules fut conservé presque parfaitement même après six mois dans des conditions de survie extrêmement difficiles (Figure 3.13). Les systèmes possédant seulement du fer ou de l'aluminium avaient des cellules plus déformées que les autres systèmes (Figures 3.14 et 3.16). Le sulfate et le silicium ont, quant à eux, mieux préservé la paroi cellulaire (Figures 3.11, 3.12 et 3.15). De toutes les impuretés, le phosphate représente celle qui a conservé le mieux la paroi cellulaire bactérienne pour la durée de l'expérience. Il faut cependant noter que les bactéries semblaient être en mauvais état dès le début de la recherche. En effet, leur cytoplasme était concentré dans certaines sections de la cellule seulement, créant un aspect non uniforme (Figure 3.17). Des travaux de Ferris et al. (1988) ont démontré que la sorption de Si à la surface de la paroi cellulaire empêchait la détérioration des cellules car l'activité des enzymes lytiques était possiblement interrompue par la sorption des métaux. Le rôle du sulfate et du phosphate sur la préservation des bactéries n'est toutefois pas connu.

La préservation partielle ou complète des cellules n'a pas empêché la formation d'oxydes de fer. De plus, une cellule morte a tendance à sorber plus de métaux qu'une cellule vivante, car chez les cellules mortes, il n'y a pas de pompage de protons à travers la

paroi cellulaire (Urrutia et al., 1992). Les cellules mortes peuvent donc jouer un rôle d'adsorption et de nucléation important dans un écosystème lacustre.

Fait intéressant à noter, des observations effectuées après 10 mois de vieillissement ont démontrées que certaines cellules semblaient se connecter par l'intermédiaire d'exopolymères (Figure 3.18). Ce processus serait relié à l'absence d'éléments dans les systèmes puisqu'il est remarqué dans les distributeurs d'eau distillée. Il demeure néanmoins intéressant de l'observer dans quelques uns des systèmes et soulève des questions quant à la capacité de certaines bactéries de produire des exopolymères lorsqu'elles sont en état de stress.

L'aspect morphologique des oxydes de fer indique l'absence d'évolution cristallographique puisque la forme des oxydes est demeurée sensiblement constante dans le temps.

4.2. Évolution chimique et effets des différents types de bactéries sur la formation d'oxydes de fer

Le deuxième volet de l'expérimentation en laboratoire consistait à déterminer si le type de bactéries mis en solution influençait la transformation des oxydes de fer. Puisqu'à la section précédente il a été conclu que les systèmes n'avaient pas évolué dans le temps de façon cristallographique, il est logique de penser que l'effet de la présence des bactéries sur le cristal formé fut mineur, car elles représentent, somme toute, des substrats passifs de nucléation. Dans le but de démontrer le rôle joué par ces microorganismes dans l'adsorption, la formation et le vieillissement des oxydes de fer, une étude physico-chimique des systèmes

abiotiques et biotiques fut effectuée. La comparaison entre les différents microorganismes est rendue possible car les conditions de départ furent identiques pour chacun des systèmes (Tableaux 3.1 et 3.2).

4.2.1. Systèmes abiotiques

Les systèmes abiotiques ont conservé un taux relativement stable de fer total dissout en solution au fil du temps, ce qui laisse supposer l'inexistence de précipitation ou d'adsorption à la surface des oxydes de fer au fur et à mesure que l'expérience progressait (Figure 3.5). Par contre, il est difficile d'affirmer avec certitude ce que devient le fer qui n'est plus en solution puisque la quantification de fer cristallin versus fer amorphe est impossible à établir avec les techniques utilisées ici. Il est donc suggéré, à des fins pratiques, que le matériel qui n'est pas en solution est sous forme d'oxydes de fer ou de précipités.

Les systèmes contenant une plus faible quantité initiale de fer sont plus difficiles à interpréter, car plusieurs fluctuations apparaissaient (Figure 3.5). Cependant, il est impossible de corréler ces changements brusques de concentrations avec un changement chimique du milieu (pH et Eh), car dans la plupart des cas, il y a contradiction. En effet, une baisse de potentiel rédox laisse supposer, à priori, une réduction des oxydes donc une plus grande concentration dissoute de l'élément, mais rarement cette corrélation est véridique. Il est sûrement plus juste de regarder l'évolution des systèmes globalement plutôt que spécifiquement, point par point, car les variations pourraient ne pas être représentatives de la réalité. Il est possible que les changements observés soient en fait causés par une erreur analytique reliée à la limite de détection des appareils. La filtration apporte également des

variations substantielles en ce qui concerne les éléments étudiés dans notre recherche (Horowitz et al., 1996). Le diamètre du filtre, le fabricant ainsi que le volume de solution filtré sont tous des facteurs problématiques. En effet, un filtre de 0.2 microns fut utilisé pour empêcher les bactéries d'interagir avec les résultats de concentrations des éléments totaux dissouts comme le phosphate et également pour retirer les oxydes de fer fixés à leur surface des analyses en solution. Par contre, certaines nanoparticules d'oxydes de fer ont pu être délogées et introduites dans le surnageant ainsi que des particules de bactéries en décomposition. De plus, trente (30) millilitres de surnageant étaient filtrés avec un seul filtre, réduisant la grosseur des pores au fur et à mesure que la quantité de surnageant passée au travers du filtre augmentait. Ainsi, il est à supposer que les derniers millilitres filtrés passaient au travers de pores obstrués de grandeur inférieure à 0.2 microns.

La concentration initiale des impuretés semble avoir affectée la concentration de fer total dissout en solution. Cette observation est en fait valide pour tous les systèmes contenant du silicium, car cet ion était présent en grande quantité, soit 10^{-3} M et très peu de fer était présent sous forme soluble dans ces systèmes. Il est toutefois possible que cette observation soit fortuite et que le vrai facteur soit plutôt les fluctuations de pH lors de la synthèse. En fait, lors de l'addition initiale de Si, le pH de la solution a augmenté, car la solution mère de silicates était très basique. Par conséquent, le pH a dû être ré-ajusté à la baisse à maintes reprises. L'augmentation brève du pH a potentiellement affecté le taux d'oxydation du Fe(II) en Fe(III), tel que démontré par l'équation 1.6. Une faible augmentation du pH a donc eu pour effet d'augmenter le taux d'oxydation du Fe(II) en Fe(III). Les fluctuations initiales de pH dans les systèmes contenant du Si ont donc favorisé une oxydation plus rapide du Fe(II) et la

formation d'une plus grande quantité d'oxydes de fer dans les systèmes, d'où les faibles concentrations de fer total dissout au départ (Figure 3.5).

La concentration de Fe(II) soluble a fluctué dans le temps. D'abord, les concentrations retrouvées en solution suivent l'évolution du fer total dissout, i.e. plus il y a de fer total dissout, plus il y a de Fe(II) présent en solution (Figure 3.6). Il semble toutefois y avoir une légère baisse de la concentration de Fe(II) soluble dans le temps, et ce dans tous les systèmes (Figure 3.6). Les fluctuations entre les points de départ et d'arrivée peuvent être reliées à une multitude de facteurs: il peut y avoir eu adsorption et désorption de Fe(II) à la surface des oxydes de fer et des bactéries ou dissolution et ré-oxydation rapide des oxydes de fer frais causés par les variations de potentiel rédox et de pH. Par contre, le prélèvement mensuel d'échantillons (solides et liquides) a augmenté le rapport air/liquide dans les bouteilles et a sûrement favorisé une oxydation des ions Fe(II) en solution. En effet, 5 mois après le début de l'expérience, une augmentation du potentiel rédox est visible pour plusieurs systèmes (Figure 3.3). Ainsi, les systèmes n'ont pas développé de conditions anaérobiques pendant la période de diagénèse simulée, car une augmentation de la quantité de Fe(II) en solution au fil du temps aurait été observée. Les variations de Fe(II) demeurent donc inexplicées. Parfois, une proportion initiale plus élevée de Fe(II)/ Fe(total) peut être remarquée pour les systèmes contenant moins de fer (10^{-5} M) comparé aux systèmes 10^{-4} M, surtout quand le silicium est mis en cause. Ceci est directement relié au taux d'oxydation qui est fonction de la concentration de fer initialement introduite en solution dans des conditions de pH et $p\text{CO}_2$ similaires (Équation 4.1). À plus forte concentration, les chances d'oxydation sont plus élevées, favorisant les systèmes 10^{-4} M. Toutefois, la méthode de la Ferrozine, plus précise, a

démontré que la concentration initiale de Fe(II) dans tous les systèmes 10^{-5} M représentait 5% de la concentration initiale de fer contre 50% dans le cas de fer 10^{-4} M (Figure 3.7), ce qui va à l'encontre de l'équation précédente.

La concentration des impuretés en solution est demeurée stable dans les systèmes abiotiques pendant la période de 6 mois (Figure 3.4). Ceci suggère que les oxydes de fer n'ont pas adsorbé ou incorporé d'impuretés pendant la période de vieillissement. Par contre, la concentration de sulfate et de phosphate excédaient parfois la quantité initialement trouvée dans le système, supposant une contamination quelconque. Dans le cas du sulfate, la concentration initiale était en fait à la limite de détection de l'appareil HACH, ce qui a pu engendrer des erreurs de mesure. Pour le phosphate, la limite de détection était meilleure et il est possible qu'une contamination se soit produite au cours de l'expérience puisqu'aucune bactérie n'était présente dans ces systèmes.

4.2.2. Systèmes biotiques

De façon générale, les systèmes comportant des bactéries possédaient une plus faible concentration d'éléments dissouts dans le milieu en les comparant aux systèmes abiotiques (Figures 3.4 et 3.5). Ceci est relié au fait que dans les systèmes biotiques, deux entités peuvent capter les ions en solution: les oxydes de fer biogéniques et les bactéries.

La stabilité chimique des oxydes de fer biogéniques peut être considérée pour la durée de l'expérience (appuie les résultats trouvés préalablement). Parfois, une faible diminution de la concentration du fer total dissout, du Fe(II), du phosphate, du silicium ou du sulfate est

visible entre chaque période d'échantillonnage, supposant la formation de précipités ou de nouveaux oxydes de fer et une adsorption favorisée aux sites réactifs des bactéries et des oxydes de fer dans des conditions oxydantes (Figures 3.4 à 3.8). Par contre, en d'autres occasions, une faible augmentation des mêmes éléments en solution à l'exception du sulfate est remarquée et peut-être expliquée par une baisse de pH des systèmes au fil du temps. L'adsorption de cations à la surface des bactéries et des oxydes est fonction du pH du milieu environnant, une baisse entraîne un relargage de ces espèces (Harrison et Berkheiser, 1982; Dzombak et Morel, 1990; Fein et al., 1997) ; Daughney et al., 1998). A l'opposé, une baisse de pH entraîne une plus grande adsorption des espèces anioniques (Dzombak et Morel, 1990).

En prenant en considération les concentrations des différentes espèces en solution seulement au temps initial et final, il est possible d'analyser les résultats en profondeur. Dans le cas du sulfate, les deux concentrations de fer employées ont généré des résultats similaires. Ainsi, une réduction du sulfate en solution est visible au fil du temps, d'après les concentrations obtenues avec la méthode colorimétrique du HACH. Ceci vient appuyer la tendance de cet élément à être adsorbé à bas pH et relargué à pH plus élevé. Le pH des systèmes 10^{-4} M devenait davantage acide au fur et à mesure de la progression de l'expérience (Figure 3.2), une réduction de la concentration de cet élément est logique. Une concentration de fer 10^{-5} M favorisait une augmentation de pH dans tous les systèmes, sans pour autant atteindre un pH basique. Les variations étaient comprises dans un écart d' une unité de pH.

Le phosphate en solution a réagi différemment selon l'espèce bactérienne présente dans les bouteilles. Dans les systèmes contenant *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *P. aeruginosa*

à une concentration de fer 10^{-4} M une réduction de l'espèce peut être remarquée (Figure 3.4). Dans tous ces systèmes, une réduction de pH a été observée (Figure 3.2). Cependant, *E.coli* et le système sans bactérie offrent un faible relargage de cet espèce en solution qui ne peut être expliqué (Figure 3.4). De même, les systèmes ayant une concentration de fer de 10^{-5} M en présence de *B. licheniformis* et *P. aeruginosa* ont favorisé le relargage du phosphate en solution sans offrir une corrélation viable avec le pH de la solution. Les autres systèmes se sont comportés comme prévu.

Le silicium a toujours favorisé une augmentation du pH de la solution au fur et à mesure de la progression de l'expérience, supposant le relargage possible à haut pH (Figure 3.2). Pour les systèmes 10^{-5} M, le retour de cet élément en solution s'est effectué en faibles proportions (Figure 3.4). Toutefois, à une concentration supérieure de fer (10^{-4} M), l'augmentation de pH n'a pas influencé le retour en solution de cet espèce, préférant une diminution de sa concentration en solution (Figure 3.4).

Bien qu'il est supposé qu'à un pH faible il y ait captage des éléments, il faut aussi prendre en considération que tout mécanisme possède des conditions d'équilibre qui lui sont spécifiques. Il est donc à noter que les résultats obtenus ici doivent être mis en parallèle avec l'effet des bactéries sur le pH du milieu ainsi que la gamme de pH permettant une adsorption à toute épreuve. Puisque ces critères ne sont pas connus ici, il est difficile d'émettre des conclusions.

La concentration de fer en solution a toujours semblé diminuer au fil du temps, car la

précipitation du fer est favorisée dans des conditions de pH allant de 4 à 9, condition respectant les résultats obtenus au cours de l'expérience. Également, MINEQL⁺ a indiqué que les conditions des différents systèmes respectaient les critères de saturation de plusieurs oxydes de fer appuyant leur formation (Tableau 3.4).

En tout et partout, les systèmes contenant des bactéries Gram - positives représentaient les systèmes ayant une plus forte concentration de fer en solution. En effet, les systèmes contenant *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis* à une concentration de fer de 10^{-4} M, avaient une concentration de fer initiale en solution plus importante que les bactéries Gram - négatives (Figure 3.4). Dans les systèmes comportant une plus faible concentration de fer (10^{-5} M), *Bacillus subtilis* menait le bal, suivi de *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa*. (Figure 3.4). Il peut être remarquer ici que *Escherichia coli* s'est glissé faiblement avant *Bacillus licheniformis*, indiquant par le fait même que les bactéries Gram - positives sont également capables de capter une grande partie du fer en solution. Par contre, une capacité d'adsorption légèrement plus faible dans les conditions du milieu pour les bactéries Gram - positives est soupçonnée. Les forces d'attraction et de maintien des ions à la surface seraient donc plus forts pour les bactéries Gram - négatives. Cette observation va à l'encontre des résultats trouvés précédemment par Beveridge et al. (1985) qui mentionnent que les bactéries Gram - positives sont en mesure de capter davantage d'ions à leur surface de part la diversité des groupes carboxyls et phosphoryls. *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sont les deux souches pouvant être considérées les plus petites, ce qui favorise l'adsorption à leur surface puisque pour obtenir une densité optique de 0.3, davantage de ces microorganismes furent nécessaires, augmentant le nombre de sites réactifs

disponibles. Le niveau du fer dissout tend, cependant, à diminuer dans le temps dans tous les systèmes (Figure 3.5).

Il est également logique de croire que le Fe(II) en solution disparaît au fil des mois, car aucune condition strictement anaérobie n'a été remarquée (Figure 3.3). Une baisse du potentiel rédox de quelques systèmes a été observée, mais une remontée après six mois est clairement visible. Aussi, il est rare que ces valeurs soient tombées sous la barre des négatifs lors de l'expérience. De plus, la présence accrue de surface réactive en solution fournit des substrats pour cet élément, réduisant de beaucoup les chances de le retrouver en solution. La concentration du Fe(II) tend à diminuer dans le temps, indépendamment des systèmes (Figure 3.6). *Bacillus licheniformis* est la seule souche bactérienne qui possède la totalité du fer en solution sous forme de Fe(III) à la fin de l'expérience (6 mois) (Figure 3.6). Pourtant, les conditions du milieu étaient toujours similaires à celles des autres systèmes. Une étude approfondie des réactions de cette souche bactérienne face à différents facteurs donnerait sûrement des renseignements sur le pourquoi d'un comportement si inattendu. En effet, de tous les systèmes, cette souche bactérienne a semblé répondre d'une façon unique sans pour autant être capable de corréler ces changements avec les conditions du milieu.

Les changements chimiques observés dans les différents systèmes au cours de l'expérimentation appuient l'idée de la stabilité des oxydes de fer puisqu'aucune dissolution majeure n'a été identifiée. Le type de bactérie présent dans le milieu n'influence guère l'identité de l'oxyde retrouvé dans le système; dans tous les cas la formation des mêmes oxydes de fer est soupçonnée. À long terme, *Bacillus licheniformis* pourrait présenter des

différences chimiques et cristallographiques majeures comparativement aux autres souches et ce, basé sur les résultats quelque peu à part retrouvés dans cette recherche.

4.3. Effet de la concentration initiale de fer introduite dans les systèmes

Un autre volet de notre expérimentation s'attardait à une étude d'impact reliant la quantité de fer introduite dans les systèmes au départ avec la quantité d'oxydes de fer formée initialement. Il a été suggéré qu'une quantité de fer originelle élevée permettait d'établir une adsorption ainsi qu'une nucléation à la surface des bactéries. Dans les systèmes ayant une plus faible quantité de l'élément, une adsorption seulement était envisagée.

4.3.1. Problématique de l'état d'oxydation

Au départ, il a été établi qu'un temps de bullage approximatif de deux heures, à un taux constant de une à deux bulles par seconde, serait requis afin d'oxyder au moins 70% du Fe(II) en solution, laissant une grande probabilité de former des oxydes de fer (III) par la suite. La quantification de l'oxygène dissout n'a pu être effectuée au moment de l'expérience. La saturation était supposée, car les bouteilles étaient partiellement recouvertes lors de l'oxydation, laissant une ouverture à l'oxygène de l'atmosphère en addition à celui propulsé dans les bouteilles. Il a été rapidement conclu, cependant, que la concentration de Fe(III) en solution dans tous les systèmes, à l'exception de ceux contenant du silicium, n'atteignait pas cette limite fixée, puisqu'un pourcentage important (environ 50%, tel que mesuré avec le HACH) demeurait sous forme de Fe(II) après le temps de bullage prescrit, limitant de moitié la quantité d'oxydes de fer pouvant se former (Figure 3.7). Une analyse ultérieure du Fe(II), à l'aide de la méthode de la ferrozine fut effectuée à des fins de comparaison. Il fut établi que la

quantité de Fe(II) présente au départ pour les systèmes contenant une faible concentration de fer (10^{-5} M) était de l'ordre de 5%, offrant ainsi une contradiction aux résultats trouvés par le HACH (Figure 3.8). La limite de détection élevée de la méthode HACH, ainsi que l'oxydation possible du composé lors de l'étape de la dilution, sont possiblement responsables de cette différence. Par contre, pour les systèmes contenant une plus grande quantité de fer en solution (10^{-4} M), 50% du fer était encore sous sa forme réduite après le bullage, venant appuyer les résultats trouvés préalablement avec la méthode colorimétrique du HACH (Figure 3.8).

4.3.2. Analyses par XRD et TEM

Finalement, il est important de mentionner que la quantité de fer introduite au départ n'a semblé avoir aucun effet sur l'identité de la structure cristalline trouvée à la fin de l'expérience. Les systèmes possédant dix fois moins de fer ont générés des résultats par diffraction X similaires aux systèmes correspondants à une plus forte concentration de fer (10^{-4} M). En effet, les deux concentrations de fer utilisées ont favorisé la précipitation des mêmes oxydes de fer en solution et à la surface des bactéries tel qu'indiqué par les indices de saturation (Tableau 3.4). L'adsorption est donc un phénomène secondaire dans ces conditions. L'espèce ou les espèces s'étant formées en solution n'a pu être déduite avec certitude, car la méthode du XRD n'était pas tout à fait adaptée au besoin de notre expérience, mais une série de possibilités peut être émise pour chacun des systèmes (Tableau 3.6). Compte tenu de la faible quantité de matériel disponible dans les systèmes contenant 10^{-5} M de fer, l'identification des oxydes de fer s'est avérée plus difficile, car les pics étaient invisibles dans le bruit de fond. Les résultats morphologiques appuient également la formation d'oxydes de fer similaires, mais il apparait évident que les systèmes possédant une plus grande

concentration de fer ont déployé des particules plus nombreuses.

4.4 Similarités entre les simulations de diagénèse et le milieu naturel

Les divers résultats obtenus ainsi que les conclusions tirées de la simulation de la diagénèse d'un milieu lacustre permettent de mieux comprendre certains mécanismes régissant cet environnement. Bien qu'incomplète sur certains aspects, l'étude effectuée sur une période de six mois vient appuyer quelques résultats et hypothèses soulevés en milieu naturel, par d'autres chercheurs. Ainsi, la formation d'oxydes de fer biogéniques amorphes a effectivement eu lieu dans les systèmes en déployant de fins cristaux peu ordonnés à la surface des bactéries. Cette trouvaille vient appuyer les résultats de Beveridge et Fyfe (1985), Bendell Young et Harvey (1991), Fortin et al. (1993), Fein et al (1997), Hochella et al. (1999), qui ont découvert quelques espèces minérales peu cristallines sur le terrain, comme la ferrihydrite ou la lépidocrocite. Les valeurs obtenues dans l'expérience tendent à appuyer la présence de lépidocrocite. Aussi, la présence d'impuretés dans les systèmes a influencé quelque peu l'identité de l'oxyde de fer de départ où une inclusion dans la structure cristalline ne peut être ignorée. Roden et Edmonds (1997) et Perret et al (2000) ont remarqué le même phénomène dans la nature. Le phosphate semble très bien préserver les cellules pour la durée de l'expérience, effet appuyé par Cornell et Schwertmann (1996) et démontré par Ferris et al. (1998) avec de la silice. L'évolution des oxydes de fer biogéniques en laboratoire s'est avérée stable, tant au point de vue morphologique que cristallographique. Par les similarités entre les études en laboratoire et les données observées à même l'environnement naturel, il est supposé que cette recherche est représentative d'un tel milieu, dans des conditions similaires.

5. CONCLUSION

Les résultats trouvés au cours de cette recherche aident à mieux comprendre la complexité de l'environnement aquatique. Le caractère amorphe et la petite taille des oxydes de fer biogéniques n'ont su justifier une transformation vers des formes cristallines dans le temps. La stabilité des oxydes de fer, formés en laboratoire dans des conditions se rapprochant de la réalité lacustre, permet de conclure que les oxydes de fer naturels se retrouvant dans les lacs sont possiblement tout aussi stables en présence d'impuretés à l'effet stabilisateur. Ceci implique, par conséquent, que les métaux traces sorbés à leur surface sont relativement stables et non disponibles pour les organismes. Il serait d'ailleurs important de connaître jusqu'à quel moment de telles conditions peuvent être maintenues. Qu'arrive-t-il quand le matériel organique est décomposé? Est-il possible d'établir la durée temporelle de la conservation des métaux à la surface d'une paroi cellulaire fossilisée? Quel serait l'effet d'une fluctuation de pH dans un environnement de cadavres cellulaires?

Les bactéries, quant à elles, apportent une dimension nouvelle à la problématique de la sorption des métaux traces et la recherche reliée à ce domaine est requise afin de mieux comprendre le phénomène. Les quatre souches étudiées ne semblaient pas affecter la minéralogie des oxydes de fer retrouvés dans les systèmes, mais il a été remarqué également que *Bacillus licheniformis* semblait parfois faire bande à part. Est-ce que les souches bactériennes possédant beaucoup d'exopolymères extracellulaires se comportent différemment? Il faut prendre en considération que les exopolymères représentent parfois une fraction importante des sédiments naturels (Fortin et al., 1993).

La quantité de fer initialement introduite dans les systèmes a effectivement eue un impact sur la quantité d'oxydes de fer biogéniques se formant à la surface des différents types de bactéries. Par contre, malgré la différence de concentration de fer employée, le phénomène de nucléation est apparu dans tous les systèmes. Le processus d'adsorption à la surface de la paroi cellulaire est secondaire dans les systèmes. La distribution des oxydes à la surface des cellules varie en fonction des conditions du milieu, mais rares sont les occasions où le recouvrement s'avérait total. Ceci n'a pourtant pas empêcher l'excellente préservation de certaines cellules en présence d'impuretés.

Il est certain que certaines méthodes d'analyse, inadéquates aux échantillons, ont souvent limité l'abilité à obtenir des résultats satisfaisants. Il serait intéressant d'étudier la structure et la composition chimique des oxydes de fer avec des techniques plus puissantes, comme la microscopie électronique à transmission à haute résolution et les techniques d'absorption des rayons X (EXAFS et XANES).

De plus, la simulation d'un milieu naturel est très difficile, car ce dernier est d'une grande complexité. Il est fort à parier que si les espèces bactériennes étaient mises dans un milieu naturel, des résultats différents seraient trouvés, car l'environnement comporte des facteurs variés qu'il est tout simplement impossible d'inclure dans une simulation en laboratoire. Il serait sans doute logique de considérer l'implantation de bactéries dans un milieu lacustre pollué pour évaluer jusqu'à quel point elles participent à la formation d'oxydes de fer et comment ces oxydes de fer se comportent face aux métaux en solution. Il y a

sûrement une quantité maximale de fer ou de métaux qu'une bactérie peut sorber à sa surface selon les conditions propres au milieu.

Enfin, des études plus détaillées et simplistes seraient nécessaires pour établir clairement si les oxydes de fer biogéniques diffèrent des formes abiotiques de par leur cristallinité et leur réactivité face aux métaux traces .

6. RÉFÉRENCES

Anderson, P. R., et Benjamin, M. M., 1985, Effects of silicon on the crystallisation and adsorption properties of ferric oxides: *Environmental Science and Technology*, v. 19, no. 11, p. 1048-1053.

Azcue, J. M., Rosa, F., et Mudroch, A., 1996, Distribution of major and trace elements in sediments and pore waters of lake Erie: *Journal of Great Lakes Research*, v. 22, no. 2, p. 389-402.

Bendell Young, L., et Harvey, H.H., 1991, The relative importance of manganese and iron oxides and organic matter in the sorption of trace metals by surficial lake sediments: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 56, p. 1175-1186.

Beveridge, T. J., 1989, Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization: *Annual Review in Microbiology*, v. 43, p. 147-171.

Beveridge, T. J., et Fyfe, W. S., 1985, Metal fixation by bacterial cell walls: *Canadian Journal of Earth Sciences*, v. 22, p. 1893-1898.

Beveridge, T. J., Meloche, J. D., Fyfe, W. S., et Murray, R. G. E., 1983, Diagenesis of metals chemically complexed to bacteria: Laboratory formation of metal phosphates, sulfides, and organic condensates in artificial sediments: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 45, no. 3, p. 1094-1108.

Beveridge, T. J., et Murray, R. G. E., 1976, Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*: *Journal of Bacteriology*, v. 127, p. 1502-1518.

Bigham, J. M., Schwertmann, U., Carlson, L., et Murad, E., 1990, A poorly crystallized oxyhydroxysulfate of iron formed by bacterial oxidation of Fe(II) in acid mine waters: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 54, p. 2743-2758.

- Bigham, J. M., Schwertmann, U., Traina, S. J., Winland, R. L., et Wolf, M., 1996, Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 60, no. 12, p. 2111-2121.**
- Buffle, J., De Vitre, R. R., Perret, D., et Leppard, G. G., 1989, Physico-chemical characteristics of colloidal iron phosphate species formed at the oxic-anoxic interface of an eutrophic lake: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 53, p. 399-408.**
- Carignan, R., Rapin, F., et Tessier, A., 1985, Sediment porewater sampling for metal analysis: A comparison of techniques: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 49, p. 2493-2497.**
- Châtellier, X., 2001, Croissance des cristaux le long de l'axe C, communication personnelle.**
- Châtellier, X., Fortin, D., West, M. M., Leppard, G. G., et Ferris, G. F., 2001, Effect of the presence of bacterial surfaces during the synthesis of Fe oxides by oxidation of ferrous iron: *European Journal of Mineralogy*, v.13, p. 705-714.**
- Cooper, C. D., Picardal, F., Rivera, J., et Talbot, C., 2000, Zinc immobilization and magnetite formation via ferric oxide reduction by *Shewanella putrefaciens* 200: *Environmental Science and Technology*, v. 34, p. 100-106.**
- Cornell, R. M., et Schwertmann, U., 1996, The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrence and uses: New York, VCH Publishers, 573 p.**
- Cornwell, J. C., et Kipphut, G. W., 1992, Biogeochemistry of manganese-and iron-rich sediments in Toolik Lake, Alaska: *Hydrobiologia*, v. 240, p. 45-59.**
- Daughney, C. J., Fein, J. B., et Yee, N., 1998, A comparison of the thermodynamics of metal adsorption onto two common bacteria: *Chemical Geology*, v. 144, p. 161-176.**

Daughney, C. J., Fowle, D. A., et Fortin, D., 2001, The effect of growth phase on proton and metal adsorption by *Bacillus subtilis*: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v.65, p.1025-1035.

Daughney, C. J., Siciliano, S., Rencz, A. N., Lean, D., et Fortin, D., submitted, Hg(II) adsorption by bacteria: A surface complexation model and its application to lakes in Kejimikujik National Park, Nova-Scotia, Canada: *Environmental Science and Technology*.

Drever, J. I., 1997, *The geochemistry of natural waters: Surface and groundwater environments*: New Jersey, Prentice-Hall Inc., 436 pages.

Düker, A., Ledin, A., Karlsson, S., et Allard, B., 1995, Adsorption of zinc on colloidal (hydr)oxides of Si, Al and Fe in the presence of a fulvic acid: *Applied Geochemistry*, v. 10, p. 197-205.

Dzombak, D. A., et Morel, F. M. M., 1990, *Surface complexation modeling. Hydrous ferric oxide*: New York, J. Wiley, 393p. p.

Farrell, R. E., Yang, J. E., Ming Huang, P., et Liaw, W. K., 1993, Chemical composition and metal speciation in porewaters from the Upper Qu'Appelle River Basin, Saskatchewan: *Water Pollution Research Journal of Canada*, v. 28, no. 1, p. 83-109.

Fein, J. B., Daughney, C. J., Yee, N., et Davis, T. A., 1997, A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 61, no. 16, p. 3319-3328.

Ferris, F. G., et Beveridge, T. J., 1985, Functions of bacterial cell surface structures: *BioScience*, v. 35, no. 3, p. 172-177.

Ferris, F. G., Fyfe, W. S., et Beveridge, T. J., 1988, Metallic ion binding by *Bacillus subtilis*: Implications for the fossilization of microorganisms: *Geology*, v. 16, p. 149-152.

Fortin, D., 1992, Caractérisation chimique et microscopique des oxyhydroxydes de fer naturels formés "in situ" dans les sédiments lacustres: Thèse de doctorat, INRS-Eau (Université du Québec), p. 239 pages.

Fortin, D., et Beveridge, T. J., 2000, Mechanistic routes towards biomineral surface development, in Baeuerlein, E., ed., Biomineralisation: From Biology to Biotechnology and medical application: Verlag, Wiley-VCH, p. 294.

Fortin, D., Ferris, F. G., et Beveridge, T. J., 1997, Surface-mediated mineral development by bacteria: Reviews in Mineralogy, v. 35, no. Chapter 5, p. 161-180.

Fortin, D., et Ferris, G. F., 1998, Precipitation of iron, silica, and sulphate on bacterial cell surfaces: Geomicrobiology, v. 15, p. 309-324.

Fortin, D., Ferris, G. F., et 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, v. 83, p. 1399-1408.

Fortin, D., Leppard, G. G., et Tessier, A., 1993, Characteristics of lacustrine diagenetic iron oxyhydroxides: Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 57, p. 4391-4404.

Gálvez, N., Barron, V., et Torrent, J., 1999, Effect of phosphate on the crystallisation of hematite, goethite and lepidocrocite from ferrihydrite: Clays and Clay minerals, v. 47, no. 3, p. 304-311.

Gu, B., Schmitt, J., Chen, Z., Llang, L., et McCarthy, J. F., 1994, Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: Mechanisms and models: Environmental Science and Technology, v. 28, p. 38-46.

Hamilton-Taylor, J., Davison, W., et Morfett, K., 1996, A laboratory study of the biogeochemical cycling of Fe, Mn, Zn and Cu across the sediment-water interface of a productive lake: *Aquatic Sciences*, v. 53, no. 3, p. 191-209.

Harrison, J. B., et Berkheiser, V. E., 1982, Anion interactions with freshly prepared hydrous iron oxides: *Clays and Clay minerals*, v. 30, no. 2, p. 97-102.

Hochella, M. F., Moore, J. N., Golla, U., et Putnis, A., 1999, A TEM study of samples from acid mine drainage systems: Metal-mineral association with implications for transport: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 63, no. 19\20, p. 3395-3406.

Horowitz, A. J., Lum, K. R., Garbarino, J. R., Hall, G. E. M., Lemieux, C., et Demas, C. R., 1996, The effect of membrane filtration on dissolved trace element concentrations: *Water, Air and Soil Pollution*, v. 90, p. 281-294.

Huerta-Diaz, M. A., Tessier, A., et Carignan, R., 1998, Geochemistry of trace metals associated with reduced sulfur in freshwater sediments: *Applied Geochemistry*, v. 13, p. 213-233.

Jambor, J. L., et Dutrizac, J. E., 1998, Occurrence and constitution of natural and synthetic ferrihydrite, a widespread iron oxyhydroxide: *Chemical Review*, v. 98, p. 2549-2585.

Kandori, K., Uchida, S., Kataoka, S., et Ishikawa, T., 1992, Effects of silicate and phosphate ions on the formation of ferric oxide hydroxide particles: *Journal of materials science*, p. 719-728.

Langmuir, D., 1997, *Aqueous Environmental Geochemistry*, Prentice-Hall inc., 600p.

Lean, D., 1999, Concentration of silica in natural waters, communication personnelle.

Leppard, G. G., 2001, Embedding techniques, communication personnelle.

Leppard, G.G., 2001, Ordre des étapes et temps de séchage en fonction des techniques d'imprégnation, communication personnelle.

Leppard, G.G., 2001, Développement de polymères dans les environnements d'eau distillée, communication personnelle.

Leppard, G.G., Heissenberger, A., Herndl, G.J., 1996, Ultrastructure of marine snow. I. Transmission electron microscopy methodology: Marine Ecology Progress Series, p. 289-298.

Lienemann, C.-P., Heissenberger, A., Leppard, G. G., et Perret, D., 1998, Optimal preparation of water samples for the examination of colloidal material by transmission electron microscopy: Aquatic Microbial Ecology, v. 14, p. 205-213.

Liss, S.N., Droppo, I.G., Flannigan, D.T., Leppard, G.G., 1996, Floc architecture in wastewater and natural riverine systems: Environmental Science & Technology, v. 30, p.680-.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., et Parker, J., 1997, Biology of microorganisms: New Jersey, Prentice-Hall Inc., 986 pages p.

Manceau, A., et Gates, W. P., 1997, Structural model for ferrihydrite: Clays and Clay minerals, v. 45, p. 448-460.

Martinez, C. E., et McBride, M. B., 1998, Coprecipitates of Cd, Cu, Pb and Zn in iron oxides: solid phase transformation and metal solubility after aging and thermal treatment: Clays and Clay minerals, v. 46, no. 5, p. 537-545.

Martinez, C. E., Sauvé, S., Jacobson, A., et McBride, M. B., 1999, Thermally induced release of adsorbed Pb upon aging ferrihydrite and soil oxides: Environmental Science and Technology, v. 33, no. 12, p. 2016-2020.

McLean, R. J. C., Beauchemin, D., et Beveridge, T. J., 1992, Influence of oxidation state on iron binding by *Bacillus licheniformis* capsule: Applied and Environmental Microbiology, v. 58, no. 1, p. 405-408.

Nordstrom, D. K., 1977, Thermochemical redox equilibria of ZoBell's solution: Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 41, p. 1835-1841.

Paige, C. R., Snodgrass, W. J., Nicholson, R. V., Scharer, J. M., et He, Q. H., 1997, The effect of phosphate on the transformation of ferrihydrite into crystalline products in alkaline media: Water, Air and Soil Pollution, v. 97, p. 397-412.

Peachey, L. D., 1958, "Thin sections. 1. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy": Journal of Biophysics and Biochemical Cytology, v. 4, p. 233-242.

Perret, D., Gaillard, J.-F., Dominik, J., et Atteia, O., 2000, The diversity of natural hydrous iron oxides: Environmental Science and Technology, v. 34, no. 17, p. 3540-3546.

Porter, K. G., et Feig, Y. S., 1980, The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora: Limnology and Oceanography, v. 25, no. 5, p. 943-948.

Quin, T. G., Long, G. J., Benson, C. G., Mann, S., et Williams, R. J. P., 1988, Influence of silicon and phosphorus on structural and magnetic properties of synthetic goethite and related oxides: Clays and Clay minerals, v. 36, no. 2, p. 165-175.

Robin, M., 2000, Moyenne de variances, communication personnelle.

Roden, E.E., et Edmonds J.W., 1997, Phosphate mobilization in iron-rich anaerobic sediments: microbial Fe(III) oxide reduction versus iron-sulfide formation: *Archives of Hydrobiologia*, v.139, no. 3, p. 347-378.

Rudd, J. W., Kelly, C. A., St.Louis, V., Hesslein, R. H., Furutani, A., et Holoka, M. H., 1986, Microbial consumption of nitric and sulfuric acids in acidified north temperate lakes: *Limnology and Oceanography*, v. 31, no. 6, p. 1267-1280.

Schecher, W. D., et McAvoy, D. C., 1994, MINEQL+: A chemical equilibrium program for personal computers, user's manual, version 3.0.

Schultze-Lam, S., Thompson, J. B., et Beveridge, T. J., 1993, Metal ion immobilization by bacterial surfaces in freshwaters environments: *Water Pollution Research Journal of Canada*, v. 28, no. 1, p. 51-81.

Schulze, D. G., et Schwertmann, U., 1987, The influence of aluminium on iron oxides: XIII. Properties of goethites synthesised in 0.3 M KOH at 25°C.: *Clay Minerals*, v. 32, p. 36-44.

Schwertmann, U., 1966, Inhibitory effect of soil organic matter on the crystallization of amorphous ferric hydroxide.: *Nature*, v. 212, p. 645-646.

Schwertmann, U., et Carlson, L., 1994, Aluminum influence on iron oxides: XVII. Unit-cell parameters and aluminum substitution of natural goethites: *Soil Science Society of America Journal*, v. 58, p. 256-261.

Schwertmann, U., et Fitzpatrick, R. W., 1977, Occurrence of lepidocrocite and its association with goethite in Natal soils: *Soil Science Society of America Journal*, v. 41, p. 1013-1018.

Schwertmann, U., Friedl, J., Stanjek, H., et Schulze, D. G., 2000, The effect of Al on Fe oxides. XIX. Formation of Al-substituted hematite from ferrihydrite at 25°C and pH 4 to 7: *Clays and Clay minerals*, v. 48, no. 2, p. 159-172.

Schwertmann, U., et Thalmann, H., 1976, The influence of Fe(II), Si and pH on the formation of lepidocrocite and ferrihydrite during oxydation of aqueous FeCl₂ solution: *Clay Minerals*, v. 11, p. 189-200.

Sherman, L. A., Baker, L. A., Weir, E. P., et Brezonik, P. L., 1994, Sediment pore-water dynamics of Little Rock Lake, Wisconsin: Geochemical processes and seasonal and spatial variability: *Limnology and Oceanography*, v. 39, no. 5, p. 1155-1171.

Stookey, L. I., 1970, Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron: *Analytical Chemistry*, v. 42, no. 7, p. 779-781.

Stumm, W., et Morgan, J. J., 1981, *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*: New York, Wiley, 780 pages p.

Stumm, W., et Sulzberger, B., 1992, The cycling of iron in natural environments: Considerations based on laboratory studies of heterogeneous redox processes: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 56, p. 3233-3257.

Tardy, Y., et Nahon, D., 1985, Geochemistry of laterites. Stability of Al-goethite, Al-hematite and Fe(3+)-kaolinite in bauxites and ferricrites. An approach of the mechanism of concretion formation.: *American Journal of Sciences*, v. 285, p. 865-903.

Tessier, A., Fortin, D., Belzile, N., DeVitre, R. R., et Leppard, G. G., 1996, Metal sorption to diagenetic iron and manganese oxyhydroxides and associated organic matter: Narrowing the gap between field and laboratory measurements: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 60, no. 3, p. 387-404.

- Tessier, A., Rapin, F., et Carignan, R., 1984, Trace metals in oxic lake sediments: possible adsorption onto iron oxyhydroxides: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 49, p. 183-194.
- Tipping, E., Thompson, D. W., et Woof, C., 1989a, Iron oxide particulates formed by oxygenation of natural and model lakewaters containing Fe(II): *Archives of Hydrobiologia*, v. 115, p. 59-70.
- Tipping, E., Thompson, D. W., et Woof, C., 1989b, Iron oxide particulates formed by the oxygenation of natural and model lakewaters containing Fe(II): *Archives of Hydrobiologia*, v. 115, no. 1, p. 59-70.
- Urrutia, M., Kemper, M., Doyle, R., et Beveridge, T. J., 1992, The membrane-induced proton motive force influences the metal binding ability of *Bacillus subtilis* cell walls: *Applied Environmental Microbiology*, v. 58, p. 3837-3844.
- Urrutia, M. U., et Beveridge, T. J., 1993, Remobilization of heavy metals retained as oxyhydroxides or silicates by *Bacillus subtilis* cells: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, no. 12, p. 4323-4329.
- Vempati, R. K., et Loeppert, R. H., 1989, Influence of structural and adsorbed Si on the transformation of synthetic ferrihydrite: *Clays and Clay minerals*, v. 37, no. 3, p. 273-279.
- Viollier, E., Inglett, P. W., Hunter, K., Roychoudhury, A. N., et Van Cappellen, P., 2000, The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters: *Applied Geochemistry*, v. 15, p. 785-790.
- Von Gutten, U., et Schneider, W., 1991, Primary products of the oxygenation of iron (II) at an oxic-anoxic boundary: Nucleation, aggregation and aging: *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 145, no. 1, p. 127-139.

Wang, M. K., Chang, C. M., Cheng, Y. W., Houg, K. H., et Chiang, H. C., 1999, Comparison of synthetic and soil Al-substituted lepidocrocite: Soil Science, v. May 1999, p. 311-321.

Warren, L. A., et Ferris, G. F., 1998, Continuum between sorption and precipitation of Fe(III) on microbial surfaces: Environmental Science and Technology, v. 32, p. 2331-2337.

Warren, L. A., et Zimmerman, A. P., 1994, The importance of surface area in metal sorption by oxides and organic matter in a heterogeneous natural sediment: Applied Geochemistry, v. 9, p. 245-254.

Welch, S. A., et Vandevivere, P., 1994, Effect of microbial and other naturally occurring polymers on mineral dissolution: Geomicrobiology Journal, v. 12, p. 227-238.

Winger, P. V., Lasier, P. J., et Jackson, B. P., 1998, The influence of extraction procedure on ion concentrations in sediment pore water: Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 35, p. 8-13.

ANNEXE A

Procédures pour observation des bactéries en épifluorescence (comptes DAPI).
Modifiées de Porter et Feig, 1980.

Préparation du fixatif concentré (glutaraldéhyde)

- Utiliser une solution de glutaraldéhyde 8% (EM grade)
- Ajouter un tampon de Na-cacodylate pour obtenir une concentration finale de 0.1M.
- Filtrer la solution de 8% glutaraldéhyde avec un filtre de 0.22 μ m (Millipore).

Fixation des échantillons

- Prélever 8, 75 ml d'un échantillon de bactéries à une densité optique de 0.3 et ajouter 1.25 ml de fixatif pour obtenir une concentration finale de 1%.
- Garder au réfrigérateur pour la nuit.

Préparation des filtres

- Ajouter 2 ml d'acide acétique concentré à 98 ml d'eau distillée.
- Ajouter 0.2g d'Irgalan noir
- Ajouter les filtres dans la solution et les laisser reposer pour une période minimale de 2 heures.

Préparation du DAPI

- Dissoudre 5 mg dans 5 ml d'eau distillée.
- Garder cette solution dans une bouteille à l'abri de la lumière et congelée en tout temps.
- Préparation une solution de travail à partir de la solution-mère. Décongeler en diluant 1:500.
- Filtrer cette solution à l'aide d'un filtre de 0.22 μ m (Millipore).

Coloration des échantillons

- Placer un filtre teint à la surface d'un filtre humide de 0.45 μ m disposé sur l'appareil de filtration.
- Ajouter l'échantillon dans la tour, sans mettre de pression.
- Ajouter la solution de travail de DAPI dans un ratio 3 (échantillon): 1(DAPI)
- Attendre 5 minutes en s'assurant que la lumière ne peut pénétrer dans la tour.
- Pomper l'échantillon.
- Recueillir le filtre et le disposer à la surface d'une lame mince.
- Recouvrir d'une goutte d'huile à immersion.
- Mettre une lamelle en place.
- Observation au microscope

La concentration des bactéries est donnée par l'équation suivante:

$$((\text{Nombre de cellules}) (\text{facteur d'agrandissement})) / ((0.875) (\text{volume de l'échantillon}))$$

ANNEXE B

Sommaire des méthodes employées pour la détermination colorimétrique des concentrations des éléments étudiés (HACH).

Éléments	Méthode	Limite de détection (mg/L)	Longueur d'onde (nm)	Écart-type (mg/L)	Interférences Concentrations minimales (mg/L)	Autre
Fer total	#8008 Ferrover	0 à 3	510	0.006	Chlore 185 Calcium 10 Magnésium 100 Molybdate de molybdène 50	pH entre 3 et 5
Fe ²⁺	#8146 1.10 Phenanthroline Method	0 à 3	510	0.006	aucune	pH entre 3 et 5
PO ₄	#8048 Phosver	0 à 2.5	890	0.01	Aluminium 200 Chrome 100 Cuivre 10 Fer 100 Nickel 300 Silicium 50 Silicate 10 Zinc 80	
SO ₄	#8051 Sulfaver 4	0 à 70	450	0.9	Calcium 20 Chlore 40 Magnésium 10 Silicium 500	
Si	#8185 grande concentration	0 à 100	452	0.45	Sulfures Fer Phosphate 60	Entre 15°C et 25°C

- **FER TOTAL:** Le réactif Ferrover réagit avec la totalité du fer en solution et la plupart des formes de fer insolubles pour produire du fer ferreux soluble. Celui-ci réagit avec l'indicateur 1,10-phénanthroline, pour former une couleur orange proportionnelle à la quantité de fer présent dans l'échantillon.
- **PO₄:** L'orthophosphate réagit avec le molybdate dans un milieu acide pour produire un complexe phosphomolybdate. L'acide ascorbique réduit le complexe en donnant une couleur bleue intense du molybdène.
- **Si:** Le phosphate et la silice réagissent avec l'ion molybdate sous des conditions acides pour former des complexes jaunâtres (acide silicomolybdique et acide

phosphomolybdique). L'ajout de l'acide nitrique détruit les complexes pouvant s'être formés avec le phosphate. La silice est par la suite déterminée en mesurant la couleur jaune résiduelle.

- **SO₄**: Les ions sulfate réagissent avec le barium contenu dans le réactif Sulfaver et forment une turbidité au barium insoluble proportionnelle au montant de sulfate en solution.
- **Fe²⁺**: L'indicateur 1.10-phenanthroline réagit avec le fer ferreux en solution pour former une couleur orangée en proportion avec la concentration de fer ferreux présent en solution. Le fer ferrique ne réagit pas. La détermination de la concentration de Fe(III) peut être accomplie en soustrayant la valeur de Fe(II) obtenue du fer total en solution.

ANNEXE C

Comparaison des résultats obtenus par la méthode de turbidité et du HACH (Sulfaver) en terme de concentrations de sulfate pour différents échantillons.

Systèmes	Concentration (M/L) turbidité	Concentration (M/L) Hach	Écart-type (M/L) turbidité
S1t0 total	2.0956×10^{-4}	1.96327×10^{-4}	9.5×10^{-7}
S1at0	9.1059×10^{-5}	5.37392×10^{-7}	2.37×10^{-6}
S1at1	1.2402×10^{-4}	1.56155×10^{-4}	2.41×10^{-6}
S1at2	1.0406×10^{-4}	5.20516×10^{-5}	9.11×10^{-6}
S1at3	9.1162×10^{-5}	1.04103×10^{-4}	1.37×10^{-6}
S1at4	9.8123×10^{-5}	0	1.48×10^{-5}
S1at5	8.0496×10^{-5}	5.20516×10^{-5}	2.95×10^{-6}
S1at6	8.2696×10^{-5}	5.20516×10^{-5}	2.89×10^{-5}
S6t0	6.1405×10^{-5}	6.47111×10^{-5}	2.64×10^{-5}
S6at0 total	6.4107×10^{-5}	2.57714×10^{-4}	3.6×10^{-6}
S6at0	1.6480×10^{-4}	1.08268×10^{-4}	5.23×10^{-5}
S6at1	1.3666×10^{-4}	5.20454×10^{-5}	2.63×10^{-5}
S6at2	8.5561×10^{-5}	1.04091×10^{-4}	1.01×10^{-5}
S6at3	9.6122×10^{-5}	1.04091×10^{-4}	9.54×10^{-6}
S6at4	1.0065×10^{-4}	1.04091×10^{-4}	1.12×10^{-5}
S6at5	1.1251×10^{-4}	1.04091×10^{-4}	3.66×10^{-5}
S6at6	1.1416×10^{-4}	2.60227×10^{-4}	2.31×10^{-5}
S11at0	1.1198×10^{-4}	3.64361×10^{-4}	8.67×10^{-6}
S11at1	1.0436×10^{-4}	3.64361×10^{-4}	2.09×10^{-6}
S11at2	1.0110×10^{-4}	1.04103×10^{-4}	2.05×10^{-5}
S11at3	1.2127×10^{-4}	1.04103×10^{-4}	6.29×10^{-6}
S11at4	1.1987×10^{-4}	5.20516×10^{-5}	3.84×10^{-5}
S11at5	1.0892×10^{-4}	5.20516×10^{-5}	2.38×10^{-5}
S11at6	5.9201×10^{-5}	2.81836×10^{-4}	3.49×10^{-5}
S16at0	1.0034×10^{-4}	3.64329×10^{-4}	9.7×10^{-9}
S16at1	1.1649×10^{-4}	1.04094×10^{-4}	1.21×10^{-5}
S16at2	1.9275×10^{-4}	5.20469×10^{-5}	5.13×10^{-6}
S16at3	1.1893×10^{-4}	0	4.77×10^{-6}
S16at4	1.0785×10^{-4}	1.04094×10^{-4}	1.45×10^{-5}
S16at5	1.1800×10^{-4}	2.08188×10^{-4}	2.88×10^{-5}
S16at6	1.0447×10^{-4}	5.36951×10^{-5}	3.3×10^{-5}
S16t6	1.0449×10^{-4}	3.16199×10^{-5}	2.13×10^{-5}
S21at0	2.1659×10^{-4}	1.56143×10^{-4}	6.44×10^{-6}
S21at1	9.6570×10^{-5}	5.20477×10^{-5}	5.39×10^{-6}
S21at2	1.5139×10^{-4}	5.20477×10^{-5}	3.27×10^{-5}

S21at3	1.0566×10^{-4}	1.04095×10^{-4}	2.99×10^{-7}
S21at4	1.5680×10^{-4}	1.04095×10^{-4}	9.92×10^{-6}
S21at5	1.8409×10^{-4}	2.2665×10^{-4}	9.51×10^{-5}
S21at6	1.2371×10^{-4}	5.20477×10^{-5}	5.82×10^{-6}
S21t5	1.3328×10^{-4}	3.24244×10^{-5}	7.76×10^{-6}

ANNEXE D

Partie 1. Concentrations de fer adsorbé sur les parois des bouteilles et dissout dans de l'acide chloridrique (1M) obtenues à l'aide de l'adsorption atomique (A.A.).

Systèmes	[Fe] mol/L	Systèmes	[Fe] mol/L
S1	-	S1A	1.08E-05
S2	-	S2A	-
S3	-	S3A	5.74E-06
S4	-	S4A	-
S5	-	S5A	5.75E-06
S6	-	S6A	-
S7	-	S7A	-
S8	-	S8A	-
S9	-	S9A	-
S10	-	S10A	-
S11	-	S11A	-
S12	-	S12A	-
S13	-	S13A	-
S14	-	S14A	-
S15	-	S15A	3.27E-06
S16	-	S16A	-
S17	-	S17A	-
S18	-	S18A	-
S19	-	S19A	2.51E-06
S20	-	S20A	-
S21	1.22E-06	S21A	-
S22	-	S22A	-
S23	6.78E-07	S23A	-
S24	-	S24A	-
S25	1.98E-06	S25A	5.45E-07

- Sous la limite de détection de l'appareil

Partie 2. Comparaison des concentrations de fer obtenues par méthode colorimétrique (Hach) et d'absorption atomique (A.A.) par souche bactérienne et temps de prélèvement.

<i>Escherichia coli</i>			<i>Bacillus subtilis</i>		
Systèmes	[Fe] Hach mol/L	[Fe] A.A. mol/L	Systèmes	[Fe] Hach mol/L	[Fe] A.A. mol/L
s1at0	4.38561E-05	4.51316E-05	s6at0	5.86713E-05	8.38747E-05
s1at1	1.25351E-05	1.31038E-05	s6at0t	8.19163E-05	0.000170188
s1at2	1.25351E-05	1.06741E-05	s6at1	5.46106E-05	5.20304E-05
s1at3	1.52212E-05	1.37665E-05	s6at2	5.55058E-05	5.31477E-05
s1at4	1.07443E-05	1.13368E-05	s6at3	6.26679E-05	6.37619E-05
s1at5	1.16397E-05	6.6983E-06	s6at4	4.5658E-05	-
s1at6	1.07443E-05	1.19995E-05	s6at5	4.20770E-05	3.35936E-05
s1t0t	1.66032E-05	7.25765E-06	s6at6	3.93912E-05	2.96831E-05
s2at0	5.7628E-05	5.92677E-05	s6t0t	1.11058E-05	-
s2at1	3.36496E-05	3.51925E-05	s7at0	3.22393E-05	7.33626E-06
s2at2	3.22382E-05	3.62954E-05	s7at0t	4.22482E-05	3.30349E-05
s2at3	3.22382E-05	3.4308E-05	s7at1	2.86516E-05	-
s2at4	3.31337E-05	3.27628E-05	s7at2	2.50701E-05	-
s2at5	3.04472E-05	2.83438E-05	s7at3	2.14887E-05	-
s2at6	2.23876E-05	2.52516E-05	s7at4	2.05933E-05	-
s3at0	4.73639E-05	5.47842E-05	s7at5	1.79072E-05	-
s3at1	3.83247E-05	3.65175E-05	s7at6	1.61165E-05	-
s3at2	3.40306E-05	4.02149E-05	s7t0t	1.61919E-05	-
s3at3	3.58216E-05	4.08666E-05	s8at0	6.15376E-05	7.82865E-05
s3at4	3.49261E-05	3.36902E-05	s8at0t	7.48184E-05	8.77851E-05
s3at5	2.77618E-05	3.19499E-05	s8at1	5.64101E-05	6.15273E-05
s3at6	8.95541E-07	-	s8at2	5.46193E-05	-
s3t0	1.63823E-06	-	s8at3	5.19331E-05	4.5325E-05
s3t0t	1.23064E-05	1.23778E-05	s8at4	4.65607E-05	4.36491E-05
s3t2	0	4.16813E-07	s8at5	4.74561E-05	4.64423E-05
s3t3	1.07504E-06	-	s8at6	4.38745E-05	3.86213E-05
s3t5	1.07504E-06	-	s8t0	3.90658E-06	-
s3t6	1.61255E-06	-	s8t0t	1.33596E-05	-
s4at0	2.19247E-05	3.73303E-05	s8t4	2.14886E-06	-
s4at1	3.65095E-05	4.74432E-05	s8t5	1.61165E-06	-
s4at2	1.79794E-06	-	s9at0	5.52762E-06	-
s4at3	2.69692E-06	1.06924E-06	s9at0t	8.35184E-05	0.000133037
s4at4	3.59589E-06	-	s9at1	6.26854E-06	-
s4at5	8.98972E-07	-	s9at2	6.26854E-06	-
s4at6	1.79794E-06	5.92695E-06	s9at3	6.26854E-06	-

s5at0	4.30108E-05	5.40949E-05	s9at4	6.26854E-06	-
s5at1	3.7378E-05	4.37171E-05	s9at5	6.26854E-06	-
s5at2	3.22430E-05	3.89257E-05	s9at6	1.70146E-05	-
s5at3	3.49299E-05	4.10564E-05	s9t0t	1.80935E-05	-
s5at4	3.2243E-05	3.94593E-05	s10at0	3.51255E-05	-
s5at5	2.68692E-05	3.52014E-05	s10at0t	4.63838E-05	3.97386E-05
s5at6	8.9564E-07	-	s10at1	2.68598E-05	-
s5t0	1.63903E-06	-	s10at2	2.23832E-05	-
s5t2	0	-	s10at3	2.14878E-05	-
s5t3	1.61291E-06	-	s10at4	1.88019E-05	-
s5t5	1.07527E-06	-	s10at5	1.70112E-05	-
s5t6	1.07527E-06	-	s10at6	1.52206E-05	-
			s10t0t	1.13297E-05	-
			s10t1	5.56557 ^E -06	-
			s10t5	5.37232 ^E -07	-
			s10t6	2.14893 ^E -06	-

0 et - Sous la limite de détection de l'appareil

Bacillus licheniformis

Pseudomonas aeruginosa

Systèmes	[Fe] Hach mol/L	[Fe] A.A. mol/L	Systèmes	[Fe] Hach mol/L	[Fe] A.A. mol/L
s11at0	8.77455E-05	8.87556E-05	s16at0	3.67066E-05	-
s11at1	6.98383E-05	8.98747E-05	s16at1	2.8649E-05	-
s11at2	6.71522E-05	8.98747E-05	s16at2	2.95443E-05	-
s11at3	6.62568E-05	8.65157E-05	s16at3	2.68585E-05	-
s11at4	6.53615E-05	0.000107782	s16at4	2.95443E-05	-
s11at5	6.62568E-05	9.99463E-05	s16at5	2.41726E-05	-
s11at6	7.39317E-05	4.39857E-05	s16at6	2.49381E-05	-
s12at0	8.23700E-05	7.5325E-05	s16t6	1.63172E-06	-
s12at1	6.35682E-05	5.79767E-05	s17at0	3.49167E-05	-
s12at2	6.26729E-05	6.69311E-05	s17at1	1.96966E-05	-
s12at3	5.55103E-05	5.90958E-05	s17at2	1.34295E-05	-
s12at4	5.46149E-05	7.47645E-05	s17at3	1.16389E-05	-
s12at5	5.10336E-05	4.2308E-05	s17at4	8.95300E-06	-
s12at6	4.87667E-05	3.33536E-05	s17at5	7.16240E-06	-
s13at0	8.14780E-05	6.80501E-05	s17at6	9.09028E-06	-
s13at0t	1.03146E-04	7.47645E-05	s17t6	1.08652E-06	-
s13at1	7.07336E-05	3.39141E-05	s18at0	3.93916E-05	-
s13at2	6.98383E-05	8.25998E-05	s18at0t	9.59723E-05	13.5167E-05
s13at3	6.80475E-05	9.09937E-05	s18at1	2.86485E-05	-
s13at4	7.16290E-05	8.93142E-05	s18at2	3.0439E-05	-

s13at5	6.62568E-05	1.37679E-05	s18at3	2.86485E-05	-
s13at6	6.7667E-05	7.86822E-05	s18at4	2.68579E-05	-
s13t0	2.68630E-06	-	s18at5	2.50674E-05	-
s13t0t	2.14904E-05	-	s18at6	2.52345E-05	-
s13t1	4.83534E-06	-	s18t0	1.0745E-06	-
s13t3	3.22356E-06	-	s18t0t	1.43267E-05	-
s13t5	3.76082E-06	-	s18t1	1.61175E-06	-
s13t6	1.61178E-06	-	s18t2	5.3725E-07	-
s14at0	2.68630E-06	-	s18t3	0	-
s14at1	2.6863E-06	-	s18t5	1.61443E-06	-
s14at2	4.47717E-06	-	s18t6	2.17622E-06	-
s14at3	2.6863E-06	-	s19at0	1.43347E-05	-
s14at4	3.58174E-06	-	s19at1	6.27141E-06	-
s14at5	4.47717E-06	-	s19at2	1.79183E-06	-
s14at6	1.17415E-05	-	s19at3	8.95916E-06	-
s14t0	0	-	s19at4	8.06325E-06	-
s15at0	8.14773E-05	5.40591E-05	s19at5	1.07510E-05	-
s15at0t	1.04578E-04	9.15524E-05	s19at6	7.21511E-06	-
s15at1	7.07331E-05	6.07753E-05	s19t6	5.4488E-07	-
s15at2	6.62563E-05	7.58836E-05	s20at0	4.65537E-05	5.08881E-07
s15at3	6.53609E-05	7.47645E-05	s20at0t	9.31075E-05	13,6917E-05
s15at4	6.53609E-05	7.6444E-05	s20at1	3.31248E-05	-
s15at5	6.17795E-05	7.47645E-05	s20at2	3.22295E-05	-
s15at6	5.95268E-05	5.51782E-05	s20at3	2.77532E-05	-
s15t0	2.68598E-06	-	s20at4	2.68579E-05	-
s15t0t	2.32785E-05	-	s20at5	2.50674E-05	-
s15t1	4.29757E-06	-	s20at6	2.52554E-05	-
s15t3	1.07439E-06	-	s20t0	1.07463E-06	-
s15t4	3.76037E-06	-	s20t0t	1.43284E-05	-
s15t5	2.68598E-06	-	s20t2	5.37314E-07	-
s15t6	1.07439E-06	-	s20t4	1.07463E-06	-
			s20t5	5.38030E-07	-
			s20t6	1.08824E-06	-

0 et - Sous la limite de détection de l'appareil

Systèmes abiotiques

Systèmes	[Fe] Hach mol/L	[Fe] A.A. mol/L
s21at0	5.64036E-05	9.45246E-05
s21at1	7.78907E-05	8.92247E-05
s21at2	7.69954E-05	9.21701E-05
s21at3	7.96813E-05	9.39373E-05
s21at4	7.78907E-05	7.97995E-05
s21at5	7.79743E-05	7.09651E-05
s21at6	7.52048E-05	8.45121E-05
s21t5	9.48169E-06	-
s22at0	9.13188E-05	1.18675E-04
s22at1	8.59471E-05	1.08662E-04
s22at2	8.95282E-05	1.18086E-04
s22at3	8.77376E-05	1.13962E-04
s22at4	8.68424E-05	1.12784E-04
s22at5	9.18989E-05	2.62005E-05
s22at6	8.50518E-05	1.01004E-04
s22t5	6.53723E-06	-
s23at0	7.96825E-05	2.67896E-05
s23at0t	1.00275E-04	9.27592E-05
s23at1	7.16247E-05	7.44996E-05
s23at2	7.16247E-05	6.62525E-05
s23at3	7.07294E-05	6.44852E-05
s23at4	6.80435E-05	6.21289E-05
s23at5	6.21237E-05	4.99534E-06
s23at6	6.44622E-05	4.44602E-05
s23t0t	1.07432E-05	-
s23t1	7.52022E-06	-
s23t2	4.83443E-06	-
s23t4	7.52022E-06	-
s23t5	6.00033E-06	-
s23t6	4.83443E-06	-
s24at0	3.58225E-06	-
s24at1	8.95563E-07	-
s24at2	8.95563E-07	-
s24at3	1.79113E-06	-
s24at4	8.95564E-07	-
s24at5	9.39148E-07	-
s24at6	8.95564E-07	-
s24t5	5.44884E-06	-
s25at0	8.05774E-05	9.86482E-05

s25at0t	1.00274E-04	3.50349E-05
s25at1	7.43103E-05	8.33339E-05
s25at2	8.14727E-05	9.86482E-05
s25at3	7.34150E-05	5.6829E-05
s25at4	6.98337E-05	4.15148E-05
s25at5	6.70412E-05	2.05031E-06
s25at6	6.53572E-05	5.15273E-05
s25t0t	9.84795E-06	-
s25t1	6.98309E-06	-
s25t2	5.37161E-06	-
s25t3	5.37161E-06	-
s25t4	4.83445E-06	-
s25t5	4.89408E-06	-
s25t6	4.29729E-06	-

0 et - Sous la limite de détection de l'appareil

ANNEXE E

Évaluation de la précision et de l'exactitude de la méthode colorimétrique Hach à l'aide d'une comparaison de résultats espacés dans le temps.

Systèmes	Essai 1	Essai 2
s1at0	4,38561E-05	4,03374E-05
s1at3	1,52212E-05	1,39476E-05
s1at5	1,16397E-05	1,33721E-05
s2at0	5,76280E-05	5,65077E-05
s2at1	3,36496E-05	3,47656E-05
s2at6	2,23876E-05	2,48841E-05
s2t2	0	1,13020E-06
s3at0	4,73639E-05	4,94170E-05
s3at0t	1,05131E-04	1,19861E-04
s3at1	3,83247E-05	4,07133E-05
s3at6	8,95541E-07	7,94845E-06
s3t1	1,66836E-06	1,10989E-06
s3t2	0	8,42502E-07
s4at0	2,19247E-05	2,50395E-05
s4at1	3,65095E-05	3,84266E-05
s4t2	0	1,13025E-06
s5at0	4,30108E-05	4,10199E-05
s5at0t	8,90862E-05	1,25721E-04
s5t0t	1,69250E-05	2,29710E-05
s5t1	1,11456E-06	1,12685E-06
s5t4	1,61291E-06	5,55612E-07
s6at0	5,86713E-05	6,13681E-05
s6at5	4,20770E-05	4,53431E-05
s6at6	3,93912E-05	4,38338E-05
s8at0	6,15376E-05	6,57634E-05
s8at1	5,64101E-05	5,81246E-05
s8at5	4,74561E-05	4,87502E-05
s8t0t	1,33596E-05	1,45149E-05
s8t1	3,90023E-06	4,70975E-06
s8t2	2,14886E-06	1,69986E-06
s8t3	5,37325E-07	1,94503E-06
s8t6	1,61165E-06	1,95774E-06
s9at5	6,26854E-06	8,37316E-06
s10at0	3,51255E-05	3,35383E-05
s10at3	2,14878E-05	2,51047E-05
s10t0	2,23313E-06	3,96392E-06
s10t0t	1,13297E-05	1,58844E-05
s10t2	2,14893E-06	2,26655E-06
s10t3	1,07447E-06	2,78142E-06
s11at2	6,71522E-05	6,76132E-05
s11at4	6,53615E-05	8,14872E-05
s12at1	6,35682E-05	2,43732E-05
s12at4	5,46149E-05	5,78730E-05
s13at0	8,14780E-05	8,09346E-05
s13at0t	1,03146E-04	1,03639E-04

s13at4	7,16290E-05	7,08549E-05
s13t2	3,76082E-06	5,54498E-06
s13t4	3,22356E-06	3,12765E-06
s14at2	4,47717E-06	3,69786E-06
s14at4	3,58174E-06	5,05859E-06
s15at4	6,53609E-05	6,58634E-05
s15t2	5,37196E-06	4,44562E-06
s16at3	2,68585E-05	2,95198E-05
s17at3	1,16389E-05	1,20088E-05
s18at3	2,86485E-05	3,14135E-05
s18t4	5,37250E-07	1,12968E-06
s19at3	8,95916E-06	9,23146E-06
s20at3	2,77532E-05	2,92867E-05
s20t1	2,68657E-06	8,37006E-07
s20t3	5,37314E-07	8,38368E-07
s23at0	7,96825E-05	7,87229E-05
s23t0	8,05738E-06	9,17444E-06
s23t3	5,90874E-06	6,95487E-06
s25at0	8,05774E-05	8,45723E-05
s25t0	6,98309E-06	9,70509E-06

0 Sous la limite de détection de l'appareil